



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

Interacciones genéticas del gen *PHAX* de *Arabidopsis thaliana*



Anastasija Pju-Kovrova

Tutoras:

María Rosa Ponce Molet

Sara Fontcuberta Cervera

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2023-2024

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

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

HACEMOS CONSTAR:

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



María Rosa Ponce Molet



Sara Fontcuberta Cervera

Elche, 20 de junio de 2024.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	1
II.- INTRODUCCIÓN.....	2
II.1.- <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo en investigación vegetal.....	2
II.2.- La biogénesis del ribosoma eucariótico citoplásmico.....	2
II.3.- Los efectos de las alteraciones en la biogénesis del ribosoma y el papel de ANAC082 como regulador de la respuesta al estrés nucleolar en las plantas.....	3
II.4.- Los snoARN y snARN, y el papel de las proteínas PHAX de los metazoos en su maduración.....	4
II.5.- La importancia del análisis de interacciones genéticas.....	5
III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	7
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria.....	8
IV.1.1.- Nomenclatura genética.....	8
IV.1.2.- Citas bibliográficas.....	9
IV.2.- Estirpes empleadas en este trabajo.....	9
IV.3.- Condiciones de cultivo de <i>Arabidopsis</i>	9
IV.3.1.- Cultivo en placa de Petri.....	9
IV.3.2.- Cultivo en maceta y recolección de semillas.....	10
IV.4.- Cruzamientos.....	11
IV.5.- Disoluciones.....	12
IV.5.1.- Medios de cultivo para <i>Arabidopsis</i>	12
IV.5.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general.....	13
IV.5.2.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico.....	13
IV.5.2.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	13
IV.6.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	14
IV.6.1.- Aislamiento de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i>	14
IV.6.2.- Genotipado de alelos insercionales y mutaciones puntuales.....	14
IV.6.2.1.- Amplificaciones mediante PCR.....	14
IV.6.2.2.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	15
IV.6.2.3.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN.....	15
IV.7.- Microfotografía y morfometría.....	16
V.- RESULTADOS.....	18
V.1.- Análisis de interacciones genéticas de <i>PHAX</i>	18
V.1.1.- Análisis de familias F ₂	18

V.1.2.- Análisis de familias F ₃	20
V.1.2.1.- Interacción genética de <i>PHAX</i> con <i>MTR4</i>	22
V.1.2.2.- Interacción genética de <i>PHAX</i> con <i>PARL1</i>	23
V.1.2.3.- Interacción genética de <i>PHAX</i> con <i>RRP7</i>	24
V.1.2.4.- Interacción genética de <i>PHAX</i> con <i>SMO4</i>	25
V.1.2.5.- Interacción genética de <i>PHAX</i> con <i>RPS24B</i>	26
V.1.2.6.- Interacción genética de <i>PHAX</i> con <i>MAS2</i>	27
V.1.2.7.- Interacción genética de <i>PHAX</i> con <i>PRP8</i>	29
V.1.2.8.- Interacción genética de <i>PHAX</i> con <i>CXIP4</i>	30
V.2.- Análisis de interacciones genéticas de <i>ANAC082</i>	31
V.2.1.- Obtención del mutante insercional <i>anac082</i>	31
V.2.2.- Cruzamiento de <i>anac082</i> por mutantes de genes que codifican FBR o PR	32
VI.- DISCUSIÓN	34
VII.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	36
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	37



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema del procesamiento de los pre-snoARN y pre-snARN en los metazoos	6
Figura 2.- Esquema general del genotipado de las inserciones de ADN-T	15
Figura 3.- Estructura de los genes <i>PHAX</i> , <i>MTR4</i> , <i>PARL1</i> , <i>RRP7</i> , <i>SMO4</i> , <i>RPS24B</i> , <i>MAS2</i> , <i>PRP8</i> y <i>CXIP4</i> , y naturaleza molecular de los alelos mutantes empleados en este TFG	20
Figura 4.- Genotipado de los mutantes parentales utilizados en los cruzamientos	21
Figura 5.- Fenotipo morfológico del sesquimutante <i>mtr4-2/mtr4-2;PHAX/phax-1</i>	22
Figura 6.- Fenotipo morfológico del sesquimutante <i>parl1-2/parl1-2;PHAX/phax-2</i>	23
Figura 7.- Fenotipo morfológico del sesquimutante <i>rrp7-1/rrp7-1;PHAX/phax-2</i>	25
Figura 8.- Fenotipo morfológico del doble mutante <i>smo4-3 phax-2</i>	26
Figura 9.- Fenotipo morfológico del sesquimutante <i>rps24b-2/rps24b-2;PHAX/phax-2</i> ...	27
Figura 10.- Fenotipo morfológico de las plantas <i>amiR-MAS2 phax-2</i>	28
Figura 11.- Fenotipo morfológico del doble mutante <i>prp8-7 phax-2</i>	29
Figura 12.- Fenotipo morfológico del doble mutante <i>cxip4-2 phax-2</i>	30
Figura 13.- Estructura de la unidad de transcripción del gen <i>ANAC082</i> y naturaleza molecular del alelo mutante empleado en este TFG	31
Figura 14.- Fenotipo morfológico y genotipado de la planta F ₁ resultante del cruzamiento entre los mutantes simples <i>anac082</i> y <i>mtr4-2</i>	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Estirpes mutantes de <i>Arabidopsis</i> empleadas en este trabajo	12
Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados como cebadores en este trabajo	16



I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

En este Trabajo de Fin de Grado se ha contribuido a la caracterización funcional de la proteína PHOSPHORYLATED ADAPTOR FOR RNA EXPORT (PHAX) de Arabidopsis. Para ello, se ha continuado con el trabajo iniciado en el laboratorio en relación con el análisis de interacciones genéticas entre dos alelos presuntamente hipomorfos del gen *PHAX* (*phax-1* y *phax-2*), y otros nulos o hipomorfos de genes que codifican factores de la biogénesis del ribosoma y proteínas ribosómicas (*mtr4-2*, *parl1-2*, *rrp7-1*, *smo4-3* y *rps24b-2*), o factores relacionados con el *splicing* (*amiR-MAS2*, *prp8-7* y *cxip4-2*). La ausencia de dobles mutantes en las familias F₂ y F₃ de la mayoría de los cruzamientos analizados, y el fenotipo sinérgico o epistático de aquellos pocos que se han identificado, revelan una relación funcional entre los genes a estudio. Por otro lado, se ha aislado un mutante nulo del gen *ANAC082*, que codifica un factor de transcripción que regula la respuesta al estrés nucleolar en Arabidopsis. Se han iniciado los cruzamientos con los mutantes *phax* y algunos de los anteriormente mencionados, con el fin de descubrir si los fenotipos de estos mutantes se suprimen en los dobles mutantes, como ocurre con otros mutantes de genes que codifican factores implicados en la traducción.

Palabras clave: Arabidopsis, biogénesis del ribosoma, *splicing*, PHAX, ANAC082, análisis de interacciones genéticas

In this Final Degree Project, we have contributed to the functional characterization of the PHOSPHORYLATED ADAPTOR FOR RNA EXPORT (PHAX) protein in Arabidopsis. For this purpose, we have continued the analysis of genetic interactions, previously initiated in the laboratory, between two putative hypomorphic alleles of the *PHAX* gene (*phax-1* and *phax-2*), and other null or hypomorphic alleles of genes encoding ribosome biogenesis factors and ribosomal proteins (*mtr4-2*, *parl1-2*, *rrp7-1*, *smo4-3*, and *rps24b-2*), or factors related to splicing (*amiR-MAS2*, *prp8-7*, and *cxip4-2*). The absence of double-mutant plants in the F₂ and F₃ of most of the analyzed crosses, and the synergistic or epistatic phenotype of the few identified double mutants, reveal a functional relationship between the genes under study. Additionally, a null mutant of the *ANAC082* gene, which encodes a transcription factor that regulates the nucleolar stress response in Arabidopsis, has been isolated. Crosses with the *phax* mutants and some of the aforementioned mutants have been initiated to determine whether the phenotypes of these mutants are suppressed in the double mutants, as occurs with other mutants of genes encoding factors involved in translation.

Keywords: Arabidopsis, ribosome biogenesis, splicing, PHAX, ANAC082, analysis of genetic interactions



II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo en investigación vegetal

Arabidopsis thaliana (en adelante, *Arabidopsis*) es una planta herbácea de la familia de las Brassicáceas, originaria de Europa, Asia y el norte de África. Su uso como sistema modelo en investigación vegetal comenzó a considerarse en la década de los 40, en pleno auge de la biología molecular y la genética, cuando los científicos iniciaron una búsqueda de modelos experimentales más sencillos de manipular y caracterizar. Friedrich Laibach fue quien, en 1943, destacó la utilidad de *Arabidopsis* en investigación y, posteriormente, junto con sus discípulos, identificó algunas de sus características fisiológicas. Tras años de estancamiento, en los años 70 resurgió el interés por *Arabidopsis* gracias a publicaciones en revistas muy prestigiosas y su presentación en conferencias científicas (revisado en Koornneef y Meinke, 2010).

Son varias las características que hacen de esta planta el organismo modelo vegetal por excelencia: su pequeño tamaño y corto ciclo de vida; su capacidad de autopolinización, facilidad de cruce y alta prolificidad; y su genoma pequeño, con unas 135 Mb distribuidas en cinco cromosomas, que fue secuenciado en el año 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Además, existen numerosas bases de datos que recopilan información detallada sobre *Arabidopsis*, entre las que destaca The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>), y varios centros de distribución de semillas de una amplia variedad de estirpes silvestres y mutantes. Los estudios más recientes con *Arabidopsis* se centran en el descubrimiento de nuevos genes y el análisis detallado de otros ya conocidos con distintos fines: agronómicos, como el aumento de la producción y la mejora de la resistencia a distintos estreses abióticos y bióticos; biomédicos, mediante el estudio de genes ortólogos asociados a enfermedades humanas; y de investigación básica, con el objetivo de avanzar en el conocimiento científico de la biología vegetal (Yaschenko *et al.*, 2024).

II.2.- La biogénesis del ribosoma eucariótico citoplásmico

El ribosoma es la maquinaria celular que traduce los ARN mensajeros (ARNm) a proteínas en todos los organismos vivos. En los eucariotas, el ribosoma está altamente conservado, aunque existen algunas diferencias entre los de los metazoos, las plantas y las levaduras. Existen tres tipos de ribosomas eucarióticos: el citoplásmico, que traduce los ARNm de los genes nucleares; el mitocondrial, responsable de la síntesis de las proteínas relacionadas con la respiración celular; y el del cloroplasto, presente solo en los organismos fotosintéticos, como *Arabidopsis*. El ribosoma eucariótico citoplásmico (en adelante, el ribosoma), también conocido como 80S por su coeficiente de sedimentación, está formado

por dos subunidades: la menor o 40S, que se ocupa de decodificar los ARNm para su traducción, y contiene el ARN ribosómico (ARNr) 18S y más de 30 proteínas ribosómicas (PR); y la mayor o 60S, responsable de la actividad peptidiltransferasa del ribosoma, que se compone de los ARNr 28S (en los metazoos) o 25S (en las plantas y las levaduras), 5,8S y 5S, y unas 50 PR (revisado en Cech, 2000).

La biogénesis del ribosoma es un proceso de gran complejidad, que transcurre en el nucleolo, el nucleoplasma y el citoplasma. Demanda una gran cantidad de energía y está rigurosamente regulado, involucrando la síntesis, el ensamblaje y la exportación de todos sus componentes: las tres polimerasas de ARN eucarióticas (ARN pol I, II, y III), los cuatro ARNr, los ARN pequeños nucleolares (snoARN), decenas de PR, y cientos de factores conocidos colectivamente como factores de la biogénesis del ribosoma (FBR). Se inicia en el nucleolo, donde la ARN pol I transcribe el ADNr 47S/45S/35S (en los metazoos, las plantas o las levaduras), cuyas numerosas copias se agrupan en las regiones organizadoras nucleolares (NOR, de Nucleolar Organizer Region). Cada copia del ADNr 47S/45S/35S contiene las secuencias de los ARNr 18S, 5,8S y 28S/25S maduros, separadas por los espaciadores transcritos internos (ITS, de Internal Transcribed Spacer) y flanqueadas en 5' y 3' por los externos (ETS, de External Transcribed Spacer), todos los cuales se escinden mediante una serie de cortes endo- y exonucleolíticos que tienen lugar durante el procesamiento del transcrito primario policistrónico que se genera, el pre-ARNr 47S/45S/35S. Por su parte, la ARN pol II transcribe los genes que codifican las PR, los FBR, y la mayoría de los snoARN. En el nucleoplasma, la ARN pol III transcribe el ADNr 5S, cuyo transcrito primario madura en un proceso relativamente simple, y los genes que dan lugar al resto de los snoARN y a los ARN transferentes (ARNt). Las partículas prerribosómicas pre-40S y pre-60S se forman secuencialmente, exportándose al citoplasma a través de los nucleoporos, donde finaliza su maduración y tiene lugar su ensamblaje para constituir el ribosoma maduro (revisado en Weis *et al.*, 2015; Saéz-Vásquez y Delseny, 2019).

II.3.- Los efectos de las alteraciones en la biogénesis del ribosoma y el papel de ANAC082 como regulador de la respuesta al estrés nucleolar en las plantas

Las alteraciones en la biogénesis del ribosoma o en la función del ribosoma maduro causan diversas patologías humanas hereditarias congénitas, conocidas con el nombre de ribosomopatías, o adquiridas, entre las que destacan distintos tipos de cáncer (revisado en Lafontaine *et al.*, 2021). En *Arabidopsis*, las mutaciones en genes que codifican PR o FBR tienen efectos pleiotrópicos en su desarrollo, y algunas son letales. Los mutantes viables en genes que codifican PR o FBR suelen presentar rasgos fenotípicos comunes: crecimiento

lento y un porte reducido, cotiledones fusionados o triples, hojas de la roseta apuntadas, con márgenes dentados y venación alterada, alteraciones en el momento de la floración, que puede ser temprana o tardía dependiendo del gen afectado, y problemas de fertilidad. A nivel subcelular, la acumulación de PR libres que no llegan a integrarse en los ribosomas, o de pre-ARNr que no pueden ser procesados correctamente por la insuficiencia de función de algunos genes de FBR, causa la hipertrofia del nucleolo y la desorganización y descondensación de la cromatina de los ADNr, un fenómeno que se conoce como estrés nucleolar (revisado en Weis *et al.*, 2015; Ohbayashi *et al.*, 2017; Saéz-Vásquez y Delseny, 2019).

En los metazoos, este tipo de estrés celular estimula distintas rutas de señalización, que inducen la detención del ciclo celular, y en última instancia, la senescencia o la apoptosis. Entre las vías de respuesta al estrés nucleolar que se han descrito, la mejor estudiada es la dependiente del factor de transcripción antitumoral p53, también conocido como el guardián del genoma, que se ha considerado la canónica (Ohbayashi y Sugiyama, 2018; Saéz-Vásquez y Delseny, 2019). En las plantas, no existe un ortólogo de p53, aunque se han descrito varias proteínas con funciones análogas, entre ellas, los factores de transcripción de la familia NAC (NAM [de No Apical Meristem], ATAF [de Arabidopsis Transcription Activation Factor], CUC [de CUp-shaped Cotyledon]). Estos factores presentan en su extremo amino un dominio NAC de unión a ADN de aproximadamente 160 aminoácidos, y desempeñan un papel esencial en el desarrollo y la adaptación de las plantas frente a diversos tipos de estrés, tanto abiótico como biótico (revisado en Wang y Dane, 2013).

Recientemente, se ha demostrado que el factor de transcripción ANAC082 actúa como un regulador clave de la respuesta al estrés nucleolar en las plantas (Ohbayashi *et al.*, 2017; revisado en Ohbayashi y Sugiyama, 2018). En Arabidopsis, este factor de transcripción de la familia NAC está codificado por el gen AT5G09330, que se ha encontrado sobreexpresado en mutantes con alteraciones en la biogénesis del ribosoma, o en la función del ribosoma maduro, y bajo condiciones de estrés nucleolar (Ohbayashi *et al.*, 2017; Sasaki *et al.*, 2023). Además, se ha observado que la insuficiencia de función de ANAC082 suprime el fenotipo morfológico característico de los mutantes afectados en la traducción, sin llegar a mitigar las alteraciones propias de estos mutantes, como la acumulación de pre-ARNr en el nucleolo que no pueden ser procesados (Ohbayashi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

II.4.- Los snoARN y snARN, y el papel de las proteínas PHAX de los metazoos en su maduración

Los snoARN y los ARN pequeños nucleares (snARN) son ARN no codificantes de menos de 300 nucleótidos que transcribe mayoritariamente la ARN pol II, aunque algunos son

transcritos por la ARN pol III. Ambos se transcriben como precursores primarios que deben ser modificados químicamente y procesados en su extremo 3' para dar lugar a los snoARN y snARN maduros, los cuales se ensamblan después con proteínas específicas, formando las ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNP) y nucleares (snRNP), respectivamente (Zhu *et al.*, 2016; revisado en Saéz-Vásquez y Delseny, 2019).

Las snoRNP participan en la biogénesis del ribosoma, facilitando el procesamiento del pre-ARNr 47S/45S/35S (apartado II.2, en la página 2). Algunas snoRNP también participan en la maduración de los snARN, a los que modifican químicamente (Figura 1, en la página 6) (revisado en Henras *et al.*, 2015; Saéz-Vásquez y Delseny, 2019).

Las snRNP participan fundamentalmente en el procesamiento de los precursores de los ARNm (pre-ARNm) o *splicing*. Durante este proceso, imprescindible para la maduración de la mayoría de los ARNm eucarióticos, el espliceosoma, que está formado por snRNP y snARN, corta y elimina las regiones no codificantes (intrones) de los pre-ARNm, y empalma las regiones codificantes (exones) para rendir los ARNm maduros (revisado en Ohtani, 2018).

Las proteínas Phosphorylated Adaptor for RNA Export (PHAX) han sido estudiadas en los metazoos, aunque también se encuentran en las plantas, y participan de forma indirecta en el procesamiento de los precursores de los snoARN (pre-snoARN) y snARN (pre-snARN). PHAX se une a estos ARN a través de un dominio de unión a ARN evolutivamente conservado y se asocia con proteínas implicadas en el transporte de los pre-snoARN del nucleoplasma a los cuerpos de Cajal, o en la exportación del núcleo al citoplasma de los pre-snARN, donde maduran (Segref *et al.*, 2001; Figura 1, en la página 6).

II.5.- La importancia del análisis de interacciones genéticas

El análisis de interacciones genéticas permite descubrir relaciones funcionales entre genes, aun desconociendo su naturaleza molecular. Es un método clásico de la genética, en el que se comparan los fenotipos morfológicos, habitualmente de dobles mutantes, con los de los mutantes simples parentales. La constatación de sinergia o supresión fenotípica en los dobles mutantes revela una relación funcional entre los genes a estudio. Los efectos sinérgicos y supresores son opuestos: en caso de sinergia, el fenotipo de los dobles mutantes es mucho más severo de lo esperado a partir de los efectos aditivos de las mutaciones individuales; mientras que, en caso de supresión, el fenotipo de los dobles mutantes es más suavizado (revisado en Pérez-Pérez *et al.*, 2009).

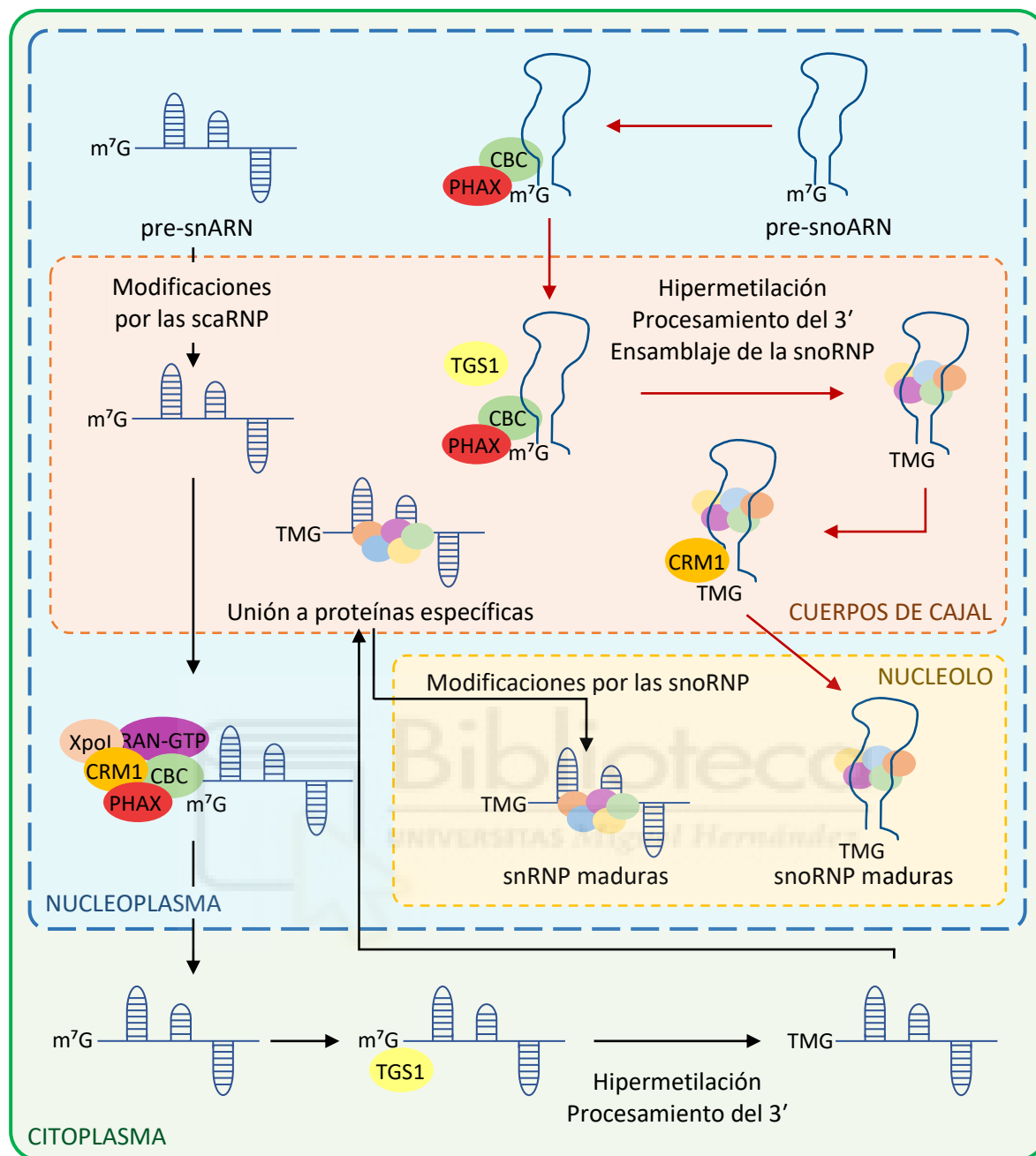


Figura 1.- Esquema del procesamiento de los pre-snoARN y pre-snARN en los metazoos. Tras su transcripción, los pre-snoARN son transportados desde el nucleoplasma a los cuerpos de Cajal, por la interacción del complejo Cap Binding Complex (CBC) y PHAX; allí son modificados químicamente y se unen a proteínas específicas, dando lugar a las snoRNP. Estas son transportadas al nucleolo por el factor Chromosome Region Maintenance 1/Exportin1 (CRM1/XpoI), donde finaliza su maduración. Los pre-snoARN son transportados desde el nucleoplasma a los cuerpos de Cajal, donde un tipo de snoRNP, conocidas como ribonucleoproteínas pequeñas de los cuerpos de Cajal (scaRNP) los modifican, para ser exportados al citoplasma asociados a CBC, que se une también a los factores CRM1/XpoI y Ras-Related Nuclear Protein (Ran)-GTP, por la intermediación de PHAX. Una vez en el citoplasma, los pre-snoARN son hipermetilados por Trimethylguanosine Synthase 1 (TGS1), procesados en 3', y reimportados a los cuerpos de Cajal. Allí, se unen a proteínas específicas, formando las snRNP, que son transportadas al nucleolo, donde concluye su maduración. Modificado ligeramente de Martínez Fenoll (2023).



III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el laboratorio de M.R. Ponce (en adelante, el o nuestro laboratorio) se estudian los mecanismos de silenciamiento génico postranscripcional mediado por microARN (miARN; Jover-Gil *et al.*, 2012), y los de la biogénesis del ribosoma (apartado II.2, en la página 2), utilizando *Arabidopsis* como organismo modelo (apartado II.1, en la página 2) y una aproximación genética. Una parte esencial del análisis genético consiste en el aislamiento y análisis de mutantes de insuficiencia de función total (nulos) o parcial (hipomorfos) de genes de interés, que se cruzan entre sí para analizar el fenotipo de los dobles mutantes y determinar si los genes a estudio están funcionalmente relacionados (apartado II.5, en la página 5).

Siguiendo esta aproximación genética, en nuestro laboratorio, se ha estudiado la función de varios genes que codifican FBR, entre ellos *RIBOSOMAL RNA PROCESSING 7 (RRP7)* y *SMALL ORGAN 4 (SMO4)*, demostrando su participación en la maduración de los ARNr 18S y 5,8S, respectivamente (Micol-Ponce *et al.*, 2018; Micol-Ponce *et al.*, 2020).

En un Trabajo de Fin de Máster (TFM) reciente, se inició la caracterización funcional del gen *PHAX*, que se coexpresa con los genes *RRP7* y *SMO4*, y codifica una proteína presuntamente ortóloga de las PHAX de los metazoos (apartado II.4, en la página 4). Se aislaron dos mutantes insercionales presuntamente hipomorfos para *PHAX*, *phax-1* y *phax-2*, cuyos fenotipos morfológicos fueron muy variables y pleiotrópicos, siendo los más extremos muy aberrantes e inviábiles. Los mutantes *phax* presentaban defectos en el procesamiento del pre-ARNr 45S y en el *splicing* de los pre-ARNm. Además, se inició un análisis de interacciones genéticas, cruzando algunos mutantes de insuficiencia de función de genes que codifican FBR y/o PR (*mtr4-2*, *par11-2*, *rrp7-1*, *smo4-3* y *rps24b-2*) o factores relacionados con el *splicing* (*amiR-MAS2*, *prp8-7* y *cxip4-2*) por las plantas *PHAX/phax-1* y *PHAX/phax-2*, ya que las plantas homocigóticas eran poco viables y casi estériles (Martínez Fenoll, 2023).

En este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se ha intentado establecer si existe alguna relación funcional entre *PHAX* y los genes afectados en los mutantes *mtr4-2*, *par11-2*, *rrp7-1*, *smo4-3*, *rps24b-2*, *amiR-MAS2*, *prp8-7* y *cxip4-2*, analizando el fenotipo de las plantas de las familias F₂ y F₃ de los cruzamientos realizados por Martínez Fenoll (2023). También se ha pretendido contribuir al estudio de la regulación de la biogénesis del ribosoma y los efectos de sus alteraciones en las plantas (apartado II.3, en la página 3). Para ello, se ha obtenido un mutante presuntamente nulo del gen *ANAC082*, que codifica el factor de transcripción que regula positivamente la respuesta frente al estrés nucleolar (Ohbayashi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020), y se ha iniciado un nuevo análisis de interacciones genéticas, cruzando este mutante por otros de insuficiencia de función de genes que codifican FBR y/o PR.



IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

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

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

IV.1.1.- Nomenclatura genética

Se mantiene la nomenclatura de los genes, proteínas y alelos que ha consagrado la comunidad de científicos de cada organismo, que incluye la regla general de que los genes y alelos se escriban en cursiva y las proteínas en tipografía normal. El nombre abreviado de los genes y proteínas de *Arabidopsis* se escribe con mayúsculas (*PHAX* y *PHAX*). Los alelos de un gen se escriben con mayúsculas para el silvestre (*PHAX*) y minúsculas para los mutantes, con un guion seguido de un número para distinguir el alelo (*phax-1* y *phax-2*, los primeros alelos mutantes descritos del gen *PHAX*).

Los genes de *Arabidopsis* también se identifican con un código de letras y números en la forma ATXGYYYYY, sin cursiva. Las letras AT se corresponden con las iniciales del nombre científico de la especie, *Arabidopsis thaliana*. La X hace referencia al cromosoma al que pertenece el gen. La G indica que es un gen nuclear, mientras que los cinco dígitos finales, YYYYYY, se corresponden con el orden en que se encuentra en el cromosoma, con relación al telómero superior. El número asignado a un gen suele diferir del anterior y del posterior en 10 unidades, aunque hay numerosas excepciones. Por ejemplo, al gen *PHAX* le corresponde el

código AT3G20430, y lo flanquean los genes AT3G20420 y AT3G20440.

Por otro lado, no existe una nomenclatura de aceptación general para los genotipos de *Arabidopsis*. En este trabajo, los mutantes homocigóticos se muestran con el nombre del alelo mutante (por ejemplo, *phax-1*) y solo se especifica el genotipo completo, en el que los alelos en cromosomas homólogos se separan con una barra (por ejemplo, *PHAX/phax-1*), cuando fue imprescindible. Se ha utilizado la notación completa para definir un genotipo, con un punto y coma como separador entre cromosomas no homólogos, en los casos de diheterocigotos y sesquimutantes. Así, el genotipo *mtr4-2/mtr4-2;PHAX/phax-1* es el de un sesquimutante, homocigótico para el alelo mutante *mtr4-2* del gen *MTR4* y heterocigótico para el alelo mutante *phax-1* y el silvestre del gen *PHAX*.

IV.1.2.- Citas bibliográficas

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

IV.2.- Estirpes empleadas en este trabajo

En este trabajo se han empleado las estirpes silvestres Columbia-0 (Col-0) y Col-3 de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., y las estirpes mutantes indicadas en la Tabla 1, en la página 12. Las semillas de estas estirpes fueron obtenidas del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC; <https://arabidopsis.info/>), replicadas por autofecundación en nuestro laboratorio, y conservadas en tubos *ependorf* a 4°C.

IV.3.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis

IV.3.1.- Cultivo en placa de Petri

Los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.5.1, en la página 12). La siembra de las semillas de *Arabidopsis* se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 2 min, en etanol al 70% v/v, y después, durante 8 o 10 min, en una disolución acuosa del 40% en

lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 2 ml/l de Triton X-100 al 1% v/v, haciendo al final tres lavados sucesivos con agua estéril. La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Se sembraron 60 semillas por placa, espaciándolas regularmente sobre la superficie del medio con ayuda de una pipeta Pasteur y una plantilla dispuesta bajo la placa. Tras su siembra, las placas de Petri se precintaron con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que supone una barrera efectiva para los aerosoles, sin impedir el intercambio de gases con el exterior. Las placas inoculadas con las semillas se estratificaron durante al menos 24 h en posición invertida, a 4°C y en oscuridad, a fin de sincronizar su germinación, tras lo que fueron cultivadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de luz blanca, suministrada por tubos LED Sylvania ToLEDo T8 V6 2FT 10W 1000LM 840 RL en cámaras de cultivo Conviron TC16 o TC30, en las que el flujo de aire es permanentemente ascendente.

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

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

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

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

Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara climatizada visitable, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de luz blanca, suministrada por tubos LED Sylvania ToLEDo T8 V7 4FT 1000LM 840 RL.

Las bandejas permanecieron subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se hizo dos veces por semana, mediante la adición de una cantidad saturante de medio mínimo ATM (apartado IV.5.1, en la página 12). Cuando la floración se interrumpió, se suspendió el riego, propiciándose el secado de las plantas, que se mantuvieron en la cámara de cultivo al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

Para la recolección de las semillas de una planta seca, fruto de su autofecundación, esta se presionó contra un colador, el cual se sujetó sobre un papel de filtro sobre el que cayeron las semillas. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta, que se acumuló sobre el papel, fue cribada a través de un colador adecuado, para eliminar en lo posible todas las partículas con un tamaño superior al de las semillas. Estas últimas se almacenaron en tubos *ependorf*, que se conservaron a 4°C .

IV.4.- Cruzamientos

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

Para hacer el cruzamiento, se eligió un grupo de capullos florales en el ápice de un tallo inflorescente de la planta que se usó como parental femenino, eliminando las flores maduras, presuntamente autofecundadas, y los capullos, a excepción de aquellos cuyos pétalos fueron apenas visibles. A estos se les extirparon los sépalos, pétalos y estambres inmaduros, obteniendo flores con un pistilo no fecundado como única estructura funcional. Estas manipulaciones se hicieron con unas pinzas de microcirugía esterilizadas por inmersión en etanol al 70% v/v y secadas al aire, para destruir cualquier traza de polen contaminante que pudiera haber. De la planta que se usó como donante de polen se extirpó una flor madura, presionándola con las pinzas a la altura de los sépalos, a fin de poner en contacto varias de sus anteras con el pistilo de la flor receptora del polen. El cruzamiento se señaló adhiriendo al tallo, junto a la flor fecundada, una etiqueta en la que se indicó el genotipo del parental masculino empleado para la polinización. La planta fecundada por este procedimiento fue devuelta a la cámara de cultivo, en la que permaneció hasta la formación y maduración de la silicua, que fue recogida y depositada en un tubo *ependorf* debidamente rotulado.

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

Línea	Fondo	Alelo	Gen	Proteína	Mutágeno, mutación	Efecto en la proteína
<i>qrt1-2</i> ^a	Col-3	<i>qrt1-2</i>	AT5G55590	QRT1	Neutrones, puntual	Truncamiento
SAIL_241_D10 ^b	<i>qrt1-2</i>	<i>phax-1</i>	AT3G20430	PHAX	ADN-T, inserción	Truncamiento
GK-094D08 ^c	Col-0	<i>phax-2</i>	AT3G20430	PHAX	ADN-T, inserción	Truncamiento
SAIL_50_C11 ^{b,d}	<i>qrt1-2</i>	<i>mtr4-2</i>	AT1G59760	MTR4	ADN-T, inserción	Truncamiento
SALK_002764 ^{e,f}	Col-0	<i>parl1-2</i>	AT1G48920	PARL1	ADN-T, inserción	Truncamiento
SAIL_628_F08 ^g	Col-0	<i>rrp7-1</i>	AT5G38720	RRP7	ADN-T, inserción	Truncamiento
SALK_071764 ^{e,h}	Col-0	<i>smo4-3</i>	AT2G40430	SMO4	ADN-T, inserción	Truncamiento
SALK_000766 ^{e,i}	Col-0	<i>rps24b-2</i>	AT5G28060	RPS24B	ADN-T, inserción	Truncamiento
<i>amiR-MAS2</i> ^j	Col-0		AT4G02720	MAS2	ADN-T, inserción ⁿ	Disminución
<i>prp8-7</i> ^k	Col-0	<i>prp8-7</i>	AT1G80070	PRP8	EMS, puntual	G1820E
SALK_044245 ^{e,l}	Col-0	<i>cxip4-2</i>	AT2G28910	CXIP4	ADN-T, inserción	Truncamiento
GK-282H08 ^{c,m}	Col-0	<i>anac082</i>	AT5G09330	ANAC082	ADN-T, inserción	Truncamiento

^aPreuss *et al.*, 1994; Copenhagen *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 2006. ^bSessions *et al.*, 2002. ^cRosso *et al.*, 2003. ^dLange *et al.*, 2011. ^eAlonso *et al.*, 2003. ^fPetricka y Nelson, 2007. ^gMcElver *et al.*, 2001; Micol-Ponce *et al.*, 2018. ^hMicol-Ponce *et al.*, 2020. ⁱHoriguchi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018; Cabezas-Fuster *et al.*, 2023. ^jSánchez-García *et al.*, 2015. ^kSasaki *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2015. ^lAceituno-Valenzuela *et al.*, 2024. ^mKim *et al.*, 2018. Wang *et al.*, 2020. ⁿEn las plantas *amiR-MAS2*, el ADN-T contiene la secuencia de un gen que da lugar a un miARN artificial que silencia parcialmente el gen AT4G02720.

IV.5.- Disoluciones

Todas las disoluciones que se mencionan en este apartado se prepararon utilizando agua desionizada, con una resistividad media de 15 M Ω /mm².m. Además, se conservaron a temperatura ambiente, salvo aquellas para las que se indica una temperatura diferente. Las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a 1 kg/cm² y 121°C durante 20 min. Las sustancias termolábiles fueron esterilizadas mediante filtración forzada por aspiración, a través de filtros Millipore de 0,22 o 0,45 μ m de diámetro de poro.

IV.5.1.- Medios de cultivo para *Arabidopsis*

Medio mínimo ATM (líquido): KNO₃ 5 mM; KH₂PO₄ 2,5 mM; MgSO₄ 2 mM; Ca(NO₃)₂ 2 mM; FeNaEDTA 51 μ M; H₃BO₃ 70 μ M; MnCl₂ 14 μ M; CuSO₄ 0,5 μ M; ZnSO₄ 1 μ M; NaMoO₄ 0,2 μ M; NaCl 10 μ M, y CoCl₂ 0,01 μ M (Kranz y Kirchheim, 1987).

Medio GM (Germination Medium; sólido): NH₄NO₃ 10,3 mM; H₃BO₃ 50,1 μ M; CaCl₂ 1,5 mM; CoCl₂·6H₂O 0,05 μ M; CuSO₄·5H₂O 0,05 μ M; Na₂EDTA 55,4 μ M; MgSO₄ 0,75 mM; MnSO₄·H₂O 50 μ M; NaMoO₄·2H₂O 0,5 μ M; KI 2,5 μ M; KNO₃ 9,4 mM; KH₂PO₄ 0,62 mM; ZnSO₄·7H₂O 15 μ M; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 0,6% m/v de Gelrite.

Para su preparación se añadieron, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa Biochemie; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES. Se agitó la suspensión en un agitador magnético hasta la disolución de sus componentes y se ajustó el pH a 5,7 con KOH 5 M y KOH 1 M (este último sirvió para aproximar el pH lo máximo posible). Posteriormente, se ajustó el volumen final a 1 l, se añadieron 6 g de Gelrite (Duchefa Biochemie), y se esterilizó en autoclave. Tras su esterilización, se mantuvo durante 30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con 15 µg/ml de higromicina B (Invitrogen). Las placas de Petri con medio sólido GM se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida y bien precintadas.

IV.5.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general

IV.5.2.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM pH 8; Na₂EDTA 50 mM, y NaCl 0,5 M. Se preparó a partir de las disoluciones madre Tris-HCl 1 M pH 8; Na₂EDTA 0,5 M pH 8, y NaCl 5 M. Se conservó hasta un mes a 4°C.

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

Acetato de potasio 5 M pH 7,5: Se preparó disolviendo 49,1 g de acetato de potasio (KCH₃COO) en 100 ml de agua, y ajustando el pH a 7,5 con ácido acético glacial en una campana extractora de gases.

Acetato de sodio 3 M pH 5,2: Se preparó disolviendo 12,3 g de acetato de sodio (NaCH₃COO) en 50 ml de agua, y ajustando el pH a 5,2 con ácido acético glacial en una campana extractora de gases. Por último, se esterilizó en autoclave.

IV.5.2.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN en geles de agarosa

Tampón TAE 50x: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de ácido acético glacial, y Na₂EDTA 50 mM. Para preparar 1 l de tampón se mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial, y 100 ml de Na₂EDTA 0,5 M pH 8.

Tampón de carga 6x: 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol, y Na₂EDTA 10 mM.

Marcador de peso molecular: Se diluyó el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder de Invitrogen; 1 µg/µl) en el tampón de carga hasta una concentración de 0,1 µg/µl. Se usaron 10 µl por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conservó a -20°C.

IV.6.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.6.1.- Aislamiento de ADN genómico de *Arabidopsis*

El ADN genómico de *Arabidopsis* empleado como molde en las amplificaciones por PCR (Mullis *et al.*, 1986) se purificó usando una versión simplificada del método de Dellaporta *et al.* (1983). Para ello, se introdujo en un tubo *ependorf* una hoja o cotiledón de la roseta de plantas 14 o 21 dde, y después se añadieron 500 µl de tampón de extracción y 3 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, esterilizadas en autoclave. La muestra se maceró a 30 Hz durante 3 min en un macerador automático (MM400; Retsch). A continuación, se añadieron 35 µl de SDS al 20% m/v, y se incubó la muestra durante 5 min a 65°C. Después, se añadieron 130 µl de KCH₃COO 5 M, incubando la muestra 8 min a 4°C, y centrifugándola durante 10 min a 13.500 rpm en una microfuga. El sobrenadante se transfirió a otro tubo *ependorf*, y se precipitó el ADN, incubando la muestra con 640 µl de isopropanol y 60 µl de NaCH₃COO 3 M durante 10 min a -20°C. Seguidamente, se centrifugó durante 10 min a 12.500 rpm, eliminando el sobrenadante por decantación y lavando el precipitado con 300 µl de etanol al 70% v/v. Se centrifugó otra vez durante 5 min a 13.500 rpm, se retiró el sobrenadante, y se dejó secar el precipitado. Finalmente, se resuspendió el ADN genómico en 30-150 µl de agua (según el material vegetal de partida), y se conservó a -20°C.

IV.6.2.- Genotipado de alelos insercionales y mutaciones puntuales

Los alelos mutantes de los genes de interés se genotiparon de dos formas distintas en función de su naturaleza molecular. Los alelos insercionales *phax-1*, *phax-2*, *mtr4-2*, *par11-2*, *rrp7-1*, *smo4-3*, *rps24b-2*, *cxip4-2* y *anac082* (Tabla 1, en la página 12) se genotiparon por amplificación mediante PCR con un cebador que hibridaba en el borde de la inserción (LB) y otros dos que la flanqueaban e hibridaban en el gen de interés (F y R), tal como se indica en la Figura 2, en la página 15. La mutación puntual de *prp8-7* (Tabla 1, en la página 12) se genotipó mediante secuenciación por el método de Sanger, tras la amplificación mediante PCR de la región del gen que albergaba la mutación.

IV.6.2.1.- Amplificaciones mediante PCR

Las amplificaciones mediante PCR se realizaron en un volumen final de 10 o 20 µl, en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, y en termocicladores Bio-Rad T100. Se usó la polimerasa de ADN termoestable GoTaq G2 Flexi (Promega) a una concentración final de 0,04 U/µl. Los oligonucleótidos empleados como cebadores (Sigma-Aldrich; Tabla 2, en la página 16) y los desoxirribonucleótidos se añadieron a una concentración final de 0,4 µM y 0,2 mM, respectivamente.

Los programas de PCR incluyeron una etapa previa a 94°C durante 3 min, seguida de 35 o 40 ciclos en los que se repitió una fase de 30 s a 94°C para la desnaturalización de los moldes, otra de 30 s a 58°C para la hibridación de los cebadores, y una fase final a 72°C para la polimerización, de duración variable en función del tamaño del fragmento a amplificar, asumiendo que la polimerasa utilizada sintetiza ADN a razón de 1 kb/min. Por último, se programó una etapa, no cíclica, de 7 min a 72°C, para rellenar las moléculas bicatenarias con colas protuberantes en 5'.

IV.6.2.2.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para las electroforesis de ADN se emplearon geles de agarosa al 1% m/v, y como electrolito, TAE 1×, que se preparó a partir de tampón TAE 50× (apartado IV.5.2.2, en la página 13). Se disolvió la agarosa en TAE 1× por calentamiento en un microondas, y una vez enfriada la disolución a 55°C, se añadió bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Las electroforesis se hicieron en cubetas horizontales, a voltaje constante de 100 V, y durante 35 min. Para visualizar las moléculas de ADN, se iluminaron los geles con luz UV de 312 nm, y se tomaron fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

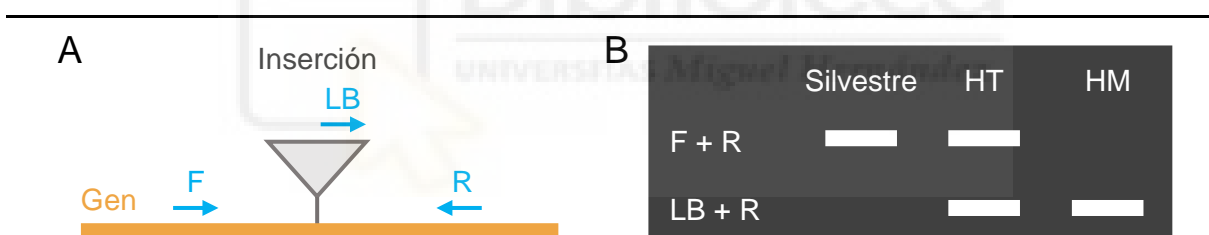


Figura 2.- Esquema general del genotipado de las inserciones de ADN-T. (A) Representación de una inserción (triángulo gris) en un gen de Arabidopsis (rectángulo naranja; no se representan los exones ni los intrones), con indicación de las posiciones de los cebadores F, R y LB empleados (flechas azules). El esquema no está dibujado a escala. (B) Representación de los productos de PCR que pueden obtenerse con las parejas de cebadores que se indican, y que se visualizan mediante su electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. HT: heterocigoto para la inserción. HM: homocigoto para la inserción. Modificado a partir de <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

IV.6.2.3.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

Para las secuenciaciones de ADN se empleó la variante del método de Sanger semiautomatizada, que se basa en el uso de didesoxinucleótidos terminadores marcados con fluorocromos (Smith *et al.*, 1986). Las secuencias fueron obtenidas por la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal), a la que se enviaron muestras de 20 µl de productos de PCR tratados con 1,5 µl de Exonucleasa I (1 U/µl) y 1 µl de FastAp (1 U/µl), ambas de Invitrogen, para la

eliminación de los cebadores y los desoxirribonucleótidos no incorporados durante las PCR. También se enviaron a STAB VIDA alícuotas de 5 µl de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de secuenciación (Tabla 2), a una concentración de 10 µM. Las posiciones ambiguas en las secuencias se esclarecieron mediante la magnificación de los electroferogramas con el programa FinchTV v1.5.0 (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>).

Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados como cebadores en este trabajo

Mutante genotipado	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'→3')
<i>phax-1</i> y <i>phax-2</i>	PHAX-F	TTCCCTTCTCTTGTGCACATC
	PHAX-R	AGACCAATTCATCTCGTGGTG
<i>mtr4-2</i>	MTR4-F	ATTGTCTGCGTACTGTGGGTC
	MTR4-R	TTTGTCAATACCTCGACGTCC
<i>smo4-3</i>	SMO4-F	GTCTCGAACTTTTTCTTGGG
	SMO4-R	AGTATTCCTCGCTTCTCGAGG
<i>parl1-2</i>	PARL1-F	AGTTGCTGTCACCAAGAAG
	PARL1-R	TGGCCTACCATGGAATTCA
<i>rps24b-2</i>	RPS24B-F	CTAATCTATTCTCTGGGCATGG
	RPS24B-R	CAGCCTTGGTCTACACTCAC
<i>cxip4-2</i>	CXIP4-F	GTCGGGGTTGGAGAAGATTAG
	CXIP4-R	TATGGTTCAACGGTGGAGAAG
<i>rrp7-1</i>	RRP7-F	CTCATGAAGAACGCCTTGAAC
	RRP7-R	GTGGAGATCGTGGAGATGAAG
<i>prp8-7</i>	PRP8-F	TGGGCTTGATCTGGCATACAA
	PRP8-R	TAAAACCAAGTGTGGACAGCAG
<i>anac082</i>	ANAC082-F	GTGTGTTACTGTCCTGCCTGC
	ANAC082-R	CTTCTAAGCAAACCTGGAGCTGAG
ADN-T	LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
	LB2	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT
	LB3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

IV.7.- Microfotografía y morfometría

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



V.- RESULTADOS

V.- RESULTADOS

V.1.- Análisis de interacciones genéticas de PHAX

Con el objetivo principal de contribuir al estudio de la posible función de PHAX en el procesamiento de los pre-ARNr y el *splicing* de los pre-ARNm en Arabidopsis, en este TFG se han analizado las familias F₂ y F₃ de cruzamientos realizados previamente en el laboratorio, entre plantas PHAX/*phax-1* y PHAX/*phax-2* y algunos mutantes homocigóticos para alelos de insuficiencia de función de genes que codifican FBR y/o PR (*mtr4-2*, *parl1-2*, *rrp7-1*, *smo4-3* y *rps24b-2*) o factores relacionados con el *splicing* (*prp8-7* y *cxip4-2*). También hemos analizado el cruzamiento con plantas *amiR-MAS2*, portadoras de un miARN artificial que silencia parcialmente *MAS2*, otro gen implicado en el *splicing*.

Para evitar la mezcla de fondos genéticos, lo que habría dificultado el análisis fenotípico de los dobles mutantes o, en su defecto, de los sesquimutantes (homocigóticos para el alelo mutante de uno de los genes y heterocigóticos para el otro), se decidió cruzar el mutante *mtr4-2* por PHAX/*phax-1*, cuya estirpe de procedencia es *qrt1-2*, que está en fondo Col-3, mientras que los otros mutantes se cruzaron por PHAX/*phax-2*, que proceden de la estirpe silvestre Col-0 (Tabla 1, en la página 12). Además, se sembró y genotipó la generación F₁ de todos los cruzamientos realizados, conservando solo las plantas dihíbridas, las cuales se trasplantaron a macetas para que completasen su ciclo de vida (Martínez Fenoll, 2023), momento en que se inició este TFG. Las unidades de transcripción de los genes a estudio se muestran en la Figura 3, en la página 20, así como la naturaleza molecular de los alelos mutantes empleados, que también se indica en la Tabla 1, en la página 12.

V.1.1.- Análisis de familias F₂

Tal como se describe al final del apartado IV.3.2, en la página 10, al inicio de este TFG se recogieron las semillas de las familias F₂ procedentes de la autofecundación de las plantas F₁ dihíbridas de los siguientes cruzamientos: *mtr4-2* × PHAX/*phax-1*, *parl1-2* × PHAX/*phax-2*, *rrp7-1* × PHAX/*phax-2*, *smo4-3* × PHAX/*phax-2*, *rps24b-2* × PHAX/*phax-2*, *amiR-MAS2* × PHAX/*phax-2*, *prp8-7* × PHAX/*phax-2*, y *cxip4-2* × PHAX/*phax-2*. Se sembraron en placas de Petri entre 130 y 230 semillas F₂ de cada cruzamiento, tal como se detalla en el apartado IV.3.1, en la página 9, a fin de analizar el fenotipo morfológico de las plantas resultantes.

Ante la ausencia de plantas F₂ con un fenotipo distinto al de los mutantes simples parentales o sus fondos genéticos 14 dde, se optó por seleccionar entre 15 y 20 plantas que hubieran crecido bien y mostraran el fenotipo de uno de los dos parentales del cruzamiento, las cuales se trasplantaron a macetas y se genotiparon. Como se pretendían aislar dobles mutantes o, en su defecto, sesquimutantes, se genotiparon los genes mutados en los

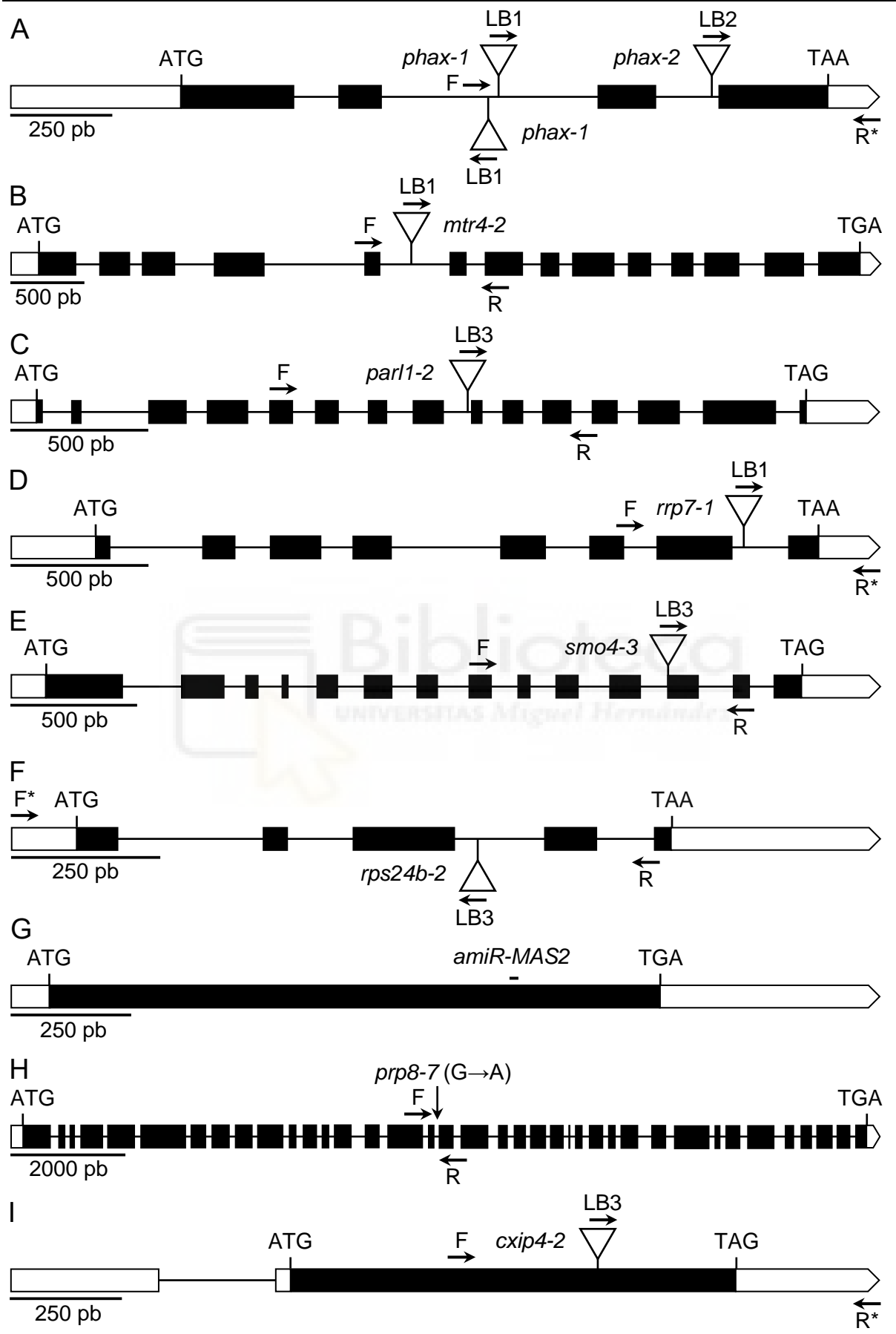


Figura 3.- Estructura de los genes *PHAX*, *MTR4*, *PARL1*, *RRP7*, *SMO4*, *RPS24B*, *MAS2*, *PRP8* y *CXIP4*, y naturaleza molecular de los alelos mutantes empleados en este TFG. (A-I) Unidades de transcripción de los genes (A) *PHAX*, (B) *MTR4*, (C) *PARL1*, (D) *RRP7*, (E) *SMO4*, (F) *RPS24B*, (G) *MAS2*, (H) *PRP8* e (I) *CXIP4*. Los rectángulos de color negro representan los exones, y las líneas que los separan, los intrones. Se indican en color blanco las regiones líder (5'-UTR) y tráiler (3'-UTR). Los triángulos invertidos marcan las inserciones de ADN-T de *phax-1*, *phax-2*, *mtr4-2*, *par1-2*, *rrp7-1*, *smo4-3*, *rps24b-2* y *cxip4-2*; la flecha vertical, la mutación puntual de *prp8-7*; y la línea horizontal, la posición donde hibrida el microARN artificial que silencia parcialmente el gen *MAS2*. Los cebadores empleados (Tabla 2, en la página 16) se indican con flechas horizontales, que no están dibujadas a escala. Además, aquellos que se indican con un asterisco hibridan aguas arriba o aguas abajo del gen.

parentales de cada cruzamiento (Figura 3), tal como se indica en el apartado IV.6.2, en la página 14, y se muestra en la Figura 4, en la página 21.

Para el cruzamiento de *amiR-MAS2* × *PHAX/phax-2*, las semillas F_2 se sembraron en placas de Petri con medio suplementado con higromicina (apartado IV.5.1, en la página 12), seleccionando las plantas resistentes a este antibiótico que no tuviesen fenotipo silvestre; estas plantas serían *amiR-MAS2*, portadoras del transgén productor del miARN artificial que silenciaría la expresión de *MAS2* a nivel postranscripcional (Tabla 1, en la página 12).

Tras el análisis de las familias F_2 se obtuvieron solamente dos dobles mutantes, una planta *amiR-MAS2 phax-2* y otra *prp8-7 phax-2*, que mostraron el mismo fenotipo pleiotrópico y poco viable que el más extremo del mutante simple *phax-2*, y no rindieron semillas. El resto de las plantas F_2 analizadas fueron mutantes simples o sesquimutantes, de las cuales solo aquellas que presentaron en heterocigosis los alelos *phax* fueron viables y produjeron semillas F_3 . La ausencia de prácticamente cualquier doble mutante de los ocho genotipos posibles sugería que eran letales embrionarios, por lo que se decidió confirmar esta sospecha analizando la generación F_3 de plantas F_2 sesquimutantes con la mutación *phax-2* en heterocigosis. Se esperaba que el análisis de las plantas F_3 fuese más sencillo que el de las F_2 , porque se obtendría un menor número de clases fenotípicas, al no aparecer plantas silvestres. Las conclusiones de los análisis de interacciones también serían más robustas al poder identificar un mayor número de dobles mutantes en las F_3 que en las F_2 .

V.1.2.- Análisis de familias F_3

Para el análisis fenotípico de las familias F_3 , se recogieron las semillas resultantes de la autofecundación de las plantas F_2 sesquimutantes, que se sembraron en placas de Petri. Se seleccionaron entre 20 y 25 plantas F_3 con los distintos fenotipos que se encontraron,

se fotografiaron, trasplantaron a macetas y genotiparon para las mutaciones *phax*, ya que las otras se encontraban en homocigosis en las plantas F₂ de procedencia.

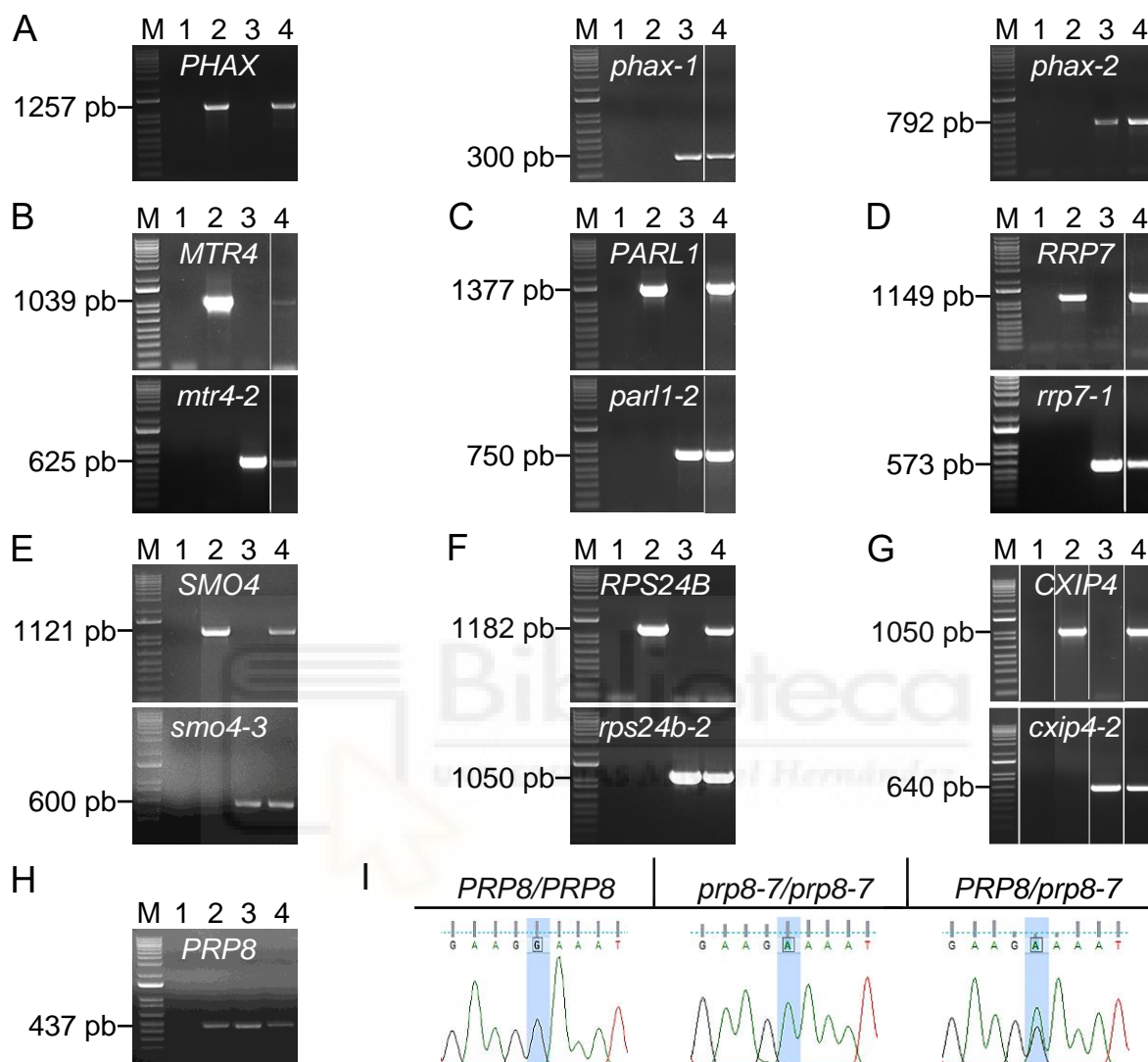


Figura 4.- Genotipado de los mutantes parentales utilizados en los cruzamientos. (A-H) Resultados de las amplificaciones por PCR obtenidas en los genotipados de las inserciones de ADN-T de (A) *phax-1* y *phax-2*, (B) *mtr4-2*, (C) *parl1-2*, (D) *rrp7-1*, (E) *smo4-3*, (F) *rps24b-2* y (G) *cxip4-2*, y (H) al amplificar la región del gen *PRP8* que contiene la mutación puntual *prp8-7*. Las imágenes corresponden a la visualización en un documentador de geles con luz UV, tras la electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 1% m/v, y teñidos con bromuro de etidio. Se representa, de izquierda a derecha, (M) el marcador de peso molecular, (1) el control negativo (PCR sin molde), y el ADN de (2) un homocigoto silvestre, (3) un homocigoto mutante y (4) un heterocigoto. (I) Electroferogramas parciales resultantes de la secuenciación por el método de Sanger de la región que contiene la mutación *prp8-7*, que se destaca en azul. Los electroferogramas corresponden a las secuencias obtenidas con un individuo silvestre, un mutante homocigótico *prp8-7* y un heterocigoto entre el alelo *prp8-7* y el silvestre *PRP8*.

V.1.2.1.- Interacción genética de *PHAX* con *MTR4*

El gen *MTR4* (AT1G59760) codifica una helicasa de ARN que actúa como cofactor del exosoma nuclear durante el procesamiento del pre-ARNr 45S. El mutante nulo *mtr4-2* es viable y fértil pero más pequeño que su estirpe de procedencia, *qrt1-2*, cuyo fondo genético a su vez es Col-3. Las hojas de las rosetas de las plantas *mtr4-2* son apuntadas y, en ocasiones, recurvadas hacia el haz, y acumulan una gran cantidad de antocianinas (Figura 5B, C y F). A nivel molecular, las plantas *mtr4-2* acumulan varios intermediarios del procesamiento del pre-ARNr 45S y el subproducto P-P' que en las plantas silvestres es degradado por el exosoma (Lange *et al.*, 2011; Micol-Ponce *et al.*, 2020).

Con el objetivo de aislar el doble mutante *mtr4-2 phax-1*, se sembraron en placas de Petri 276 semillas F_3 procedentes de la autofecundación de una planta F_2 sesquimutante *mtr4-2/mtr4-2;PHAX/phax-1*, que rindieron 224 plantas con un fenotipo muy similar al del mutante simple *mtr4-2* y siete plantas mucho más pequeñas, algunas de las cuales se parecían bastante al fenotipo más extremo del mutante simple *phax-1*. Además, 45 de las 276 semillas sembradas no germinaron (Figura 5A-F).



Figura 5.- Fenotipo morfológico del sesquimutante *mtr4-2/mtr4-2;PHAX/phax-1*. (A) Fotografía de una placa de Petri en la que se puede observar la segregación fenotípica de las plantas F_3 procedentes de la autofecundación de una planta F_2 *mtr4-2/mtr4-2;PHAX/phax-1*. Se destacan con flechas de distintos colores una planta con el fenotipo del mutante simple *mtr4-2* (morada), una planta mucho más pequeña (naranja) y una semilla no germinada (azul). (B-G) Rosetas de (B) Col-3, (C) *qrt1-2*, (D, E) *phax-1*, (F) *mtr4-2* y (G) *mtr4-2/mtr4-2;PHAX/phax-1*. Las barras de escala representan (A) 1 cm y (B-G) 1 mm. Las fotografías se tomaron 21 dde.

Se seleccionaron 25 plantas, entre ellas las siete más pequeñas, que se fotografiaron, trasplantaron a macetas, y genotiparon por amplificación mediante PCR con los cebadores PHAX-F y PHAX-R, para comprobar la presencia del alelo silvestre *PHAX*, y los cebadores PHAX-F y LB1, para amplificar el alelo insercional *phax-1* (Tabla 2, en la página 16; Figura 3A, en la página 20; Figura 4A, en la página 21). Se identificaron así 16 sesquimutantes *mtr4-2/mtr4-2;PHAX/phax-1* (Figura 5G, en la página 22) y nueve mutantes simples *mtr4-2*. Ninguna planta resultó, por tanto, ser doble mutante.

V.1.2.2.- Interacción genética de *PHAX* con *PARL1*

El gen *PARL1* (AT1G48920), también conocido como *NUCLEOLIN 1* (*NUC1*), codifica una de las dos nucleolinas de *Arabidopsis*, que participa en la regulación de la expresión del ADNr 45S y en el procesamiento del pre-ARNr 45S. El mutante nulo *parl1-2* es bastante más pequeño que su silvestre Col-0, y presenta una roseta con hojas apuntadas que muestran defectos en su patrón de venación (Figura 6B y D). A nivel molecular, las plantas *parl1-2* acumulan distintos pre-ARNr derivados del procesamiento del pre-ARNr 45S (Petricka y Nelson, 2007; Pontvianne *et al.*, 2007).

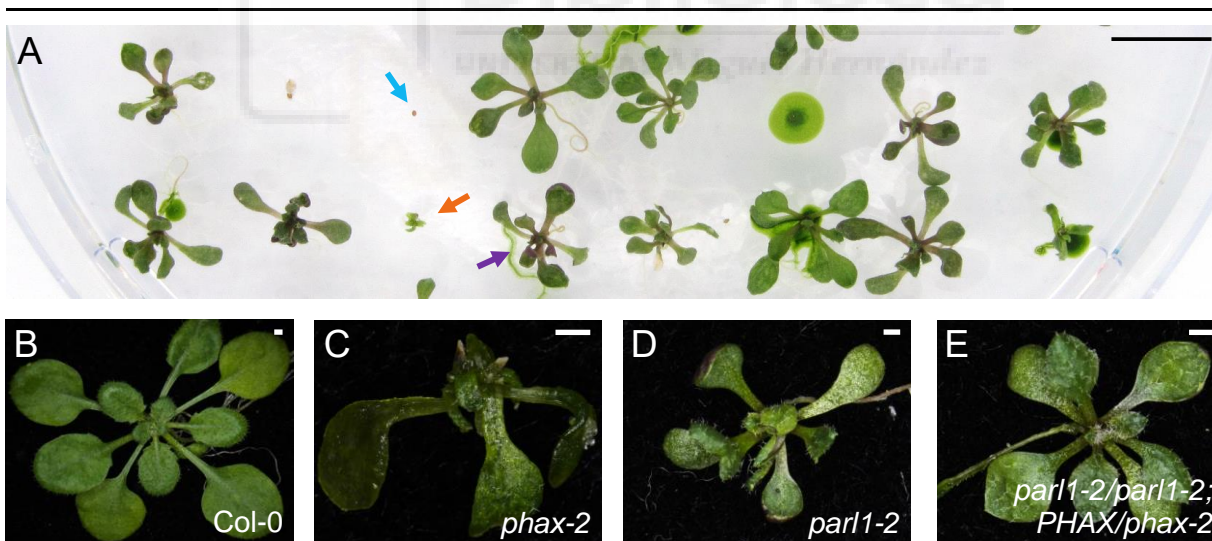


Figura 6.- Fenotipo morfológico del sesquimutante *parl1-2/parl1-2;PHAX/phax-2*. (A) Fotografía de una placa de Petri en la que se puede observar la segregación fenotípica de las plantas F_3 procedentes de la autofecundación de una planta F_2 *parl1-2/parl1-2;PHAX/phax-2*. Se destacan con flechas de distintos colores una planta con el fenotipo del mutante simple *parl1-2* (morada), una planta más pequeña (naranja) y una semilla no germinada (azul). (B-E) Rosetas de (B) Col-0, (C) *phax-2*, (D) *parl1-2* y (E) *parl1-2/parl1-2;PHAX/phax-2*. Las barras de escala representan (A) 1 cm y (B-E) 1 mm. Las fotografías se tomaron 21 dde.

Con el objetivo de aislar el doble mutante *par11-2 phax-2*, se sembraron en placas de Petri 219 semillas F₃ procedentes de la autofecundación de una planta F₂ sesquimutante *par11-2/par11-2;PHAX/phax-2*, que rindieron 179 plantas con el mismo fenotipo que el mutante simple *par11-2* y seis plantas más pequeñas, algunas de las cuales se parecían al mutante simple *phax-2* de fenotipo más extremo. Además, 34 de las 219 semillas sembradas no germinaron (Figura 6A-D, en la página 23).

Se seleccionaron 25 plantas, entre ellas las seis más pequeñas, que se fotografiaron, trasplantaron a macetas, y genotiparon por amplificación mediante PCR con los cebadores PHAX-F y PHAX-R, para comprobar la presencia del alelo silvestre *PHAX*, y los cebadores LB2 y PHAX-R, para amplificar el alelo insercional *phax-2* (Tabla 2, en la página 16; Figura 3A, en la página 20; Figura 4A, en la página 21). Se identificaron así 17 sesquimutantes *par11-2/par11-2;PHAX/phax-2* (Figura 6E, en la página 23) y ocho mutantes simples *par11-2*. Tampoco en esta ocasión se logró aislar un doble mutante.

V.1.2.3.- Interacción genética de *PHAX* con *RRP7*

El gen *RRP7* (AT5G38720) codifica una proteína nucleolar que actúa como un FBR en la maduración del ARNr 18S. El mutante nulo *rrp7-1* es más pequeño que su silvestre Col-0, y presenta una roseta con hojas muy estrechas y apuntadas que muestran un patrón vascular alterado (Figura 7B y D). A nivel molecular, las plantas *rrp7-1* acumulan varios intermediarios del procesamiento del pre-ARNr 45S (Micol-Ponce *et al.*, 2018).

Con el objetivo de aislar el doble mutante *rrp7-1 phax-2*, se sembraron en placas de Petri 127 semillas F₃ procedentes de la autofecundación de una planta F₂ sesquimutante *rrp7-1/rrp7-1;PHAX/phax-2*, que rindieron 112 plantas con un fenotipo muy similar al del mutante simple *rrp7-1*, cinco plantas más grandes y dos más pequeñas, las cuales se parecían al mutante simple *phax-2* de fenotipo más extremo. Además, ocho de las 127 semillas sembradas no germinaron (Figura 7A-D, en la página 25).

Se seleccionaron 25 plantas, entre ellas las cinco más grandes y las dos pequeñas, que se fotografiaron, trasplantaron a macetas, y genotiparon por amplificación mediante PCR, tal y como se describe en el apartado V.1.2.2, en la página 23. Así, se determinó que 15 eran sesquimutantes *rrp7-1/rrp7-1;PHAX/phax-2* (Figura 7E, en la página 25), como su parental, y las diez restantes, el mutante simple *rrp7-1*. De nuevo, no se identificó ningún doble mutante.

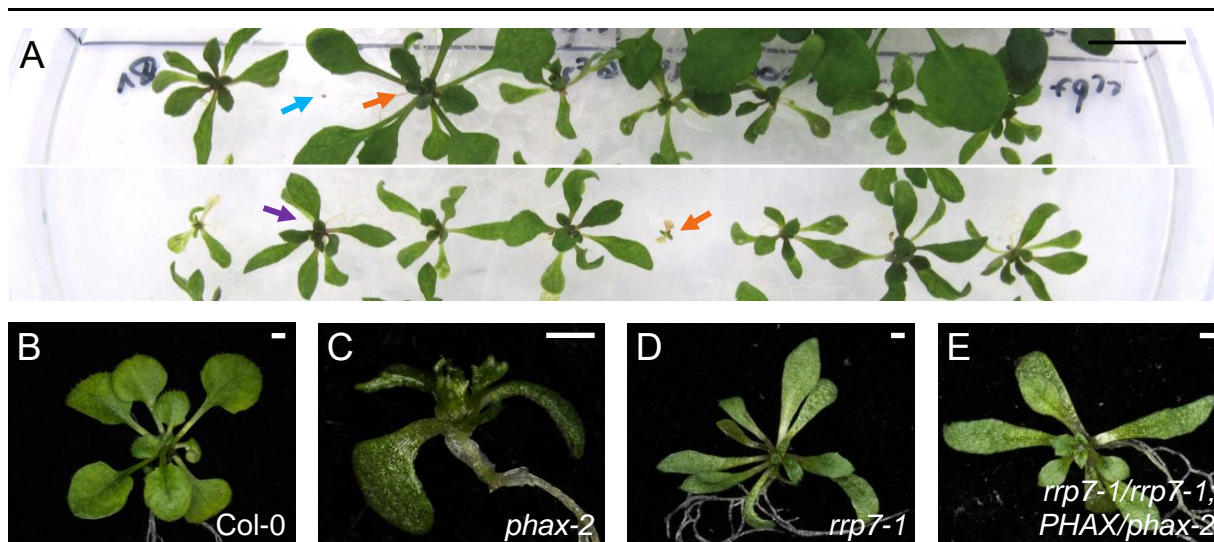


Figura 7.- Fenotipo morfológico del sesquimutante *rrp7-1/rrp7-1;PHAX/phax-2*. (A) Fotografía de una placa de Petri en la que se puede observar la segregación fenotípica de las plantas F_3 procedentes de la autofecundación de una planta F_2 *rrp7-1/rrp7-1;PHAX/phax-2*. Se destacan con flechas de distintos colores una planta con el fenotipo del mutante simple *rrp7-1* (morada), una planta más grande y otra más pequeña (naranja) y una semilla no germinada (azul). (B-E) Rosetas de (B) Col-0, (C) *phax-2*, (D) *rrp7-1* y (E) *rrp7-1/rrp7-1;PHAX/phax-2*. Las barras de escala representan (A) 1 cm y (B-E) 1 mm. Las fotografías se tomaron 21 dde.

V.1.2.4.- Interacción genética de *PHAX* con *SMO4*

El gen *SMO4* (AT2G40430) codifica una proteína nucleocitoplásmica que actúa como un FBR en la maduración del ARNr 5,8S. El mutante nulo *smo4-3* presenta una roseta con hojas algo más apuntadas y dentadas que su silvestre Col-0 (Figura 8B y D, en la página 26). A nivel molecular, las plantas *smo4-3* acumulan distintos intermediarios del procesamiento del pre-ARNr 45S (Micol-Ponce *et al.*, 2020).

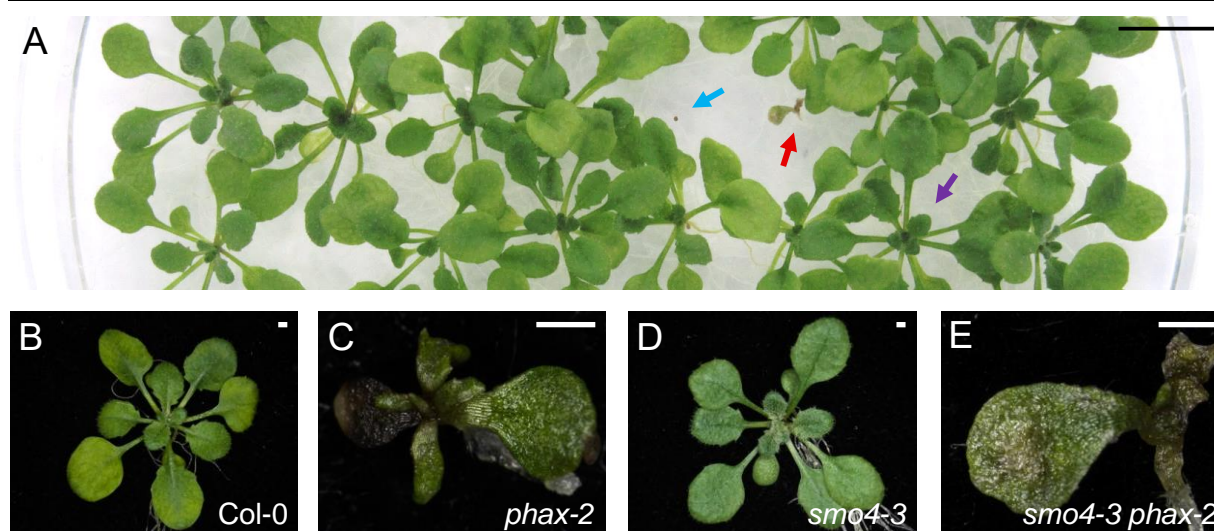


Figura 8.- Fenotipo morfológico del doble mutante *smo4-3 phax-2*. (A) Fotografía de una placa de Petri en la que se puede observar la segregación fenotípica de las plantas F₃ procedentes de la autofecundación de una planta F₂ *smo4-3/smo4-3;PHAX/phax-2*. Se destacan con flechas de distintos colores una planta con el fenotipo del mutante simple *smo4-3* (morada), el doble mutante *smo4-3 phax-2* (roja) y una semilla no germinada (azul). (B-E) Rosetas de (B) Col-0, (C) *phax-2*, (D) *smo4-3* y (E) *smo4-3 phax-2*. Las barras de escala representan (A) 1 cm y (B-E) 1 mm. Las fotografías se tomaron 21 dde.

Con el objetivo de aislar el doble mutante *smo4-3 phax-2*, se sembraron en placas de Petri 276 semillas F₃ procedentes de la autofecundación de una planta F₂ sesquimutante *smo4-3/smo4-3;PHAX/phax-2*, que rindieron 231 plantas con el mismo fenotipo que el mutante simple *smo4-3*, y una planta mucho más pequeña, similar al mutante simple *phax-2* de fenotipo más extremo. Además, 43 de las 276 semillas sembradas no germinaron (Figura 8A-D).

Se seleccionaron 25 plantas, entre ellas la más pequeña y parecida a *phax-2*, que se fotografiaron, trasplantaron a macetas, y genotiparon por amplificación mediante PCR, tal y como se describe en el apartado V.1.2.2, en la página 23. Así, se determinó que 19 plantas eran sesquimutantes *smo4-3/smo4-3;PHAX/phax-2*, cinco eran el mutante simple *smo4-3*, y la única planta más pequeña que era muy similar al mutante *phax-2* de fenotipo más extremo, era el doble mutante *smo4-3 phax-2* (Figura 8E).

V.1.2.5.- Interacción genética de *PHAX* con *RPS24B*

El gen *RPS24B* (AT4G28060) codifica una proteína estructural de la subunidad 40S del ribosoma, que participa como FBR en las primeras etapas de la maduración del ARNr 18S, y probablemente también en la maduración del ARNr 5,8S. El mutante nulo *rps24b-2* es un poco más pequeño que su estirpe silvestre Col-0, y presenta una roseta con hojas ligeramente apuntadas, cloróticas y con márgenes dentados (Figura 9B y D, en la página 27). A nivel molecular, las plantas *rps24b-2* acumulan distintos pre-ARNr resultantes del procesamiento del pre-ARNr 45S (Cabezas-Fuster *et al.*, 2022).

Con el objetivo de aislar el doble mutante *rps24b-2 phax-2*, se sembraron en placas de Petri 230 semillas F₃ procedentes de la autofecundación de una planta F₂ sesquimutante *rps24b-2/rps24b-2;PHAX/phax-2*, que rindieron 173 plantas con el fenotipo del mutante simple *rps24b-2* y 43 con un fenotipo muy similar al de *rps24b-2*, pero bastante más pequeñas. Además, 14 de las 230 semillas sembradas no germinaron (Figura 9A-D, en la página 27).

Se seleccionaron 25 plantas, entre ellas varias de las pequeñas, que se fotografiaron, trasplantaron a macetas, y genotiparon por amplificación mediante PCR, tal y como se detalla en el apartado V.1.2.2, en la página 23. Así, se determinó que nueve eran sesquimutantes

rps24b-2/rps24b-2;PHAX/phax-2 (Figura 9E) y las 16 restantes, el mutante simple *rps24b-2*. Como en los genotipados de plantas F₃ anteriormente detallados, tampoco se identificó un doble mutante, pero en este caso la proporción de sesquimutantes fue mucho menor de lo esperado y que en las otras F₃ analizadas.

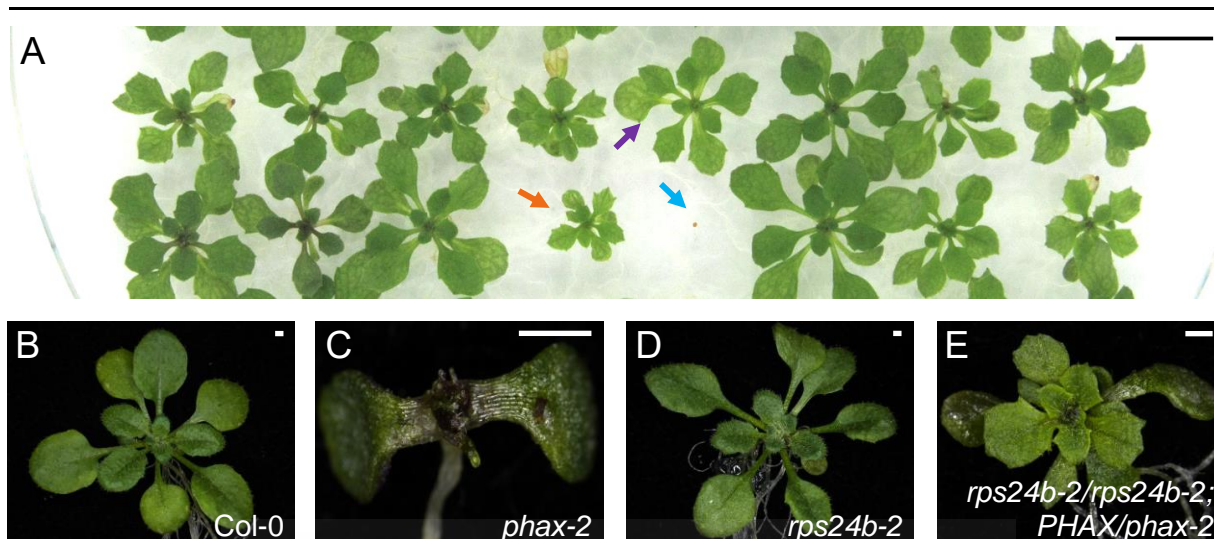


Figura 9.- Fenotipo morfológico del sesquimutante *rps24b-2/rps24b-2;PHAX/phax-2*. (A) Fotografía de una placa de Petri en la que se puede observar la segregación fenotípica de las plantas F₃ procedentes de la autofecundación de una planta F₂ *rps24b-2/rps24b-2;PHAX/phax-2*. Se destacan con flechas de distintos colores una planta con el fenotipo del mutante simple *rps24b-2* (morada), una planta con un fenotipo similar a la anterior pero más pequeña (naranja) y una semilla no germinada (azul). (B-E) Rosetas de (B) Col-0, (C) *phax-2*, (D) *rps24b-2* y (E) *rps24b-2/rps24b-2;PHAX/phax-2*. Las barras de escala representan (A) 1 cm y (B-E) 1 mm. Las fotografías se tomaron 21 dde.

V.1.2.6.- Interacción genética de *PHAX* con *MAS2*

El gen *MAS2* (AT4G02720) es esencial y codifica una proteína nuclear multifuncional, que participa en la regulación de la expresión del ADNr 45S, y en el *splicing* de los pre-ARNm. Los mutantes nulos *mas2-2* y *mas2-3* son letales embrionarios, por lo que en el laboratorio se diseñó un transgén productor de un miARN artificial contra *MAS2*, que lo silencia parcialmente (Sánchez-García *et al.*, 2015). Las plantas *amiR-MAS2* sobreexpresan dicho transgén; estas son un poco más pequeñas que su estirpe silvestre Col-0, y presentan una roseta con hojas apuntadas, cloróticas y con márgenes dentados (Figura 10B y D, en la página 28). El *splicing* de los pre-ARNm se encuentra alterado en las plantas *amiR-MAS2*, que además muestran una acumulación de ARNm en los núcleos celulares (pendiente de publicar).

Con el objetivo de obtener más plantas *amiR-MAS2 phax-2*, se sembraron en placas de Petri con medio suplementado con higromicina 272 semillas F₃ procedentes de la autofecundación de una planta F₂ *amiR-MAS2/amiR-MAS2;PHAX/phax-2*, que rindieron 183

plantas con un fenotipo prácticamente silvestre, 28 plantas con un fenotipo muy similar, tanto en tamaño como en morfología foliar, al de las *amiR-MAS2*, y 19 plantas mucho más pequeñas, que recordaban al mutante simple *phax-2*. Además, 14 de las 272 semillas sembradas no germinaron (Figura 10A-D).

Se seleccionaron 20 plantas, entre ellas seis de las pequeñas, que se fotografiaron, trasplantaron a macetas, y genotiparon por amplificación mediante PCR, tal y como se detalla en el apartado V.1.2.2, en la página 23. Así, se determinó que ocho eran *amiR-MAS2/amiR-MAS2;PHAX/phax-2*, como la planta F₂ de procedencia, seis eran *amiR-MAS2*, y las seis más pequeñas homocigóticas *amiR-MAS2 phax-2* (Figura 10E).

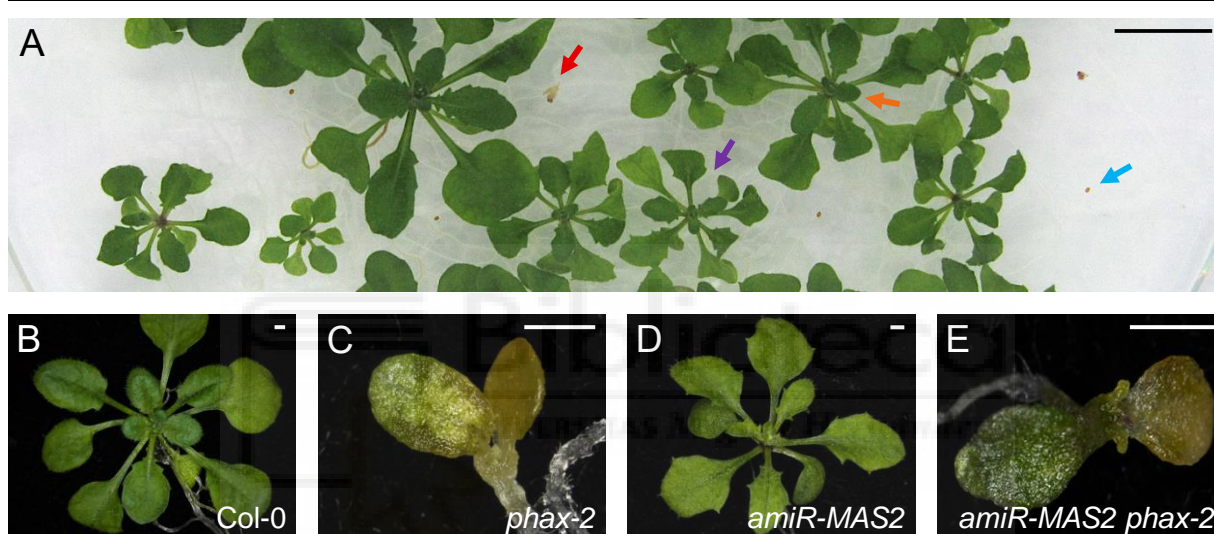


Figura 10.- Fenotipo morfológico de las plantas *amiR-MAS2 phax-2*. (A) Fotografía de una placa de Petri en la que se observa la segregación fenotípica de las plantas F₃ procedentes de la autofecundación de una planta *amiR-MAS2/amiR-MAS2;PHAX/phax-2*. Se destacan con flechas de distintos colores una planta con el fenotipo de *amiR-MAS2* (morada), otra más grande y con un fenotipo casi silvestre (naranja), otra mucho más pequeña que resultó ser homocigótica *amiR-MAS2 phax-2* (roja), y una semilla no germinada (azul). (B-E) Rosetas de (B) Col-0, (C) *phax-2* de fenotipo más extremo, (D) *amiR-MAS2* y (E) *amiR-MAS2 phax-2*. Las barras de escala representan (A) 1 cm y (B-E) 1 mm. Las fotografías se tomaron 21 dde.

El análisis de la interacción entre los genes *PHAX* y *MAS2* se vio dificultado por la presencia de plantas F₃ con un fenotipo casi silvestre, y que, sin embargo, eran capaces de crecer en presencia del antibiótico higromicina, que debería impedir el crecimiento normal de las plantas sin el transgén productor del miARN contra *MAS2*. Una posible explicación para este fenómeno es que el transgén se esté silenciando de alguna forma, lo que impediría llegar a conclusiones definitivas sobre una interacción o no de los dos genes a estudio.

V.1.2.7.- Interacción genética de *PHAX* con *PRP8*

El gen *PRP8* (AT1G80070) es esencial y codifica una proteína muy conservada entre los eucariotas, que forma parte del núcleo catalítico del espliceosoma. El mutante hipomorfo *prp8-7* es un poco más pequeño que su fondo genético Col-0, y presenta una roseta con hojas apuntadas y márgenes dentados (Figura 11B y D). El *splicing* de los pre-ARNm se encuentra alterado en las plantas *prp8-7*, que además muestran una acumulación de ARNm en los núcleos celulares (Cabezas-Fuster *et al.*, 2022).

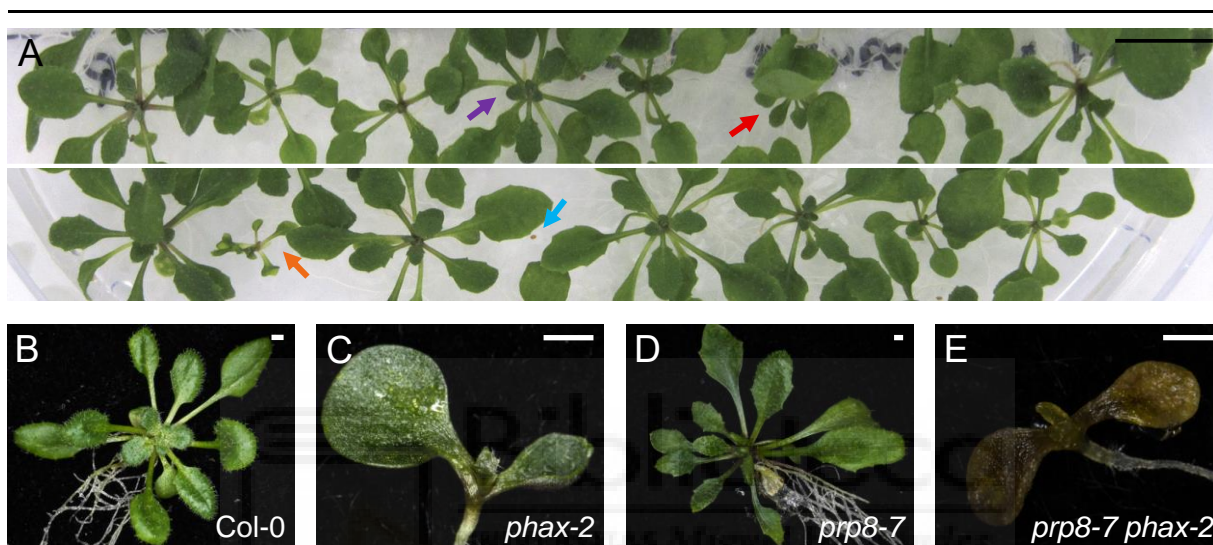


Figura 11.- Fenotipo morfológico del doble mutante *prp8-7 phax-2*. (A) Fotografía de una placa de Petri en la que se observa la segregación fenotípica de las plantas F_3 procedentes de la autofecundación de una planta F_2 *prp8-7/prp8-7;PHAX/phax-2*. Se destacan con flechas de distintos colores una planta con el fenotipo del mutante simple *prp8-7* (morada), una planta con un fenotipo similar a la anterior pero más pequeña (naranja), el doble mutante *prp8-7 phax-2* (roja) y una semilla no germinada (azul). (B-E) Rosetas de (B) Col-0, (C) *phax-2*, (D) *prp8-7* y (E) *prp8-7 phax-2*. Las barras de escala representan (A) 1 cm y (B-E) 1 mm. Las fotografías se tomaron 21 dde.

En la generación F_2 se obtuvo un único doble mutante, lo que sugería que las plantas *prp8-7 phax-2* morían durante su desarrollo embrionario. Para intentar obtener más dobles mutantes *prp8-7 phax-2*, se sembraron en placas de Petri 270 semillas F_3 procedentes de la autofecundación de una planta F_2 sesquimutante *prp8-7/prp8-7;PHAX/phax-2*, que rindieron 202 plantas con el fenotipo del mutante simple *prp8-7*, 14 con un fenotipo similar al de las anteriores, pero bastante más pequeñas, y dos aún más pequeñas y con un fenotipo muy similar al del mutante simple *phax-2* de fenotipo más extremo. Además, 52 de las 270 semillas sembradas no llegaron a germinar (Figura 11A-D).

Se seleccionaron 25 plantas, entre ellas varias de las pequeñas, que se fotografiaron, trasplantaron a macetas, y genotiparon por amplificación mediante PCR, tal y como se detalla

en el apartado V.1.2.2, en la página 23. Así, se determinó que 18 eran sesquimutantes *prp8-7/prp8-7;PHAX/phax-2*, cinco eran el mutante simple *prp8-7*, y las dos más pequeñas y similares al mutante simple *phax-2* más extremo, eran dobles mutantes *prp8-7 phax-2* (Figura 11E, en la página 29). La presencia de tantas semillas que no germinan sugiere que también podrían ser dobles mutantes.

V.1.2.8.- Interacción genética de *PHAX* con *CXIP4*

El gen *CXIP4* (AT2G28910) es esencial y codifica una proteína nuclear con un motivo de dedos de zinc de tipo CCHC, que regula la homeostasis del calcio, activando al antiportador H^+/Ca^{2+} cuando se expresa en la levadura (Cheng *et al.*, 2004). En el laboratorio se ha determinado que *CXIP4* participa en el *splicing* de los pre-ARNm (Aceituno-Valenzuela *et al.*, 2024). El mutante hipomorfo *cxip4-2* es más pequeño que su estirpe silvestre Col-0, y presenta una roseta con hojas apuntadas y con márgenes dentados, que acumulan una gran cantidad de antocianinas (Figura 12B y D).

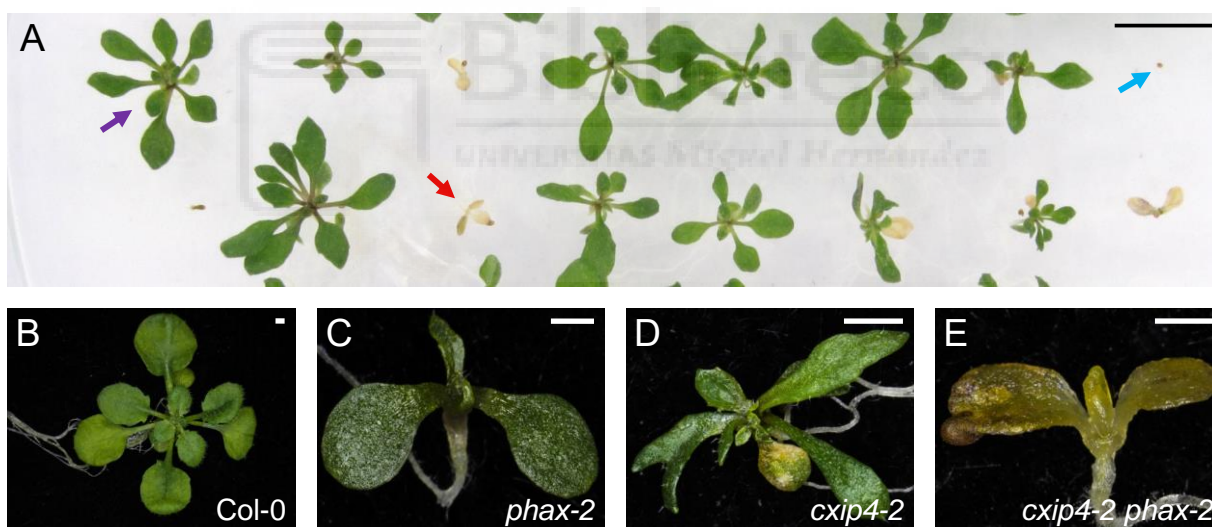


Figura 12.- Fenotipo morfológico del doble mutante *cxip4-2 phax-2*. (A) Fotografía de una placa de Petri en la que se observa la segregación fenotípica de las plantas F_3 procedentes de la autofecundación de una planta F_2 *cxip4-2/cxip4-2;PHAX/phax-2*. Se destacan con flechas de distintos colores una planta con el fenotipo del mutante simple *cxip4-2* (morada), el doble mutante *cxip4-2 phax-2* (roja) y una semilla no germinada (azul). (B-E) Rosetas de (B) Col-0, (C) *phax-2*, (D) *cxip4-2* y (E) *cxip4-2 phax-2*. Las barras de escala representan (A) 1 cm y (B-E) 1 mm. Las fotografías se tomaron 21 dde.

Con el objetivo de aislar el doble mutante *cxip4-2 phax-2*, se sembraron en placas de Petri 276 semillas F_3 procedentes de la autofecundación de una planta F_2 sesquimutante *cxip4-2/cxip4-2;PHAX/phax-2*, que rindieron 261 plantas con el fenotipo del mutante simple

cxip4-2 y cinco plantas más pequeñas y similares al mutante simple *phax-2* de fenotipo más extremo. Además, 10 de las 276 semillas sembradas no germinaron (Figura 12A-D, en la página 30).

Se seleccionaron 25 plantas, entre ellas las cinco más pequeñas, que se fotografiaron, trasplantaron a macetas, y genotiparon por amplificación mediante PCR, tal y como se detalla en el apartado V.1.2.2, en la página 23. Así, se determinó que 13 eran sesquimutantes *cxip4-2/cxip4-2;PHAX/phax-2*, siete eran el mutante simple *cxip4-2*, y las cinco más pequeñas y similares al mutante simple *phax-2* eran dobles mutantes *cxip4-2 phax-2* (Figura 12E, en la página 30).

V.2.- Análisis de interacciones genéticas de *ANAC082*

A fin de contribuir al estudio de la regulación de la biogénesis del ribosoma y los efectos de sus alteraciones en las plantas, antes del inicio de este TFG, se solicitó la línea de dominio público GK-282H08, descrita previamente como *anac082* (Kim *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020), cuyo ADN-T interrumpe el cuarto exón del gen AT5G09330 (*ANAC082*), que tiene una unidad de transcripción de 3.143 pb, con cinco exones (Figura 13).

El gen *ANAC082* codifica una proteína de 489 aminoácidos, perteneciente a la familia NAC de factores de transcripción, que es específica de las plantas. Tal como se describe en el apartado II.3, en la página 3, los factores NAC se han relacionado con la respuesta de las plantas frente a distintos tipos de estrés (revisado en Wang y Dane, 2013). En particular, *ANAC082* se ha identificado como un regulador positivo de la respuesta al estrés nucleolar en *Arabidopsis* (Ohbayashi *et al.*, 2017; Sasaki *et al.*, 2023).

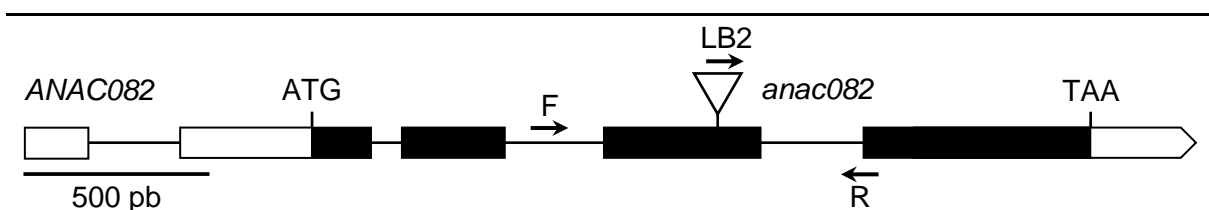


Figura 13.- Estructura de la unidad de transcripción del gen *ANAC082* y naturaleza molecular del alelo mutante empleado en este TFG. Se siguen las pautas descritas en el pie de la Figura 3, en la página 20.

V.2.1.- Obtención del mutante insercional *anac082*

Al inicio de este TFG, se sembraron 420 semillas de la línea GK-282H08, procedente del NASC, en placas de Petri, tal como se detalla en el apartado IV.3.1, en la página 9. Se analizó el fenotipo de las plantas resultantes 21 dde, observando que, en nuestras condiciones de cultivo, también eran muy similares a las de Col-0, la estirpe silvestre de procedencia, tanto

en tamaño como en morfología foliar (Figura 14A y B), tal y como habían descrito previamente Kim *et al.* (2018) y Wang *et al.* (2020).

Se seleccionaron 49 plantas de la línea para su genotipado, que se llevó a cabo por amplificación mediante PCR con los cebadores ANAC082-F y ANAC082-R, para comprobar la presencia del alelo silvestre *ANAC082*, y los cebadores LB2 y ANAC082-R, para amplificar el alelo insercional *anac082* (Tabla 2, en la página 16; Figura 13, en la página 31). Se concluyó así que 25 de las 49 plantas analizadas eran homocigotas silvestres, siete eran heterocigotas, y 17 eran homocigotas para el alelo *anac082*, tal como se muestra en la Figura 14G. Varias plantas *anac082* se trasplantaron a macetas para que completasen su ciclo de vida y rindiesen nuevas semillas, tal como se describe en el apartado IV.3.2, en la página 10.

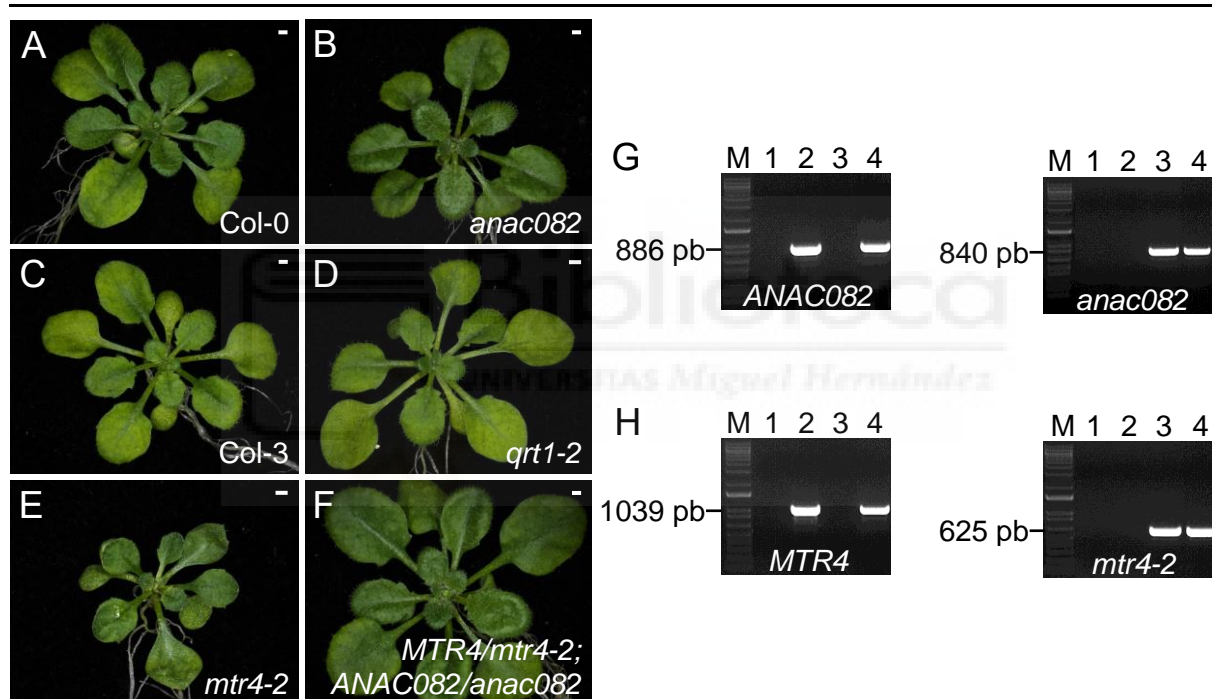


Figura 14.- Fenotipo morfológico y genotipado de la planta F₁ resultante del cruzamiento entre los mutantes simples *anac082* y *mtr4-2*. (A-F) Rosetas de (A) Col-0, (B) *anac082*, (C) Col-3, (D) *qrt1-2*, (E) *mtr4-2* y (F) *MTR4/mtr4-2; ANAC082/anac082*. Las barras de escala representan 1 mm. (G, H) Productos de PCR visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% m/v, y teñidos con bromuro de etidio, al genotipar las inserciones de ADN-T de (G) *mtr4-2* y (H) *anac082*. Se representa, de izquierda a derecha, (M) el marcador de peso molecular, (1) el control negativo (PCR sin molde), y el ADN de (2) un homocigoto silvestre, (3) un homocigoto mutante y (4) la planta F₁ dihíbrida.

V.2.2.- Cruzamiento de *anac082* por mutantes de genes que codifican FBR o PR

Tal como se describe en el apartado II.3, en la página 3, el gen *ANAC082* se encuentra sobreexpresado en los mutantes que presentan alteraciones en la biogénesis del ribosoma o en la función del ribosoma maduro (Ohbayashi *et al.*, 2017; Sasaki *et al.*, 2023), y su pérdida

de función es capaz de suprimir el fenotipo morfológico de estos mutantes, sin llegar a mitigar sus alteraciones a nivel molecular (Ohbayashi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

Para comprobar si esto ocurre igual con los mutantes que se estudian en el laboratorio, se inició un nuevo análisis de interacciones genéticas, cruzando los mutantes *phax*, *mtr4-2*, *par11-2*, *rrp7-1*, *smo4-3* y *rps24b-2* por *anac082*, tal como se detalla en el apartado IV.4, en la página 11. De los cruzamientos realizados, solo el de *mtr4-2* por *anac082* resultó exitoso, rindiendo una única semilla F₁; las silicuas del resto de los cruzamientos no llegaron a elongarse o no contuvieron semillas viables. La semilla F₁ del cruzamiento de *mtr4-2* por *anac082* se sembró en una placa de Petri, y se analizó el fenotipo morfológico de la planta resultante 21 dde, que fue totalmente silvestre (Figura 14A-F, en la página 32), descartando así que fuese fruto de la autofecundación del parental femenino *mtr4-2*. No obstante, también se genotipó por amplificación mediante PCR con los cebadores ANAC082-F, ANAC082-R y LB2, para comprobar la presencia de los alelos *ANAC082* y *anac082*, y MTR4-F, MTR4-R y LB1, para amplificar los alelos *MTR4* y *mtr4-2* (Tabla 2 en la página 16; Figura 13, en la página 31; Figura 3B, en la página 20); se determinó así que la planta era genotípicamente dihíbrida, tal como se muestra en la Figura 14G y H, en la página 32.

Esta planta F₁ se trasplantó a una maceta para que completase su ciclo de vida, y más adelante, se analizarán las plantas F₂ para comprobar si el fenotipo morfológico del mutante simple parental *mtr4-2* se suprime en el doble mutante *mtr4-2 anac082*.



VI.- DISCUSIÓN

VI.- DISCUSIÓN

Este TFG se ha centrado en el análisis de interacciones genéticas del gen *PHAX* de *Arabidopsis*, cuya función en relación con la biogénesis del ribosoma y el *splicing* de los pre-ARNm se está estudiando en el laboratorio. La búsqueda de interacciones genéticas en dobles mutantes es una parte importante del abordaje genético para la caracterización funcional de un gen de interés. En nuestro caso, hemos intentado identificar dobles mutantes en familias F_3 de cruzamientos entre los alelos insercionales y presuntamente hipomorfos *phax-1* y *phax-2* del gen *PHAX* y otros, también de pérdida de función, de genes implicados en ambos procesos, la biogénesis del ribosoma y el *splicing*.

En este estudio se ha abordado el análisis de interacciones en poblaciones F_3 derivadas de sesquimutantes, en los que el alelo *phax* se encontraba en heterocigosis, ya que los mutantes simples de los genes implicados en ambos procesos son mucho más viables y fértiles que los *phax*, cuyos fenotipos son muy extremos. En nuestro caso, la segregación fenotípica esperada de la descendencia de la autofecundación de una planta sesquimutante, es 3:1, de individuos con fenotipo sesquimutante y/o mutante simple, que serían totalmente indistinguibles, frente a individuos de fenotipo doble mutante, que podría ser más extremo si hubiese sinergia, o similar al fenotipo de un parental, si hubiese epistasia. También podrían presentar los rasgos de ambos parentales si no hubiese interacción genética, o excepcionalmente supresión del fenotipo mutante.

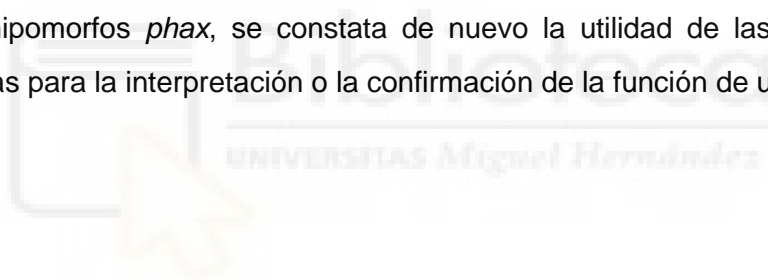
Se sembraron en la mayoría de los casos más de 200 semillas F_3 en tres o cuatro placas de Petri, debido a la disposición constante de las semillas al utilizar la plantilla de uso habitual en el laboratorio cuando se emplea una alta densidad de siembra. Esperábamos identificar entre 50 y 70 dobles mutantes en cada siembra, que serían más que suficientes para poder analizar sus fenotipos y extraer conclusiones de posibles interacciones genéticas. Sin embargo, la ausencia de dobles mutantes en la mayoría de las poblaciones F_3 analizadas sugiere la existencia de la sinergia fenotípica más extrema que se puede encontrar, que es la letalidad embrionaria. Estos resultados indicarían también la existencia de una relación funcional entre *PHAX* y la biogénesis del ribosoma y el *splicing* de los pre-ARNm y, por tanto, una conservación funcional entre los eucariotas en los que se ha estudiado la proteína *PHAX*, tal y como esperábamos. También son congruentes con los resultados aún sin publicar obtenidos en el laboratorio, en los que se han encontrado alteraciones en ambos procesos en los mutantes *phax*.

Encontramos en la mayoría de las siembras muchas semillas que no germinaron y que podrían ser dobles mutantes cuyos embriones habrían fracasado en etapas tardías del

desarrollo embrionario. Las pocas plantas dobles mutantes identificadas en alguno de los cruzamientos se podrían considerar *escapers*, un término genético para definir a aquellas plantas que evaden la letalidad al haber superado las fases fenocríticas del desarrollo embrionario. La prueba estadística que se debería haber usado para los análisis de segregaciones fenotípicas es la del chi cuadrado (χ^2), con un nivel de significación de 0,95, sin tener en cuenta el genotipado, ya que solo se usaron las plantas que sospechábamos que podían ser los dobles mutantes. El número de grados de libertad debería ser de uno, ya que las clases fenotípicas posibles eran dos, la del mutante simple y la del doble mutante.

La mayor frecuencia de dobles mutantes *prp8-7 phax-2* o de plantas homocigóticas *amiR-MAS2 phax-2*, sugiere un impacto menos severo de la combinación de la pérdida de función de *PHAX* con mutantes con alteraciones en el *splicing*. Sin embargo, este resultado también puede explicarse al considerar que tanto en las plantas homocigóticas *prp8-7* como *amiR-MAS2*, la pérdida de función de los respectivos genes es parcial, ya que los alelos nulos de ambos son letales embrionarios.

En resumen, en nuestros análisis de interacciones genéticas usando dobles mutantes con los alelos hipomorfos *phax*, se constata de nuevo la utilidad de las aproximaciones genéticas clásicas para la interpretación o la confirmación de la función de un gen.





VII.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

VII.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este TFG se ha contribuido al estudio funcional del gen *PHAX* en *Arabidopsis*, mediante el análisis de interacciones genéticas en dobles mutantes entre sus alelos insercionales y presuntamente hipomorfos *phax-1* y *phax-2* y otros de pérdida de función de genes de los que se sospechaba debían estar relacionados. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de interacciones sinérgicas y, por tanto, que los genes cuyos alelos están implicados en los cruzamientos, están funcionalmente relacionados.

Los resultados obtenidos son preliminares y se necesitará volver a sembrar un número mayor de semillas de los sesquimutantes para analizar en profundidad las segregaciones fenotípicas e identificar un mayor número de dobles mutantes, si fuese posible. También se deberán analizar las silicuas de los sesquimutantes para intentar encontrar evidencias de una posible letalidad embrionaria y determinar en qué fases se interrumpe el desarrollo. En el caso de identificar varios dobles mutantes viables, se deberán trasplantar a macetas y seguir su desarrollo a lo largo del mayor tiempo posible, para poder describir sus fenotipos morfológicos y compararlos con los de sus parentales.

Como alternativa a la ausencia de dobles mutantes viables de algunos de los cruzamientos, se propone la aplicación de técnicas de edición genética basadas en el sistema CRISPR/Cas9, que son de uso habitual en el laboratorio. Se intentaría generar alelos hipomorfos de *PHAX* con un menor nivel de pérdida de función que los alelos insercionales, utilizando como fondo genético de la edición, los mutantes simples que se han empleado en los cruzamientos. Este abordaje permitiría la obtención de múltiples alelos y, por tanto, el estudio fenotípico y molecular de la combinación de mutaciones, lo que no hemos conseguido con el uso de los alelos insercionales *phax*, ya que en homocigosis generan fenotipos muy variables y los más extremos son muy aberrantes y poco viables.



VIII.- BIBLIOGRAFÍA

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Aceituno-Valenzuela, U.I., Fontcuberta-Cervera, S., Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., Ruiz-Bayón, A., y Ponce, M.R. (2024). CXIP4 depletion causes early lethality and pre-mRNA missplicing in *Arabidopsis*. *bioRxiv* doi: 10.1101/2024.06.06.597795.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., y Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Cabezas-Fuster, A., Micol-Ponce, R., Fontcuberta-Cervera, S., y Ponce, M.R. (2022). Missplicing suppressor alleles of *Arabidopsis PRE-MRNA PROCESSING FACTOR 8* increase splicing fidelity by reducing the use of novel splice sites. *Nucleic Acids Research* **50**, 5513-5527.
- Cabezas-Fuster, A., Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., y Ponce, M.R. (2023). Cross-kingdom conservation of *Arabidopsis* RPS24 function in 18S rRNA maturation. *bioRxiv* doi: 10.1101/2023.04.21.537868.
- Cech, T.R. (2000). Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science* **289**, 878-879.
- Cheng, N.H., Liu, J.Z., Nelson, R.S., y Hirschi, K.D. (2004). Characterization of CXIP4, a novel *Arabidopsis* protein that activates the H⁺/Ca²⁺ antiporter, CAX1. *FEBS Lett* **559**, 99-106.
- Copenhaver, G.P., Browne, W.E., y Preuss, D. (1998). Assaying genome-wide recombination and centromere functions with *Arabidopsis* tetrads. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**, 247-252.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19-21.
- Francis, K.E., Lam, S.Y., y Copenhaver, G.P. (2006). Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by *QUARTET1*, a pectin methyltransferase gene. *Plant Physiology* **142**, 1004-1013.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.F., Chakraborty, A., y Gleizes, P.E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **6**, 225-242.
- Horiguchi, G., Mollá-Morales, A., Pérez-Peréz, J.M., Kojima, K., Robles, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., y Tsukaya, H. (2011). Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant Journal* **65**, 724-736.
- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2012). The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal-distal, venation and stomatal patterning in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1322-1333.
- Kim, H.J., Park, J.H., Kim, J., Kim, J.J., Hong, S., Kim, J., Kim, J.H., Woo, H.R., Hyeon, C., Lim, P.O., Nam, H.G., y Hwang, D. (2018). Time-evolving genetic networks reveal a NAC troika that negatively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **115**, E4930-E4939.
- Koornneef, M., y Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant Journal* **61**, 909-921.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Lafontaine, D.L.J., Riback, J.A., Bascetin, R., y Brangwynne, C.P. (2021). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**, 165-182.
- Lange, H., Sement, F.M., y Gagliardi, D. (2011). MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **68**, 51-63.
- Martínez Fenoll, S. (2023). Contribución a la caracterización funcional del gen *PHOSPHORYLATED ADAPTOR FOR RNA EXPORT (PHAX)* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- McElver, J., Tzafir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., Thomas, C., Schetter, A., Zhou, Q., Cushman, M.A., Tossberg, J., Nickle, T., Levin, J.Z., Law, M., Meinke, D., y Patton, D. (2001). Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**, 1751-1763.

- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., Ruiz-Bayón, A., Montacé, C., Saéz-Vasquéz, J., y Ponce, M.R. (2018). Arabidopsis RIBOSOMAL RNA PROCESSING7 is required for 18S rRNA maturation. *Plant Cell* **30**, 2855-2872.
- Micol-Ponce, R., Sarmiento-Mañús, R., Fontcuberta-Cervera, S., Cabezas-Fuster, A., de Bures, A., Saéz-Vasquéz, J., y Ponce, M.R. (2020). SMALL ORGAN4 is a ribosome biogenesis factor involved in 5.8S ribosomal RNA maturation. *Plant Physiology* **184**, 2022-2039.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* **51**, 263-273.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Ohbayashi, I., Lin, C.Y., Shinohara, N., Matsumura, Y., Machida, Y., Horiguchi, G., Tsukaya, H., y Sugiyama, M. (2017). Evidence for a role of ANAC082 as a ribosomal stress response mediator leading to growth defects and developmental alterations in Arabidopsis. *Plant Cell* **29**, 2644-2660.
- Ohbayashi, I., y Sugiyama, M. (2018). Plant nucleolar stress response, a new face in the NAC-dependent cellular stress responses. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2247.
- Ohtani, M. (2018). Plant snRNP biogenesis: a perspective from the nucleolus and Cajal bodies. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2184.
- Peréz-Peréz, J.M., Candela, H., y Micol, J.L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends in Genetics* **25**, 368-376.
- Petricka, J.J., y Nelson, T.M. (2007). Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiology* **144**, 173-186.
- Pontvianne, F., Matía, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M., y Sáez-Vásquez, J. (2007). Characterization of *AtNUC-L1* reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of *AtNUC-L2* gene in Arabidopsis. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 369-379.
- Preuss, D., Rhee, S.Y., y Davis, R.W. (1994). Tetrad analysis possible in Arabidopsis with mutation of the *QUARTET (QRT)* genes *Science* **264**, 1458-1460.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., y Weisshaar, B. (2003). An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* **53**, 247-259.
- Saéz-Vásquez, J., y Delseny, M. (2019). Ribosome biogenesis in plants: from functional 45S ribosomal DNA organization to ribosome assembly factors. *Plant Cell* **31**, 1945-1967.
- Sánchez-García, A.B., Aguilera, V., Micol-Ponce, R., Jover-Gil, S., y Ponce, M.R. (2015). Arabidopsis *MAS2*, an essential gene that encodes a homolog of animal NF- κ B activating protein, is involved in 45S ribosomal DNA silencing. *Plant Cell* **27**, 1999-2015.
- Sasaki, S., Murakami, T., Yasumuro, M., Makita, A., Oi, Y., Hiragori, Y., Watanabe, S., Kudo, R., Hayashi, N., Ohbayashi, I., Sugiyama, M., Yamashita, Y., Naito, S., y Onouchi, H. (2023). Upstream open reading frame-mediated upregulation of ANAC082 expression in response to nucleolar stress in Arabidopsis. *Plant Biotechnology* **40**, 21-30.
- Sasaki, T., Naumann, U., Forai, P., Matzke, A.J.M., y Matzke, M. (2012). Unusual case of apparent hypermutation in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **192**, 1271-1280.
- Sasaki, T., Kanno, T., Liang, S.C., Chen, P.Y., Liao, W.W., Lin, W.D., Matzke, A.J.M., y Matzke, M. (2015). An Rtf2 domain-containing protein influences pre-mRNA splicing and is essential for embryonic development in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **200**, 523-535.
- Segref, A., Mattaj, I.W., y Ohno, M. (2001). The evolutionarily conserved region of the U snRNA export mediator PHAX is a novel RNA-binding domain that is essential for U snRNA export. *RNA* **7**, 351-360.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., y Goff, S.A. (2002). A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* **14**, 2985-2994.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H., y Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**, 796-815.

- Wang, R., Zhao, J., Jia, M., Xu, N., Liang, S., Shao, J., Qi, Y., Liu, X., An, L., y Yu, F. (2018). Balance between cytosolic and chloroplast translation affects leaf variegation. *Plant Physiology* **176**, 804-818.
- Wang, W., Ryu, K.H., Bruex, A., Barron, C., y Schiefelbein, J. (2020). Molecular basis for a cell fate switch in response to impaired ribosome biogenesis in the Arabidopsis root epidermis. *Plant Cell* **32**, 2402-2423.
- Wang, Z., y Dane, F. (2013). NAC (NAM/ATAF/CUC) transcription factors in different stresses and their signaling pathway. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 1397-1408.
- Weis, B.L., Kovacevic, J., Missbach, S., y Schleiff, E. (2015). Plant-specific features of ribosome biogenesis. *Trends in Plant Science* **20**, 729-740.
- Yaschenko, A.E., Alonso, J.M., y Stepanova, A.N. (2024). Arabidopsis as a model for translational research. *Plant Cell*, koae065.
- Zhu, P., Wang, Y., Qin, N., Wang, F., Wang, J., Deng, X.W., y Zhu, D. (2016). Arabidopsis small nucleolar RNA monitors the efficient pre-rRNA processing during ribosome biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **113**, 11967-11972.

