

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
Grado en Biotecnología
Curso 2015/16

Instituto de Bioingeniería, Área de Genética
Trabajo Fin de Grado

Caracterización funcional de los genes *CRD* de *Arabidopsis thaliana*



Eva Núñez Delegido

Estudiante de Biotecnología

Tutores:

Pedro Robles Ramos

Víctor Manuel Quesada Pérez

Almudena Ferrández Ayela

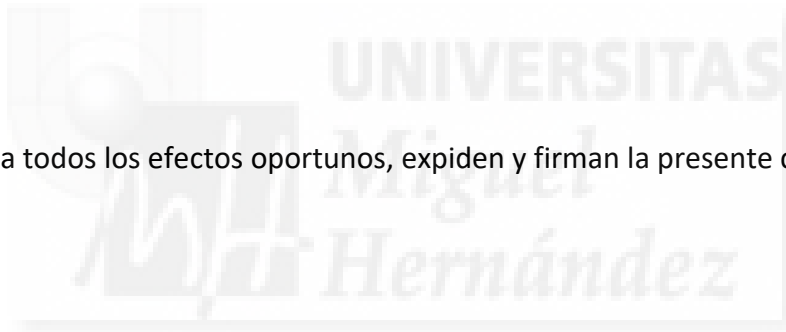
D. Víctor Manuel Quesada Pérez y D. Pedro Robles Ramos, ambos Profesores Titulares del Área de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

Dña. Almudena Ferrández Ayela, contratada posdoctoral del Área de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICAN:

Que Dña. Eva Núñez Delegido, estudiante de cuarto curso del Grado en Biotecnología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado "Caracterización funcional de los genes *CRD* de *Arabidopsis thaliana*" incluido en la memoria de este Trabajo Fin de Grado. El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Área de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, expiden y firman la presente certificación,



En Elche, septiembre de 2016

Fdo.:

Víctor M. Quesada Pérez

Fdo.:

Pedro Robles Ramos

Fdo.:

Almudena Ferrández Ayela

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

En los laboratorios de Víctor Quesada y Pedro Robles se lleva a cabo una aproximación de genética inversa en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, con el fin de caracterizar genes nucleares no estudiados hasta el momento cuyos productos participan en la expresión de la información genética de los cloroplastos. Algunos de los genes que están siendo caracterizados codifican proteínas de los ribosomas cloroplásticos (clororribosomas), a los que hemos denominado *CRD* (*CHLOROPLAST RIBOSOME DEFECTIVE*).

En este Trabajo Fin de Grado se ha iniciado la caracterización molecular y funcional de los genes *CRD*, centrándonos en *CRD1* y *CRD3*. Con este objetivo, se ha determinado el efecto de la pérdida de su función sobre la expresión de algunos genes cloroplásticos y de otros nucleares, así como en los niveles de distintos tipos de ARN ribosómicos. Además, se han generado construcciones de sobreexpresión para realizar el rescate fenotípico de los mutantes *crd* y estudiar su efecto sobre el fenotipo silvestre. Adicionalmente, hemos identificado nuevos mutantes tras realizar una búsqueda de alelos insercionales de ADN-T de genes nucleares que codifican proteínas del clororribosoma. Finalmente, se han realizado cruzamientos entre los mutantes *crd* y otros previamente descritos, afectados en la función de los clororribosomas, para estudiar sus eventuales interacciones genéticas mediante el análisis de dobles mutantes.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, cloroplasto, *crd*, clororribosomas, ARNr.

ABSTRACT AND KEYWORDS

A reverse genetics approach in the model plant *Arabidopsis thaliana* is taking place in the laboratories of Victor Quesada and Pedro Robles, with the aim of characterising nuclear genes so far unstudied and whose products are involved in the expression of the genetic information of the chloroplasts. One of the subjects of this study are the genes we have named *CRD* (*CHLOROPLAST RIBOSOME DEFECTIVE*), which encode proteins of the chloroplast ribosomes (chlororribosomes).

In this Final Project, we have initiated the molecular and functional characterization of the *CRD* genes focusing on *CRD1* and *CRD3*, because these genes have not been hitherto characterized. To this goal, the effect of their loss of function in the expression of some chloroplast and nuclear genes, as well as in the levels of various types of ribosomal RNAs has been determined. Furthermore, constructions overexpressing the *CRD* genes have been generated to carry out the phenotypic rescue of the *crd* mutants and to study their eventual effects on the wild-type phenotype. In addition, we have identified new T-DNA mutants after searching for insertional alleles of other nuclear genes encoding chlororribosome proteins. Finally, crosses between the *crd* mutants and others previously described and also affected in the chlororribosome function have been made, in order to study their potential genetic interactions by analysing the corresponding double mutants.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, chloroplast, *crd*, ribosomes, chlororribosomes, rRNA.

UNIDADES Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-T	ADN de transferencia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-qPCR	Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa
cm	Centímetros
°C	Grados centígrados
dte	Días tras la estratificación
g	Gramos
h	Horas
kb	Kilobases
kg	Kilogramos
l	Litros
lx	Luxes
m	Masa
M	Molar
Mb	Megabases
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
P	Probabilidad
pb	Pares de bases
U	Unidades de actividad enzimática
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
V	Voltios
v	Volumen

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo.....	8
1.2. La mitocondria y el cloroplasto: orgánulos con genoma propio.....	9
1.3. Proteínas ribosómicas del cloroplasto	11
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Nomenclatura.....	14
3.2. Estirpes de <i>Arabidopsis</i> empleadas.....	14
3.3. Disoluciones.....	14
3.3.1. Medios de cultivo	14
3.3.2. Electroforesis en geles de agarosa	15
3.3.3. Purificación de ADN genómico	16
3.4. Métodos de cultivo.....	16
3.4.1. Manipulación de las semillas.....	16
3.4.2. Esterilización y estratificación de las semillas	16
3.4.3. Cultivo de las semillas <i>in vitro</i>	17
3.4.4. Trasplante y cultivo en maceta.....	17
3.4.5. Cruzamientos.....	18
3.5. Obtención de imágenes.....	18
3.6. Extracción de ADN genómico	18
3.7. Síntesis de oligonucleótidos	18
3.8. Amplificación mediante PCR	19
3.9. Electroforesis en geles de agarosa	19
3.10. Extracción de ARN	19
3.11. Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR)	20
3.12. Análisis de los ARNr	20
3.13. Diseño y obtención de construcciones de ADN.....	20
3.13.1. Vectores empleados.....	20
3.13.2. Amplificación mediante PCR y purificación de los fragmentos a clonar	21
3.13.3. Clonación de los insertos en el vector de entrada pENTR/D-TOPO y transformación de <i>E. coli</i>	21
3.13.4. Clonación de los insertos en el vector de destino pMDC32.....	22
4. RESULTADOS	25
4.1. Efecto de las mutaciones <i>crd1</i> y <i>crd3</i> sobre la expresión de genes cloroplásticos.....	25
4.2. Efecto de las mutaciones <i>crd1</i> y <i>crd3</i> sobre la expresión de genes nucleares.....	27

4.3.	Análisis de los niveles de los ARNr en los mutantes <i>crd</i>	28
4.4.	Diseño y obtención de transgenes	31
4.4.1.	Obtención y clonación de los productos de PCR en un vector de entrada <i>Gateway</i>	31
4.4.2.	Generación de construcciones de destino	32
4.4.3.	Obtención de plantas transgénicas	33
4.5.	Escrutinio de líneas de ADN-T portadoras de inserciones en genes que codifican proteínas ribosómicas cloroplásticas.....	34
4.6.	Estudio de las interacciones genéticas entre las mutaciones <i>crd</i> y otras previamente descritas que afectan a la función del clororribosoma.....	35
5.	DISCUSIÓN	37
6.	CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	39
7.	BIBLIOGRAFÍA	40

Índice de figuras

Figura 1.	Individuo silvestre de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Figura 2.	Estructura de un cloroplasto.....	10
Figura 3.	Mapas de los vectores pENTR/D-TOPO y pMDC32	21
Figura 4.	Fenotipos morfológicos de los mutantes <i>crd</i>	25
Figura 5.	Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de genes cloroplásticos en los mutantes <i>crd1</i> y <i>crd3</i>	26
Figura 6.	Estructura de los genes <i>CRD1</i> y <i>CRD3</i>	27
Figura 7.	Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de genes nucleares en los mutantes <i>crd1</i> y <i>crd3</i>	28
Figura 8.	Perfiles de los ARNr en los mutantes <i>crd</i>	29
Figura 9.	Determinación de las ratios entre distintas especies de ARNr.....	30
Figura 10.	Confirmación de la incorporación de los insertos al vector pENTR/D-TOPO.....	32
Figura 11.	Confirmación de la incorporación de los insertos al vector de destino pMDC32.....	33
Figura 12.	Comprobación mediante PCR de los clones de <i>A. tumefaciens</i> transformados con la construcción de destino.....	33
Figura 13.	Fenotipos mutantes identificados en las líneas de ADN-T analizadas.....	35
Figura 14.	Fenotipos morfológicos de mutantes previamente descritos y afectados en la función del clororribosoma.....	36

Índice de tablas

Tabla 1. Genes cloroplásticos y nucleares estudiados mediante RT-qPCR en los mutantes *crd1* y *crd3*.....26

ANEXOS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....44

Tabla 2. Líneas de ADN-T en genes que codifican proteínas ribosómicas del cloroplasto estudiadas en este trabajo.....45

Comunicación a congreso y póster.....46



1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo

Arabidopsis thaliana (en adelante *Arabidopsis*) es una angiosperma de la familia de las Brassicáceas, utilizada como organismo modelo en estudios de biología molecular, fisiología y genética vegetal (Figura 1). Al contrario de otras brassicáceas con gran importancia económica, como la col (*Brassica oleracea*), el rábano (*Raphanus sativus*), el nabo (*Brassica rapa*) o la mostaza blanca (*Sinapsis alba*) y negra (*Brassica nigra*), *Arabidopsis* carece de interés agronómico y comercial. Sin embargo, presenta una serie de características que la convierten en un sistema modelo idóneo para la investigación básica, como su ciclo de vida corto (de seis a ocho semanas si es cultivada en condiciones de luz continua, lo que permite obtener hasta ocho generaciones al año), su pequeño tamaño (que permite cultivar un gran número de individuos en un espacio reducido), su fácil manipulación y cultivo, su capacidad de autofecundación (es una especie autógama) y su elevada fertilidad (un individuo silvestre puede producir miles de semillas).



Figura 1. Individuo silvestre de *Arabidopsis thaliana*. Fotografía de una planta adulta con indicación de sus distintas partes aéreas. (A) Flores, (B) silicuas, (C) tallo principal, (D) tallo secundario, (E) hoja caulinar y (F) roseta de hojas vegetativas.

Además de las ventajas comentadas anteriormente, cabe destacar el pequeño tamaño de su genoma haploide (de unas 125 Mb), completamente secuenciado (*The Arabidopsis Genome Initiative* AGI, 2000), diez veces más grande que el de la levadura cervecera *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mb), similar al de otros organismos modelo como *Drosophila melanogaster* (180 Mb) o *Caenorhabditis elegans* (97 Mb) y mucho menor que el de especies vegetales con interés económico como el arroz (466 Mb), el maíz (2.500 Mb), el tomate (950 Mb) o el trigo (16.000 Mb). El genoma nuclear de *Arabidopsis* está organizado en cinco cromosomas que contienen muy poco ADN repetitivo, en los que se han descrito hasta la fecha 27.655 genes que codifican proteínas y 5.865 que cifran ARN no traducidos (<https://www.araport.org/data/araport11>). Los genomas cloroplástico y mitocondrial de *Arabidopsis* contienen 129 y 146 genes respectivamente, de los que 85 y 122 codifican proteínas. El número de genes del genoma de *Arabidopsis* es similar al que presentan los

genomas de otras especies cultivadas de plantas con flores, por lo que los resultados obtenidos a partir de sus investigaciones son potencialmente extrapolables a otras especies vegetales con interés agronómico.

1.2. La mitocondria y el cloroplasto: orgánulos con genoma propio

En el interior de las células vegetales coexisten tres genomas distintos, localizados en tres compartimentos celulares diferentes: el núcleo, las mitocondrias y los cloroplastos. Los dos últimos son orgánulos con una doble membrana en los que tienen lugar procesos biológicos energéticos imprescindibles para la vida. En las mitocondrias se produce la respiración celular, proceso metabólico en el que se sintetiza ATP mediante la fosforilación oxidativa. Por su parte, en los cloroplastos (Figura 2) se lleva a cabo la fotosíntesis que permite a los organismos fotosintéticos obtener materia orgánica a partir de nutrientes inorgánicos utilizando la energía lumínica del Sol. Además, en los cloroplastos se sintetizan moléculas esenciales para los organismos autótrofos, tales como aminoácidos, lípidos, hormonas vegetales, nucleótidos, vitaminas y metabolitos secundarios (Rébeillé et al., 1997; Bartoli et al., 2000; Gueguen et al., 2000).

Las mitocondrias y los cloroplastos proceden de procariotas ancestrales, antepasados de las α -proteobacterias y cianobacterias actuales respectivamente, que fueron fagocitados por células eucariotas primitivas con las que establecieron una relación endosimbiótica (Gray, 1999; Lang et al., 1999). El genoma de estos endosimbiontes se redujo drásticamente durante la evolución al transferirse gran parte de sus genes al genoma nuclear de la célula hospedadora. Como consecuencia, muchos genes fundamentales para el correcto desarrollo y funcionamiento de los cloroplastos y las mitocondrias se localizan en el genoma nuclear, por lo que la expresión de los tres genomas vegetales debe coordinarse de manera muy precisa. El estado funcional, metabólico y de desarrollo de los cloroplastos y las mitocondrias se transmite al núcleo mediante señalización retrógrada (de los orgánulos al núcleo) y, a su vez, el núcleo responde a través de señalización anterógrada (del núcleo a los orgánulos) pudiendo modificar la expresión de genes cuyos productos actúan en las mitocondrias y los cloroplastos. Estas rutas de señalización permiten ajustar en cada momento las actividades de ambos orgánulos con los requerimientos energéticos, metabólicos o fisiológicos celulares (revisado en Robles et al., 2012a).

INTRODUCCIÓN

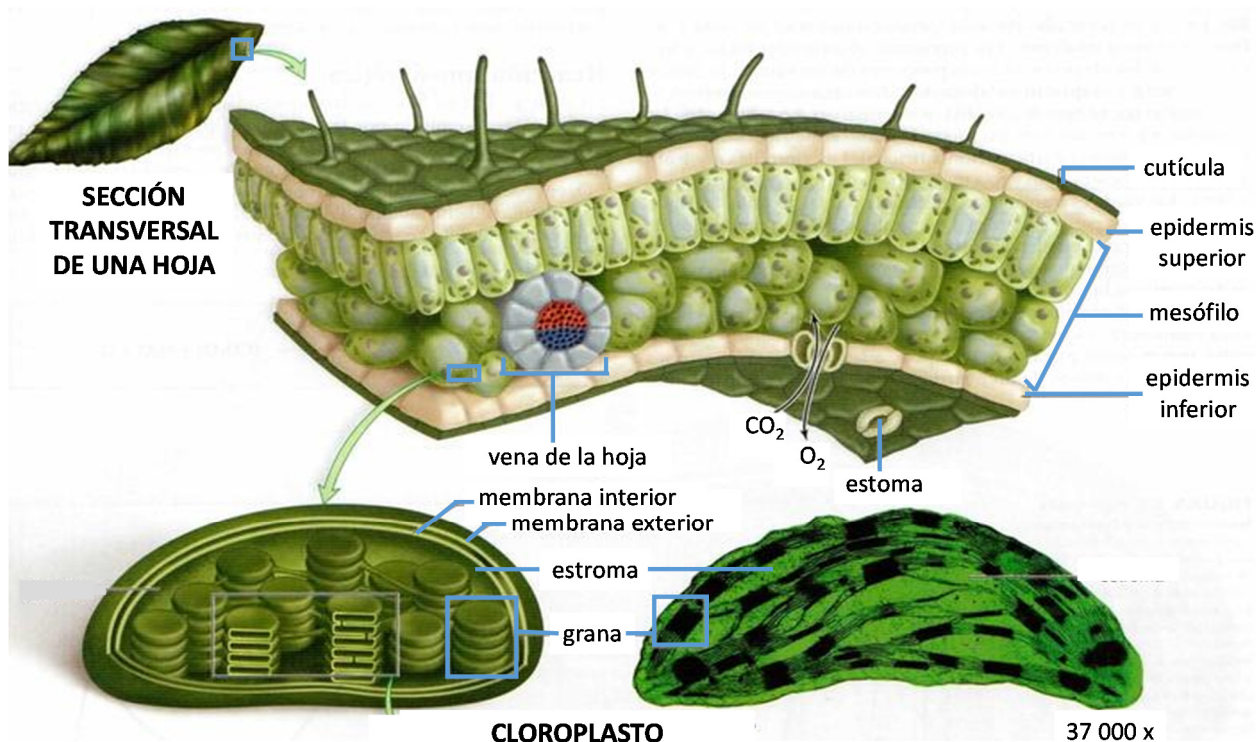


Figura 2. Estructura de un cloroplasto. Ilustración de la sección transversal de una hoja C3 (superior) y las distintas partes de un cloroplasto en un dibujo (inferior izquierda) y en una imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (inferior derecha). Tomado con modificaciones de Mader (2008).

Debido al flujo de genes de los genomas organulares al nuclear, la gran mayoría de las proteínas que actúan en las mitocondrias y los cloroplastos (alrededor de 2.000 y más de 3.000, respectivamente, según estudios proteómicos y bioinformáticos; Huang et al., 2013, Lee et al., 2013) están codificadas por genes nucleares, siendo minoritarias las codificadas por genes organulares. En el cloroplasto, la mayoría de las proteínas codificadas por su genoma participan en la fotosíntesis y en el flujo de la información génica en su interior. Entre las plantas terrestres, el contenido en genes del genoma del cloroplasto es bastante similar, presentando todas ellas cuatro genes que cifran ARN ribosómicos (ARNr), 30-31 genes que se transcriben produciendo ARN de transferencia, 21 genes que dan lugar a proteínas ribosómicas y los restantes genes codifican proteínas implicadas en procesos como la fotosíntesis o la transcripción (Shaw et al., 2007). Respecto a las proteínas cloroplásticas cifradas por genes nucleares, se desconoce la función de muchas de ellas y hasta la fecha no se han obtenido alelos mutantes para la mayoría de los genes que las codifican.

Respecto a la transcripción del genoma cloroplástico, éste contiene los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* y *rpoC2* que codifican las distintas subunidades de una polimerasa de ARN de tipo procariótico (PEP; *Plastid-Encoded Plastid RNA Polymerase*; Igloi y Kössel, 1992). La especificidad de unión de PEP a promotores del ADN de los cloroplastos depende de factores sigma cifrados por el núcleo (Kanamaru y Tanaka, 2004). Además de PEP, en los cloroplastos actúa una polimerasa de ARN monomérica (NEP; *Nuclear-Encoded Plastid RNA Polymerase*), codificada por el genoma nuclear y similar a la de los bacteriófagos T3/T7 (Börner et al., 2015). PEP y NEP controlan la expresión de distintos conjuntos de genes cloroplásticos. Durante la

diferenciación y el desarrollo del orgánulo, NEP transcribe fundamentalmente genes implicados en la transcripción y traducción en los proplastidios (precursores de los cloroplastos), mientras que PEP suele presentar actividad en los cloroplastos maduros regulando la expresión de genes implicados en la fotosíntesis (Liere y Maliga, 2001).

1.3. Proteínas ribosómicas del cloroplasto

Los ribosomas cloroplásticos, denominados clororribosomas, llevan a cabo la síntesis proteica en este orgánulo y están compuestos por dos subunidades, una grande (50S) y una pequeña (30S), que constituyen un ribosoma 70S similar en estructura y tamaño a los ribosomas bacterianos. Las subunidades 50S y 30S están compuestas a su vez por moléculas de ARNr, todas ellas codificadas por el genoma del cloroplasto, y por numerosas proteínas ribosómicas (PRP, *Plastid Ribosomal Proteins*) de mayor tamaño que sus ortólogas bacterianas. La mayoría de las PRP están codificadas por genes nucleares por lo que deben importarse al cloroplasto, siendo un ejemplo de la participación del genoma nuclear en la expresión de la información genética que alberga el genoma cloroplástico.

De la subunidad 30S del clororribosoma forman parte 24 proteínas denominadas Rps (*Ribosomal protein of the small subunit*), 21 de las cuales presentan una proteína ortóloga en *Escherichia coli* (en adelante *E.coli*). De las 24 Rps, 12 están codificadas por el genoma del cloroplasto y 12 por el genoma nuclear (Yamaguchi et al., 2000). Por su parte, la subunidad 50S contiene 33 proteínas Rpl (*Ribosomal protein of the large subunit*), 31 de ellas con ortólogas en *E. coli*. De las 33 proteínas Rpl, 24 están codificadas por el genoma nuclear y 9 por el cloroplástico (Yamaguchi y Subramanian, 2000). A pesar de las similitudes estructurales con los ribosomas procarióticos, la traducción en los clororribosomas es más compleja, probablemente debido, al menos en parte, a la presencia de proteínas ribosómicas específicas del cloroplasto, denominadas PSRP (*Plastid-Specific Ribosomal Proteins*). La subunidad 30S presenta tres proteínas de este tipo (PSRP2-4) y la 50S dos (PSRP5 y PSRP6) (Sharma et al., 2007). Las técnicas de criomicroscopía electrónica y *cross-linking* con ARN mensajero (ARNm) han permitido resolver la estructura tridimensional del clororribosoma y determinar que algunas proteínas PSRP se localizan en posiciones óptimas para su interacción con los ARNm así como con factores de transcripción específicos del cloroplasto durante las etapas iniciales de la traducción (Manuell et al., 2007).

En los últimos años, se han llevado a cabo varios estudios para determinar la función de las proteínas ribosómicas del cloroplasto (revisado en Tiller y Bock, 2014). Para analizar las proteínas ribosómicas codificadas por el genoma cloroplástico se ha utilizado habitualmente *Nicotiana tabacum* como sistema modelo, ya que para esta especie se dispone de un protocolo eficaz de transformación del cloroplasto. Por el contrario, suele escogerse *Arabidopsis* como modelo para estudiar la función de las proteínas ribosómicas codificadas por genes nucleares, mediante aproximaciones de genética directa o inversa. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que las mutaciones en las proteínas ribosómicas del cloroplasto suelen

ocasionar efectos tales como retraso en el crecimiento, reducción de la actividad biosintética de proteínas en el cloroplasto y/o alteraciones en la fotosíntesis (Pesaresi et al., 2001; Morita-Yamamuro et al., 2004; Romani et al., 2012; Tiller et al., 2012). Además, la caracterización de mutantes con alteraciones en el flujo de la información génica en el cloroplasto, incluida la traducción, ha revelado la importancia que tiene su correcto funcionamiento para el desarrollo adecuado de las hojas (Pyke et al., 2000; Wang et al., 2000; Wycliffe et al., 2005). Otros trabajos han puesto de manifiesto que algunas mutaciones en proteínas PRP resultan letales, al modificar seriamente la función cloroplástica. Como ejemplo de esto puede citarse a los mutante *asl1* (*albino seedling lethality 1*) del arroz y *asl2* del maíz afectados en la proteína Rps20 (Gong et al., 2014) y Rpl21 (Lin et al., 2014) del clororribosoma, respectivamente. La reciente caracterización del mutante *wlp1* (*white leaf and panicles 1*) del arroz, que presenta un desarrollo anómalo de los cloroplastos particularmente a bajas temperaturas, ha permitido determinar por vez primera la función de una proteína PRP en esta especie: Rpl13 (Song et al., 2014). Los autores de este trabajo proponen que la función cloroplástica está comprometida en el mutante *wlp1* como consecuencia de un menor nivel de síntesis de la polimerasa de ARN PEP (véase el apartado anterior) debido a la perturbación de la traducción en este orgánulo.



2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En los laboratorios de Víctor Quesada y Pedro Robles se lleva a cabo una aproximación de genética inversa, con el objetivo de caracterizar funcionalmente genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas y que participan en el flujo de la información genética en este orgánulo. Se eligieron inicialmente genes para los que no se había descrito previamente ningún fenotipo mutante a partir de la perturbación de su función. La genética inversa se fundamenta en la obtención de alelos mutantes de un gen, habitualmente insercionales y de pérdida de función, a partir del conocimiento de su secuencia de nucleótidos (Alonso y Ecker, 2006). El sistema modelo escogido para este estudio ha sido la especie vegetal *Arabidopsis thaliana*, para la que se dispone de numerosas herramientas genéticas y moleculares que permiten realizar abordajes de genética inversa.

Entre los genes seleccionados para su caracterización en los laboratorios de V. Quesada y P. Robles se encuentran algunos de los que codifican proteínas ribosómicas del cloroplasto. Las líneas mutantes que dieron lugar a un fenotipo morfológico se escogieron para su análisis. Entre otros, se identificaron cinco mutantes afectados en proteínas ribosómicas del cloroplasto que se denominaron *crd* (*chloroplast ribosome defective*). Los mutantes *crd1*, *crd2-1*, *crd2-2* y *crd3* están afectados en genes cuyos productos son componentes de la subunidad grande del clororribosoma, mientras que *crd4* lo está en un gen que cifra una proteína de la subunidad pequeña. Estos mutantes fueron caracterizados genética y fisiológicamente en trabajos previos del laboratorio (Gea Caselles, 2012; Valderrama Pérez, 2014; Navarro Cartagena, 2015).

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado (TFG) fue el de iniciar la caracterización funcional de los genes *CRD*, especialmente la de *CRD1* y *CRD3*, al tratarse de genes que hasta la fecha no han sido estudiados por otros autores. Con este fin, se ha determinado el efecto de las mutaciones *crd1* y *crd3* sobre la expresión de varios genes cloroplásticos y nucleares, así como la alteración producida en los niveles de los ARNr por la perturbación de la función de los genes *CRD*. Además, se han generado varias construcciones para llevar a cabo el rescate fenotípico de los mutantes *crd* y para estudiar el efecto que pudiera tener la sobreexpresión de estos genes en el fenotipo de la estirpe silvestre Columbia-0. En este trabajo, se ha realizado una búsqueda e iniciado la caracterización de nuevos mutantes afectados en genes nucleares que codifican proteínas del clororribosoma y que no han sido descritos previamente. Finalmente, se han realizado cruzamientos entre los mutantes *crd* y otros afectados en la función del clororribosoma obtenidos por autores previos, con el fin de estudiar sus interacciones genéticas mediante el análisis de dobles mutantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Nomenclatura

En este TFG se hace referencia a los alelos de un gen mediante abreviaturas de tres letras en cursiva, utilizando las mayúsculas para los alelos silvestres y las minúsculas para los alelos mutantes. Los diferentes genes con una misma denominación, se identifican añadiendo un número a la abreviatura. A los distintos alelos mutantes de un gen se les asigna un número que se separa del identificador del gen con un guion. Los fenotipos mutantes se denotan por la misma abreviatura de tres letras, con la primera en mayúscula y sin cursiva. Esta nomenclatura es la propuesta por Meinke y Koornneeff (1997) para *Arabidopsis*.

3.2. Estirpes de *Arabidopsis* empleadas

Como estirpe silvestre de referencia de *Arabidopsis* se ha utilizado Columbia-0 (Col-0), debido a que todas las estirpes mutantes empleadas en este trabajo se encuentran en dicho fondo genético y derivan de mutagénesis insercional con el ADN-T de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (en adelante *A. tumefaciens*). Estas líneas mutantes pertenecen a las colecciones de dominio público del Instituto SALK (Alonso et al., 2003) y SAIL (*Syngenta Arabidopsis Insertion Library*) (véase la Tabla 2 de Anexos). Con anterioridad a este trabajo se obtuvieron las estirpes mutantes *crd1*, *crd2-1*, *crd3* y *crd4* (Robles et al., 2015 y resultados no publicados). Las semillas de las estirpes utilizadas en este trabajo fueron suministradas por el *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*, NASC (<http://arabidopsis.info/>).

3.3. Disoluciones

3.3.1. Medios de cultivo

A continuación se indican los medios de cultivo utilizados. En su preparación siempre se empleó agua desionizada y se trabajó con guantes para evitar su contaminación. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en un presoclave a 1 kg/cm² y 121°C durante 20 min.

3.3.1.1. Medios de cultivo líquidos

— Medio ATM

El medio mínimo ATM (Kranz, 1987) se utilizó para regar las plantas cultivadas en maceta. Se compone de KNO₃ (5 mM), KH₂PO₄ (2,5 mM), MgSO₄ (2 mM), Ca(NO₃)₂ (2 mM), FeNaEDTA (51 μM), H₃BO₃ (70 μM), MnCl₂ (14 μM), CuSO₄ (0,5 μM), ZnSO₄ (1 μM), NaMoO₄ (0,2 μM), NaCl (10 μM) y CoCl₂ (0,01 μM).

— Medio LB

Se utilizó para el cultivo líquido de la bacteria *E.coli*. Para preparar 1 l de LB (Luria-Bertani), se añadió a 800 ml de agua destilada 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se agitó hasta su completa disolución con un agitador magnético y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH (5M). Finalmente se enrasó

hasta un volumen final de 1 l, se tapó el matraz con papel de aluminio y se autoclavó. Una vez autoclavado el medio se conservó a 4°C.

3.3.1.2. Medios de cultivo sólidos

Para la preparación de medios de cultivo sólidos, se añadió agar tras disolverse por completo el resto de componentes del medio. Se esterilizaron a continuación en un presoclave y se vertieron en cajas de Petri dentro de una cabina de flujo laminar CRUMA 870-FL a fin de evitar su contaminación. Estos medios se conservaron a 4°C con las placas de Petri en posición invertida para evitar la condensación de agua.

— Medio GM

Se utilizó para el cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* en placas de Petri. Para preparar 2 l de medio GM, se añadieron 1800 ml de agua destilada a un matraz de 2 l y se adicionaron 4,3 g de sales MS (Murashige and Skoog) de Duchefa, 20 g de sacarosa (1%) y 1 g de Mes (0,5 g/l), agitándose hasta su completa disolución con un agitador magnético. El pH de la disolución se ajustó a 5,7 con KOH (5 M y/o 1 M) y se enrasó hasta un volumen final de 2 l, dividiéndose el volumen en 2 matraces a razón de 1 l en cada uno de ellos. A continuación se añadieron 8 g de Plant Agar de Duchefa a cada matraz, se sellaron con papel de aluminio y se esterilizaron en un presoclave. Tras su esterilización y enfriamiento a 55-60°C en un baño termostatzado, el medio se vertió en placas de Petri de 15 cm de diámetro a razón de unos 100 ml por placa.

En las placas destinadas a la siembra de semillas procedentes de plantas previamente transformadas con *A. tumefaciens*, el medio de cultivo se suplementó con el antibiótico higromicina a una concentración de 15 mg/l para seleccionar solamente aquellas plántulas que hubieran incorporado la construcción.

— Medio LB

Se utilizó para el cultivo de bacterias. Para la preparación de 1 l de medio LB sólido, se siguieron las pautas indicadas en el apartado anterior, con la salvedad de que tras enrasar a 1 l el medio de cultivo, se añadieron 15 g de agar bacteriológico europeo (Duchefa). Las placas de Petri con el medio solidificado se conservaron a 4°C. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con los antibióticos kanamicina, o kanamicina y rifampicina, para la selección de colonias transformantes.

3.3.2. Electroforesis en geles de agarosa

— TAE 50x

El TAE 50x está constituido de Tris-base (2 M), ácido acético glacial (5,71% v/v) y Na₂EDTA (50 mM, pH 8,0) a pH 7,6. A partir de esta disolución madre se prepararon disoluciones de trabajo de TAE 1x.

— Tampón de carga 6x

Se compone de Ficoll (20% m/v), xilencianol (0,25% m/v), azul de bromofenol (0,25% m/v) y Na₂EDTA (10 mM).

— *Marcador de peso molecular*

Se utilizaron dos tipos de marcadores de peso molecular: 1 kb ladder de Gibco/BRL (diluido en tampón de carga a una concentración de 0,1 µg/µl) y el Hiperladder de Bioline (diluido en tampón de carga a una concentración de 0,14 µg/µl). Se cargaron 8 µl de marcador 1 kb ladder de Gibco/BRL o 5 µl de marcador Hiperladder de Bioline, por pocillo de un gel de agarosa. Ambos tipos de marcadores se conservaron a -20°C.

3.3.3. Purificación de ADN genómico

— *Tampón de extracción*

Se compone de Tris-HCl (100 mM, pH 8,0), Na₂EDTA (50 mM) y NaCl (0,5 M).

— *Dodecilo sulfato de sodio (SDS)*

Se utilizó al 20% m/v a pH final de 7,2.

3.4. Métodos de cultivo

3.4.1. Manipulación de las semillas

Las semillas se recogieron en tubos eppendorf a partir de plantas secas individuales que habían finalizado su ciclo vital y se conservaron a 4°C hasta su siembra.

3.4.2. Esterilización y estratificación de las semillas

Con el fin de evitar la aparición de hongos en los cultivos *in vitro* las semillas se esterilizaron antes de su cultivo. El procedimiento de esterilización consistió en lavados sucesivos de las semillas en tubos eppendorf. En el primer lavado las semillas se sumergieron durante 8 min en una disolución acuosa del 40% de lejía comercial (NaClO al 45% m/v) y 2 µl/ml de una disolución del 1% v/v en Tritón X-100 (un detergente), agitando repetidamente los tubos. A continuación se retiró la lejía y se realizó un segundo lavado con agua estéril. Se agitaron de nuevo los tubos y se eliminó el agua. El lavado con agua estéril se repitió dos veces más y las semillas se dejaron en los tubos eppendorf suspendidas en 1 ml de agua estéril. En el caso de las semillas procedentes de las plantas transformadas con *A. tumefaciens*, se realizó un primer lavado de 2 min en etanol al 70%, previo al lavado con la lejía y el Tritón X-100, para aumentar la eficacia en la eliminación de los contaminantes fúngicos.

Las semillas esterilizadas y suspendidas en agua se conservaron a 4°C durante al menos 24 h para romper su dormancia y favorecer la germinación, proceso que se denomina estratificación y que se llevó a cabo antes o después de su siembra en placas de Petri.

3.4.3. Cultivo de las semillas *in vitro*

Las semillas recolectadas se sembraron en placas de Petri de 15 cm de diámetro con medio de cultivo solidificado en su interior. Las siembras se realizaron con materiales estériles dentro de una cabina de flujo laminar CRUMA 870-FL. Se sembraron habitualmente unas 100 semillas regularmente espaciadas sobre la superficie del medio de cultivo. Finalizada la siembra, las cajas de Petri se precintaron con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que evita la entrada de partículas contaminantes pero permite el intercambio de gases con el exterior.

Las semillas de plantas transformadas con *A. tumefaciens* se sembraron a elevada densidad utilizando agar de cobertera a una concentración de 5 g/l. Para ello, una vez esterilizadas las semillas (alrededor de 80 mg), se les retiró el agua y se les añadió 10 ml de agar de cobertera previamente autoclavado. Se agitaron y se vertieron sobre la caja de Petri con medio suplementado con higromicina. Las cajas de Petri con las semillas sembradas y estratificadas se incubaron dentro de una cámara de cultivo HLR-352-PE (Panasonic) a $20\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ con iluminación continua de 2400-3100 lx de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Panasonic 40 FL40SS-ENW-37.

3.4.4. Trasplante y cultivo en maceta

Las plantas cultivadas en placas de Petri se trasplantaron individualmente a maceta para que completasen su ciclo de vida, de la tercera a la cuarta semana tras la estratificación de las semillas. Las macetas contenían un sustrato consistente en una mezcla de perlita, vermiculita y turba no fertilizada de musgo *Sphagnum*, en una relación en volumen 1:1:0,5, respectivamente. Cada planta se aisló de sus vecinas mediante el uso de cilindros de plástico transparentes denominados aracones (Beta Tech).

En el caso de plantas destinadas a ser transformadas con la bacteria *A. tumefaciens*, se trasplantaron a macetas cuadradas, en las que se dispusieron unas 25-30 plantas. En este tipo de macetas no se emplearon aracones, sino que se creó mediante bolsas de plástico transparente una barrera para separar las plantas de una maceta de las de otras.

Para el trasplante de las plantas de las placas de Petri a las macetas, se utilizaron pinzas de metal, introduciendo la raíz en el sustrato de la maceta que previamente había sido humedecido con la disolución de riego ATM. Las bandejas se introdujeron en una cámara climatizada a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 60-70% de humedad relativa, bajo iluminación continua, con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White, con iluminación continua de 5000 lx. El fondo de las macetas se mantuvo siempre en contacto con agua y una vez a la semana se regaron con medio mínimo ATM para aportar nutrientes a las plantas. El riego se interrumpió cuando acabó la floración de las plantas, dejando que éstas se secan para proceder a recolectar las semillas.

3.4.5. Cruzamientos

Las plantas se fecundaron manualmente para obtener la descendencia deseada. Con este fin, se utilizaron dos individuos de *Arabidopsis*, uno como donante de polen (parental masculino) y otro como receptor (parental femenino), siguiendo el procedimiento de emasculación descrito por Kranz, 1987. Los cruzamientos se llevaron a cabo utilizando una lupa binocular Motic MSZ-140 y pinzas de microcirugía Aesculap BD331. Se eligió un tallo inflorescente de la planta con capullos florales en su ápice y se eliminaron únicamente las flores maduras y todos los capullos que no se iban a utilizar en el cruzamiento para evitar la autofecundación. A las restantes flores se les extirparon los sépalos, pétalos y estambres inmaduros, dejando desnudo el pistilo no fecundado. Las pinzas de microcirugía se limpiaron de nuevo y con ellas se extirpó en la planta donante, una flor madura con estambres con polen en sus anteras. Se pusieron en contacto varias de las anteras del parental masculino con el pistilo de la flor del parental femenino impregnándolo con el polen de las anteras. A continuación, el cruzamiento se señaló mediante una pequeña etiqueta adhesiva debidamente rotulada y adherida al tallo junto a la flor fecundada. Finalmente, la planta fecundada se introdujo de nuevo en la cámara de cultivo para permitir la formación y maduración de la silicua derivada del cruzamiento. Una vez las silicuas estaban maduras y prácticamente secas, se recogieron e introdujeron en un tubo eppendorf debidamente rotulado en el que se recolectaron las semillas resultantes del cruzamiento. Una vez secas se almacenaron a 4°C hasta su siembra.

3.5. Obtención de imágenes

Las imágenes de las plantas se tomaron con un microscopio estereoscópico Leica M60 equipado con una cámara digital ICE80 HD y con una cámara fotográfica portátil digital Nikon Coolpix S220.

3.6. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo para utilizarlo como molde en amplificaciones mediante PCR empleando el método de Dellaporta et al., (1983) con modificaciones tal y como se detalla en <http://www.caltech.edu/meyerowitz/protocols/quickdna.html>. El ADN molde se obtuvo a partir de hojas recolectadas o plantas completas. Se emplearon para la maceración de las muestras 3-4 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro (Vidrafoc, 376/1) por muestra y un macerador Mixermill 300. Una vez secos, los precipitados de ácidos nucleicos se resuspendieron en 45 µl de agua estéril y se guardaron a -20°C.

3.7. Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por la casa comercial Sigma-Aldrich y se recogen, así como su finalidad, en la Tabla 1 de Anexos. Los cebadores para el genotipado de las líneas insercionales del Instituto SALK fueron diseñados con la herramienta informática *T-DNA Primer Designed* del SALK (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

3.8. Amplificación mediante PCR

Se han realizado amplificaciones mediante PCR con el objetivo de genotipar las inserciones de ADN-T en las líneas estudiadas, generar construcciones para el rescate de los fenotipos mutantes y secuenciar sus insertos.

Se tomó en cada amplificación 1 μ l de ADN genómico como molde y las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de pared fina de 0,2 ml en un volumen final de 10 μ l por amplificación, utilizando un termociclador Bio-Rad 9700, en el que se programó un número de 35 ciclos. Los oligonucleótidos empleados se añadieron a una concentración final de 0,4 μ M y cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos a otra de 0,2 mM. La duración de la etapa de polimerización varió en función del tamaño de la molécula a amplificar, asumiéndose que la polimerasa de ADN utilizada sintetiza habitualmente ADN a razón de una kilobase por min. La temperatura de apareamiento (*annealing temperature*; T_m) se calculó con la fórmula $T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$, siendo C, G, A y T el número de las respectivas bases en el cebador (Suggs et al., 1981). Se empleó una temperatura de apareamiento entre 5 y 10°C inferior a la calculada.

En las amplificaciones mediante PCR se utilizaron dos polimerasas de ADN distintas. Para confirmar la presencia de los insertos en el vector pENTR/D-TOPO en las colonias bacterianas, se utilizó la polimerasa termoestable *HorsePower-Taq* (Canvax Biotech). Por el contrario, para las amplificaciones que perseguían la obtención de construcciones y la secuenciación de fragmentos de ADN se usó la polimerasa *Phusion* (Thermo Scientific) que presenta actividad correctora de pruebas y por tanto, una menor tasa de error.

3.9. Electroforesis en geles de agarosa

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 1 o al 2 % m/v. Una vez disuelta la agarosa en 1xTAE mediante un microondas, se añadió bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5 μ g/ml. Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta horizontal rellena con 1xTAE. Las muestras de ADN a cargar en cada uno de los pocillos del gel se prepararon añadiendo a cada una de ellas 2 μ l de tampón de carga. En cada gel se cargó siempre al menos una alícuota del marcador de peso molecular. Finalizada la electroforesis, se visualizó bajo luz ultravioleta de 312 nm, y se fotografió en un documentador de geles INFINITY VX2.

3.10. Extracción de ARN

El ARN total se extrajo a partir de muestras de 80 mg de plántulas de 13 días tras la estratificación (dte) de la estirpe silvestre Col-0 y mutantes *crd1*, *crd2-1*, *crd3* y *crd4*, recolectadas en tubos eppendorf y que fueron sumergidos en nitrógeno líquido para su inmediata congelación y posteriormente almacenadas a -80°C. Se utilizó TRIsure (Bioline) para realizar extracciones de ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se resuspendieron en 45 μ l de agua estéril libre de RNasas y se almacenaron a -80°C

para impedir la degradación del ARN. El ARN así obtenido se analizó directamente en un Bioanalizador Agilent 2100 (véase el apartado 3.12) o se retrotranscribió a ADNc (véase el apartado 3.11).

3.11. Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Para el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR se procedió a eliminar las posibles trazas de ADN genómico en las muestras de ARN extraídas, tratándolas con la DNasa TURBO (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Se retrotranscribió 1 µg de ARN de cada muestra, utilizando hexanucleótidos al azar (*random primers*), según se describe en Quesada et al. (2011). El ADNc obtenido se diluyó tres veces y se utilizó 1 µl de la solución resultante para llevar a cabo las amplificaciones mediante qRT-PCR con un sistema de detección ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos (véase la Tabla 1 de Anexos) se diseñaron como se describe en Robles et al. (2012b). Cada 20 µl de mezcla de reacción contenía 7,5 µl de SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline), 0,4 µM de cebadores y 1 µl de la disolución de ADNc. La cuantificación relativa de los transcritos se llevó a cabo siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). Se utilizaron tres réplicas biológicas distintas y de cada una de ellas tres réplicas técnicas. La expresión de los genes estudiados se normalizó utilizando como control interno la del gen de la ACTINA2.

3.12. Análisis de los ARNr

Los ARNr de la estirpe silvestre y de las mutantes fueron analizados y cuantificados a partir de preparaciones de ARN total (véase el apartado 3.10) empleando un Bioanalizador Agilent 2100, el kit *Agilent RNA 6000 Pico kit* y el software suministrado por el fabricante, siguiendo sus instrucciones (Agilent Technologies; <http://www.agilent.com>).

3.13. Diseño y obtención de construcciones de ADN

Se ha llevado a cabo la obtención de construcciones mediante la tecnología Gateway de Invitrogen (www.invitrogen.com). Con este fin, se realizan dos reacciones sucesivas de integración, mediadas por la topoisomerasa I del virus *Vaccinia* y la recombinasa LR (reacción LR) del fago λ , en dos vectores: un vector de entrada y un vector de destino, éste último especialmente diseñado para un fin específico (Landy, 1989).

3.13.1. Vectores empleados

Para la elaboración de las construcciones del rescate fenotípico de los mutantes *crd* se ha empleado como vector de entrada el pENTR-D™/TOPO® de 2.580 pb suministrado con el kit *pENTR-D™/TOPO® Cloning kit* (Invitrogen; Figura 3A) y como vector de destino el pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003; Figura 3B).

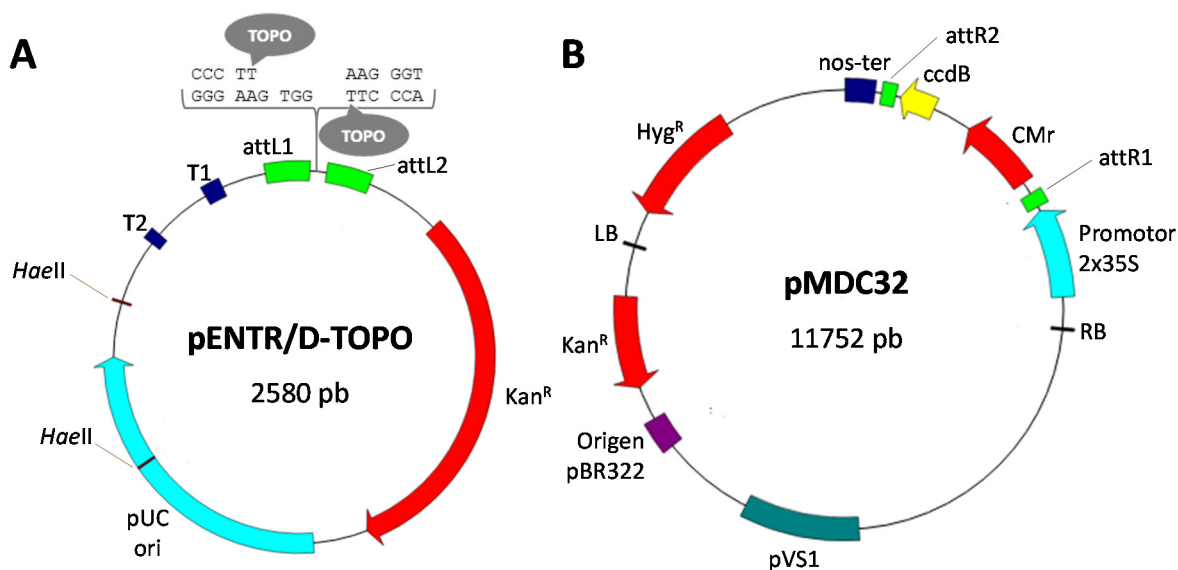


Figura 3. Mapas de los vectores pENTR/D-TOPO y pMDC32. (A) Vector de entrada pENTR/D-TOPO. Se muestran los sitios de recombinación *attL1* y *attL2*, los promotores de expresión *T2* y *T1*, el gen de resistencia a kanamicina (*Kan^R*), el origen de replicación *pUC* (*ori pUC*), las dianas de restricción para la enzima *HaeIII*, así como los lugares de actuación de la Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* (TOPO). (B) Vector de destino pMDC32. Se muestran los sitios de recombinación *attR1* y *attR2*, dos copias del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor, los genes de resistencia a kanamicina (*Kan^R*), higromicina (*Hyg^R*) y cloranfenicol (*CMr*), el origen de replicación *pBR322*, el origen de replicación para *A. tumefaciens* *pVS1*, el terminador de la transcripción *nos* (*nos-ter*) y el gen de toxicidad *ccdB*.

3.13.2. Amplificación mediante PCR y purificación de los fragmentos a clonar

Se llevaron a cabo amplificaciones mediante PCR de las regiones génicas de interés, para su incorporación al vector de entrada. Como molde para dichas amplificaciones se empleó ADN genómico de la estirpe silvestre Col-0, la polimerasa de ADN *Phusion* (véase el apartado 3.8) y distintas combinaciones de cebadores *Forward* (F) y *Reverse* (R) específicos para cada gen (véase la Tabla 1 de Anexos). Los productos de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (véase el apartado 3.9), se purificaron del gel con el kit *GenElute Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.13.3. Clonación de los insertos en el vector de entrada pENTR/D-TOPO y transformación de *E. coli*

Para llevar a cabo la reacción de incorporación de los insertos de ADN purificados en el vector de entrada pENTR/D-TOPO se incubó durante 5 min a temperatura ambiente una mezcla de 4 µl de la solución del inserto purificado, 1 µl del vector y 1 µl de la *Salt Solution* del *pENTR-DTM/TOPO[®] Cloning kit* (Invitrogen).

Se empleó todo el volumen de reacción (6 µl) para la transformación de 50 µl de células quimio-competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) mediante choque térmico. Para ello, se mezclaron por inversión los tubos y se incubaron en hielo durante 20 min. A continuación, las mezclas de ligación se incubaron 40 s

en un baño a 42°C e inmediatamente después los tubos se transfirieron a hielo. A cada tubo se añadieron 250 µl de medio de cultivo LB líquido, y se incubaron a 37°C con agitación a 225 rpm durante 1 h. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 1 min, se eliminó la mitad del sobrenadante y las células se resuspendieron en el volumen restante para su siembra con perlas de vidrio de 3 mm de diámetro (Vidrafoc, 376/1) en placas de Petri que contenían medio LB sólido suplementado con kanamicina 25 mg/l. Las placas de Petri se incubaron a 37°C durante toda la noche en posición invertida.

3.13.3.1. Selección de transformantes mediante PCR

Para comprobar que las colonias que crecieron en los medios de cultivo suplementados con kanamicina eran portadoras del inserto, se realizaron ampliaciones mediante PCR. Para ello se seleccionaron colonias aisladas y a partir de ellas se realizaron rayas (*streaks*) en placas Petri con medio de cultivo LB suplementado con kanamicina y se incubaron toda la noche a 37°C. Con ayuda de una punta estéril se tomó masa bacteriana de las *streaks*, que se introdujo en las mezclas de reacción de PCR para su uso como molde en las ampliaciones. Los cebadores universales M13-*Forward* y M13-*Reverse*, se emplearon en combinaciones con los cebadores ATG y STOP específicos de cada gen (véase la Tabla 1 de Anexos) para comprobar la clonación direccional de los insertos. Los productos de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (véase el apartado 3.13.2). Una vez seleccionados los clones positivos, se realizaron cultivos líquidos de 2,5 ml y se congelaron a -80°C alícuotas de 800 µl a las que se añadieron previamente 200 µl de glicerol. El resto del cultivo se empleó para la extracción del ADN plasmídico con el kit *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma).

3.13.4. Clonación de los insertos en el vector de destino pMDC32

Dado que los vectores de entrada y destino poseen el mismo marcador de selección (kanamicina), es necesario llevar a cabo la linearización de las construcciones generadas, para poder transferir posteriormente el inserto al vector de destino y conseguir su específica replicación en las células transformadas. Los ADN plasmídicos purificados de los clones de entrada fueron linearizados utilizando la enzima *BfoI* (*HaeII*; Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa y se purificaron del gel (véase el apartado 3.13.2).

A continuación, se llevó a cabo la reacción LR gracias a las secuencias *attL1* y *attL2* del vector de entrada, y *attR1* y *attR2* del de destino, que permiten la clonación direccional por recombinación homóloga entre estas secuencias. Para ello se tomó 1 µl del vector de entrada linearizado y purificado, 1 µl del vector de destino pMDC32 y 0,5 µl de la enzima LR clonasa (Gateway® LR Clonase™ II Enzyme mix; Invitrogen), que se incubaron durante 1 h a 25°C. La enzima se inactivó añadiendo 0,5 µl de la proteinasa K (Invitrogen) e incubando 25 min a 37°C. A continuación se procedió a transformar células competentes de *E. coli* con los 3 µl de la mezcla de reacción y se seleccionaron los transformantes siguiendo los protocolos descritos en el

apartado anterior, con la salvedad de que se emplearon los cebadores F y R del vector pMDC32 (véase la Tabla 1 de Anexos) combinados con cebadores específicos de cada inserto.

3.13.4.1. Secuenciación de los insertos clonados en los vectores de destino

Para comprobar la integridad de la secuencia de los insertos clonados en los vectores de destino, se llevó a cabo la secuenciación automatizada de éstos por el método de Sanger. Los insertos clonados en los vectores de destino se amplificaron mediante PCR utilizando la polimerasa de ADN *Phusion*, se precipitaron con etanol absoluto y se resuspendieron en 10 µl de agua estéril. Se emplearon 2 µl del producto de PCR como molde en las reacciones de secuenciación, y se mezclaron en un tubo de 0,2 ml de pared fina con 2 µl de la mezcla maestra del *Kit ABI PRISM Big Dye terminator cycle sequencing* y 1 µl del cebador correspondiente. Los tubos se introdujeron en un termociclador y se utilizó el siguiente programa: 96°C, 2 min; 25 ciclos [96°C, 10 s; 50°C, 5 s; 60°C, 4 min], 4°C, ∞. Las reacciones de secuenciación se precipitaron con etanol absoluto y se resuspendieron en 20 µl de formamida desionizada. Tras su desnaturalización a 96°C durante 2 min se resolvieron en un secuenciador automático ABIPrism3100. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa *Chromas* (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>).

3.13.4.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez confirmada la integridad de las secuencias de los insertos clonados, se prepararon cultivos líquidos para la congelación de células y la extracción de ADN plasmídico (véase el apartado 3.13.3.1). Para transformar células quimio-competentes de *A. tumefaciens* C58 resistentes a rifampicina, se añadieron entre 750 y 1250 ng de la construcción formada por el inserto clonado en el vector de destino, a 50 µl de células de *A. tumefaciens*. La mezcla se incubó en hielo durante 20 min y se sometió a un choque térmico a 42°C durante 40 s. A continuación se añadieron 250 µl de medio de cultivo LB líquido y la mezcla se incubó 2 h a 28°C con agitación a 225 rpm. Posteriormente, las células se centrifugaron, se resuspendieron en 100 µl de medio de cultivo líquido LB y se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo LB suplementado con kanamicina y rifampicina, a concentraciones finales de 50 y 25 mg/l, respectivamente, que posteriormente se incubaron durante 48 h a 28°C en posición invertida. En las colonias resultantes se comprobó la presencia del gen de interés según se detalla en el apartado 3.13.3.1.

3.13.4.3. Transformación de *Arabidopsis*

Se sembraron placas de Petri con semillas de la estirpe silvestre Col-0 y de los mutantes *crd* a una densidad de 50 semillas por placa. Los individuos resultantes se trasplantaron a los 21 dte a macetas cuadradas, a razón de unas 25-30 plantas por maceta. Tras el alzado, se cortaron las inflorescencias terminales para favorecer la producción de nuevas inflorescencias. Siete días más tarde, las inflorescencias se sumergieron en un cultivo de 250 ml de *A. tumefaciens* obtenido previamente a partir de los clones

bacterianos que resultaron positivos, al que se añadieron 50 μ l del detergente Silwett-L77 que facilita la adhesión de las bacterias a las flores. Las plantas permanecieron sumergidas en los cultivos durante 30 s y después se dejaron secar sobre papel de filtro. Una vez secas, las macetas se cubrieron con bolsas de plástico, se colocaron en las bandejas sin agua de riego para favorecer que las bacterias penetraran en las planta a través de los estomas y se devolvieron a la cámara de cultivo. Las bolsas se abrieron dos días después por la parte superior para evitar el exceso de condensación de agua.



4. RESULTADOS

4.1. Efecto de las mutaciones *crd1* y *crd3* sobre la expresión de genes cloroplásticos

Con anterioridad a este trabajo, en los laboratorios de los profesores Víctor Quesada y Pedro Robles se aislaron los mutantes *crd*, portadores en homocigosis de alelos insercionales y recesivos de genes nucleares que cifran proteínas ribosómicas del cloroplasto (Tabla 1). Los mutantes *crd* se caracterizan principalmente por su crecimiento más lento, y su menor tamaño y pigmentación que Col-0, la estirpe silvestre de la que proceden (Figura 4). Previamente a este trabajo, se llevó a cabo un análisis genético y fisiológico de los mutantes *crd* (Gea Caselles, 2012; Valderrama Pérez, 2014; Navarro Cartagena, 2015). En este trabajo hemos iniciado la caracterización molecular de los genes *CRD1* y *CRD3*.



Figura 4. Fenotipos morfológicos de los mutantes *crd*. Se muestran las imágenes correspondientes a un individuo silvestre Col-0 y a los mutantes *crd1*, *crd2-1*, *crd3* y *crd4*, tomadas a los 22 dte. Las barras de escala representan 1 mm.

Se ha descrito previamente que mutantes de *Arabidopsis* afectados en genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas implicadas en la expresión del genoma del orgánulo, presentan alteraciones en los niveles de transcritos de genes del cloroplasto y de algunos genes nucleares cuyos productos actúan en este orgánulo. Como ejemplo de lo anterior pueden citarse a los mutantes *rug2*, *mterf9*, *mda1* o *shot1* (revisado en Quesada, 2016) afectados en genes *mTERF* o a los mutantes *sca1* (Mateo-Bonmatí et al., 2015) y *sca3* (Hricová et al., 2006), afectados en los genes que codifican la proteína ribosómica Rps5 (al igual que *crd4*) y la polimerasa de ARN RpoTp, respectivamente. En este trabajo hemos estudiado el efecto que tiene la perturbación de la función de los genes *CRD1* y *CRD3* sobre la expresión de algunos genes nucleares y de otros del genoma del cloroplasto. Para ello se analizó mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) en los mutantes *crd1* y *crd3* y en su silvestre Col-0, la expresión de los genes *rbcl*, *rps18*, *psbD*, *psbA*, *clpP* y *rpoC1* del genoma cloroplástico así como la de los genes nucleares *CRD1*, *CRD2*, *CRD3*, *CRD4* y *RBCSA1*, cuyos productos son proteínas que actúan en el cloroplasto (Tabla 1).

El análisis de la expresión de los genes cloroplásticos estudiados reveló patrones de expresión similares en los mutantes *crd1* y *crd3*. De este modo, los transcritos de los genes *rbcl*, *rps18*, *psbD*, *psbA* y *clpP* se acumularon en ambos mutantes a niveles significativamente más elevados que en el silvestre Col-0, con la excepción del gen *psbD* cuyo nivel de expresión en *crd3* resultó sólo ligeramente superior al del silvestre. Comparados con el silvestre Col-0, los valores de sobreexpresión de los genes estudiados en *crd1* variaron desde 1,6 veces (*psbD*) a 3 veces (*clpP*), mientras que en *crd3* estos valores oscilaron desde 1,3 veces

RESULTADOS

(*psbD*) a 3,2 veces (*psbA*). El gen *rpoC1* mostró un nivel de expresión en *crd1* y *crd3* ligeramente inferior y superior al de Col-0, respectivamente, si bien estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas. Los resultados obtenidos indican que la pérdida de función de los genes *CRD1* o *CRD3* afecta a la expresión de la mayoría de los genes del genoma cloroplástico estudiados.

Tabla 1. Genes cloroplásticos y nucleares estudiados mediante RT-qPCR en los mutantes *crd1* y *crd3*.

	Código AGI ^a	Gen	Producto proteico
Cloroplásticos	AtCg00490	<i>rbcl</i>	Subunidad grande de la enzima RuBisCO
	AtCg00650	<i>rps18</i>	Proteína S18 de la subunidad 30S del clororribosoma
	AtCg00270	<i>psbD</i>	Proteína D2 del fotosistema II
	AtCg00020	<i>psbA</i>	Proteína D1 del fotosistema II
	AtCg00670	<i>clpP</i>	Subunidad de la proteasa Clp ATP dependiente
	AtCg00180	<i>rpoC1</i>	Subunidad beta de la ARN polimerasa organular
Nucleares	At4g01310	<i>CRD1</i>	Proteína L5 de la subunidad 50S del clororribosoma
	At5g54600	<i>CRD2</i>	Proteína L24 de la subunidad 50S del clororribosoma
	At1g75350	<i>CRD3</i>	Proteína L31 de la subunidad 50S del clororribosoma
	At2g33800	<i>CRD4</i>	Proteína S5 de la subunidad 30S del clororribosoma
	At1g67090	<i>RBCS1A</i>	Subunidad pequeña de la enzima RuBisCO

^a*Arabidopsis Genome Initiative, 2000.*

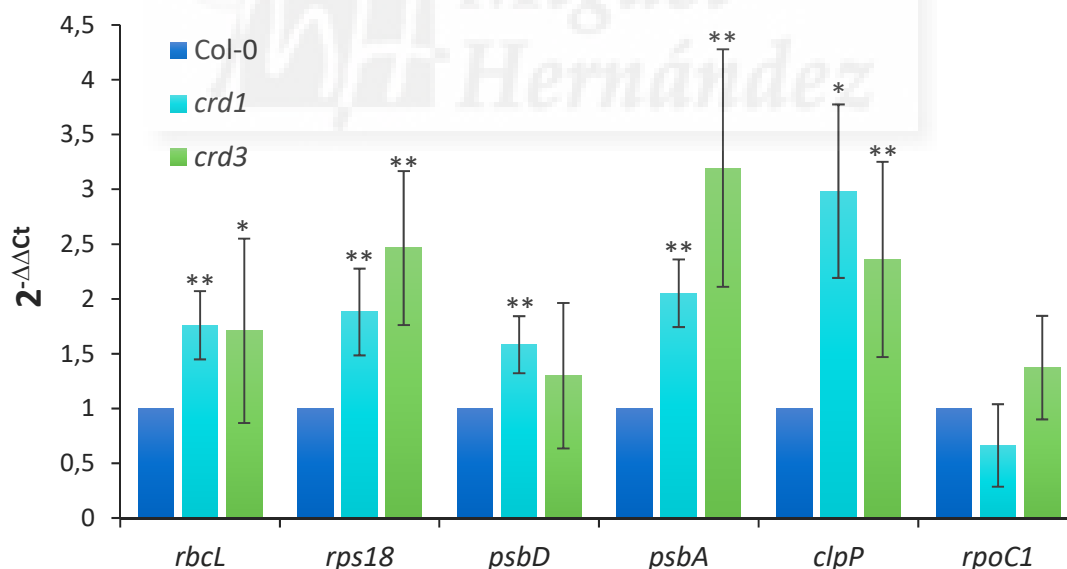


Figura 5. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de genes cloroplásticos en los mutantes *crd1* y *crd3*.

Los valores relativos se determinaron utilizando para cada gen el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ tras su normalización con los obtenidos para el gen de la ACTINA2, que se empleó como control interno, y se compararon con los de Col-0 a los que se les asignó un valor de 1. Cada valor corresponde a la media \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas diferentes y reacciones que se llevaron a cabo por triplicado. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa de los valores de ΔC_T de cada uno de los mutantes respecto a Col-0 en un test de la U de Mann-Whitney (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; $n=9$).

4.2. Efecto de las mutaciones *crd1* y *crd3* sobre la expresión de genes nucleares

Hemos analizado la expresión de los genes nucleares *CRD* en los mutantes *crd1* y *crd3* con un doble objetivo. De una parte, determinar si los niveles de transcritos de los genes *CRD1* y *CRD3* se ven afectados por la presencia de inserciones de ADN-T situadas en las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR, *untranslated regions*) de los genes *CRD1* y *CRD3*, respectivamente (Figura 6). De otra, establecer si la perturbación de la función de *CRD1* o *CRD3* altera la expresión de los restantes genes *CRD*, dado que todos ellos están funcionalmente relacionados (codifican proteínas ribosómicas del cloroplasto) y previamente a este trabajo encontramos que algunas mutaciones *crd* interaccionaban genéticamente (Navarro Cartagena, 2015).

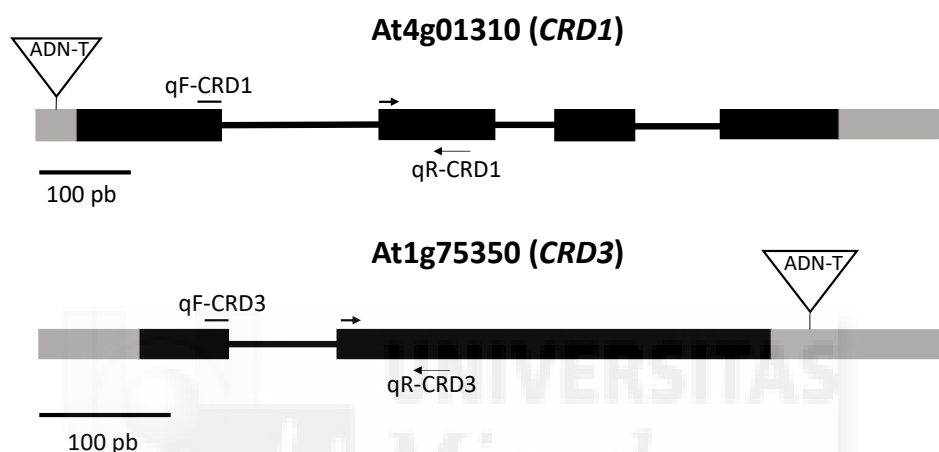


Figura 6. Estructura de los genes *CRD1* y *CRD3*. Representación esquemática de los genes At4g01310 (*CRD1*) y At1g75350 (*CRD3*) con indicación mediante flechas de las posiciones de los cebadores qF y qR de cada gen utilizados en los análisis mediante RT-qPCR. Las inserciones de ADN-T se representan mediante un triángulo invertido. Los exones e intrones se denotan mediante rectángulos negros y líneas continuas, respectivamente. Los rectángulos grises corresponden a las regiones 5' y 3' UTR.

Los resultados obtenidos muestran una disminución estadísticamente significativa en los niveles de transcritos de los genes *CRD1* y *CRD3* en los mutantes *crd1* y *crd3*, respectivamente (Figura 7). De este modo, la expresión de *CRD1* y *CRD3* se redujo en *crd1* y *crd3* en un 62% y 59% de los valores presentes en Col-0, respectivamente. En cuanto a la expresión de los restantes genes *CRD*, en *crd1* se encuentran significativamente sobreexpresados *CRD2*, *CRD3* y *CRD4* (1,6, 2,6 y 1,9 veces respectivamente, comparados con Col-0) mientras que en *crd3*, *CRD1* y *CRD4* se sobreexpresan significativamente (1,8 y 1,9 veces respectivamente, comparado con Col-0; Figura 7). En cuanto a *CRD2*, mostró niveles de expresión similares en *crd3* y Col-0 (Figura 7). Hemos analizado en los mutantes *crd1* y *crd3* y en Col-0 la expresión del gen *RBCS1A* (Tabla 1) utilizado habitualmente como un marcador de señalización retrógrada de los cloroplastos al núcleo (Robles et al., 2015). Hemos detectado una disminución en los niveles de transcritos de *RBCS1A* en los mutantes *crd1* y *crd3* respecto al silvestre Col-0, si bien estas diferencias sólo resultaron ser estadísticamente significativas en el caso de *crd3* (Figura 7).

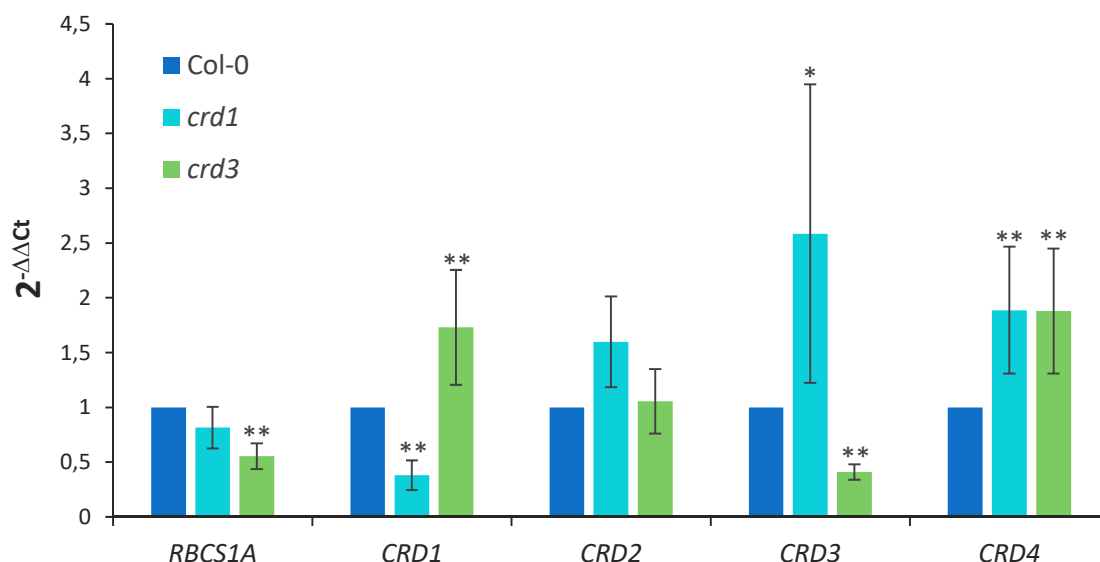


Figura 7. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de genes nucleares en los mutantes *crd1* y *crd3*. Se siguen las pautas descritas para la Figura 5.

4.3. Análisis de los niveles de los ARNr en los mutantes *crd*

En las células vegetales podemos encontrar distintas especies de ARNr formando parte de los ribosomas citoplasmáticos, cloroplásticos o mitocondriales. En el caso del clororribosoma, se distinguen los ARNr 23S, 16S, 5S y 4,5S. El ARNr 16S forma parte de la subunidad pequeña (30S) del clororribosoma y los restantes pertenecen a la subunidad grande (50S). Los ARNr no se acumulan de forma estable a menos que se incorporen a las subunidades ribosómicas, por lo que la cuantificación de los niveles de los ARNr 16S y 23S suele utilizarse como un indicador de los niveles de las subunidades 30S y 50S, respectivamente (Tiller et al., 2012, Walter et al., 2010). Además, ambas subunidades ribosómicas se asocian únicamente durante la traducción y la acumulación de una de las dos subunidades es independiente de la acumulación de la otra. Por todo ello, la cuantificación de los niveles de los ARNr cloroplásticos representativos de cada una de las subunidades del clororribosoma puede ser útil para distinguir entre defectos en la biogénesis de la subunidad grande y la pequeña. Dado que las proteínas CRD son constituyentes de las distintas subunidades del clororribosoma, las mutaciones *crd* podrían alterar la traducción en los cloroplastos debido a una deficiencia en alguna de las subunidades del clorribosoma.

RESULTADOS

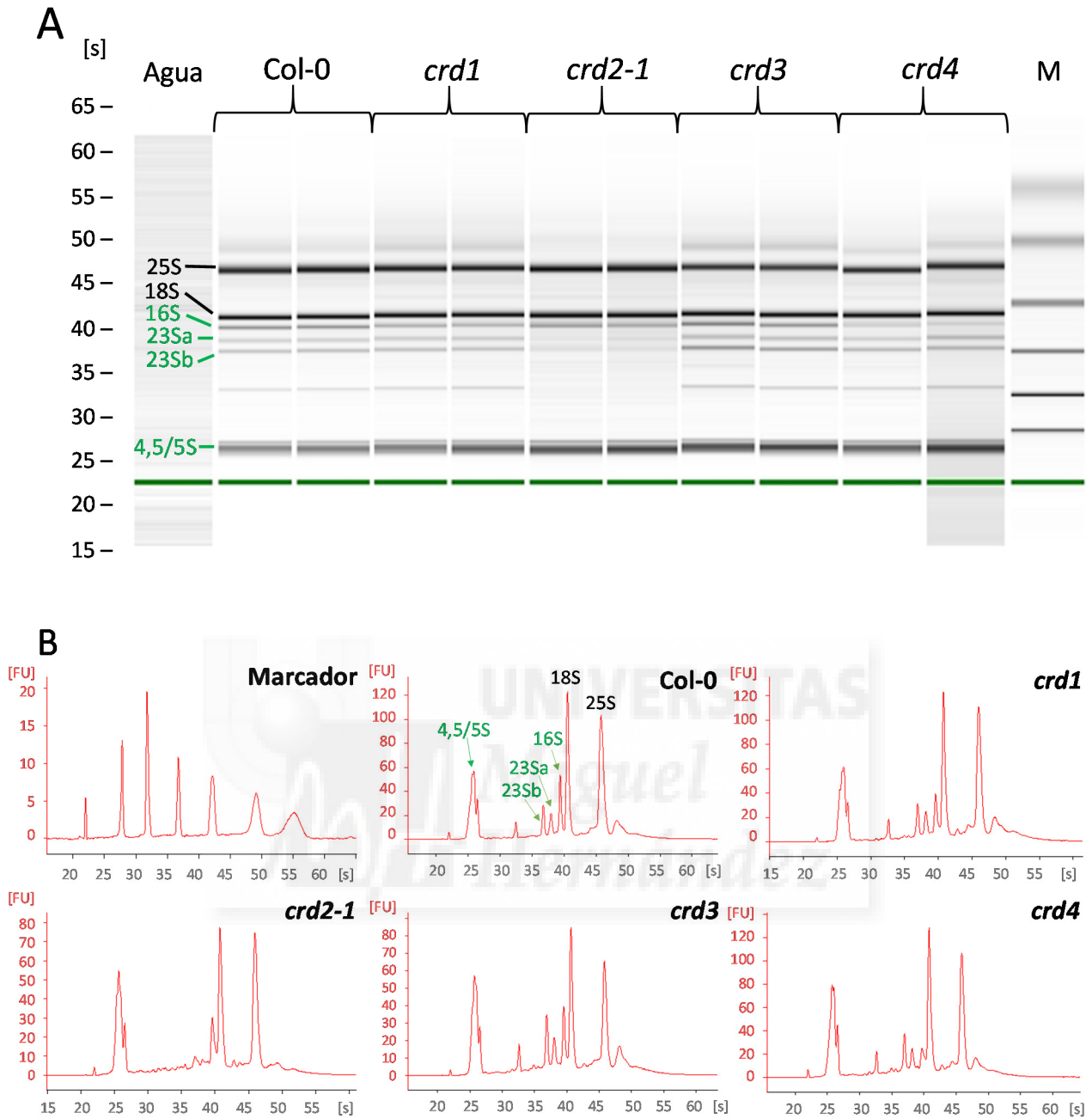


Figura 8. Perfiles de los ARNr en los mutantes *crd*. Las muestras de ARN total extraídas de plantas mutantes *crd* y silvestres Col-0 13 dte se prepararon con el Pico Kit RNA 6000 (Agilent) y se resolvieron en un Bioanalizador Agilent 2000. (A) Imagen del gel con el ARN total resuelto y (B) electroferogramas representativos de los mutantes *crd* y de Col-0. Las diferentes especies de ARNr (25S, 18S, 16S, 23Sa, 23Sb y 4,5/5S) se indican en el perfil de Col-0 y en el gel del ARN total. Los fragmentos 23Sa y 23Sb proceden del procesamiento del ARNr 23S por la acción de RNasas (Nishimura et al., 2010). Se denotan en negro y verde los ARNr citoplasmáticos (18S y 25S) y cloroplásticos (16S, 23Sa, 23Sb y 4,5/5S), respectivamente.

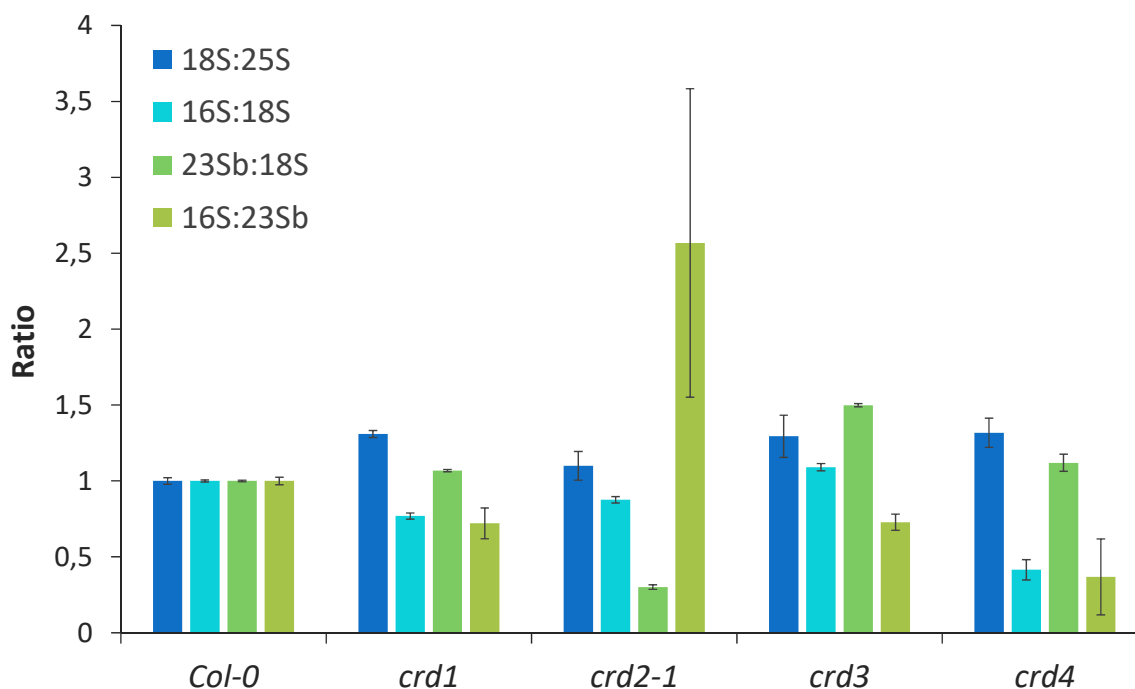


Figura 9. Determinación de las ratios entre distintas especies de ARNr. Cada valor corresponde a las ratios entre distintas especies de ARNr (18S:25S; 16S:18S; 23Sb:18S y 16S:23Sb) obtenidas en los mutantes *crd* y referidas a la correspondiente ratio obtenida en el silvestre Col-0. Se representa para cada estirpe la media \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas diferentes. Las preparaciones de ARN total de los mutantes *crd* y del silvestre Col-0 se resolvieron en un Bioanalizador Agilent 2000.

Hemos analizado y cuantificado mediante un Bioanalizador (véase el apartado 3.12) los niveles de los ARNr citoplasmáticos 25S y 18S y cloroplásticos 23S, 16S, y 4,5/5S presentes en muestras de ARN total obtenidas a partir de los mutantes *crd* y del silvestre Col-0. Hemos identificado algunas diferencias destacables en los niveles de algunas especies de ARNr cloroplástico entre los mutantes *crd* y Col-0. Así por ejemplo, en *crd1*, el ARNr 16S resultó menos abundante que en Col-0, tal y como se refleja en el correspondiente electroferograma y en el gel de la Figura 8. En el mutante *crd2-1* destaca la disminución acusada en los ARNr 23Sa y 23Sb (Figura 8). En cuanto a *crd3*, la principal diferencia que encontramos respecto al silvestre fue un aumento en los niveles de los ARNr 23Sa y 23Sb, como puede apreciarse en la imagen del gel de la Figura 8. Finalmente, el mutante *crd4* mostró una disminución acusada en los niveles del ARNr 16S, tal y como se observa en el electroforegrama correspondiente y en el gel de la Figura 8. Por su parte, los mutantes *crd2-1*, *crd3* y *crd4* presentaron un ligero aumento en los niveles de los ARNr 4,5/5S respecto a Col-0, mientras que no encontramos diferencias apreciables en *crd1* (Figura 8A).

Con el objetivo de determinar si las mutaciones *crd* afectaban a la acumulación de alguna de las subunidades del clororribosoma, hemos calculado las ratios entre los ARNr cloroplásticos (16S y 23S) y el citoplasmático (18S). Los dos primeros son representativos de las subunidades pequeña 30S (ARNr 16S) y grande 50S (ARNr 23S) del clororribosoma y el último lo es de la subunidad pequeña 40S del ribosoma citoplasmático. Hemos seguido el procedimiento descrito por otros autores (Tiller et al., 2012) de forma que

los valores obtenidos para cada uno de los mutantes se normalizaron refiriéndolos a los obtenidos para la correspondiente ratio en el silvestre Col-0, al que se le asignó un valor de 1 para su representación (Figura 9). De este modo, si en un mutante los valores de la ratio 16S:18S son inferiores a 1 se encontraría afectada la subunidad pequeña (30S) del clororribosoma. Por el contrario, si los valores de la ratio 23Sb:18S son menores que 1 la subunidad que se encontraría afectada sería la 50S. Finalmente, el cálculo de la ratio 16S:23Sb se utiliza como una medida directa de la estequiometría del complejo formado por las dos subunidades del ribosoma.

El mutante *crd1* presentó una ratio 16S:18S menor de 1 lo que sugeriría una disminución en los niveles de la subunidad 30S del clororribosoma. Consistente con este resultado, la ratio 16S:23Sb también fue inferior a 1. Por su parte, *crd2-1* mostró una ratio 23Sb:18S muy inferior a 1, lo que indicaría que se encontraría afectada la subunidad grande 50S. En consonancia con este resultado, la ratio 16S:23Sb mostró un valor muy superior a 1 en *crd2-1*, lo que sugeriría que la estequiometría de ambas subunidades estaría alterada y habría una menor abundancia de la subunidad 50S respecto a la 30S. En cuanto al mutante *crd3*, el resultado más destacable fue una disminución en la ratio 16S:23Sb, que presentó un valor inferior a 1 lo que sugiere una alteración en la estequiometría de ambas subunidades (30S y 50S). Por su parte, en el mutante *crd4* las ratios 16S:18S y 16S:23Sb fueron inferiores a 1, lo que sería compatible con una reducción en los niveles de la subunidad 30S del clororribosoma.

4.4. Diseño y obtención de transgenes

En este trabajo se ha diseñado y obtenido para cada uno de los genes *CRD* un transgén en el que la expresión del gen *CRD* correspondiente queda bajo el control del promotor de expresión constitutiva 35S. El propósito ha sido doble. De una parte, llevar a cabo el rescate fenotípico de los mutantes *crd1*, *crd2-1*, *crd3* y *crd4*, puesto que en los laboratorios de V. Quesada y P. Robles se ha caracterizado hasta la fecha un único alelo mutante de cada uno de los genes *CRD*, a excepción de *CRD2*, que cuenta con un segundo alelo (*crd2-2*) muy poco viable. De otra, transformar plantas silvestres Col-0 con los distintos transgenes obtenidos y comprobar si el exceso de función de alguno de los genes *CRD* ocasiona una alteración en el fenotipo silvestre.

4.4.1. Obtención y clonación de los productos de PCR en un vector de entrada Gateway

Para obtener las construcciones comentadas en el párrafo anterior, hemos utilizado la tecnología Gateway desarrollada por la empresa Invitrogen (www.invitrogen.com) que permite transferir rápida y eficazmente una secuencia de ADN desde un vector en el que se encuentra introducida (vector de entrada) a otros vectores receptores (vectores destino) (véase el apartado 3.13). Se amplificaron mediante PCR las regiones codificantes de los genes *CRD* utilizando como molde ADN genómico de la estirpe silvestre Col-0 así como la polimerasa de ADN Phusion que posee actividad correctora de pruebas y por lo tanto una tasa de error sustancialmente menor que la polimerasa Taq utilizada habitualmente. Hemos diseñado un total de

ocho cebadores para amplificar mediante PCR los genes *CRD*, empleando un cebador *Forward* (F) y otro *Reverse* (R) específicos de cada uno de los genes (véase la Tabla 1 de Anexos). Los productos de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y tras comprobar que sus tamaños correspondían con los esperados se purificaron de los geles de agarosa según se detalla en el apartado 3.13.2. Los productos de PCR purificados se incorporaron al vector de entrada pENTR/D-TOPO (véase el apartado 3.13.3) gracias a la acción de la topoisomerasa I. Con la mezcla de reacción obtenida se transformaron células quimio-competentes de *E. coli* DH5 α que fueron sembradas en medio de cultivo sólido suplementado con el antibiótico kanamicina (véase el apartado 3.13.3). Con el fin de comprobar que las colonias resistentes a la kanamicina que aparecieron en el medio de cultivo portaban el clon de entrada, llevamos a cabo PCR de colonias. Para ello, utilizamos como molde masa bacteriana procedente de las colonias y como cebadores los oligonucleótidos universales M13-*Forward* y M13-*Reverse*, que hibridan con secuencias que flanquean al sitio de clonación de pENTR/D-TOPO, así como combinaciones de éstos con otros específicos de cada gen (véase la Tabla 1 de Anexos). Los productos de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa con el fin de comprobar la presencia de las inserciones en los clones de entrada (Figura 10). Finalmente, se seleccionaron algunos de los clones positivos confirmados y se procedió a la purificación de su ADN plasmídico.

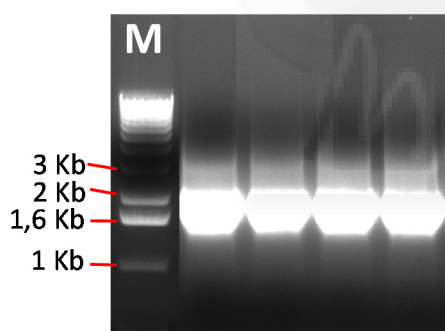


Figura 10. Confirmación de la incorporación de los insertos al vector pENTR/D-TOPO. La imagen corresponde a la electroforesis en un gel de agarosa al 1% m/v teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR obtenidos a partir de colonias de *E. coli* DH5 α resistentes a la kanamicina y portadoras del clon de entrada correspondiente al gen *CRD4*. Se utilizaron los cebadores específicos del gen *CRD4* (At2g33800-ATG-F/-STOP-R). (M) Marcador de peso molecular.

4.4.2. Generación de construcciones de destino

Los insertos presentes en los vectores de entrada pENTR/D-TOPO se transfirieron al vector de destino pMDC32, que incluye dos copias en tándem del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (Figura 3). Dado que ambos tipos de vectores poseen el mismo marcador seleccionable (el gen de resistencia a la kanamicina), procedimos como se indica en el apartado 3.13.4 a la linearización y aislamiento de las construcciones de entrada. A continuación, se llevaron a cabo las reacciones LR entre los clones de entrada linearizados y los vectores de destino (véase el apartado 3.13.4). Con las mezclas de las reacciones LR se transformaron mediante choque térmico células de *E. coli* DH5 α y se inocularon en placas LB con medio de cultivo suplementado con kanamicina. Para cada una de las construcciones se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina y se confirmó la presencia de los insertos en los clones de destino realizando

amplificaciones mediante PCR y utilizando distintas combinaciones de cebadores (Figura 11). A continuación se verificó mediante el método de Sanger la secuencia completa de los insertos presentes en los clones de destino (véase el apartado 3.13.4.1).

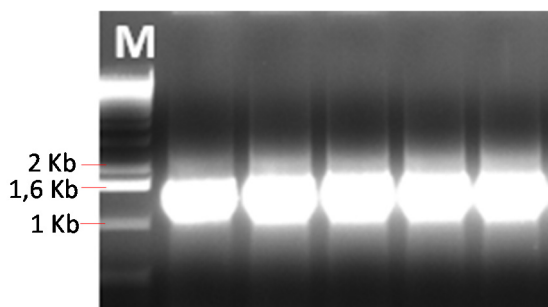


Figura 11. Confirmación de la incorporación de los insertos al vector de destino pMDC32. La imagen corresponde a la electroforesis en un gel de agarosa al 1% m/v teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR obtenidos a partir de colonias de *E. coli* DH5 α resistentes a la kanamicina y portadoras del clon de destino correspondiente al gen *CRD4*. Se utilizaron los cebadores específicos del gen *CRD4* (At2g33800-ATG-F/-STOP-R). (M) Marcador de peso molecular.

4.4.3. Obtención de plantas transgénicas

Para cada una de las construcciones se extrajo, a partir de varias colonias de *E. coli* resistentes a la kanamicina, el ADN plasmídico que contenía los clones de destino. A continuación se transformaron células quimio-competentes de *A. tumefaciens* C58 resistentes a rifampicina y kanamicina, tal y como se detalla en el apartado 3.13.4.2, con las que se inocularon placas de medio de cultivo LB suplementadas con ambos antibióticos. Finalmente, se verificó la presencia de las construcciones *35S-CRD1*, *35S-CRD2*, *35S-CRD3* y *35S-CRD4* mediante PCR de igual modo que se hizo anteriormente para *E. coli* (véase el apartado 3.13.3.1).

A partir de los clones positivos de *A. tumefaciens* (Figura 12) se prepararon cultivos que se emplearon para transformar plantas mutantes *crd1*, *crd2-1*, *crd3* y *crd4* con el fin de llevar a cabo su rescate fenotípico, así como silvestres Col-0, tal y como se detalla en el apartado 3.13.4.3. En el caso de las plantas Col-0, se deseaba comprobar si un exceso de función de alguno de los genes *CRD* ocasionaba una alteración en el fenotipo silvestre. Las semillas T₁ procedentes de la transformación de los mutantes *crd* se recolectaron y sembraron a elevada densidad en medio de cultivo suplementado con el antibiótico higromicina (véase el apartado 3.4.3). Hemos identificado y seleccionado varias plantas resistentes a higromicina, candidatas a portar en su genoma nuclear el transgén que expresa la versión silvestre de un gen *CRD* así como el gen de resistencia al antibiótico. Estos individuos se trasplantaron a maceta y en el momento de redactar esta memoria de TFG todavía no han completado su ciclo de vida.

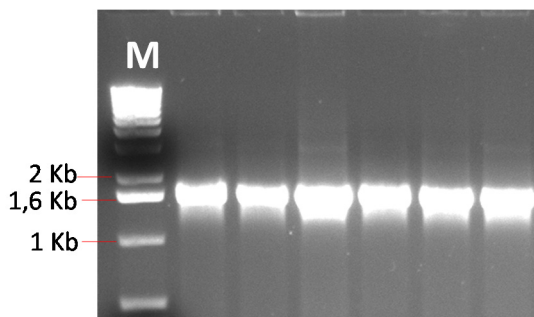


Figura 12. Comprobación mediante PCR de los clones de *A. tumefaciens* transformados con la construcción de destino. Gel de agarosa al 1% m/v teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR obtenidos a partir de colonias de *A. tumefaciens* C58 resistentes a kanamicina y rifampicina y portadoras del clon de destino correspondiente al gen *CRD4*. Se utilizaron combinaciones de los cebadores específicos del gen *CRD4* (At2g33800-ATG-F/-STOP-R) con los cebadores del vector pMDC32. (M) Marcador de peso molecular.

Con posterioridad a este trabajo, una vez estén disponibles las semillas T_2 para su recolección, se procederá a su siembra en placas de Petri y se comprobará si los individuos T_2 procedentes de las plantas mutantes *crd* presentan un fenotipo silvestre, lo que indicará que se ha producido el rescate fenotípico. De igual modo, se estudiarán las plantas silvestres Col-0 transformadas con el fin de identificar eventuales cambios en su fenotipo.

4.5. Escrutinio de líneas de ADN-T portadoras de inserciones en genes que codifican proteínas ribosómicas cloroplásticas

Hemos ampliado el catálogo de mutantes afectados en genes que codifican proteínas del clororibosoma, objeto de estudio en el laboratorio de V. Quesada y P. Robles. Con esta finalidad, se llevó a cabo una nueva búsqueda de alelos insercionales de genes para los que previamente no se habían descrito alelos viables de pérdida de función. Se seleccionaron 20 líneas derivadas de mutagénesis insercional con el ADN-T de *A. tumefaciens*, afectadas en nueve genes que codifican siete proteínas ribosómicas del cloroplasto: una perteneciente a la subunidad pequeña (30S) y seis a la grande (50S) (véase la Tabla 2 de Anexos). Durante el proceso de selección, se procuró que siempre que fuera posible, las líneas elegidas presentasen la inserción del ADN-T en el promotor o en regiones codificantes lo más cercanas posibles al inicio de la traducción. Para cada uno de los genes se seleccionaron al menos dos líneas de ADN-T, excepto en un caso en el que sólo se pudo seleccionar una línea.

Se analizó el fenotipo de las plantas T_3 obtenidas y en 2 de las 20 líneas (N500178 y N511735) aparecieron individuos presuntos mutantes, en una proporción inferior a $\frac{1}{4}$ respecto a las de fenotipo silvestre. De cada una de estas dos líneas, se trasplantaron a maceta todos los individuos presuntamente mutantes aparecidos y varias plantas de fenotipo silvestre hasta totalizar ocho individuos. Para las restantes 18 líneas en las que no apareció ninguna planta con un fenotipo distinto del silvestre, se trasplantaron ocho individuos T_3 con la esperanza de obtener en la siguiente generación (T_4), individuos que mostraran un fenotipo mutante y, por lo tanto, presuntamente homocigóticos para la inserción. En las líneas N500178 y N511735 reaparecieron en la generación T_4 los fenotipos mutantes identificados en T_3 . En estas mismas líneas, en algunas progenies T_4 procedentes de plantas T_3 que presentaron un fenotipo silvestre, aparecieron individuos que mostraron un fenotipo mutante, idéntico al que apareció en las plantas T_3 , junto a otros de tipo silvestre, en una proporción aproximada 3:1 (silvestre:mutante). En algunas de las familias T_4 procedentes de las líneas N510836, N556045, N526825, N818133, N535952 y N634934, que no rindieron fenotipo mutante en T_3 , aparecieron dos clases fenotípicas, una mayoritaria constituida por individuos de fenotipo silvestre y otra minoritaria formada por individuos presuntamente mutantes. En muy pocos casos,

RESULTADOS

como en la línea N526825, la proporción silvestre:mutante se ajustaba a una 3:1 (55 silvestres:19 mutantes, $\chi^2= 0,018$, $P<0,05$).

Los individuos fenotípicamente mutantes identificados fueron de menor tamaño que el silvestre y se clasificaron en dos categorías: aquellos que presentaron una despigmentación generalizada de las hojas (Figura 13, imágenes B-E) y los restantes que mostraron alteraciones morfológicas (Figura 13, imágenes F-I).

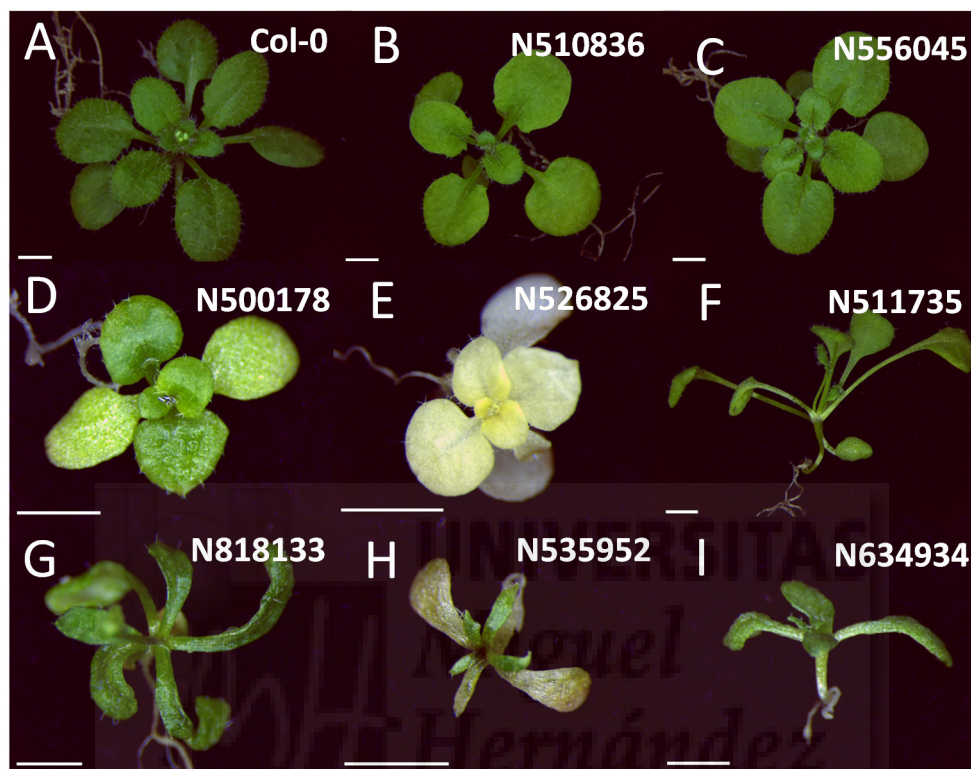


Figura 13. Fenotipos mutantes identificados en las líneas de ADN-T analizadas. Imágenes de un individuo silvestre Col-0 (A), y de los presuntos mutantes afectados en la pigmentación (B-E) o en la morfología corporal (F-I). Las imágenes se tomaron a los 21 dte. Las barras de escala indican en todos los casos 2 mm.

4.6. Estudio de las interacciones genéticas entre las mutaciones *crd* y otras previamente descritas que afectan a la función del clororribosoma

En este trabajo se han realizado cruzamientos entre los mutantes *crd* y otros previamente descritos, afectados en proteínas ribosómicas del cloroplasto [*psrp3/1-1* (*plastid-specific ribosomal protein3/1-1*) y *rps17-1* (*ribosomal protein s17-1*); Tiller et al., 2012] o en funciones relacionadas con las del clororribosoma [*rbf1-1* (*ribosome-binding factor1-1*) y 2; Friested et al., 2014]. El objetivo de estos cruzamientos era identificar eventuales interacciones genéticas que aportaran información sobre las relaciones funcionales entre los genes *CRD* y otros relacionados. En todos los casos, los mutantes seleccionados no fueron solicitados directamente a los autores, sino al NASC como líneas portadoras de alelos insercionales de ADN-T descritas por dichos autores (véase la Tabla 2 de Anexos). Para realizar los cruzamientos, se escogieron aquellas plantas T₃ que presentaron un fenotipo mutante claramente distinguible del silvestre (Figura 14),

RESULTADOS

presuntamente homocigóticas para una inserción de ADN-T en el correspondiente gen (véase la Tabla 2 de Anexos). Hemos comprobado la reproducibilidad de los fenotipos mutantes en la siguiente generación (T₄).

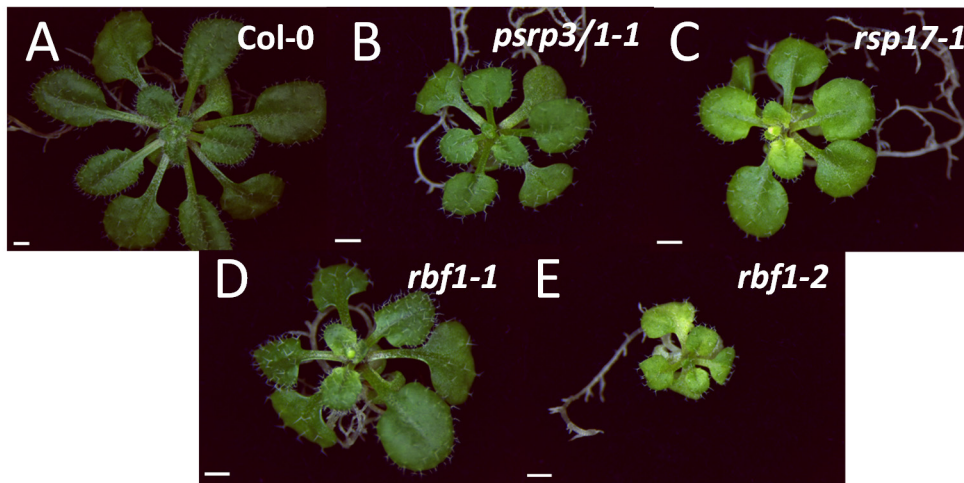


Figura 14. Fenotipos morfológicos de mutantes previamente descritos y afectados en la función del clororribosoma. Imágenes de un individuo silvestre Col-0 (A) y de los mutantes *psrp3/1-1* (B), *rsp17-1* (C), *rbf1-1* (D) y *rbf1-2* (E). Las imágenes se obtuvieron a los 21 dte. Las barras de escala indican en todos los casos 1 mm.

En el momento de redactar esta memoria se han obtenido las semillas F₂ derivadas de los siguientes cruzamientos: *rbf1-1* x *crd1*, *rbf1-1* x *crd2-1*, *rbf1-1* x *crd3*, *rbf1-1* x *crd4*, *rbf1-2* x *crd1*, *rbf1-2* x *crd2-1*, *rbf1-2* x *crd3*, *rbf1-2* x *crd4*, *psrp3/1-1* x *crd1*, *psrp3/1-1* x *crd2-1*, *psrp3/1-1* x *crd3*, *psrp3/1-1* x *crd4*, *rsp17-1* x *crd1*, *rsp17-1* x *crd2-1*, *rsp17-1* x *crd3* y *rsp17-1* x *crd4*. En todos los casos, las plantas F₁ obtenidas mostraron un fenotipo silvestre, como corresponde a dos mutaciones recesivas que afectan a genes distintos. El análisis de las progenies F₂ se realizará con posterioridad a este trabajo.

5. DISCUSIÓN

La mayoría de las proteínas cloroplásticas y mitocondriales están codificadas por genes nucleares, se sintetizan en el citoplasma y se transportan a los orgánulos dónde realizan su función, que en muchos casos se desconoce debido a la ausencia de mutantes afectados en dichos genes. Algunas de estas proteínas participan en la expresión de la información genética de los cloroplastos. Un ejemplo son las proteínas del clororribosoma, algunas codificadas por el genoma nuclear y otras por el cloroplástico. Se han descrito numerosos ejemplos de efectos fenotípicos causados por mutaciones en proteínas de los clororribosomas o de los ribosomas citosólicos (Tiller y Bock, 2014). En *Arabidopsis*, mutaciones en algunos genes que cifran proteínas de la subunidad pequeña (PRPS20) o de la grande (PRPL1, L4, L21, L28 y L35) resultan letales embrionarias, por lo que su función es esencial en el desarrollo embrionario. Por el contrario, otros mutantes como *prps1*, *prps17*, *prpl11* y *prpl24* son viables, aunque presentan una reducción acusada en su crecimiento y pigmentación (Zhang et al., 2016).

En este TFG se ha iniciado la caracterización molecular y funcional de los mutantes *crd*, afectados en proteínas del clororribosoma, los cuales presentan un menor tamaño y grado de pigmentación que su estirpe silvestre (Gea Caselles, 2012; Valderrama Pérez, 2014; Navarro Cartagena, 2015) y una morfología alterada de sus cloroplastos (Quesada y Robles, resultados sin publicar). Los genes *CRD2* y *CRD4*, que codifican las proteínas RPL24 y RPS5 de las subunidades grande y pequeña, respectivamente, han sido estudiados previamente por otros autores (Tiller et al., 2012; Mateo-Bonmatí et al., 2015; Zhang et al., 2016). En este trabajo, nos hemos centrado principalmente en los genes *CRD1* y *CRD3*, que codifican, respectivamente, las proteínas RPL5 y RPL31, de la subunidad grande. Hemos estudiado el efecto que las inserciones de ADN-T tienen sobre la expresión de *CRD1* y *CRD3* en los mutantes *crd1* y *crd3*, respectivamente, y encontrado una disminución estadísticamente significativa en sus niveles de transcritos, comparados con los del silvestre, lo que indica que los alelos *crd1* y *crd3* no son nulos, sino muy probablemente hipomorfos. Esto está en consonancia con las localizaciones de las inserciones de ADN-T, situadas en las regiones 5' (*crd1*) y 3' (*crd3*) no traducidas, y que podrían afectar a la estabilidad de los ARNm. Hemos analizado la expresión de varios genes del genoma del cloroplasto implicados en la fotosíntesis, la traducción o la transcripción en *crd1* y *crd3*. En todos los casos, con la excepción de *rpoC1* en *crd1*, encontramos un aumento significativo en sus niveles de expresión. Estos resultados demuestran que la perturbación de la función del clororribosoma altera la expresión de genes del genoma cloroplástico. Hemos estudiado la expresión de *CRD2*, 3 y 4 en *crd1*, y la de *CRD1*, 2 y 4 en *crd3*, para determinar si la pérdida de función de *CRD1* o *CRD3* altera la expresión de los restantes genes *CRD*. Todos los genes *CRD* analizados se sobreexpresan significativamente en *crd1* y *crd3*, con la excepción de *CRD2* en *crd3* que presentó valores similares al silvestre. Esto sugiere la posible existencia de un mecanismo que intentaría compensar la pérdida de función del gen ribosómico afectado, mediante el aumento de expresión de otros genes cuyos productos también son componentes del clororribosoma. Además, en *crd1* y *crd3* se produjo un descenso en los niveles de transcritos del gen nuclear que cifra la

subunidad pequeña de la enzima Rubisco, debido a la activación de la ruta de señalización retrógrada en respuesta a la alteración en la función ribosómica del cloroplasto.

Hemos cuantificado en los mutantes *crd* y en Col-0, los niveles de los ARNr de las subunidades 50S (ARNr 23S) y 30S (ARNr 16S) de los clororribosomas, puesto que su acumulación estable sólo se produce si se incorporan a la subunidad ribosómica correspondiente. Hemos encontrado una menor abundancia de los ARNr 23Sa y 23Sb en *crd2-1* y del ARNr 16S en *crd1* y *crd4*, mientras que en *crd3* se observó un aumento en los niveles de los ARNr 23Sa y 23Sb. Consistente con estos resultados, los valores de la ratio 23Sb:18S en *crd2-1* fueron similares a los descritos anteriormente para este mutante (Tiller et al., 2012) y sugieren una disminución en los niveles de la subunidad ribosómica 50S, esperable dado que *CRD2* codifica la proteína RPL24 de esta subunidad. Del mismo modo, en *crd1* y *crd4*, los valores de las ratios 16S:18S y 23S:18S sugerirían una menor abundancia de la subunidad 30S. En *crd4* sería esperable, al ser un mutante afectado en una proteína de la subunidad pequeña. No así en *crd1*, en el que está afectada la proteína RPL5 asociada con la subunidad grande del clororribosoma. En cuanto a *crd3*, los resultados sugieren que, como en *crd1*, estaría afectada la subunidad 30S, a pesar de que el producto de *CRD3*, RPL31, forma parte de la subunidad 50S. Podría deberse a una función dual de las proteínas RPL5 y RPL31, que actuarían como componentes estructurales del ribosoma y, además, se requerirían en la expresión de genes cuyos productos forman parte de la subunidad pequeña o bien en su ensamblaje, sin ser componentes de la misma. Se ha propuesto una función reguladora de la expresión génica para la proteína RPL4 de la subunidad 50S del ribosoma de *E. coli* y para sus ortólogas en *Arabidopsis* y la espinaca (Trifa et al., 1998).

En este trabajo se han generado construcciones portadoras de una copia silvestre de los genes *CRD* que se han transferido a individuos mutantes *crd* y silvestres Col-0 con el fin de realizar el rescate fenotípico de los mutantes y analizar el efecto de un exceso de función de los genes *CRD* en Col-0, respectivamente. Con posterioridad a este trabajo se realizará el análisis fenotípico y genotípico de los transformantes obtenidos.

Hemos iniciado el análisis de varias líneas presuntamente portadoras de inserciones de ADN-T en genes que cifran proteínas ribosómicas del cloroplasto y que hasta la fecha no habían sido estudiadas. Esto permitirá ampliar el catálogo de mutantes afectados en proteínas ribosómicas cloroplásticas actualmente en estudio en los laboratorios de V. Quesada y P. Robles. El análisis de los dobles mutantes derivados de los cruzamientos realizados en este trabajo entre los mutantes *crd* y otros descritos previamente y afectados en genes relacionados con la traducción en el cloroplasto, permitirá identificar eventuales interacciones genéticas y definir relaciones funcionales entre los genes afectados.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este TFG se ha iniciado el análisis molecular y funcional de los genes *CRD*, especialmente de *CRD1* y *CRD3*, que hasta la fecha no habían sido caracterizados. Mediante RT-qPCR cuantitativa se ha analizado la expresión de los genes *CDR1* y *CRD3* en *crd1* y *crd3*, respectivamente, y los resultados obtenidos sugieren que los alelos mutantes son probablemente hipomorfos. Por otra parte, los resultados del análisis de la expresión de varios genes cloroplásticos en *crd1* y *crd3*, sugieren que la perturbación de la función del clororribosoma altera la expresión de genes del genoma cloroplástico. De igual modo, se ha estudiado la expresión de cada uno de los restantes genes *CRD* en *crd1* y *crd3*, y la sobreexpresión observada podría interpretarse como una posible compensación de la pérdida de función del gen ribosómico afectado, mediante el aumento de la expresión de otros genes cuyos productos también son componentes del clororribosoma.

Los resultados del análisis de los niveles de los ARNr de las subunidades 50S y 30S de los clororribosomas revelaron alteraciones en todos los mutantes *crd*, lo que nos permite proponer la existencia de posibles cambios en los niveles de las subunidades de los clororribosomas mutantes respecto de los silvestres. De este modo, en *crd2-1* y *crd4* se encontraría alterada la subunidad grande (50S) y pequeña (30S), respectivamente. En el caso de los mutantes *crd1* y *crd3*, nuestros resultados sugerirían una alteración en la subunidad 30S, aunque sus productos proteicos, las proteínas RPL5 (*CRD1*) y RPL31 (*CRD3*), forman parte de la subunidad 50S. Esto podría deberse a una función dual de las proteínas RPL5 y RPL31, que actuarían como componentes estructurales de la subunidad grande y, a su vez, como reguladores de la función o el ensamblaje de los de la pequeña.

Hemos obtenido construcciones para llevar a cabo el rescate fenotípico de los mutantes *crd* y estudiar el efecto de la ganancia de función de los genes *CRD* en el fenotipo silvestre. Con posterioridad a este trabajo se realizará el análisis fenotípico y genotípico de los transformantes obtenidos.

En este TFG se ha ampliado el catálogo de nuevos presuntos mutantes insercionales en genes que codifican proteínas del clororribosoma disponible en el laboratorio, y añadido otros cuatro descritos por autores previos afectados en la función del clororribosoma. Se han identificado ocho nuevos presuntos mutantes, cuatro de ellos presentan la despigmentación característica de los mutantes afectados en proteínas ribosómicas del cloroplasto. Como continuación a este TFG, se llevará a cabo el genotipado mediante PCR de las líneas de ADN-T que han presentado fenotipo presuntamente mutante para corroborar la presencia de la inserción en los genes supuestamente señalizados y se estudiará si reaparecen los fenotipos observados en la siguiente generación. Si esto se confirma, se realizarán cruzamientos entre estos mutantes y los *crd*, al igual que se han realizado entre estos últimos y los cuatro previamente descritos, con el fin de identificar eventuales interacciones genéticas y definir relaciones funcionales entre los genes afectados mediante la generación de dobles mutantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Alonso, J.M., y Ecker, J.R. (2006). Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. *Nat. Rev. Genet.* 7, 524-536.
- Bartoli, C.G., Pastori, G.M., y Foyer, C.H. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol.* 123, 335-344.
- Börner, T., Aleynikova, A.Y., Zubo, Y.O., Kusnetsov, V.V. (2015). Chloroplast RNA polymerases: role in chloroplast biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1847, 761–769.
- Curtis, M.D., y Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133, 462-469.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. y Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep. *Plant Mol. Biol. Reporter* 4, 19-21.
- Fristedt, R., Scharff, L.B., Clarke, C.A., Wang, Q., Lin, C., Merchant, S.S., y Bock, R. (2014). RBF1, a Plant Homolog of the Bacterial Ribosome-Binding Factor RbfA Acts in Processing of the Chloroplast 16S Ribosomal RNA. *Plant Physiol.* 164, 201-215.
- Gea Caselles, F. (2012). Análisis genético de mutantes afectados en proteínas cloroplásticas de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo Fin de Máster.
- Gong, X., Jiang, Q., Xu, J., Zhang, J., Teng, S., Lin, D., y Dong Y. (2013). Disruption of the rice plastid ribosomal protein s20 leads to chloroplast developmental defects and seedling lethality. *G3 (Bethesda)* 3, 1769-1777.
- Gray, M.W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 678-687
- Gueguen, V., Macherel, D., Jaquinod, M., Douce, R., y Bourguignon, J. (2000). Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275, 5016-5025.
- Hess, W. R., y Börner, T. (1999). Organellar RNA polimerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 190, 1–59.
- Huang, M., Friso, G., Nishimura, K., Qu, X., Olinares, P.D., Majeran, W., Sun, Q., y van Wijk, K.J. (2013). Construction of plastid reference proteomes for maize and *Arabidopsis* and evaluation of their orthologous relationships; the concept of orthoproteomics. *J. Proteome Res.* 12, 491–504.
- Igloi, G.L., y Kössel, H. (1992). The transcriptional apparatus of chloroplasts. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 525–558.
- Kanamaru, K., y Tanaka, K. (2004). Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2215-2223.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 913-49.
- Lang, B.F., Gray M.W., y Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 33, 351-397.
- Lee, C.P., Taylor, N.L., y Millar, A.H. (2013). Recent advances in the composition and heterogeneity of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Front Plant Sci.* 4, 4.
- Liere, K., y Maliga, P. (2001). Plastid RNA polymerases in higher plants. En “Regulation of Photosynthesis” (E. M. Aro, Ed.), p. 29–49. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lin, D., Jiang, Q., Zheng, K., Chen, S., Zhou, H., Gong, X., Xu, J., Teng, S., y Dong, Y. (2015). Mutation of the rice ASL2 gene encoding plastid ribosomal protein L21 causes chloroplast developmental defects and seedling death. *Plant. Biol.* 17, 599-607.

- Mader, S. (2009). *Biology*. 10th Edition. Ed. Glencoe/McGraw Hill.
- Manuell, A.L., Quispe, J., y Mayfield, S.P. (2007). Structure of the chloroplast ribosome: novel domains for translation regulation. *PLoS Biol.* 5(8), e209.
- Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., Quesada, V., Hricová, A., Candela, H., y Micol, J.L. (2015). Plastid control of abaxial-adaxial patterning. *Sci. Rep.* 5, 15975.
- Meinke, D. y Koornneef, M. (1997). Community standards for *Arabidopsis*. *Plant J.* 12, 247-253.
- Morita-Yamamuro, C., Tsutsui, T., Tanaka, A., y Yamaguchi, J. (2004). Knock-out of the plastid ribosomal protein S21 causes impaired photosynthesis and sugar-response during germination and seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 781-788.
- Navarro Cartagena, S. (2015). Análisis genético y fenotípico de mutantes *mterf* y *crd* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo Fin de Grado.
- Nishimura, K., Ashida, H., Ogawa, T., y Yokota, A. (2010). A DEAD box protein is required for formation of a hidden break in *Arabidopsis* chloroplast 23S rRNA. *Plant J.* 63, 766-777.
- Pesaresi, P., Varotto, C., Meurer, J., Jahns, P., Salamini, F., y Leister, D. (2001). Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in *Arabidopsis*: effects on mRNA translation and photosynthesis. *Plant J.* 27, 179-189.
- Pyke, K., Zubko, M.K., y Day, A. (2000). Marking cell layers with spectinomycin provides a new tool for monitoring cell fate during leaf development. *J. Exp. Bot.* 51, 1713-1720.
- Rébeillé, F., Macherel, D., Mouillon, J.M., Garin, J., y Douce, R. (1997). Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria. *EMBO J.* 16, 947-957.
- Robles, P., Micol, J.L., y Quesada, V. (2015). Mutations in the plant-conserved MTERF9 alter chloroplast gene expression, development and tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 154, 297-313.
- Robles, P., Micol, J.L. y Quesada, V. (2012a). Unveiling Plant mTERF Functions. *Molecular Plant*. 5-2, 294-296.
- Romani, I., Tadini, L., Rossi, F., Masiero, S., Pribil, M., Jahns, P., Kater, M., Leister, D., y Pesaresi, P. (2012). Versatile roles of *Arabidopsis* plastid ribosomal proteins in plant growth and development. *Plant J.* 72, 922-934.
- Sharma, M.R., Wilson, D.N., Datta, P.P., Barat, C., Schluenzen, F., Fucini, P., y Agrawal, R.K. (2007). Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19315-19320.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., y Small, R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.* 94, 275-288.
- Song, J., Wei, X., Shao, G., Sheng, Z., Chen, D., Liu, C., Jiao, G., Xie, L., Tang, S., y Hu, P. (2014). The rice nuclear gene WLP1 encoding a chloroplast ribosome L13 protein is needed for chloroplast development in rice grown under low temperature conditions. *Plant Mol. Biol.* 84, 301-14.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H., y Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6613-6617.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.

- Tiller, N., Weingartner, M., Thiele, W., Maximova, E., Schöttler, M.A., y Bock, R. (2012). The plastid-specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. *Plant J.* 69, 302-316.
- Tiller, N., y Bock, R. (2014). The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Mol. Plant* 7, 1105-1120.
- Trifa, Y., Privat, I., Gagnon, J., Baeza, L., y Lerbs-Mache, S. (1998). The nuclear RPL4 gene encodes a chloroplast protein that co-purifies with the T7-like transcription complex as well as plastid ribosomes. *J. Biol. Chem.* 273, 3980-3985.
- Valderrama Pérez, M. (2014). Caracterización genética y fisiológica de mutantes *mTERF* y *crd* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo Fin de Máster.
- Walter, M., Piepenburg, K., Schöttler, M.A., Petersen, K., Kahlau, S., Tiller, N., Drechsel, O., Weingartner, M., Kudla, J., y Bock, R. (2010). Knockout of the plastid RNase E leads to defective RNA processing and chloroplast ribosome deficiency. *Plant J.* 64, 851–863.
- Wang, Y., Duby, G., Purnelle, B., y Boutry, M. (2000). Tobacco VDL gene encodes a plastid DEAD box RNA helicase and is involved in chloroplast differentiation and plant morphogenesis. *Plant Cell* 12, 2129-2142.
- Wycliffe, P., Sitbon, F., Wernersson, J., Ezcurra, I., Ellerström, M., y Rask, L. (2005). Continuous expression in tobacco leaves of a *Brassica napus* PEND homologue blocks differentiation of plastids and development of palisade cells. *Plant J.* 44, 1-15.
- Yamaguchi, K., y Subramanian, A.R. (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J. Biol. Chem.* 275, 28466-28482.
- Zhang, J., Yuan, H., Yang, Y., Fish, T., Lyi, S.M., Thannhauser, T.W., Zhang, L., y Li, L. (2016). Plastid ribosomal protein S5 is involved in photosynthesis, plant development, and cold stress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 67, 9, 2731–2744.

ANEXOS



Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

	Gen	Nombre	Secuencias de los oligonucleótidos (5' → 3')	
Genotipado y secuenciación	<i>CRD1</i>	At4g01310-RP/-LP	TCCAACAGCACGATTTTATC	AAATCAAATCAAACGCACGAG
	<i>CRD2</i>	At5g54600-RP/-LP	AACTGCAAACGGATCATTACG	GCAAGAACAAGACATGGGTTC
	<i>CRD3</i>	At1g75350-RP/-LP	TTTCAAATTAGCCGGTGATG	AATAGCCCACACATTGACTG
	<i>CRD4</i>	At2g33800-RP/-LP	AGCAGATTTCTGAACAGCAGC	AATTAACGTTGCTCGTTGGTG
		At2g33800-R2	CGTATAGTGGTGAGAGTATGC	
ADN-T	LBa1-Salk/LB-Salk	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	AGTTGCAGCAAGCGGTCCACGC	
	LB1-Sail/LB4-Sail	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	GCTGGTGGCAGGATATATTG	
Rescate fenotípico y sobreexpresión	<i>CRD1</i>	At4g01310-ATG-F/-STOP-R	CACCATGGCGTCTCCTTCGC	TCATCTCTTTCCTTTTCTTTAG
	<i>CRD2</i>	At5g54600-ATG-F/-STOP-R	CACCATGGCAACCATGTCTG	CTAAGATGCGGAGGTAAC
	<i>CRD3</i>	At1g75350-ATG-F/-STOP-R	CACCATGGCGGTTTCTCTCCC	TCATTTCTTCTCCCTTTGG
	<i>CRD4</i>	At2g33800-ATG-F/-STOP-R	CACCATGGCGACAGCATCAG	TCACTCCAGAGTTCTTCC
	Vectores	M13-F/-R	GTTGTAAAACGACGGCCAGTG	GGAAACAGCTATGACCATGATT
PMDC32-Fnew/-R		CCTTCGCAAGACCCTTCTC	ACATGCTTAACGTAATTCAACAG	
RT-qPCR	<i>CRD1</i>	qAt4g01310-F2/-R2	CAACGGCATCAAACCTGATTC	GATTTCCAAGGTGTGAGTCCC
	<i>CRD2</i>	qAt5g54600-F/-R	CCGTCACTTCTCCGGTCAAG	GCATTTTGTGGAGAATCGGAAG
	<i>CRD3</i>	qAt1g75350-F/-R	CTGCAATTAAGAAAGCCGGTG	TGCAATTCCTTCTACGACACG
	<i>CRD4</i>	qAt2g33800-F/-R	TAATCACCTCTGATCTGTGAG	TGCTGCTGTTCAGAAATCTGC
	<i>ACT2</i>	qAt3G18780-F/-R	GCACCCTGTTCTTCTTACCG	AACCCTCGTAGATTGGCACA
	<i>rbcL</i>	qAtCg00490-F/-R	CTTACTATACTCTGAATATGAA	CCAGTAGAAGATTGAGCAGCTA
	<i>rps18</i>	qAtCg00650-F/-R	GACGGGTGAATAGAGTGACTTT	GGAGTCGACTCACTTCTTTCAA
	<i>psbD</i>	qAtCg00270-F/-R	AACTTCATGGTATACTCATGGATT	CAACAAAGAATGCGCTAAACTATT
	<i>psbA</i>	qAtCg00020-F/-R	GAGCAGCAATGAATGCGATA	CCTATGGGGTGCCTTCTGTA
	<i>CLPP</i>	qAtCg00670-F/-R	GGTTGACATATAACAACCGACTTT	CCATCCACCAGGAGAGTTTATA
	<i>rpoC1</i>	qAtCg00180-F/-R	ATGATCGATCGGTATAAACATC	TCGCAGTATACTAGGCCTTC
	<i>RBCS1A</i>	qAt1g67090-F/-R	GCAGGTGTGGCCTCCGATT	CAACTCGAATTCAACACAAGGAAT

Tabla 2. Líneas de ADN-T en genes que codifican proteínas ribosómicas del cloroplasto estudiadas en este trabajo.

Gen	Proteína	Línea ADN-T	Posición inserción	Referencia	Fenotipo
At1g29070	RPL34	N613878	Exón (único)	ND	Silvestre
		N553787	300-5'UTR	ND	Silvestre
At1g64510	RPS6	N634934	300-5'UTR	ND	Individuos con cotiledones alargados
At1g68590	PSRP3	N510806	1er Exón	Tiller et al., 2012	Individuos más pequeños y despigmentados que el silvestre
At1g79850	RPS17	N566943	300-5'UTR	Tiller et al., 2012	Individuos más pequeños y despigmentados que el silvestre
At3g25920	RPL15	N500178	300-5'UTR	ND	Individuos más pequeños y despigmentados que el silvestre
		N818133	2º Intrón	ND	Individuos pequeños, oscuros y con hojas anormales
At3g27830	RPL12A	N535952	300-5'UTR	ND	Individuos muy pequeños y con hojas filiformes
		N554872	300-5'UTR	ND	Silvestre
At3g27840	RPL12B	N521908	300-5'UTR	ND	Silvestre
		N526825	Exón (único)	ND	Individuos más pequeños y despigmentados que el silvestre
At3g52150	PSRP2	N640803	300-5'UTR	Tiller et al., 2012	Silvestre
At3g54210	RPL17	N647061	1000-Promotor	ND	Silvestre
		N803419	300-5'UTR	ND	Silvestre
		N813680	300-3'UTR	ND	Silvestre
At3g56910	PSRP5	N551891	1er Exón	Tiller et al., 2012	Individuos más pequeños y despigmentados que el silvestre
		N527323	300-5'UTR	ND	Silvestre
At4g17560	RPL19	N556045	300-5'UTR	ND	Individuos despigmentados con rosetas compactas y hojas redondeadas y planas
		N860776	3er Intrón	ND	Silvestre
At4g34370	RBF1	N508178	3er Exón	Fristed et al., 2014	Individuos con la roseta con la parte central despigmentada
		N558490	5'UTR	Fristed et al., 2014	Individuos más pequeños y despigmentados que el silvestre
At5g17870	PSRP6	N802064	Exón (único)	Tiller et al., 2012	Silvestre
At5g47190	RPL19	N511735	4º Exón	ND	Individuos con peciolo e hipocotilo más alargados que el silvestre
		N523092	4º Intrón	ND	Silvestre
		N524584	300-5'UTR	ND	Silvestre
At5g65220	RPL29	N510836	300-3'UTR	ND	Individuos más pequeños y despigmentados que el silvestre
		N822992	300-3'UTR	ND	Silvestre

ND: Líneas no descritas previamente por otros autores.

XIII REUNIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

Oviedo, del 22 al 24 de junio de 2016

Functional characterization of *Arabidopsis* *CRD* genes

Pedro Robles Ramos, Almudena Ferrández Ayela, Eva Núñez Delegido, Moisés Cabanes Martínez y Víctor Quesada Pérez

Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández, 03202, Elche, Alicante, Spain

The *crd* (*chloroplast ribosome defective*) mutants of *Arabidopsis thaliana* were previously isolated in our laboratory in a search for T-DNA mutants presumably affected in the flux of genetic information in the chloroplasts. All the *crd* mutants are loss-of-function alleles of four nuclear genes encoding different chloroplast ribosomal proteins: three of the small subunit (30S) and one of the large one (50S). The *crd* mutants share some common phenotypic traits such as impaired growth, pale leaves, stems and sepals as well as abnormal chloroplasts. In addition, two of them, *crd2* and *crd4* synergistically interact with the *mda1-1* mutant affected in the *mTERF5* gene encoding a mitochondrial transcription termination factor chloroplast-localized¹. We have confirmed that increased paleness of *crd* leaves correlates with reduced levels of chlorophylls. We checked by qRT-PCR transcription of *CRD* genes at different time points in whole plants, finding that their expression decrease 20 days after stratification. In order to investigate, as it may be assumed, if chloroplast function was perturbed in the *crd* mutants, we are conducting molecular analyses at different levels. A quantification of the ribosomal RNA species present in the mutants may indicate specific assembly problems of one or both subunits of the chloro-ribosome and hence altered assembly and/or stability of this organelle². We found that the *crd* mutants showed changes in the 30S:50S ratio: three of them being lower and one higher than the wild type, which is consistent with the physical locations of the affected proteins in each ribosomal subunit. We have also studied by qRT-PCR whether, in addition to potential defects in chloroplast translation, the *crd* mutants showed altered steady-state levels of plastid gene transcripts. Our results revealed that most of the studied genes displayed transcripts levels significantly higher than the wild type, including those of genes involved in photosynthesis, translation or transcription in the organelle. Finally, as part of the functional characterization, we want to study the effects of *CRD* gain of function in wild-type and mutant genetic backgrounds. For this purpose, we are obtaining *CRD* overexpression lines in which the transcription of the *CRD* genes is constitutively driven by the CaMV 35S promoter.

References

¹Robles, P., et al. (2015). Mutations in the plant-conserved MTERF9 alter chloroplast gene expression, development and tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 154: 297–313.

²Tiller, N., et al. (2012). The plastid-specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. *Plant J.* 69: 302-316.

Functional characterization of Arabidopsis CRD genes

Pedro Robles Ramos, Almudena Ferrández-Ayela, Eva Núñez Delegido, Moisés Cabanes Martínez y Víctor Quesada Pérez

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández,
Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain. probles@umh.es

1. INTRODUCTION

The *crd* (chloroplast ribosome defective) mutants of *Arabidopsis thaliana* were previously isolated in our laboratory in a search for T-DNA mutants presumably affected in the flux of genetic information in the chloroplasts. All the *crd* mutants are loss-of-function alleles of four nuclear genes encoding different chloroplast ribosomal proteins: three of the small subunit (30S), *crd4*, and one of the large one (50S), *crd1*, 2 and 3. The *crd* mutants share some common phenotypic traits such as impaired growth, pale leaves, stems, sepals and fruits as well as abnormal chloroplasts. In addition, two of them, *crd2* and *crd4* synergistically interact with the *mda1-1* mutant affected in the *mTERF5* gene encoding a mitochondrial transcription termination factor chloroplast-localized¹.

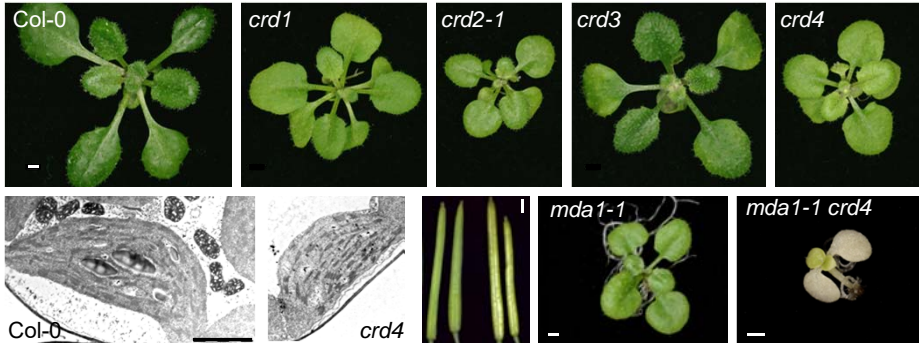


Figure 1. Phenotypes of the *crd* mutants. Upper panel: rosette pictures taken 21 days after stratification (DAS). Scale bar: 1 mm. Lower panel: Transmission electron micrographs showing chloroplasts of the mesophyll of the first vegetative leaves (26 DAS) of wild-type Col-0 and *crd4* (this last one is smaller and do not show starch grains, bar 2 μm). Two Col-0 siliques (left) and two *crd1* which are green pale colored (bar 1 mm). A *mda1-1* mutant plant and a *mda1-1 crd4* double mutant 21 DAS (bars 1 mm).

4. rRNA PROFILES. In order to investigate if chloroplast function was perturbed in the *crd* mutants, we are conducting different molecular analyses. A quantification of the ribosomal RNA (rRNA) species present in the mutants may indicate defects in the biogenesis of the large (50S) versus the small (30S) subunits of the chloro-ribosome². The ratio 16S:23Sb is a measure of the stoichiometry of the 30S and 50S subunits. All the *crd* mutants show changes in this ratio, being lower than one in *crd1*, 3 and 4, and higher in *crd2*. This might reflect specific assembly problems of one or both subunits of the chloro-ribosome and hence altered assembly and/or stability of this organelle in these mutants.

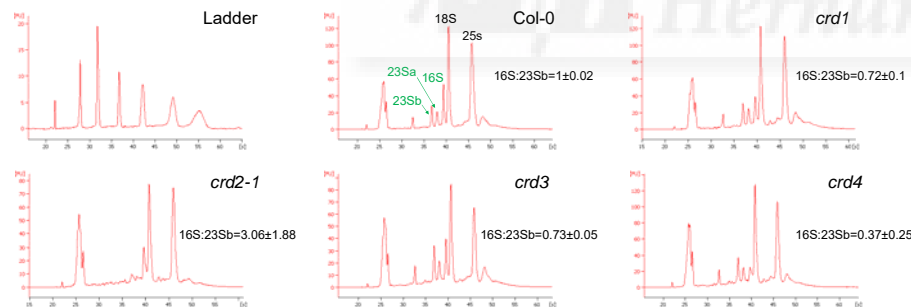


Figure 4. Agilent 2100 Bioanalyzer rRNA profiles of the *crd* mutants. Representative electropherograms of RNA extracted from rosettes of 13 DAS plants. The different ribosomal subunits are indicated on the Col-0 image (rRNA of the chloro-ribosome and the cytosolic ribosome are shown in green and black, respectively). Changes in rRNA accumulation are shown by the ratio 16S:23Sb±SD (data for the calculation comprise three biological samples per genotype). Samples were resolved with the RNA 6000 Pico Kit (Agilent).

5. EXPRESSION OF PLASTID GENES IN THE *crd* MUTANTS

We have also studied by qRT-PCR whether, in addition to potential defects in chloroplast translation, the *crd1* and *crd3* mutants showed altered steady-state levels of different plastid-gene transcripts. Our results revealed that the studied genes displayed transcript levels significantly higher than the wild type, including those of genes involved in photosynthesis (*rbcl*, *psbD* and *psbA*), translation (*rps18*) or transcription (*rpoC1*) in the organelle.

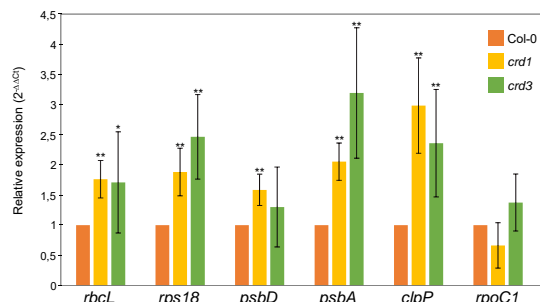


Figure 5. Expression of plastid genes. Relative values were determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method for each gene after normalization with those of the *ACTIN2* gene, and compared with those of Col-0 to which a value of 1 was assigned. Each value correspond to the mean ± SD of three different biological replicates and triplicate reactions. Asterisks indicate a significant difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

REFERENCES

- Robles, P. et al. (2015). *Physiol. Plant.* **154**: 297-313.
- Tiller, N. et al. (2012). *Plant J.* **69**: 302-316.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research has been supported by grants from the Conselleria de Educació, Investigació, Cultura i Esports of the Generalitat Valenciana (GV/2009/058 and AICO/2015) to V. Q. P.

2. CHLOROPHYLL LEVELS

We have confirmed that increased paleness of *crd* leaves correlates with reduced levels of chlorophylls, especially in *crd2*, 3 and 4.

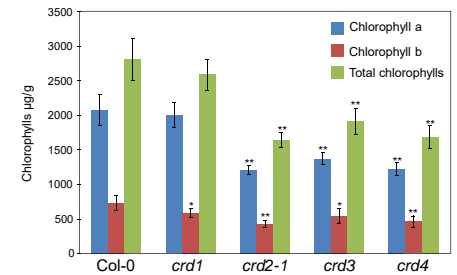


Figure 2. Chlorophyll levels in the *crd* mutants. Bars represent means ± standard deviations (SD) (in micrograms per gram of fresh weight) of 6 independent samples, each containing 80 mg of leaves of 23 DAS plants. Asterisks indicate a significant difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

3. TEMPORAL TRANSCRIPT PROFILE

We checked by qRT-PCR expression of *CRD* genes at different time points of vegetative development in whole plants, finding the lowest levels of transcripts at 20 DAS. For *CRD1* and 4 we found the highest levels of expression at 14 DAS.

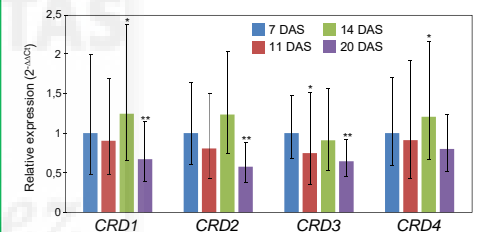


Figure 3. Expression of *CRD* genes. We have used the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The *ACTIN2* gene was used as an internal control. Data are compared with those of the earliest time point recorded (7 DAS), to which a value of 1 was assigned. Each value correspond to the mean ± SD of three different biological replicates and triplicate reactions. Asterisks indicate a significant difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

6. OVEREXPRESSION LINES

As part of the functional characterization, we want to study the effects of CRD gain of function in wild-type and mutant genetic backgrounds. For this purpose, we are obtaining *CRD* overexpression lines in which the transcription of the *CRD* genes is constitutively driven by the CaMV 35S promoter.

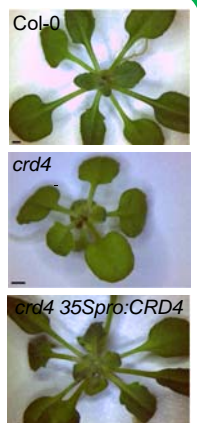


Figure 6. An example of one overexpression line. Rosette pictures showing the phenotypic rescue of the *crd4* mutant with the *35S:proCRD4* construct. Pictures were taken 21 DAS. Scale bars indicate 1 mm.

7. FUTURE WORK

In order to complete the functional characterization of the *crd* mutants we will perform:

- Double mutant analysis at the rRNA level.
- Determination of the expression profile of nuclear genes coding chloroplast proteins.
- Generation of transgenic lines for the study of the subcellular localization of the CRD proteins.