

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
Grado en Biotecnología  
Curso 2014/15

**Instituto de Bioingeniería, Área de Genética**  
Trabajo Fin de Grado

## **Análisis genético y fenotípico de mutantes *mterf* y *crd* de *Arabidopsis thaliana***



**Elche, Junio de 2015**

**Sergio Navarro Cartagena**  
Estudiante de Biotecnología

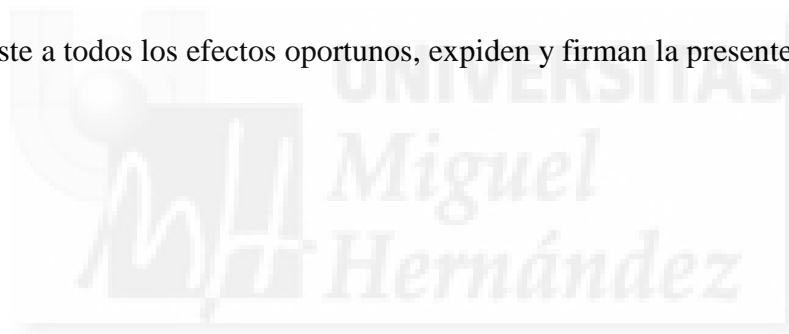
**Tutores:** Víctor Manuel Quesada Pérez y Pedro Robles Ramos

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

CERTIFICAN:

Que D. Sergio Navarro Cartagena, estudiante de cuarto curso del Grado en Biotecnología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado "Análisis genético y fenotípico de mutantes *mterf* y *crd* de *Arabidopsis thaliana*" incluido en la memoria de este Trabajo Fin de Grado. El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Área de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

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



En Elche, junio de 2015

Fdo. Dr. Víctor Manuel Quesada Pérez

Fdo. Dr. Pedro Robles Ramos

## **RESUMEN Y PALABRAS CLAVE**

En los laboratorios de Víctor Quesada y Pedro Robles se está llevando a cabo una aproximación de genética inversa empleando la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, con el objetivo de dilucidar la función que desempeñan en el desarrollo y en la respuesta frente al estrés abiótico, genes no caracterizados hasta la fecha y que participan en la expresión de la información genética de los cloroplastos.

Con este fin, se están estudiando dos familias de genes nucleares cuyos productos actúan en el cloroplasto. La primera es la de los factores de terminación de la transcripción mitocondrial (*mTERF*), que en los animales y las plantas participan en la regulación de la expresión de los genomas organulares. La segunda está integrada por genes a los que hemos denominado *CRD* (*CHLOROPLAST RIBOSOME DEFECTIVE*) y que codifican proteínas de los ribosomas del cloroplasto, implicadas en la traducción en este orgánulo.

En este trabajo Fin de Grado se ha realizado una contribución al análisis genético de los mutantes *crd* así como al de algunos *mterf* previamente descritos. Se ha iniciado la caracterización de un nuevo mutante (*mterf6*) y realizado un estudio de su respuesta frente al estrés abiótico y al ácido abscísico (ABA) durante la germinación y en etapas tempranas del crecimiento vegetativo. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de distintos tipos de interacciones genéticas entre las mutaciones *crd*, así como una alteración en la respuesta del mutante *mterf6* frente al ABA, el NaCl y el estrés osmótico producido por el manitol.

The reverse genetic approach carried out in the laboratories of Víctor Quesada and Pedro Robles using *Arabidopsis thaliana*, has as main goals to shed light on the function in plant development and in the response to abiotic stress, of genes uncharacterized to date and whose products participate in the flow of the genetic information in the chloroplasts.

For this purpose, two gene families were chosen as a subject of study. The first one is that of the *mTERF* genes, which encode transcription factors involved in the regulation of gene expression in the organellar genomes. The second one includes genes that we have called *CRD* (*CHLOROPLAST RIBOSOME DEFECTIVE*), whose products are chloroplast ribosomal proteins required for translation in this organelle.

In this Final Degree Project, it has been performed a contribution to the genetic analysis of the *crd* mutants and some *mterf* previously described. We have started the characterization of a new mutant “*mterf6*” and studied its response to abiotic stress and abscisic acid (ABA) during germination and in early stages of growth. Our results revealed the existence of different genetic interactions between the *crd* mutations as well as an alteration in the response of *mterf6* to ABA, NaCl and the osmotic stress caused by mannitol.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, cloroplasto, *mTERF*, *crd*, estrés abiótico, clororribosomas.

## UNIDADES Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-T	ADN de transferencia
ARN	Ácido ribonucleico
cm	Centímetros
cve	Cotiledones verdes y expandidos
°C	Grados centígrados
dte	Días tras la estratificación
g	Gramos
h	Horas
kb	Kilobases
kg	Kilogramos
l	Litros
lx	Luxes
m	Masa
M	Molar
Mb	Megabases
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MΩ	Megaohmios
nm	Nanómetros
P	Probabilidad
pb	Pares de bases
U	Unidades de actividad enzimática
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar
V	Voltios
v	Volumen
$\chi^2$	Chi cuadrado

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1. Orgánulos con genoma propio: la mitocondria y el cloroplasto .....	7
1.2. La familia génica <i>mTERF</i> .....	8
1.3. Proteínas ribosómicas del cloroplasto .....	10
1.4. Arabidopsis como organismo modelo .....	11
<b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1. Nomenclatura empleada en este trabajo .....	15
3.2. Estirpes de Arabidopsis empleadas en este trabajo .....	15
3.2.1. Estirpes silvestres .....	15
3.2.2. Estirpes mutantes .....	15
3.3. Disoluciones .....	16
3.3.1. Medios de cultivo .....	16
3.3.1.1. Medios de cultivo líquidos .....	16
3.3.1.2. Medios de cultivo sólidos .....	17
3.3.1.3. Medios de cultivo suplementados .....	17
3.3.2. Disoluciones para electroforesis .....	17
3.4. Métodos de cultivo .....	18
3.4.1. Manipulación de semillas .....	18
3.4.2. Esterilización de semillas .....	18
3.4.3. Estratificación de semillas .....	18
3.4.4. Cultivo de semillas .....	19
3.4.5. Trasplante a maceta .....	19
3.4.6. Cultivo en maceta .....	19
3.4.7. Cruzamientos .....	20
3.5. Análisis morfológico .....	20
3.6. Extracción de ADN genómico .....	20
3.7. Oligonucleótidos empleados en este trabajo .....	21
3.8. Amplificaciones mediante PCR .....	22
3.9. Electroforesis en geles de agarosa .....	22

<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
4.1. Estudio de las interacciones genéticas entre los mutantes <i>crd</i> .....	23
4.2. Análisis de interacciones genéticas entre mutantes <i>mterf</i> y <i>crd</i> .....	26
4.3. Análisis de interacciones genéticas entre el mutante <i>sca3-2</i> y mutantes <i>mterf</i> .....	29
4.4. Aislamiento y caracterización inicial del mutante <i>mterf6</i> .....	33
4.5. Análisis de la respuesta del mutante <i>mterf6</i> al estrés abiótico.....	34
4.6. Estudio del crecimiento fotoautotrófico de los mutantes <i>crd</i> y <i>mterf6</i> .....	36
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA</b> .....	<b>40</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>41</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Genes <i>mTERF</i> caracterizados molecularmente.....	10
<b>Figura 2.</b> Individuo de <i>Arabidopsis</i> .....	12
<b>Figura 3.</b> Fenotipos morfológicos de los mutantes insercionales <i>crd</i> .....	23
<b>Figura 4.</b> Fenotipo del presunto doble mutante <i>crd2-1 crd3</i> .....	24
<b>Figura 5.</b> Fenotipo del presunto doble mutante <i>crd2-1 crd4</i> .....	26
<b>Figura 6.</b> Fenotipo del presunto doble mutante <i>crd2-1 rug2-2</i> .....	27
<b>Figura 7.</b> Fenotipo del presunto doble mutante <i>crd4 rug2-2</i> .....	28
<b>Figura 8.</b> Fenotipo morfológico del doble mutante <i>mda1-1 sca3-2</i> .....	30
<b>Figura 9.</b> Genotipado de la mutación <i>mda1-1</i> en el doble mutante <i>mda1-1 sca3-2</i> .....	30
<b>Figura 10.</b> Genotipado de la mutación <i>sca3-2</i> en el doble mutante <i>mda1-1 sca3-2</i> .....	30
<b>Figura 11.</b> Fenotipo morfológico del presunto doble mutante <i>mterf9 sca3-2</i> .....	32
<b>Figura 12.</b> Fenotipos morfológicos del mutante <i>mterf6</i> .....	33
<b>Figura 13.</b> Identificación de la inserción de ADN-T en el gen At4g38160 ( <i>MTERF6</i> ).....	34
<b>Figura 14.</b> Efecto del NaCl sobre la germinación y la formación de cve en el silvestre Col-0 y el mutante <i>mterf6</i> .....	35
<b>Figura 15.</b> Efecto del manitol sobre la germinación y la formación de cve en el silvestre Col-0 y el mutante <i>mterf6</i> .....	36

<b>Figura 16.</b> Efecto del ABA sobre la germinación y la formación de cve en el silvestre Col-0 y el mutante <i>mterf6</i> .....	36
<b>Figura 17.</b> Efecto de la ausencia de sacarosa sobre el crecimiento de la estirpe silvestre Col-0 y de los mutantes <i>mterf6</i> y <i>crd</i> .....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Genomas cloroplásticos de diferentes organismos fotosintéticos .....	8
<b>Tabla 2.</b> Estirpes mutantes empleadas en este trabajo.....	16
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	21
<b>Tabla 4.</b> Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F <sub>3</sub> procedentes del cruzamiento <i>crd2-1</i> x <i>crd3</i> .....	24
<b>Tabla 5.</b> Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F <sub>3</sub> procedentes del cruzamiento <i>crd2-1</i> x <i>crd4</i> .....	26
<b>Tabla 6.</b> Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F <sub>3</sub> procedentes del cruzamiento <i>crd2-1</i> x <i>rug2-2</i> .....	27
<b>Tabla 7.</b> Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F <sub>3</sub> procedentes del cruzamiento <i>crd4</i> x <i>rug2-2</i> .....	28
<b>Tabla 8.</b> Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F <sub>3</sub> procedentes del cruzamiento <i>mda1-1</i> x <i>sca3-2</i> .....	31
<b>Tabla 9.</b> Determinación de los pesos frescos de presuntos dobles mutantes procedentes de poblaciones F <sub>3</sub> del cruzamiento <i>mda1-1</i> x <i>sca3-2</i> .....	31
<b>Tabla 10.</b> Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F <sub>3</sub> procedentes del cruzamiento <i>mterf9</i> <i>sca3-2</i> .....	32

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Orgánulos con genoma propio: la mitocondria y el cloroplasto

Las mitocondrias y los cloroplastos son orgánulos presentes en las células eucariotas y que se caracterizan fundamentalmente por presentar una doble membrana y un genoma propio. Mientras que en las mitocondrias tiene lugar la fosforilación oxidativa que permite obtener energía en forma de ATP, en los cloroplastos se produce la fotosíntesis, proceso mediante el cual los organismos fotosintéticos obtienen materia orgánica a partir de nutrientes inorgánicos a través de la energía lumínica del Sol. En los cloroplastos también se sintetizan moléculas esenciales para la vida de los organismos autótrofos tales como aminoácidos, lípidos, hormonas vegetales, nucleótidos, vitaminas y metabolitos secundarios (Rébeillé et al., 1997; Bartoli et al., 2000; Gueguen et al., 2000).

Estos orgánulos tendrían su origen en organismos procarióticos ancestrales de vida libre que fueron fagocitados por una célula eucariótica primitiva con la que establecieron una relación endosimbiótica (Gray, 1999; Lang et al., 1999). En concreto, las mitocondrias y los cloroplastos procederían de los ancestros de las  $\alpha$ -proteobacterias y cianobacterias actuales, respectivamente. Durante la evolución, los genomas de estos endosimbiontes sufrieron una drástica reducción del número de genes que albergaban, al transferirse la mayoría de ellos al genoma nuclear de la célula hospedadora. Debido a ello, muchos de los genes fundamentales para el correcto desarrollo y funcionamiento de los cloroplastos y las mitocondrias residen en el genoma nuclear, por lo que la expresión de éste último y de los genomas organulares debe coordinarse de manera muy precisa. Mediante señalización retrógrada (de los orgánulos al núcleo), el estado funcional, metabólico y de desarrollo de los cloroplastos y las mitocondrias se transmite al núcleo. A su vez, el núcleo responde habitualmente a través de señalización anterógrada (del núcleo a los orgánulos) modificando la expresión de genes cuyos productos actúan en los cloroplastos y las mitocondrias. Esto permite ajustar las actividades de estos orgánulos con los requerimientos energéticos, metabólicos o fisiológicos celulares (revisado en Robles et al., 2012a).

De acuerdo con lo anterior, la inmensa mayoría de las proteínas localizadas en las mitocondrias y los cloroplastos (alrededor de 2.000 y 2.600 respectivamente; Taylor et al., 2009) están codificadas por genes nucleares, siendo muy pocas las cifradas por genes cloroplásticos o mitocondriales. La mayoría de las proteínas codificadas por el genoma del cloroplasto están relacionadas con su función principal, la fotosíntesis, y con el flujo de la información génica en el interior del orgánulo. Entre las plantas terrestres, el contenido génico del genoma cloroplástico es bastante similar (Tabla 1): presentan todas ellas varios genes que cifran ARN ribosómicos, 30-31 que se transcriben produciendo ARNt, 21 que dan lugar a proteínas ribosómicas y los restantes genes codifican proteínas implicadas en procesos como la fotosíntesis o la transcripción (Shaw et al., 2007).

El genoma cloroplástico contiene la información necesaria para sintetizar una polimerasa de ARN de tipo procariótico (denominada PEP; *Plastid-Encoded Plastid RNA Polymerase*; Igloi y Kösel, 1992), constituida por las subunidades codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* y *rpoC2*.



Su especificidad de unión a promotores del ADN cloroplástico viene dada por factores sigma cifrados por el núcleo (Kanamaru y Tanaka, 2004). Además, en los cloroplastos actúa una polimerasa de ARN monomérica denominada NEP (*Nuclear-Encoded Plastid RNA Polymerase*), codificada por el genoma nuclear y similar a la de los bacteriófagos T3/T7 (Hess y Börner, 1999). Ambas polimerasas de ARN controlan la expresión de distintos conjuntos de genes cloroplásticos. Durante el desarrollo del orgánulo, NEP transcribe fundamentalmente aquellos genes implicados en la traducción y transcripción en los proplastidios (los precursores de los cloroplastos), mientras que PEP actúa en los cloroplastos maduros regulando la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis (Liere y Maliga, 2001).

**Tabla 1.** Genomas cloroplásticos de diferentes organismos fotosintéticos

Especie	Tipo de organismo	Tamaño del genoma (pb)	Nº de genes que codifican	
			ARN	Proteínas
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Planta fanerógama	154.478	44	85
<i>Pisum sativum</i>	Planta fanerógama	122.169	34	74
<i>Oryza sativa</i>	Planta fanerógama	134.525	46	108
<i>Zea mays</i>	Planta fanerógama	140.384	46	111
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Alga verde	203.828	40	69
<i>Micromonas spp.</i>	Alga verde	72.585	32	57
<i>Physcomitrella patens</i>	Musgo	122.890	44	85
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Hepática	143.780	23	70

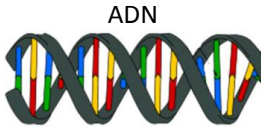
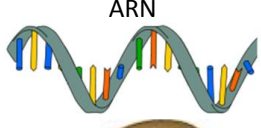

El tamaño del genoma se indica en pares de bases de ADN (pb). Tomado con modificaciones de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>).

## 1.2. La familia génica *mTERF*

La secuenciación de los genomas nucleares del arroz (*Oryza sativa*) y de *Arabidopsis thaliana* (en adelante *Arabidopsis*) a principios de este siglo ha permitido identificar nuevas familias génicas desconocidas en el reino vegetal. Una de estas familias es la de los factores de terminación de la transcripción mitocondrial (*mTERF*), inicialmente descrita en los metazoos y posteriormente en las plantas (Linder et al., 2005). Se han identificado genes *mTERF* en los genomas nucleares de distintas especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas, así como en el musgo *Physcomitrella patens* y en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, aunque no se han descrito en los hongos y los procariontes.

Los factores mTERF tienen en común la presencia de un número variable de repeticiones de un motivo denominado *mTERF* de unos 30 aminoácidos. En los vertebrados se han identificado cuatro subfamilias (MTERF1-4), siendo la proteína MTERF1 la primera en ser caracterizada (Roberti et al., 2009). Sin embargo, los genomas vegetales, especialmente los de las plantas superiores, contienen un número de genes *mTERF* superior al de los genomas animales (Kleine et al., 2012). En los metazoos, las proteínas mTERF participan en el control de la transcripción mitocondrial, requiriéndose tanto para su inicio como para su finalización, lo que pone de manifiesto que la regulación de la transcripción mitocondrial es más compleja de lo que se creía en un principio (Figura 1) (Robles et al., 2012a). Recientemente se ha descubierto que las proteínas MTERF3 y MTERF4 se requieren también para la correcta biogénesis de los ribosomas mitocondriales, lo que indica que los genes *mTERF*, al menos en los animales, participan además en la traducción mitocondrial (Figura 1) (Cámara et al., 2011; Wredenberg et al., 2013).

Hasta la fecha se han caracterizado ocho genes *mTERF* en organismos fotosintéticos: *MOC1* (*mterf-like gene of Chlamydomonas1*) en el alga unicelular *C. reinhardtii* (Schonfeld et al., 2004), *SOLDAT10* (*SINGLET OXYGEN-LINKED DEATH ACTIVATOR10*; Meskauskiene et al., 2009), *BSM/RUG2* (*BELAYA SMERT/RUGOSA2*) (Babiychuck et al., 2011; Quesada et al., 2011), *MDA1* (*mTERF DEFECTIVE IN Arabidopsis1*; Robles et al., 2012b), *SHOT1* (*SUPPRESSOR OF HOT1-4 1*; Kim et al., 2012), *mTERF9* (Robles et al., 2015) y *mTERF15* (Hsu et al., 2014) en *Arabidopsis* y *Zm-mTERF4*, el ortólogo en el maíz de *BSM/RUG2* (Hammani y Barkan, 2014). Las proteínas MTERF15 y *Zm-mTERF4* se requieren para el correcto procesamiento de distintos tipos de transcritos organulares (Figura 1). MTERF15 está implicado en la eliminación del intrón 3 del ARN del gen mitocondrial *nad2* (que cifra un componente del Complejo I de la cadena de transporte electrónico), mientras que *Zm-mTERF4* participa en el *splicing* de ARN implicados en la traducción cloroplástica. Las proteínas *SOLDAT10*, *MDA1*, *MTERF9* y *Zm-mTERF4* son cloroplásticas, mientras que *MOC1*, *SHOT1* y *MTERF15* se localizan en las mitocondrias. *BSM/RUG2* presenta localización dual ya que se ha identificado en ambos orgánulos. La perturbación de la función de los genes *mTERF* vegetales altera la expresión de genes de los genomas organulares y por ende la función cloroplástica y/o mitocondrial. Esta es muy probablemente la causa de la significativa reducción en el crecimiento de los individuos mutantes, que en ocasiones detienen su desarrollo, como sucede en los mutantes *bsm* (Babiychuck et al., 2011) y *Zm-mterf4* (Hammani y Barkan, 2014) de *Arabidopsis* y el maíz, respectivamente.

Factores mTERF	Actuación a nivel de	Función
MTERF1 de mamíferos MOC1 de <i>C. reinhardtii</i>	 ADN	Terminación de la transcripción antisentido en la mitocondria
Zm-mTERF4 del maíz BSM/RUG2 de <i>A. thaliana</i> MTERF15 de <i>A. thaliana</i>	 ARN	<i>Splicing</i> de ARN mitocondrial o cloroplástico
MTERF3 de mamíferos MTERF4 de mamíferos	 Síntesis proteica	Biogénesis ribosómica mitocondrial

**Figura 1. Genes *mTERF* caracterizados molecularmente.** Funciones propuestas para los mTERF caracterizados a nivel molecular en los animales y las plantas. Tomado con modificaciones de Kleine y Leister, 2015.

### 1.3. Proteínas ribosómicas del cloroplasto

La gran mayoría de proteínas cloroplásticas están codificadas por genes nucleares, por lo que deben sintetizarse en el citoplasma e importarse posteriormente a este orgánulo. Por el contrario, sólo unas pocas decenas de proteínas se sintetizan en el cloroplasto a partir de la información contenida en su genoma (Tabla 1). Los ribosomas cloroplásticos, también denominados clororribosomas, llevan a cabo la traducción en este orgánulo siendo por tanto los encargados de la síntesis de proteínas en el mismo. El clororribosoma está compuesto por dos subunidades, una grande (50S) y una pequeña (30S), dando lugar a un ribosoma 70S de estructura y tamaño similares a los de los ribosomas bacterianos. Ambas subunidades son complejos ribonucleoproteínicos constituidos por moléculas de ARN ribosómicos (ARNr) y distintas proteínas ribosómicas. Todos los ARNr del clororribosoma están codificados por el genoma organular. Sin embargo, la mayor parte de las proteínas ribosómicas cloroplásticas (PRP, *Plastid Ribosomal Proteins*) están cifradas por genes nucleares y son, generalmente, mayores que sus ortólogas bacterianas. Al igual que sucede con los factores mTERF, codificados por el núcleo, las PRP son otro ejemplo de la participación de genes nucleares en la expresión de la información genética que alberga el genoma cloroplástico.

La subunidad pequeña del clororribosoma contiene 24 proteínas denominadas Rps (*Ribosomal protein of the small subunit*), de las que 12 están codificadas por el genoma del cloroplasto y las restantes 12 por el nuclear (Yamaguchi et al., 2000). 21 de las 24 proteínas Rps poseen una proteína ortóloga en *Escherichia coli* (Yamaguchi et al., 2000). La subunidad grande del clororribosoma presenta 33 proteínas Rpl (*Ribosomal protein of the large subunit*), 31 de ellas con ortólogas en *E. coli*. De las 33 proteínas Rpl, 24 están codificadas por el genoma nuclear y 9 por el cloroplástico

(Yamaguchi y Subramanian, 2000). A pesar de que existe un número elevado de proteínas ortólogas y cierta similitud estructural con los ribosomas procarióticos, la traducción en el cloroplasto es más compleja. Esta mayor complejidad podría deberse, al menos en parte, a la adquisición de proteínas ribosómicas específicas de este orgánulo denominadas PSRP (*Plastid-Specific Ribosomal Proteins*), tres de ellas en la subunidad pequeña 30S (PSRP2-4) y dos en la subunidad grande 50S (PSRP5 y PSRP6) (Sharma et al., 2007). Se ha determinado la estructura del ribosoma cloroplástico mediante criomicroscopía electrónica y *cross-linking* con ARN mensajero (ARNm), lo que ha permitido descubrir que algunas proteínas PSRP se localizan en posiciones óptimas para interactuar con el ARNm así como con factores de traducción específicos del cloroplasto durante el inicio de la traducción (Manuell et al., 2007).

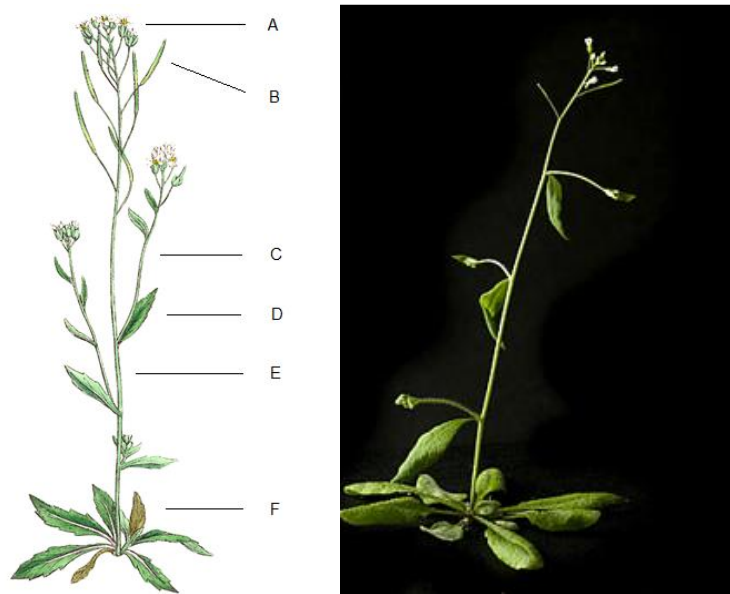
Son varios los estudios realizados en los últimos diez años sobre la función de las proteínas ribosómicas del cloroplasto (revisado en Tiller y Bock, 2014). *Nicotiana tabacum* se ha utilizado como sistema modelo para analizar las proteínas ribosómicas cifradas por el genoma del cloroplasto, ya que en esta especie se dispone de un protocolo eficaz de transformación de dicho orgánulo. Por el contrario, suele escogerse *Arabidopsis* como modelo para estudiar la función de las proteínas ribosómicas codificadas por genes nucleares, mediante aproximaciones de genética directa o inversa. Los resultados obtenidos indican que las mutaciones en las proteínas ribosómicas del cloroplasto provocan al menos alguno de los siguientes efectos: retraso en el crecimiento, reducción de la actividad biosintética de proteínas en el cloroplasto y/o alteraciones en la fotosíntesis (Pesaresi et al., 2001; Morita-Yamamuro et al., 2004; Romani et al., 2012; Tiller et al., 2012). Del mismo modo, la caracterización de mutantes con alteraciones en el flujo de la información génica en el interior del cloroplasto, incluido el proceso de traducción, revela la importancia de su correcto funcionamiento para el adecuado desarrollo de las hojas (Pyke et al., 2000; Wang et al., 2000; Wycliffe et al., 2005).

Otros estudios revelan que algunas mutaciones en proteínas PRP resultan letales, al comprometer la función cloroplástica. Es el caso de los mutante *ASL1* del arroz y *ASL2* del maíz afectados en la proteína S20 (Gong et al., 2014) y L21 del clororribosoma (Lin et al., 2014), respectivamente. Recientemente se ha establecido por primera vez la función de un gen, *WLP1*, que cifra una proteína PRP L13 en el arroz, a partir de la caracterización de un mutante hipomorfo con un desarrollo anómalo de los cloroplastos, particularmente a bajas temperaturas (Song et al., 2014). Los autores del trabajo sugieren que la función del cloroplasto se ve comprometida en *wlp1* debido a una menor síntesis de PEP, consecuencia de un funcionamiento inadecuado de la traducción.

#### **1.4. Arabidopsis como organismo modelo**

*Arabidopsis* es una planta ampliamente utilizada como organismo modelo para la investigación en biología vegetal. Se trata de una angiosperma perteneciente a la familia de las Brassicáceas o Crucíferas (Figura 2). *Arabidopsis* carece de interés comercial aunque a esta familia pertenecen especies vegetales de gran importancia económica como la col (*Brassica oleracea*), el

rábano (*Raphanus sativus*), el nabo (*Brassica rapa*), la colza (*Brassica napus*), la mostaza blanca (*Sinapsis alba*) y negra (*Brassica nigra*).



**Figura 2. Individuo de Arabidopsis.** Dibujo representativo (izquierda) y fotografía (derecha) de una planta adulta con indicación de sus distintas partes aéreas. (A) Flores, (B) silicuas, (C) tallo secundario, (D) hoja caulinar, (E) tallo principal y (F) roseta de hojas vegetativas. Tomado con modificaciones de *The European Commission Research* (<http://ec.europa.eu/research>) y <http://neofronteras.com/?p=3604>.

Arabidopsis reúne una serie de características que la hacen idónea como sistema modelo para realizar estudios genéticos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Entre éstas pueden destacarse: su corto ciclo de vida (de seis a ocho semanas cuando se cultiva en condiciones de luz continua), su fácil manipulación y cultivo, su elevada fertilidad (un individuo silvestre puede producir miles de semillas), su pequeño tamaño (lo que permite cultivar un elevado número de individuos en un espacio reducido) y su capacidad de autofecundación (es una especie autógena).

A estas características puede añadirse el pequeño tamaño de su genoma haploide [completamente secuenciado (*The Arabidopsis Genome Initiative* AGI, 2000)], de sólo unas 125 Mb, diez veces más grande que el de la levadura cervecera *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mb), similar al de otros organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* (97 Mb) o *Drosophila melanogaster* (180 Mb) y notablemente menor que el de otras especies vegetales como el arroz (466 Mb), el tomate (950 Mb), el maíz (2.500 Mb) o el trigo (16.000 Mb). El genoma nuclear de Arabidopsis contiene muy poco ADN repetitivo y está organizado en cinco cromosomas, en los que se han descrito hasta la fecha 27.206 genes que codifican proteínas y 1.290 genes que cifran ARN no traducidos (*The Arabidopsis Information Resource* version 10, TAIR10, [http://www.arabidopsis.org/doc/news/breaking\\_news/140#id22](http://www.arabidopsis.org/doc/news/breaking_news/140#id22)). Por el contrario, sus genomas cloroplástico y mitocondrial contienen 129 y 146 genes, respectivamente, de los que 85 y 122 codifican proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>). El genoma de Arabidopsis no difiere

sustancialmente en cuanto al número de genes, del de otras especies cultivadas de plantas con flores, por lo que los resultados derivados de la investigación en este sistema modelo son potencialmente extrapolables a otras especies vegetales con interés agronómico.

Se han descrito más de 750 estirpes silvestres, ecotipos o accesiones de *Arabidopsis* distribuidos por todo el planeta, fundamentalmente en el hemisferio norte. En su gran mayoría, se encuentran disponibles para la comunidad científica a través de distintos bancos de semillas. Los ecotipos pueden presentar variaciones en su morfología, desarrollo y/o fisiología, resultado de su adaptación a las distintas condiciones ambientales en las que viven.



## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En los laboratorios de los profesores Víctor Quesada y Pedro Robles se lleva a cabo una aproximación de genética inversa con el objetivo de caracterizar genes nucleares que codifican proteínas localizadas en el cloroplasto y que participan en el flujo de la información genética en este orgánulo. Se trata de genes para los que no se había descrito ningún fenotipo mutante a partir de la perturbación de su función.

La genética inversa se fundamenta en la obtención de alelos mutantes, fundamentalmente insercionales y de pérdida de función, de un gen a partir del conocimiento de su secuencia nucleotídica (Alonso y Ecker, 2006). Se ha utilizado *Arabidopsis* como sistema modelo gracias a la disposición de varias colecciones de líneas portadoras de alelos insercionales generadas a partir de mutagénesis mediante el ADN-T de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Se escogieron para su estudio genes que cifran proteínas ribosómicas del cloroplasto, así como aquellos que codifican factores de terminación de la transcripción mitocondrial (*mTERF*, *mitochondrial Transcription tERmination Factors*). Las líneas mutantes que rindieron un fenotipo morfológico fueron escogidas para su posterior análisis. En el caso de los genes *mTERF*, se identificaron mutantes afectados en los genes *MDA1* (*mTERF DEFECTIVE IN Arabidopsis1*) y *MTERF9* (Robles et al., 2012b; 2015). Por otra parte, se aislaron cinco mutantes afectados en proteínas ribosómicas del cloroplasto que se denominaron *crd* (*chloroplast ribosome defective*). Los mutantes *crd1*, *crd2-1*, *crd2-2* y *crd3* están afectados en genes cuyos productos forman parte de la subunidad grande del ribosoma cloroplástico, mientras que *crd4* lo está en un gen que cifra una proteína de la subunidad pequeña.

El objetivo inicial de este Trabajo Fin de Grado era el de avanzar en el estudio de las eventuales relaciones funcionales entre los genes *CRD* y *mTERF*, así como entre éstos y otros que también participan en el flujo de la información genética en el cloroplasto. Como herramienta para la determinación de las operaciones genéticas en las que participan los genes estudiados, se decidió utilizar el análisis genético basado en el aislamiento y la caracterización fenotípica y molecular de dobles mutantes. Por otro lado, en esta memoria se ha contribuido al estudio de un nuevo mutante (*mterf6*), afectado en un gen *mTERF*, que hasta el momento no había recibido atención en cuanto a la caracterización de su respuesta al estrés abiótico. Finalmente, como parte del análisis de algunos de los mutantes estudiados, se determinó su crecimiento fotoautotrófico.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Nomenclatura empleada en este trabajo

En la redacción del presente Trabajo Fin de Grado se han seguido las pautas de nomenclatura propuestas por Meinke y Koornneeff (1997) para *Arabidopsis*. Las posteriores modificaciones y actualizaciones de este documento pueden encontrarse en [http://www.arabidopsis.org/portals/nomenclature/symbol\\_main.jsp](http://www.arabidopsis.org/portals/nomenclature/symbol_main.jsp).

Los alelos de un gen se refieren habitualmente mediante abreviaturas de tres letras en cursiva, usando mayúsculas para los alelos silvestres y minúsculas para los alelos mutantes. En el caso de existir diferentes genes con una misma denominación, se les distingue añadiendo un número al grupo de tres letras que les identifica. Los distintos alelos mutantes de un gen reciben un distintivo numérico, separado por un guion del identificador del gen. Los fenotipos mutantes se denotan mediante abreviaturas de tres letras, la primera de ellas en mayúsculas y todas ellas sin cursiva. A continuación, se añade un número para diferenciar fenotipos causados por mutaciones en distintos genes que reciben una misma denominación.

En este trabajo también se ha utilizado la notación AGI (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) para la denominación de los genes de *Arabidopsis*. Así por ejemplo, hemos continuado con la caracterización de los genes At5g54600, At1g75350 y At2g33800, dónde las letras *A* y *t* denotan el género (*Arabidopsis*) y la especie (*thaliana*), respectivamente, el número que viene a continuación hace referencia al cromosoma dónde se encuentra el gen (*g*) y los restantes números indican su localización dentro del cromosoma.

#### 3.2. Estirpes de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo

##### 3.2.1. Estirpes silvestres

Hemos empleado la estirpe silvestre de *Arabidopsis* Columbia-0 (Col-0) suministrada por el *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*, NASC (<http://arabidopsis.info/>).

##### 3.2.2. Estirpes mutantes

Hemos utilizado las estirpes mutantes que se indican en la Tabla 2, todas ellas aisladas con anterioridad a este trabajo, derivadas de mutagénesis insercional con el ADN-T de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y pertenecientes a distintas colecciones de dominio público: SALK (Alonso et al., 2003), SAIL (Syngenta Arabidopsis Insertion Library) y WiscDsLox (<https://myweb.space.wisc.edu/groups/Krysan/Web/2010/>). Las semillas de estas estirpes fueron suministradas por el NASC (<http://arabidopsis.info/>). Todos los mutantes utilizados en este trabajo están en fondo genético Col-0.



**Tabla 2.** Estirpes mutantes empleadas en este trabajo

Gen afectado	Estirpe mutante	Referencia
At5g55580	<i>mterf9</i>	Robles et al., 2015
At4g14605	<i>mda1-1</i>	Robles et al., 2012
At4g38160	<i>mterf6</i>	
At5g54600	<i>crd2-1</i>	
At1g75350	<i>crd3</i>	
At2g33800	<i>crd4</i>	
At4g02990	<i>rug2-2</i>	Quesada et al., 2011
At2g24120	<i>sca3-2</i>	Hricová et al., 2006

### 3.3. Disoluciones

#### 3.3.1. Medios de cultivo

Se indican a continuación los medios de cultivo empleados en este Trabajo Fin de Grado. En todo momento se trabajó con guantes para evitar la contaminación de los medios, siempre se empleó agua desionizada (con una resistividad media de 15 M $\Omega$  por cm) y todos los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave a 1 kg/cm<sup>2</sup> y 121°C durante 20 min en matraces con una capacidad dos veces superior a la del volumen a autoclavar a fin de evitar su derrame.

##### 3.3.1.1. Medios de cultivo líquidos

###### Medio ATM

El medio mínimo ATM (Kranz, 1987) se utilizó para regar las plantas cultivadas en maceta. Se compone de KNO<sub>3</sub> (5 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,5 mM), MgSO<sub>4</sub> (2 mM), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 mM), FeNaEDTA (51  $\mu$ M), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (70  $\mu$ M), MnCl<sub>2</sub> (14  $\mu$ M), CuSO<sub>4</sub> (0,5  $\mu$ M), ZnSO<sub>4</sub> (1  $\mu$ M), NaMoO<sub>4</sub> (0,2  $\mu$ M), NaCl (10  $\mu$ M) y CoCl<sub>2</sub> (0,01  $\mu$ M).

Para la preparación del medio ATM se añadió a 900 ml de agua: 5 ml de KNO<sub>3</sub> (1 M), 2,5 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 M), 2 ml de MgSO<sub>4</sub> (1 M), 2 ml de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1 M), 2 ml de FeNaEDTA (20 mM) y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando finalmente el volumen a 1 l. Todas las disoluciones madre se prepararon en las concentraciones indicadas. Las disoluciones madre de las sales se añadieron a los 900 ml de agua y no a la inversa, a fin de evitar la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico.

La composición de la disolución de micronutrientes es la siguiente: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (70 mM), MnCl<sub>2</sub> (14 mM), CuSO<sub>4</sub> (0,5 mM), ZnSO<sub>4</sub> (1 mM), NaMoO<sub>4</sub> (0,2 mM), NaCl (10 mM) y CoCl<sub>2</sub> (0,01 mM). Esta disolución se preparó añadiendo a 900 ml de agua: 4,32 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,77 g de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 124 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 287 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 48,7 mg de NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 584,4 mg de NaCl y 2,38 mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. Finalmente, se enrasó todo hasta el volumen final de 1 l.

### 3.3.1.2. Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos se prepararon añadiendo agar tras la completa disolución del resto de los componentes del medio. A continuación se esterilizaron en un autoclave y se vertieron en cajas de Petri dentro de una cabina de flujo laminar horizontal (CRUMA 870-FL) a fin de evitar su contaminación. Una vez preparados, los medios de cultivo sólidos se conservaron a 4°C con las placas de Petri en posición invertida para evitar la condensación de agua.

#### Medio GM

Se utilizó para el cultivo *in vitro* de Arabidopsis. Para la preparación de 2 l de medio GM, suficiente para obtener 20 placas de Petri, se añadieron 1800 ml de agua destilada a un matraz de 2 l y se adicionaron 4,3 g de sales MS (Duchefa), 20 g de sacarosa (1%) y 1 g de Mes (0,5 g/l), agitándose hasta su completa disolución con un agitador magnético. Se ajustó el pH de la disolución a 5,7 con KOH (5 M y/o 1 M) y se enrasó hasta un volumen final de 2 l, dividiéndose el volumen en 2 matraces a razón de 1 l en cada uno de ellos. Se añadió posteriormente 8 g de Plant Agar (Duchefa) a cada matraz, se sellaron con papel de aluminio y se esterilizaron en un autoclave. Tras la esterilización, se procedió a su vertido en placas de Petri a razón de aproximadamente unos 100 ml por placa de 15 cm de diámetro.

### 3.3.1.3. Medios de cultivo suplementados

El medio de cultivo GM descrito en el apartado anterior se suplementó cuando fue necesario, con distintas concentraciones de diferentes sustancias: NaCl (100 mM, 150 mM y 200 mM), KCl (125 mM y 150 mM), manitol (350 mM y 500 mM) o ácido abscísico (ABA; 3 µM, 6 µM y 10 µM). El NaCl, el KCl y el manitol se añadieron al medio de cultivo a la vez que el resto de componentes. El ABA se añadió tras la esterilización del medio de cultivo en un autoclave y su posterior estabilización a 55-60°C en un baño termostático.

La disolución madre de ABA se preparó a una concentración de 10 mM, añadiendo 26 mg de la hormona a una mezcla de agua y dimetil sulfóxido (DMSO) al 50% v/v en un volumen final de 10 ml. Se esterilizó por filtración, se alícuotó en tubos eppendorf y las alícuotas se almacenaron a -20°C.

### 3.3.2. Disoluciones para electroforesis

#### TAE 50x

El TAE 50x se compone de Tris-base (2 M), ácido acético glacial (5,71% v/v) y Na<sub>2</sub>EDTA (50 mM, pH 8,0). Para preparar 1 l se mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de una disolución Na<sub>2</sub>EDTA (0,5 M, pH 8,0). Su pH final se ajustó a 7,6. A partir de esta disolución madre se prepararon disoluciones de trabajo de TAE 1x.

### Tampón de carga 6x para electroforesis en geles de agarosa

El tampón de carga usado en las electroforesis se compone de Ficoll (20% m/v), xilencianol (0,25% m/v), azul de bromofenol (0,25% m/v) y Na<sub>2</sub>EDTA (10 mM).

### Marcador de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa

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

## **3.4. Métodos de cultivo**

### **3.4.1. Manipulación de semillas**

Las semillas se recogieron a partir de plantas totalmente secas que habían completado su ciclo de vida. Para ello se cortó la planta por la base, se presionó contra un colador con un tamaño de poro adecuado al de las semillas y sobre una hoja de papel en blanco se recogió lo tamizado. Las semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta cayeron en el papel y se volvieron a pasar por el tamiz de manera que, tras sucesivas repeticiones, únicamente quedaron las semillas. Almacenamos las semillas recogidas en tubos eppendorf y las conservamos a 4°C hasta su siembra.

### **3.4.2. Esterilización de semillas**

Las semillas obtenidas se esterilizaron antes de su cultivo para evitar la aparición de hongos en los cultivos *in vitro*. El procedimiento de esterilización consistió en sucesivos lavados de las semillas dentro de tubos eppendorf. En el primer lavado se suspendieron las semillas en una disolución acuosa del 40% de lejía comercial (NaClO al 45% m/v) y 3 µl/ml de una disolución del 1% v/v en Tritón X 100 (un detergente) durante 8 min, agitando bien los tubos. Pasado el intervalo anterior, se retiró la lejía de los tubos utilizando una micropipeta P1000 (evitando la eliminación de semillas) y se realizó un segundo lavado de agua estéril. Se agitaron de nuevo los tubos para evitar que las semillas se adhiriesen y se eliminó el agua. Se repitió dos veces más el lavado con agua estéril, y se dejaron las semillas dentro de los tubos eppendorf suspendidas en 1 ml de agua estéril.

### **3.4.3. Estratificación de semillas**

Las semillas esterilizadas y embebidas en agua se conservaron a 4°C durante al menos 24 h para favorecer su germinación al romper su dormancia. Este proceso se denomina estratificación y se puede llevar a cabo antes o después de su siembra en placas de Petri.

#### **3.4.4. Cultivo de semillas**

Se sembraron las semillas recolectadas en placas de Petri de 15 cm de diámetro con aproximadamente 100 ml de medio de cultivo solidificado en su interior. La siembra se llevó a cabo con materiales estériles dentro de una cabina de flujo laminar CRUMA 870-FL. Se utilizó una pipeta Pasteur para sembrar en cada placa de Petri aproximadamente 100 semillas, recolectándolas de los tubos eppendorf y depositándolas de una en una sobre la superficie del medio de cultivo en la posición que indicaba una cuadrícula situada debajo de la placa de Petri a modo de plantilla. Tras la siembra se precintaron las cajas de Petri con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, protegiéndolas de la entrada de cualquier partícula dañina pero sin impedir su libre intercambio de gases con el exterior.

Las semillas, recién sembradas y estratificadas en las cajas de Petri, se incubaron a  $20\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  con una iluminación continua de 2400-3100 lx de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Panasonic 40 FL40SS-ENW-37, dentro de una cámara de cultivo HLR-352-PE (Panasonic).

#### **3.4.5. Trasplante a maceta**

Cuando las plantas cultivadas en placas de Petri alcanzaron un tamaño que dificultaba su crecimiento en ellas, se trasplantaron a maceta para que completasen su ciclo de vida (aproximadamente desde la tercera a la cuarta semana tras la siembra de las semillas).

Habitualmente se utilizaron bandejas de plástico de 28 x 50 x 7 cm (ancho x largo x profundo), en las que cabían 42 alveolos de plástico, cada uno de ellos de 5 x 5 cm (diámetro x altura). En cada alveolo se colocaron macetas de rejilla de 5 x 6 cm (diámetro mayor x altura), en las cuales se añadió previamente un sustrato consistente en una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; 105-125 kg/m<sup>3</sup>), vermiculita (granulometría de 0 a 3 mm; 80-100 kg/m<sup>3</sup>) y turba no fertilizada de musgo *Sphagnum* de estructura gruesa, en una relación volumétrica de 1:1:0,5 respectivamente. Las macetas con rejilla permiten extraer las plantas individualmente de los alveolos para una más cómoda manipulación de las mismas. Se aisló cada planta de sus vecinas mediante el uso de cilindros de plástico transparentes denominados aracones (*aracons*; Beta Tech), proporcionados con sus correspondientes bases que se anclan a la maceta.

Para trasplantar las plantas de las placas de Petri a las macetas, se utilizaron unas pinzas de metal cogiendo la planta por la base, con cuidado de no dañar la raíz e introduciéndola en el sustrato de la maceta (previamente humedecido con disolución de riego ATM).

#### **3.4.6. Cultivo en maceta**

Las bandejas se almacenaron en una cámara climatizada a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 60-70% de humedad relativa, bajo iluminación continua, con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White, totalizando 5000 lx. Las bandejas de alveolos estuvieron permanentemente en contacto con agua en el fondo de las cubetas, realizándose un aporte de nutrientes una vez por semana mediante su riego con medio mínimo ATM. Cuando la floración de la

planta se interrumpe, cesa su riego, dejando que éstas se sequen para la posterior recolección de las semillas.

### **3.4.7. Cruzamientos**

Se realizó la fecundación de plantas de manera manual con el objetivo de obtener la descendencia deseada. Para ello se utilizaron dos plantas de *Arabidopsis*, una como donante (parental masculino) y otra como receptora de polen (parental femenino), y se siguió el procedimiento de emasculación descrito por Kranz, 1987.

Mediante la ayuda de una lupa binocular Motic MSZ-140 y pinzas de microcirugía Aesculap BD331, se procedió a la realización de los cruzamientos entre las plantas. Para ello se eligió un tallo inflorescente de la planta con capullos florales en su ápice y se le eliminaron las flores maduras, así como todos los capullos que tenía con el fin de evitar la autofecundación. A las flores restantes se les extirparon los sépalos, los pétalos y los estambres inmaduros, dejando al aire el pistilo (no fecundado) de esa forma. Se limpiaron de nuevo las pinzas de microcirugía y con ellas, en la planta donante, se extirpó una flor madura con los pétalos abiertos y estambres con polen en sus anteras. Con cuidado, se puso en contacto varias de las anteras del parental masculino con el pistilo de la flor del parental femenino, asegurando la impregnación del mismo con el polen de las anteras. Se señaló en todos los casos el cruzamiento añadiendo una etiqueta al tallo junto a la flor fecundada. Por último, la planta fecundada se devolvió a la cámara de cultivo para permitir la formación y maduración de la silicua resultante del cruzamiento. Una vez seca, se recogieron las silicuas y se depositaron en un tubo eppendorf adecuadamente etiquetado.

### **3.5. Análisis morfológico**

Las fotografías que aparecen en este trabajo fueron tomadas con un microscopio estereoscópico Leica M60 equipado con una cámara digital ICE80 HD, y las de menor aumento con una cámara fotográfica digital Nikon Coolpix S220.

### **3.6. Extracción de ADN genómico**

Se extrajo ADN genómico con el fin de utilizarlo como molde en amplificaciones mediante PCR empleando el método de Dellaporta et al., (1983), modificado según se indica en <http://www.caltech.edu/meyerowitz/protocols/quickdna.html>.

El ADN molde con el que se trabajó se extrajo de plantas silvestres (Col-0), mutantes sencillos (*sca3-2*, *rug2-2*, *mda1-1*, *mterf6*, *mterf9*, *crd2-1*, *crd3* y *crd4*) o dobles mutantes (*sca3-2 mda1-1*, *sca3-2 mterf9*, *rug2-2 crd2-1*, *rug2-2 crd4*, *crd2-1 crd3* y *crd2-1 crd4*), que fueron recolectadas, introducidas en tubos eppendorf y congeladas a -18°C. Se añadió a cada tubo 500 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 0,5 M, NaCl 0,5 M, EDTA 0,5 M) y con la ayuda de unas pinzas, se introdujeron 2 o 3 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro (Vidrafoc, 376/1), introduciéndose posteriormente los

tubos eppendorf en un macerador Mixermill 300 durante 180 segundos a 30 Hz. Se añadió a cada tubo 35 µl de SDS al 20% y se mezcló por inversión antes de incubar los tubos a 65°C durante 5 min. A continuación se les añadió 130 µl de acetato de potasio (KOAc) 5M y se mezcló bien por inversión. Se incubaron los tubos durante 8 min en hielo y se centrifugaron en una microfuga a 13000 rpm durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf estériles y se añadió a cada tubo 640 µl de isopropanol y 60 µl de acetato de sodio (NaAcO) 3M a fin de precipitar los ácidos nucleicos. Se incubaron los tubos durante 10 min a -20°C y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron los precipitados de ácidos nucleicos añadiendo 500 µl de etanol al 70% a cada tubo. Tras centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min, se eliminó el etanol y se dejaron secar los precipitados con los tubos abiertos sobre la poyata. Una vez secos, se resuspendieron con 20 o 40 µl de agua estéril y se almacenaron a -20°C.

### 3.7. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por la casa comercial Sigma-Aldrich y se recogen, así como su finalidad, en la Tabla 3. Para el genotipado de cada una de las mutaciones se emplearon tres cebadores diseñados con la herramienta informática *T-DNA Primer Designed* del SALK (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) previamente a este trabajo. Dos de ellos, los cebadores RP (*Right Primer*) y LP (*Left Primer*) hibridan con secuencias génicas situadas aguas arriba y abajo de la inserción, respectivamente. Para cada gen se utilizó una pareja de cebadores RP y LP específica. El tercer cebador denominado LBa1 (*Left Border a1*) o LBb1.3 hibrida con secuencias presentes en el borde izquierdo del ADN-T (Tabla 3).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Finalidad	Denominación de los cebadores (Forward/Reverse)	Secuencias de los cebadores (5' → 3')	
		Cebador Forward	Cebador Reverse
Viabilidad del ADN	ACTINA2 F/R	GCACCCTGTTCTTCTTACCG	AACCCTCGTAGATTGGCACA
	LBb1.3	ATTTTGCCGATTCGGAAC	
Genotipado de las mutaciones	LBa1		TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
	MTERF9 LP/RP	CAAACCTGGAAAAGATTGAGG	GGTCTTGGCATTCTAATTCC
	MDA1 LP/RP	TGTTGAATGGGAAGACAAAGC	AACCGATAACCTGAAACCGAC
	SCA3 F2/R3	GCTCCTCATATTGAGCTTTTG	GAATCCATTATATCATCCAAATG
	MTERF6 F1/R2	ATGGAGGTGACAAATACGAGC	GAGGAATCTGATCCTAGGCTG

### 3.8. Amplificaciones mediante PCR

Con el objetivo de genotipar las mutaciones estudiadas, se tomó en cada amplificación 1 µl de la solución de ADN genómico extraída de individuos de la estirpe silvestre Col-0, de los mutantes *sca3-2*, *mda1-1*, *mterf6* y *mterf9*, y de los dobles mutantes *sca3-2 mda1-1* y *sca3-2 mterf9*. Los cebadores empleados se añadieron a una concentración final de 0,4 µM y cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos a otra de 0,2 mM.

Las reacciones se llevaron a cabo en todos los casos en tubos eppendorf de pared fina de 0,2 ml utilizando un volumen final de 10 µl por reacción, en un termociclador Bio-Rad 9700, en el que se programó un número de 35 ciclos. Se utilizó siempre la polimerasa termoestable *Taq* (Bioline). La duración de la etapa de polimerización dependió del tamaño de la molécula que se pretendía amplificar, asumiéndose que la polimerasa de ADN utilizada habitualmente sintetiza ADN a razón de una kilobase por min. La temperatura de apareamiento (*annealing temperature*;  $T_m$ ) se calculó con la fórmula  $T_m = 4(C+G) + 2(A+T)$ , siendo C, G, A y T el número de las respectivas bases en el oligonucleótido (Suggs et al., 1981). Utilizamos una temperatura de apareamiento entre 5 y 10°C inferior a la calculada. Se ha programado siempre una etapa final de 10 min a 72°C, para permitir el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas protuberantes en 5'.

### 3.9. Electroforesis en geles de agarosa

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa al 1 o al 2% m/v, preparados a partir de la disolución de 1,3 o 2,6 g de agarosa respectivamente, en 130 ml de tampón electrolito 1xTAE en un microondas. Se añadió a la disolución bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5 µg/ml mientras la disolución estaba aún caliente, y se vertió a continuación en un portageles para electroforesis, al cual se le anclan unos peines para la generación de pocillos en el gel. Se dejó enfriar la disolución hasta su solidificación, se extrajo el peine y se colocó el portageles en una cubeta horizontal para electroforesis que se rellenó con tampón de electroforesis 1xTAE. Se prepararon las muestras de ADN a cargar en cada uno de los pocillos del gel añadiendo a cada una de ellas 2 µl de tampón de carga y se reservaron pocillos en cada gel para cargar una alícuota (5 u 8 µl) del marcador de peso molecular a fin de inferir los tamaños aproximados de los productos de PCR. Se aplicó una corriente eléctrica a un voltaje constante de (100 V) y el ADN migró hacia el polo positivo, gracias a su carga negativa. Transcurrida la electroforesis, se extrajo el portageles con el gel, se observó bajo luz ultravioleta de 312 nm, y se fotografió en un documentador de geles INFINITY VX2, para posteriormente estimar el tamaño de las moléculas obtenidas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudio de las interacciones genéticas entre los mutantes *crd*

Los mutantes *crd* se aislaron previamente a este trabajo en los laboratorios de los profesores V. Quesada y P. Robles. Los individuos *crd* portan en homocigosis alelos mutantes insercionales y recesivos, en genes nucleares que codifican proteínas ribosómicas cloroplásticas (véase la Tabla 2 en la página 16) y se caracterizan por presentar un menor tamaño y grado de pigmentación que la estirpe silvestre de la que derivan (Col-0) (Figura 3). Además, la morfología de los cloroplastos de las células del mesófilo foliar de los mutantes *crd* está alterada (Quesada y Robles, resultados sin publicar). Con anterioridad a este trabajo, se inició el análisis genético y fisiológico de los mutantes *crd* (Gea Caselles, 2012; Valderrama Pérez, 2014). Hemos continuado con su caracterización mediante el análisis de las eventuales interacciones genéticas entre algunos de ellos.



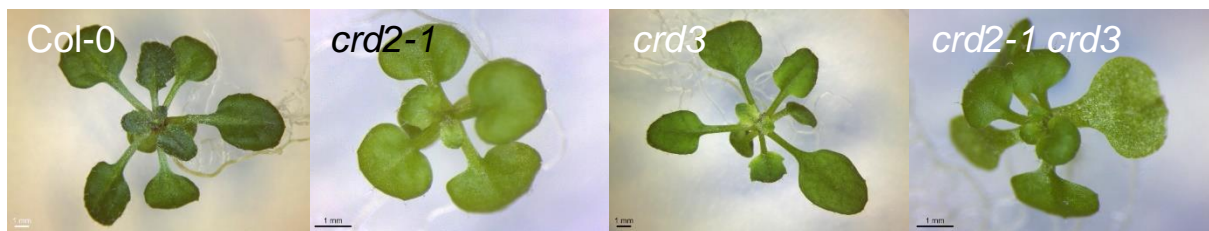
**Figura 3. Fenotipos morfológicos de los mutantes insercionales *crd*.** Imágenes de un individuo silvestre Col-0 y de los mutantes *crd1*, *crd2-1*, *crd3* y *crd4*. Las imágenes se tomaron a los 22 dte (días tras la estratificación). Las barras de escala indican 1 mm. Todas las imágenes se obtuvieron a los mismos aumentos.

En el análisis genético, para determinar si los genes afectados en distintos mutantes participan en la misma o en distintas operaciones genéticas, una estrategia habitualmente empleada consiste en realizar cruzamientos entre ellos con el objetivo de identificar y caracterizar los correspondientes dobles mutantes. En un trabajo anterior (Gea Caselles, 2012) se estudiaron los dobles mutantes que implicaban a la estirpe *crd1*. En este Trabajo de Fin de Grado se ha completado el estudio de los restantes dobles mutantes: *crd2-1 crd3*, *crd2-1 crd4* y *crd3 crd4*. Con este fin se realizaron los cruces *crd2-1 x crd3*, *crd2-1 x crd4* y *crd3 x crd4*. Según se espera de la complementación entre mutantes recesivos afectados en genes distintos, todos los individuos F<sub>1</sub> resultantes de los cruzamientos presentaron fenotipo silvestre. Las plantas F<sub>1</sub> se dejaron autofecundar y las correspondientes semillas F<sub>2</sub> se recogieron y sembraron. En ninguna de las poblaciones F<sub>2</sub> estudiadas encontramos individuos de fenotipo doble mutante claramente distinguible de cada uno de los mutantes simples implicados en cada cruzamiento. Por este motivo, decidimos identificarlos en poblaciones F<sub>3</sub>, en las que el número de individuos dobles mutantes esperado para genes que segregan independientemente, es mayor (1 de cada 4) que en poblaciones F<sub>2</sub> (1 de cada 16), lo que suele facilitar su detección. Para ello se seleccionan individuos F<sub>2</sub> de fenotipo mutante simple, y por tanto homocigóticos para una de las mutaciones, de manera que en promedio, las dos terceras partes de ellos deben ser heterocigóticos para



la segunda mutación. Se detalla a continuación los resultados obtenidos tras el análisis de las distintas familias F<sub>3</sub> establecidas.

Los mutantes *crd2-1* y *crd4* son similares en aspecto y tamaño y se diferencian de los individuos *crd3* fundamentalmente porque estos últimos presentan indentaciones más evidentes en el margen foliar y un amarilleamiento de sus peciolo y de la región basal del limbo foliar (Figura 3). Por ello, siempre que fue posible, obtuvimos poblaciones F<sub>3</sub> a partir de la autofecundación de plantas F<sub>2</sub> de fenotipo Crd3. En el caso del cruzamiento *crd2-1* x *crd3*, el análisis de los individuos y de las segregaciones fenotípicas aparecidas en las poblaciones F<sub>3</sub> sugiere la existencia de una interacción epistática entre ambas mutaciones (Figura 4; Tabla 4).



**Figura 4. Fenotipo del presunto doble mutante *crd2-1 crd3*.** Rosetas de un individuo silvestre (Col-0), de los mutantes sencillos *crd2-1* y *crd3*, y del doble mutante *crd2-1 crd3*. Las fotografías se obtuvieron a los 22 dte. Las barras de escala indican 1 mm.

**Tabla 4.** Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F<sub>3</sub> procedentes del cruzamiento *crd2-1* x *crd3*

Familias F <sub>3</sub>	Fenotipo en F <sub>2</sub>	Clases fenotípicas			Segregación	
		Crd3	Doble mutante	Hipótesis	$\chi^2$	P
1	Crd3	35	2	3:1	7,50	0,006
2	Crd3	40	0	1		
3	Crd3	40	0	1		
4	Crd3	32	6	3:1	1,72	0,189
5	Crd3	28	12	3:1	0,53	0,465
6	Crd3	33	6	3:1	1,92	0,165
7	Crd3	40	0	1		

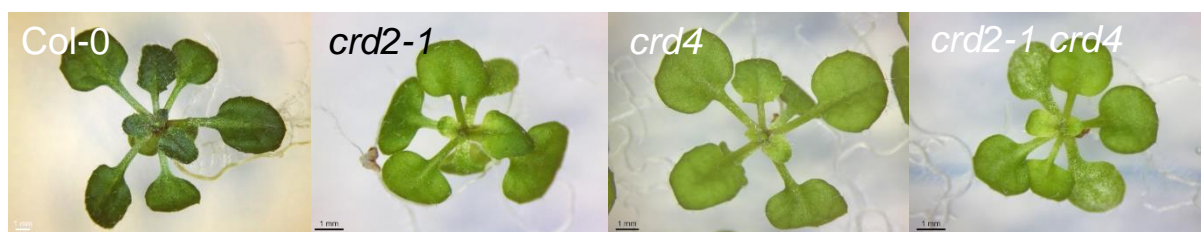
Se indica el valor de  $\chi^2$  para la segregación propuesta. Aparecen en cursiva aquellos valores en los que los resultados observados en las poblaciones F<sub>3</sub> se ajustan a la hipótesis nula ( $P > 0,05$ ). En caso de que una de las clases fenotípicas esperadas tenga un valor inferior a 5 individuos se ha aplicado la corrección de Yates.

En 4 de las 7 familias F<sub>3</sub> estudiadas aparecieron dos clases fenotípicas, una mayoritaria constituida por individuos de fenotipo Crd3 y otra por individuos de fenotipo similar a Crd2, que se ajustaban a una proporción 3:1 en 3 de las 4 poblaciones segregantes. Consideramos a los individuos

de fenotipo similar a Crd2 como presuntos dobles mutantes, lo que indicaría que *CRD2* es epistático sobre *CRD3* (Figura 4). De acuerdo con esta hipótesis, las segregaciones fenotípicas obtenidas en las familias F<sub>2</sub> derivadas del mismo cruzamiento se ajustaron a una proporción 9:4:3 (236 Silvestre: 85 Crd2: 66 Crd3;  $\chi^2 = 3,56$ ; P = 0,17).

En el momento de redactar esta memoria se han obtenido y estudiado varias familias F<sub>2</sub> derivadas del cruce *crd3* x *crd4*. Entre sus individuos hemos distinguido plantas silvestres y mutantes Crd4 y Crd3 que se ajustaban a una proporción 9:4:3 (314 Silvestre: 142 Crd4: 96 Crd3;  $\chi^2 = 0,70$ ; P = 0,70). La segregación fenotípica obtenida sugiere que el fenotipo de los dobles mutantes es indistinguible del de Crd4 por lo que *CRD4* sería epistático sobre *CRD3*. Con posterioridad a este trabajo se obtendrán y estudiarán familias F<sub>3</sub> derivadas de individuos F<sub>2</sub> de fenotipo Crd3, lo que permitirá confirmar o refutar esta hipótesis.

El principal rasgo fenotípico que diferencia a los mutantes individuales *crd2-1* y *crd4* es el tamaño ligeramente mayor de este último (Figura 3). No obstante, esta diferencia es difícil de apreciar en las poblaciones F<sub>2</sub> derivadas del cruzamiento *crd2-1* x *crd4*, debido a la existencia de un cierto grado de variabilidad en los tamaños de las distintas plantas aparecidas. Aun así, utilizamos la diferencia en tamaño como criterio para la selección de plantas F<sub>2</sub> con las que establecer las correspondientes familias F<sub>3</sub>. Seleccionamos para ello los individuos mutantes de mayor tamaño, considerándolos presuntos homocigóticos *crd4* y tras su autofecundación se analizaron las segregaciones fenotípicas aparecidas en las poblaciones F<sub>3</sub>. En 2 de las 8 familias F<sub>3</sub> estudiadas aparecieron dos clases, una constituida por individuos de fenotipo aparentemente Crd4 y otra por individuos presuntamente doble mutante, de tamaño y aspecto muy similar al de *crd2-1* (Figura 5). No obstante, ninguna de las dos segregaciones fenotípicas se ajustó a una proporción 3:1 (Tabla 5). El reducido número de familias segregantes identificadas y su falta de ajuste a una segregación 3:1 podrían atribuirse al elevado grado de similitud fenotípica entre *crd2-1*, *crd4* y el presunto doble mutante *crd2-1 crd4*, lo que dificultaría su distinción. Una posible interpretación de estos resultados sería la existencia de una interacción epistática de *CRD2* sobre *CRD4*. No obstante, esta interacción epistática propuesta, así como las de *CRD2* sobre *CRD3* y *CRD4* sobre *CRD3* se confirmarán con posterioridad a este trabajo. Para ello, se ha extraído ADN genómico de individuos presuntos dobles mutantes derivados de cruzamientos entre los mutantes *crd* citados anteriormente, con el fin de genotipar mediante PCR las correspondientes mutaciones.



**Figura 5. Fenotipo del presunto doble mutante *crd2-1 crd4*.** Rosetas de un individuo silvestre (Col-0), de los mutantes sencillos *crd2-1* y *crd4*, y del doble mutante *crd2-1 crd4*. Las fotografías se obtuvieron a los 22 dte. Las barras de escala indican 1 mm.

**Tabla 5.** Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F<sub>3</sub> procedentes del cruzamiento *crd2-1 x crd4*

Familias F <sub>3</sub>	Fenotipo en F <sub>2</sub>	Clases fenotípicas			Segregación	
		Crd4	Doble mutante	Hipótesis	$\chi^2$	P
1	Crd4	40	0	1		
2	Crd4	38	0	1		
3	Crd4	40	0	1		
4	Crd4	33	4	3:1	3,90	0,046
5	Crd4	40	0	1		
6	Crd4	36	4	3:1	4,73	0,028
7	Crd4	40	0	1		
8	Crd4	40	0	1		

Se siguen las mismas indicaciones que en la Tabla 4.

#### 4.2. Análisis de interacciones genéticas entre mutantes *mterf* y *crd*

En los laboratorios de V. Quesada y P. Robles se obtuvieron y caracterizaron anteriormente a este trabajo dobles mutantes derivados de los cruzamientos entre individuos *crd* de una parte, y *mda1* y *mterf9* de otra (Robles et al., 2015). Los mutantes *mda1-1* y *mterf9*, afectados en los genes *mTERF* At4g14605 y At5g55580 respectivamente, presentan un retraso en su desarrollo y una pigmentación pálida generalizada, posiblemente debido a una alteración en la función cloroplástica (Robles et al., 2012b; 2015). Con el objetivo de continuar con el análisis de las eventuales interacciones genéticas entre genes *mTERF* y *CRD*, en un trabajo anterior (Valderrama Pérez, 2014) se obtuvieron poblaciones de semillas F<sub>2</sub> derivadas de cruzamientos entre los mutantes *crd2-1* y *crd4* de una parte, y el mutante *rug2-2* afectado en el gen *mTERF* *RUGOSA2* (Quesada et al., 2011), de otra. En este trabajo se detalla la caracterización de los dobles mutantes correspondientes. Las segregaciones fenotípicas de las familias F<sub>2</sub> procedentes del cruzamiento *crd2-1 x rug2-2* se ajustaron a una

proporción 9:3:3:1 (149 Silvestre: 59 Crd2-1: 63 Rug2-2: 14 Doble mutante;  $\chi^2=3,90$ ;  $P=0,27$ ). A continuación, se obtuvieron poblaciones de semillas F<sub>3</sub> a partir de plantas F<sub>2</sub> que presentaron fenotipo Crd2-1.



**Figura 6. Fenotipo del presunto doble mutante *crd2-1 rug2-2*.** Rosetas de un individuo silvestre (Col-0), del mutante sencillo *rug2-2* (en fondo genético Col-0) y de dos individuos de la familia F<sub>3</sub>-4. El de la derecha es supuestamente doble mutante *crd2-1 rug2-2* y el de la izquierda presenta fenotipo Crd2-1. Las imágenes se tomaron a los 22 dte. Las barras de escala indican 1 mm.

**Tabla 6.** Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F<sub>3</sub> procedentes del cruzamiento *crd2-1 x rug2-2*

Familias F <sub>3</sub>	Fenotipo en F <sub>2</sub>	Clases fenotípicas		Segregación		
		Crd2-1	Doble mutante	Hipótesis	$\chi^2$	P
1	Crd2-1	29	10	3:1	0,01	0,926
2	Crd2-1	23	15	3:1	4,24	0,039
3	Crd2-1	21	15	3:1	5,33	0,021
4	Crd2-1	30	10	3:1	0,00	1,000
5	Crd2-1	27	12	3:1	0,69	0,405
6	Crd2-1	32	7	3:1	1,03	0,309

Se siguen las mismas indicaciones que en la Tabla 4.

En todas las familias F<sub>3</sub> estudiadas aparecieron dos clases fenotípicas, una constituida por individuos de fenotipo Crd2-1 y otra por individuos presuntos dobles mutantes, que se ajustaron a una proporción 3:1 en 4 de ellas. Los individuos *crd2-1 rug2-2* mostraron un fenotipo resultante de combinar rasgos fenotípicos presentes en los parentales: un menor tamaño y pigmentación, similar a *crd2-1*, y hojas de la roseta variegadas y con indentaciones como en *rug2-2* (Figura 6). Estos resultados sugieren una relación de aditividad entre los genes *RUG2* y *CRD2*.

En el caso de las familias F<sub>2</sub> derivadas del cruzamiento *crd4 x rug2-2*, la segregación fenotípica observada también se ajustó a una proporción 9:3:3:1 (102 Silvestre: 30 Crd4: 48 Rug2-2: 12 Doble mutante;  $\chi^2 = 5,33$ ;  $P = 0,15$ ).



**Figura 7. Fenotipo del presunto doble mutante *crd4 rug2-2*.** Rosetas de un individuo silvestre (Col-0), del mutante sencillo *rug2-2* y de dos individuos de la familia F<sub>3</sub>-6. El de la izquierda es supuestamente doble mutante *crd4 rug2-2* y el de la derecha presenta fenotipo Crd4. Las imágenes se tomaron a los 22 dte. Las barras de escala indican 1 mm.

**Tabla 7. Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F<sub>3</sub> procedentes del cruzamiento *crd4 x rug2-2***

Familias F <sub>3</sub>	Fenotipo en F <sub>2</sub>	Clases fenotípicas			Segregación	
		Crd4	Doble mutante	Hipótesis	$\chi^2$	P
1	Crd4	33	6	3:1	1,92	0,165
2	Crd4	23	17	3:1	6,53	0,010
3	Crd4	31	8	3:1	0,42	0,517
4	Crd4	40	0	1		
5	Crd4	40	0	1		
6	Crd4	31	9	3:1	0,13	0,715
7	Crd4	40	0	1		
8	Crd4	39	0	1		
9	Crd4	35	5	3:1	3,33	0,067
10	Crd4	28	12	3:1	0,53	0,465

Se siguen las mismas indicaciones que en la Tabla 4.

Se obtuvieron poblaciones F<sub>3</sub> procedentes de plantas F<sub>2</sub> de fenotipo Crd4. En 6 de las 10 familias F<sub>3</sub> estudiadas aparecieron dos clases fenotípicas, una integrada por individuos de fenotipo Crd4 y otra por presuntos dobles mutantes, cuyo fenotipo consideramos resultante de la mera aditividad de los de los mutantes individuales (Tabla 7; Figura 7): plantas de tamaño inferior a los de los mutantes sencillos, con hojas de la roseta variegadas y con indentaciones. Esto sugiere la existencia de una aditividad entre los genes *CRD4* y *RUG2*. En 5 de las 6 poblaciones segregantes la segregación fenotípica observada se ajustó a una proporción 3:1 (Crd4:Doble mutante).

Con el fin de confirmar las interacciones genéticas propuestas, se ha iniciado el genotipado mediante PCR de las correspondientes mutaciones en los presuntos dobles mutantes *crd2-1 rug2-2* y *crd4 rug2-2*, que será finalizado con posterioridad a este trabajo.

### 4.3. Análisis de interacciones genéticas entre el mutante *sca3-2* y mutantes *mterf*

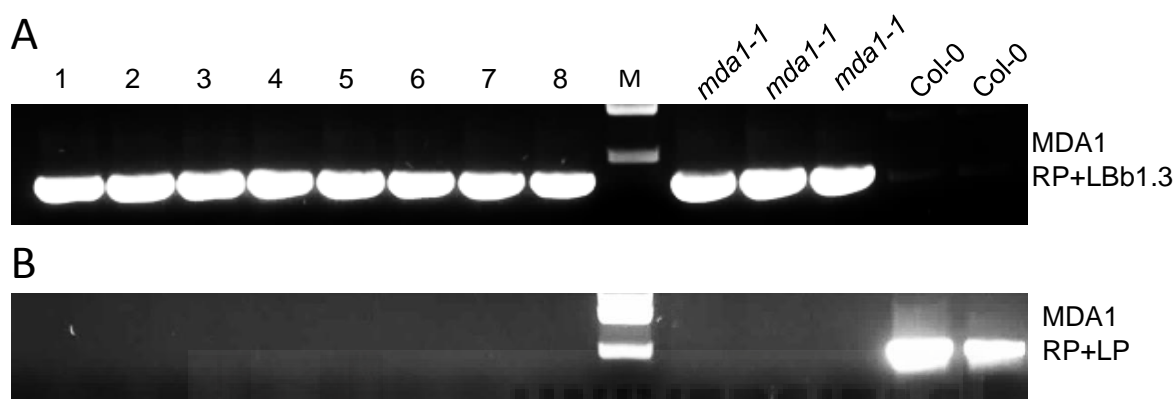
El mutante *sca3-2* (*scabra3-2*) está afectado en el gen nuclear *SCA3* que codifica una polimerasa monomérica de ARN del cloroplasto (RpoTp) requerida para la transcripción de genes del genoma de dicho orgánulo (Hricová et al., 2006). La perturbación de la función de los genes *MDA1* (Robles et al., 2012b) y *MTERF9* (Robles et al., 2015) altera la expresión de genes del genoma del cloroplasto. Por ello, decidimos investigar la existencia de eventuales relaciones funcionales entre la polimerasa RpoTp y los factores mTERF MDA1 y MTERF9.

En un trabajo previo (Valderrama Pérez, 2014) se efectuaron los cruzamientos *sca3-2* x *mda1-1* y *sca3-2* x *mterf9*, y se obtuvieron varias poblaciones de semillas F<sub>2</sub>. En este trabajo, hemos identificado y estudiado los dobles mutantes *sca3-2 mda1-1* y *sca3-2 mterf9* y obtenido semillas F<sub>2</sub> derivadas del cruzamiento *sca3-2* x *mterf6*, siendo este último un mutante afectado en un gen *mTERF* cuya caracterización hemos iniciado y que se comenta más adelante (véase el apartado 4.4 en la página 33). En las familias F<sub>2</sub> estudiadas derivadas del cruzamiento *sca3-2* x *mda1-1*, se observaron únicamente 3 clases fenotípicas que se ajustaron a una proporción 9:4:3 (107 Silvestre: 47 Sca3-2: 46 Mda1-1;  $\chi^2=2,37$ ; P=0,30), lo que sugería que la mutación *sca3-2* era epistática sobre *mda1-1*. Para facilitar la identificación de los individuos dobles mutantes, se obtuvieron 16 familias F<sub>3</sub> a partir de la autofecundación de 8 plantas F<sub>2</sub> de fenotipo Sca3-2 y de otras tantas de fenotipo Mda1-1 (Tabla 8). Los resultados obtenidos apoyan la existencia de una interacción epistática: en 5 de las 8 familias F<sub>3</sub> obtenidas a partir de individuos F<sub>2</sub> de fenotipo Mda1-1, aparecieron dos clases fenotípicas, una constituida por individuos de fenotipo Mda1-1 y otra por individuos de fenotipo Sca3-2 (Figura 8) que se ajustaban a una proporción 3:1 (Mda1-1:Sca3-2) (Tabla 8). En consonancia con estos resultados, todas las plantas pertenecientes a 8 progenies F<sub>3</sub> derivadas de otros tantos individuos F<sub>2</sub> de fenotipo Sca3-2 presentaron fenotipo Sca3-2 (resultados no mostrados).

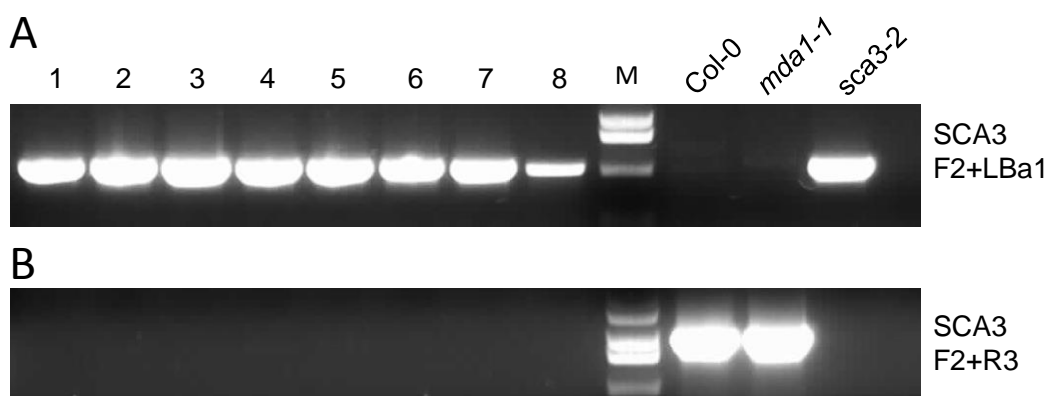
Con el fin de genotipar las mutaciones *sca3-2* y *mda1-1*, se extrajo ADN de varios individuos F<sub>3</sub> presuntos dobles mutantes *sca3-2 mda1-1* que se utilizó como molde en amplificaciones mediante PCR. Se emplearon para ello oligonucleótidos diseñados previamente a este trabajo para la identificación de ambas mutaciones (Hricová et al., 2006; Robles et al., 2012b) y que se detallan en la Tabla 3 en la página 21. No se obtuvieron productos de amplificación con oligonucleótidos que hibridan con secuencias de los genes *SCA3* (F2 y R2) y *MDA1* (LP y RP) que flanquean a las inserciones presentes en los alelos mutantes (Figuras 9 y 10) debido a la presencia del ADN-T entre dichas secuencias. Por el contrario, sí se obtuvieron productos de amplificación cuando se combinó un oligonucleótido que hibrida con secuencias específicas del borde izquierdo del ADN-T (LBb1.3 y LBa1 para *MDA1* y *SCA3*, respectivamente) y uno que lo hace con secuencias de los genes *SCA3* (F2) o *MDA1* (RP) situadas aguas arriba de las inserciones. Estos resultados demuestran que los individuos F<sub>3</sub> seleccionados eran portadores en homocigosis de las mutaciones *sca3-2* y *mda1-1*.



**Figura 8. Fenotipo morfológico del doble mutante *mda1-1 sca3-2*.** Rosetas de un individuo silvestre (Col-0), de los mutantes sencillos *mda1-1* y *sca3-2* (ambos en fondo genético Col-0) y del doble mutante *mda1-1 sca3-2*. Las fotografías se obtuvieron a los 22 dte. Las barras de escala indican 1 mm.



**Figura 9. Genotipado de la mutación *mda1-1* en el doble mutante *mda1-1 sca3-2*.** La imagen corresponde a la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, de los productos de PCR obtenidos a partir de amplificaciones realizadas con los cebadores (A) MDA1-RP+LBb1.3 o (B) MDA1-RP+MDA1-LP. Se empleó como molde el ADN genómico de 8 individuos de la familia F<sub>3-5</sub> presuntos dobles mutantes, así como de individuos mutantes *mda1-1* y silvestres Col-0. (M) Marcador de peso molecular.



**Figura 10. Genotipado de la mutación *sca3-2* en el doble mutante *mda1-1 sca3-2*.** La imagen corresponde a la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, de los productos de PCR obtenidos a partir de amplificaciones realizadas con los cebadores (A) SCA3-F2+LBa1 o (B) SCA3-F2+R3. Se empleó como molde el ADN genómico de 8 individuos de la familia F<sub>3-5</sub> presuntos dobles mutantes, así como de individuos mutantes *mda1-1* y *sca3-2* y del silvestre Col-0. (M) Marcador de peso molecular.

**Tabla 8.** Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones F<sub>3</sub> procedentes del cruzamiento *mda1-1* x *sca3-2*

Familias F <sub>3</sub>	Fenotipo en F <sub>2</sub>	Clases fenotípicas en F <sub>3</sub>			Segregación	
		Mda1-1	Sca3-2	Hipótesis	χ <sup>2</sup>	P
1	Mda1-1	46	0	1		
2	Mda1-1	35	7	3:1	1,55	0,212
3	Mda1-1	47	11	3:1	1,12	0,288
4	Mda1-1	42	0	1		
5	Mda1-1	30	15	3:1	1,67	0,196
6	Mda1-1	31	14	3:1	0,89	0,343
7	Mda1-1	38	8	3:1	1,42	0,233
8	Mda1-1	42	0	1		

Se siguen las mismas indicaciones que en la Tabla 4.

Para confirmar la existencia de una interacción epistática entre las mutaciones *sca3-2* y *mda1-1* se cuantificaron los pesos frescos de plantas F<sub>3</sub> presuntas dobles mutantes *mda1-1 sca3-2* y se compararon con los valores obtenidos para individuos de la estirpe silvestre Col-0 y de los mutantes sencillos *mda1-1* y *sca3-2*. Los pesos frescos de los individuos *mda1-1 sca3-2* no resultaron ser significativamente distintos de los de *sca3-2*, pero sí lo fueron de los de *mda1-1* y Col-0, lo que nos permitió confirmar la epistasia de *sca3-2* sobre *mda1-1* (Tabla 9).

**Tabla 9.** Determinación de los pesos frescos de presuntos dobles mutantes procedentes de poblaciones F<sub>3</sub> del cruzamiento *mda1-1* x *sca3-2*

Estirpe	Nº de individuos	Peso fresco (mg) <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	Reducción de peso (%) <sup>c</sup>
Col-0	15	26,13±3,7	7,6E-35	-
<i>mda1-1</i>	15	7,95±1,4	2,2E-23	69,55
<i>sca3-2</i>	15	2,46±0,5	0,94	90,55
<i>mda1-1 sca3-2</i>	30	2,45±0,6	-	90,60

<sup>a</sup>Se indican los valores promedios en mg de los pesos frescos de los individuos analizados de cada estirpe ± la desviación típica. <sup>b</sup>Los valores correspondientes a los individuos presuntos dobles mutantes *mda1-1 sca3-2* no resultaron significativamente distintos de los de *sca3-2* (P>0,05) y sí lo fueron de los de *mda1-1* y Col-0 (P<0,01), empleando un test de la t de Student. <sup>c</sup>Se representa, en porcentaje, la reducción de peso de individuos mutantes sencillos y dobles mutantes con respecto a la estirpe silvestre Col-0.

En cuanto a las familias F<sub>2</sub> procedentes del cruzamiento *sca3-2* x *mterf9*, las proporciones fenotípicas se ajustaron a una segregación 9:3:3:1 (42 Silvestre: 17 Sca3-2: 21 Mterf9: 3 Doble



mutante;  $\chi^2=3,42$ ;  $P=0,35$ ). Se obtuvieron poblaciones  $F_3$  a partir de la autofecundación de plantas  $F_2$  de fenotipo Sca3-2 o Mterf9. En 8 de las 12 familias  $F_3$  estudiadas aparecieron dos clases fenotípicas, una constituida por individuos de fenotipo Mterf9 o Sca3-2 (dependiendo del fenotipo de la planta  $F_2$  de procedencia) y otra por presuntos dobles mutantes que se ajustaban, en 7 de ellas, a una proporción 3:1 (Tabla 10). Los resultados obtenidos sugieren una relación sinérgica entre ambas mutaciones ya que el fenotipo de los dobles mutantes no se explica por la mera aditividad del de los mutantes individuales: las plantas *mterf9 sca3-2* fueron más pequeñas, crecieron más lentamente y presentaron una pigmentación sustancialmente menor que la de los mutantes individuales (Figura 11). Además, la mayoría de los individuos *mterf9 sca3-2* no sobrevivieron a su trasplante a maceta.



**Figura 11. Fenotipo morfológico del presunto doble mutante *mterf9 sca3-2*.** Rosetas de un individuo silvestre (Col-0), de los mutantes sencillos *mterf9* y *sca3-2* (ambos en fondo genético Col-0) y del doble mutante *mterf9 sca3-2*. Las fotografías se obtuvieron a los 22 dte. Las barras de escala indican 1 mm.

**Tabla 10.** Análisis de las segregaciones fenotípicas en poblaciones  $F_3$  procedentes del cruzamiento *mterf9 sca3-2*

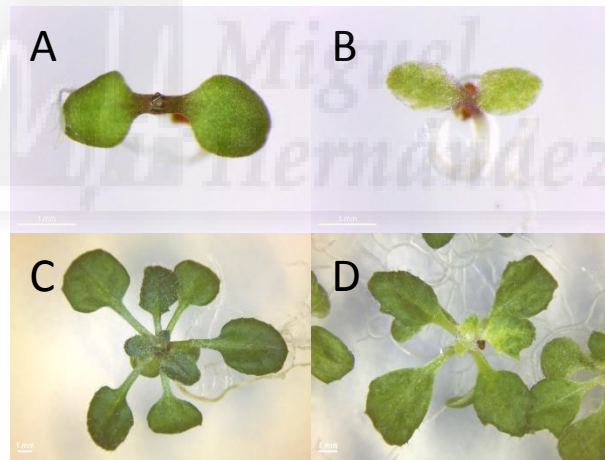
Familias $F_3$	Fenotipo en $F_2$	Clases fenotípicas en $F_3$			Segregación		
		Mterf9	Sca3-2	Doble mutante	Hipótesis	$\chi^2$	P
1	Mterf9	42	0	8	3:1	2,16	0,141
2	Mterf9	38	0	12	3:1	0,02	0,870
3	Mterf9	49	0	0	1		
4	Mterf9	40	0	10	3:1	0,67	0,414
5	Mterf9	50	0	0	1		
6	Mterf9	37	0	14	3:1	0,16	0,686
7	Mterf9	50	0	0	1		
8	Mterf9	35	0	16	3:1	1,10	0,293
9	Sca3-2	0	37	13	3:1	0,02	0,870
10	Sca3-2	0	50	0	1		
11	Sca3-2	0	41	10	3:1	0,79	0,373
12	Sca3-2	0	45	6	3:1	4,76	0,029

Se siguen las mismas indicaciones que en la Tabla 4.

Hemos confirmado en F<sub>4</sub> el fenotipo de los individuos *mterf9 sca3-2* y extraído el ADN genómico de varios individuos presuntos dobles mutantes. Con posterioridad a este trabajo se procederá a su genotipado.

#### 4.4. Aislamiento y caracterización inicial del mutante *mterf6*

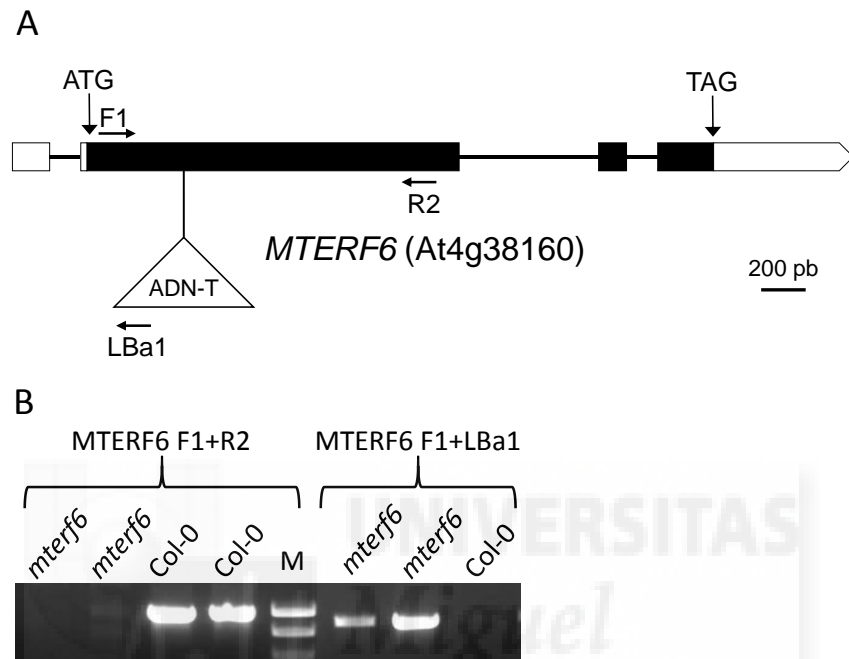
El mutante *mterf6* se identificó en la búsqueda de mutantes de *Arabidopsis* portadores de inserciones de ADN-T en genes *mTERF* que se realizó en los laboratorios de V. Quesada y P. Robles. En este trabajo se ha iniciado la caracterización genética, molecular y fenotípica de este mutante. Los individuos *mterf6* presentan como rasgo más conspicuo una pérdida de pigmentación verde que se aprecia en los cotiledones (Figura 12A, B) y posteriormente en las hojas vegetativas y caulinares, el tallo, los sépalos y los frutos. Las hojas vegetativas suelen presentar una pérdida de pigmentación que no es homogénea, de manera que la región basal del limbo foliar y el peciolo manifiestan una coloración amarillenta (Figura 12C, D). Las plantas *mterf6* crecen más lentamente y presentan un menor tamaño que las de su estirpe silvestre (Col-0). El retraso en el crecimiento se pone de manifiesto tempranamente, ya que la aparición de los cotiledones y del primer par de hojas ocurre más tardíamente que en Col-0 (Figura 14B). Hemos comprobado la reproducibilidad del fenotipo mutante en las generaciones T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y posteriores.



**Figura 12. Fenotipos morfológicos del mutante *mterf6*.** Imágenes de la estirpe silvestre Col-0 (A, C) y del mutante *mterf6* (B, D), tomadas a los 6 (A, B) y 22 (C, D) dte. Las barras de escala indican 1 mm.

Hemos genotipado plantas *mterf6* a fin de confirmar que eran portadoras de la inserción del ADN-T en el gen At4g38160, presuntamente afectado en el mutante *mterf6*. Para ello se extrajo ADN de individuos mutantes *mterf6* y se analizó mediante PCR la presencia del ADN-T tal y como se indica en Materiales y Métodos (véanse las páginas 21 y 22). Se realizaron amplificaciones combinando los cebadores F1 y R2, que hibridan con secuencias del gen *MTERF6* situadas aguas arriba y abajo de la inserción, respectivamente, así como con los cebadores F1 y LBa1, hibridando este último con secuencias específicas del borde izquierdo del ADN-T (Figura 13A). A partir del ADN de

los individuos *mterf6*, solamente se obtuvieron productos de PCR con los cebadores F1 y LBa1, y no así con F1 y R2, debido a que la presencia del ADN-T entre las secuencias del gen con las que hibridan ambos cebadores impide su amplificación (Figura 13B). Por el contrario, la ausencia del ADN-T en Col-0 permitió la obtención de productos de PCR con F1 y R2 pero no así con F1 y LBa1 (Figura 13B). Estos resultados indican que el mutante *mterf6* es portador en homocigosis de una inserción de ADN-T en el gen At4g38160.

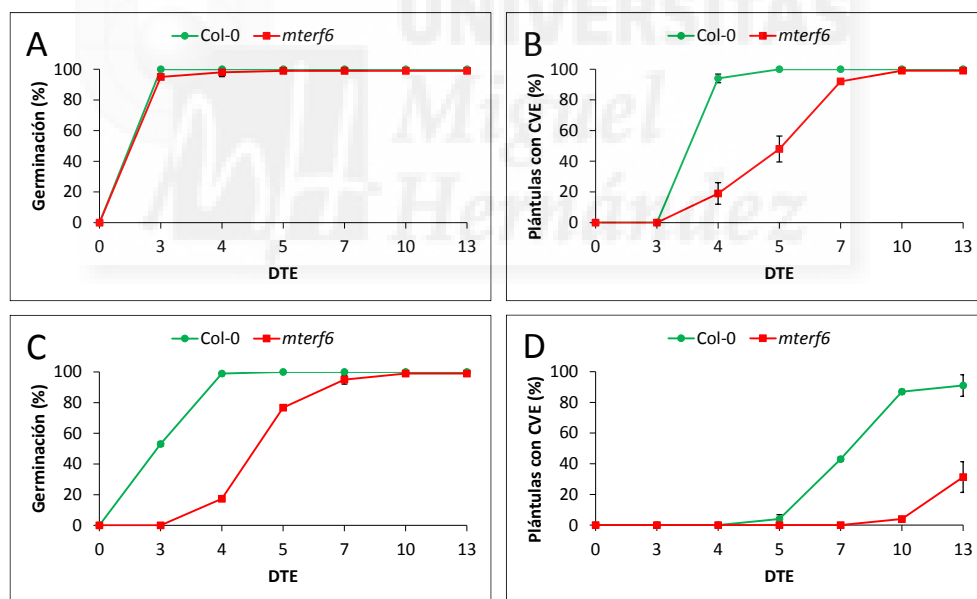


**Figura 13. Identificación de la inserción de ADN-T en el gen At4g38160 (*MTERF6*).** (A) Representación esquemática del gen At4g38160 con indicación mediante flechas de las posiciones de los cebadores F1, R2 y LBa1. La inserción de ADN-T se representa mediante un triángulo invertido. Los exones e intrones se representan mediante rectángulos negros y líneas continuas respectivamente. Los rectángulos blancos corresponden a exones no traducidos y a las regiones 5' y 3' no traducidas. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, de los productos de PCR obtenidos a partir de amplificaciones realizadas con los cebadores MTERF6-F1 y R2 así como con MTERF6-F1 y LBa1 empleando ADN genómico de individuos mutantes *mterf6* y del silvestre Col-0. (M) Marcador de peso molecular.

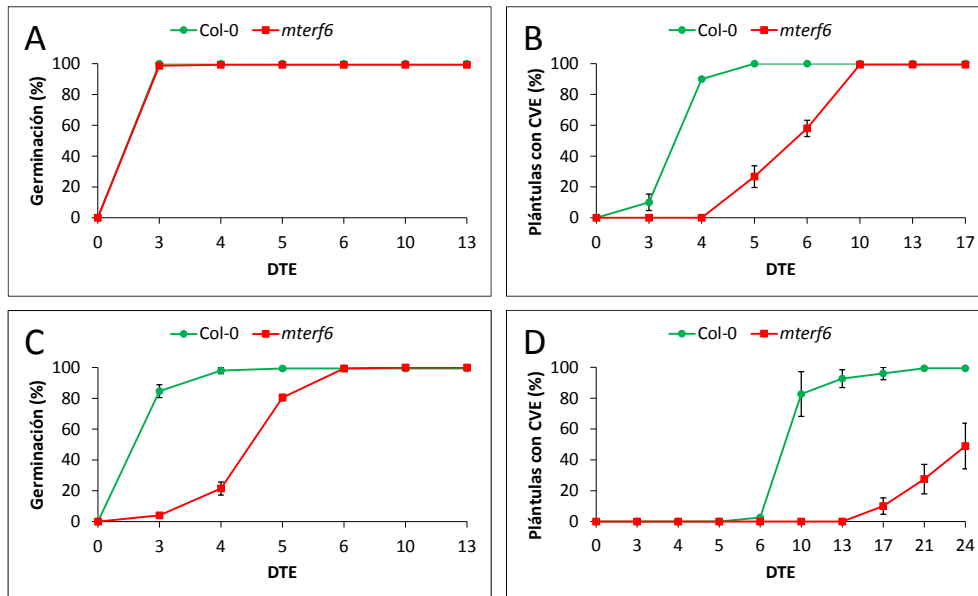
#### 4.5. Análisis de la respuesta del mutante *mterf6* al estrés abiótico

Se ha descrito que mutantes afectados en genes *mTERF* como *mda1* (Robles et al., 2012b), *mterf9* (Robles et al., 2015), *shot1* (Kim et al., 2012) y *soldat10* (Meskauskiene et al., 2009) presentan una respuesta alterada frente a distintos agentes productores de estrés abiótico. Con el fin de determinar si el mutante *mterf6* presentaba una tolerancia frente al estrés distinta a la del silvestre, se analizó su sensibilidad y la de Col-0 a la hormona ácido abscísico (ABA), implicada en la adaptación de las plantas al estrés ambiental, al estrés iónico producido por el NaCl y al osmótico debido al manitol. Para ello se sembraron semillas del mutante *mterf6* y de Col-0 en medios de cultivo

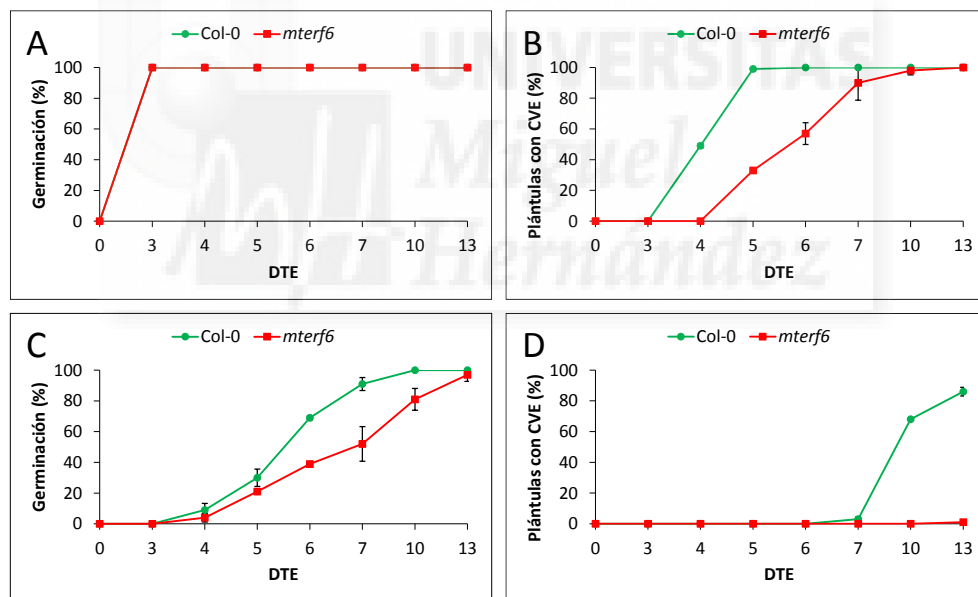
suplementados con diferentes concentraciones de NaCl, manitol o ABA (véase la página 17 de Materiales y Métodos). Se evaluó la capacidad de germinar y de producir plántulas con cotiledones verdes y expandidos (cve) durante al menos las dos primeras semanas tras la estratificación de las semillas. En medio de cultivo sin suplementar no se observaron diferencias en la germinación entre la estirpe mutante y la silvestre. Por el contrario, la germinación del mutante *mterf6* resultó ser más sensible que la de Col-0 al NaCl (150 y 200 mM), manitol (350 mM) y ABA (3, 6 y 10  $\mu$ M) (Figuras 14A, C; 15A, C; 16A, C). Estas diferencias fueron más patentes en presencia de NaCl y manitol. Consistente con un retraso en su crecimiento, la aparición de plántulas *mterf6* con cve en medio de cultivo sin suplementar se produjo más tardíamente que las de Col-0 [p.e. a los 4 días tras la estratificación (dte) el 19% y 94% de plántulas *mterf6* y Col-0 presentaron cve, respectivamente (Figura 14 B)]. No obstante, a los 10 dte el 100% de las plántulas de ambas estirpes produjeron cve. El mutante *mterf6* rindió un porcentaje de plántulas con cve sustancialmente inferior al de Col-0 en presencia de ABA, NaCl y manitol en todas las concentraciones estudiadas. Así por ejemplo, sólo a partir de los 13 y 17 dte se pudieron identificar plántulas *mterf6* con cve en presencia de 150 mM de NaCl o 350 mM de manitol respectivamente, mientras que en las mismas condiciones de cultivo Col-0 rindió plántulas con cve a partir de los 5-6 dte (Figuras 14D, 15D).



**Figura 14. Efecto del NaCl sobre la germinación y la formación de cve en el silvestre Col-0 y el mutante *mterf6*.** Cada valor corresponde a la media  $\pm$  la desviación estándar del porcentaje de germinación (A, C) y de plántulas con cve (B, D), en medios de cultivo sin suplementar (A, B) o suplementados con NaCl 150 mM (C, D), de dos o tres muestras independientes de al menos 50 semillas cada una. Los porcentajes de germinación y de plántulas con cve de cada estirpe en presencia de NaCl se normalizaron por los valores obtenidos por la misma estirpe en ausencia de NaCl. Se observaron diferencias similares entre el mutante y el silvestre en su germinación en presencia de NaCl 200 mM (resultados no mostrados). Se consideraron germinadas aquellas semillas en las que se observó la emergencia de la radícula a través de la testa de la semilla. Los resultados corresponden a un experimento representativo de los dos realizados. DTE: días tras la estratificación.



**Figura 15. Efecto del manitol sobre la germinación y la formación de cve en el silvestre Col-0 y el mutante *mterf6*.** Cada valor corresponde a la media  $\pm$  la desviación estándar del porcentaje de germinación (A, C) y de plántulas con cve (B, D), en medios de cultivo sin suplementar (A, B) o suplementados con manitol 350 mM (C, D), de dos o tres muestras independientes de al menos 50 semillas cada una. Se siguen las pautas descritas para la Figura 14.

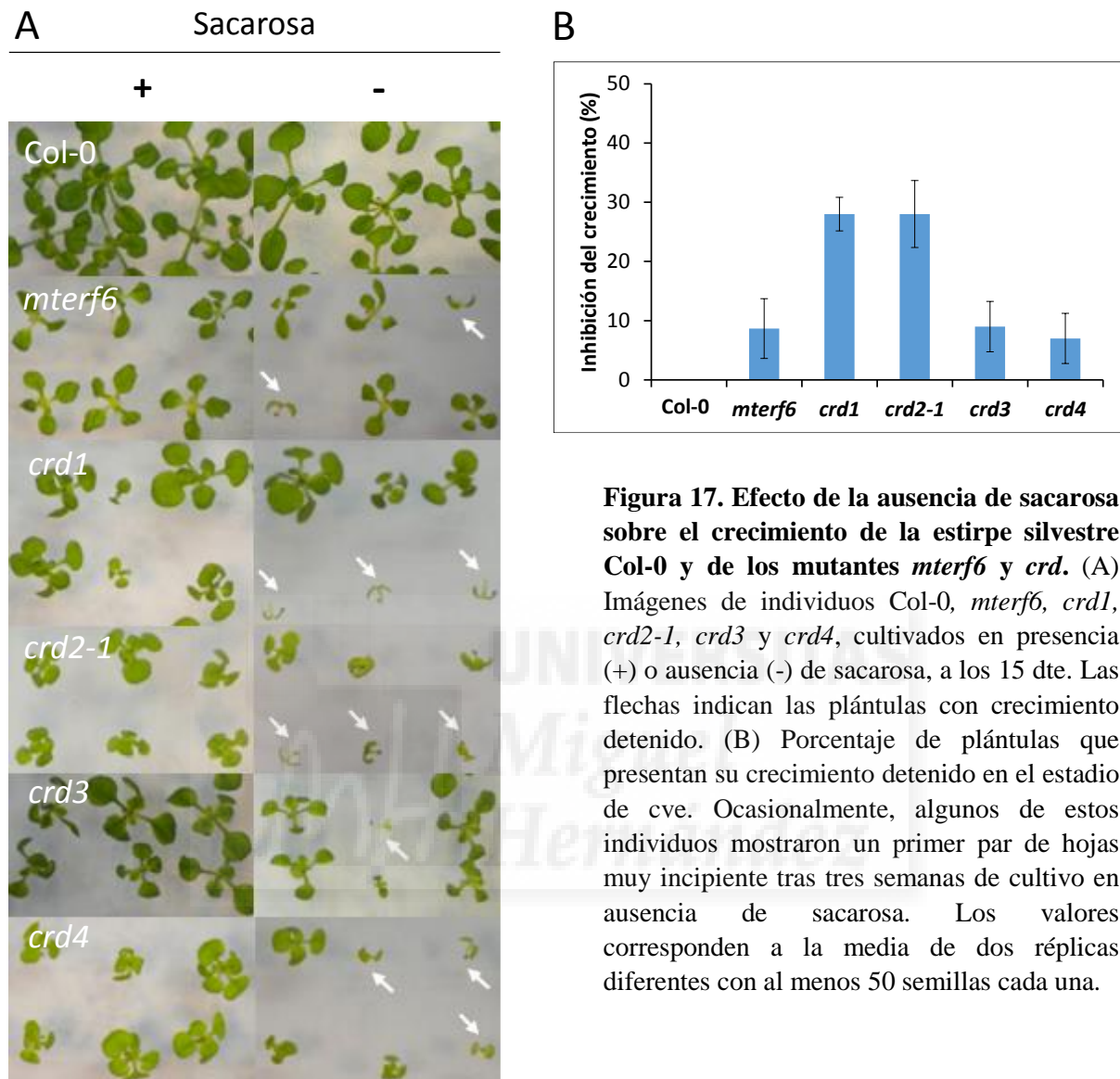


**Figura 16. Efecto del ABA sobre la germinación y la formación de cve en el silvestre Col-0 y el mutante *mterf6*.** Cada valor corresponde a la media  $\pm$  la desviación estándar del porcentaje de germinación (A, C) y de plántulas con cve (B, D), en medios de cultivo sin suplementar (A, B) o suplementados con ABA 3  $\mu$ M (C, D), de dos o tres muestras independientes de al menos 50 semillas cada una. Se observaron diferencias similares entre el mutante y el silvestre en su germinación en presencia de ABA 6 y 10  $\mu$ M. Se siguen las pautas descritas para la Figura 14.

#### 4.6. Estudio del crecimiento fotoautotrófico de los mutantes *crd* y *mterf6*

Se ha descrito que algunos mutantes afectados en la función cloroplástica presentan un crecimiento fotoautotrófico alterado (Hricová et al., 2006). Dado que los mutantes *crd* son portadores

de mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas ribosómicas del cloroplasto (véase el apartado 1.3 en la página 10), decidimos estudiar si su crecimiento fotoautotrófico estaba alterado.



**Figura 17. Efecto de la ausencia de sacarosa sobre el crecimiento de la estirpe silvestre Col-0 y de los mutantes *mterf6* y *crd*.** (A) Imágenes de individuos Col-0, *mterf6*, *crd1*, *crd2-1*, *crd3* y *crd4*, cultivados en presencia (+) o ausencia (-) de sacarosa, a los 15 dte. Las flechas indican las plántulas con crecimiento detenido. (B) Porcentaje de plántulas que presentan su crecimiento detenido en el estadio de cve. Ocasionalmente, algunos de estos individuos mostraron un primer par de hojas muy incipiente tras tres semanas de cultivo en ausencia de sacarosa. Los valores corresponden a la media de dos réplicas diferentes con al menos 50 semillas cada una.

Para ello se cultivaron *in vitro* individuos *crd* y Col-0 en presencia y ausencia de sacarosa. Se incluyó en este análisis al mutante *mterf6*, ya que su despigmentación y la posible localización cloroplástica de la proteína MTERF6 (Kleine et al., 2012) sugieren una actividad cloroplástica alterada. En ausencia de sacarosa, se determinó el porcentaje de plántulas en las que se detuvo su crecimiento vegetativo en el estadio de cve a los 22 dte. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17. Todos los mutantes estudiados mostraron una inhibición en su crecimiento superior a la del silvestre, que resultó ser más acusada en el caso de los mutantes *crd1* y *crd2-1* (28% de inhibición), lo que indica una alteración en su crecimiento fotoautotrófico.

## 5. DISCUSIÓN

La inmensa mayoría de las proteínas que actúan en los cloroplastos y las mitocondrias están codificadas por genes nucleares. No obstante, se desconoce la función que muchas de ellas desempeñan en el desarrollo vegetal o en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico, en buena medida debido a la ausencia de mutantes afectados en dichos genes. En los laboratorios de V. Quesada y P. Robles se está llevando a cabo una aproximación de genética inversa, con el objetivo de contribuir a caracterizar algunos de estos genes para los que no se había descrito previamente ningún fenotipo mutante a partir de la perturbación de su función. Se emplea para ello *Arabidopsis*, una especie modelo para la que se dispone de un amplio abanico de herramientas genéticas y moleculares para abordar aproximaciones de genética inversa. Se seleccionaron para su estudio los genes *CRD*, que cifran proteínas ribosómicas del cloroplasto, y los factores mTERF, requeridos para la correcta expresión de los genes de los genomas organulares animales y vegetales.

Para el análisis de las posibles interacciones entre los genes objeto de estudio, una aproximación comúnmente empleada consiste en la obtención y caracterización de los dobles mutantes correspondientes (Pérez-Pérez et al., 2009). La aparición en el doble mutante de un fenotipo aditivo, como resultado de la combinación de dos mutaciones recesivas en los individuos parentales, sugiere que ambos genes actúan en rutas genéticas distintas. Sin embargo, la aparición de fenotipos sinérgicos o epistáticos (correspondientes a la manifestación de uno de los fenotipos de los mutantes parentales sencillos) sugiere una relación funcional entre los genes. En un trabajo anterior (Gea Caselles, 2012) se estudiaron los dobles mutantes entre *crd1* y el resto de mutantes *crd* (*crd2-1* al *crd4*).

En el presente Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo el análisis de los restantes dobles mutantes que implican a genes *CRD* (*crd2-1 crd3*, *crd2-1 crd4* y *crd3 crd4*). Los resultados obtenidos sugieren que *CRD2* es epistático sobre el resto de genes *CRD*, mientras que *CRD4* lo es sobre *CRD1* y *CRD3*, existiendo una relación de aditividad entre estos dos últimos. Los mutantes *crd1*, *crd2-1* y *crd3* están afectados en genes que cifran proteínas de la subunidad grande del clororribosoma 50S (L31, L24 y L5, respectivamente) mientras que *crd4* lo está en un gen cuyo producto, la proteína S5, se localiza en la subunidad pequeña 30S. La participación de estos genes en la formación de una misma estructura, el ribosoma cloroplástico, podría justificar las interacciones epistáticas observadas, sugiriendo una relación funcional entre ellos. La relación sinérgica descrita entre el mutante *mda1-1* y los *crd2* y *crd4* (Robles et al., 2015), apoyaría la relación funcional entre *CRD2* y *CRD4*. No obstante, la interpretación de los fenotipos de los dobles mutantes ha sido cualitativa y en ocasiones resultó difícil de determinar, como en el caso de la epistasia de *crd2-1* sobre *crd4*. El genotipado de las correspondientes mutaciones y un posterior análisis fenotípico ultraestructural y molecular de los dobles mutantes, permitirá confirmar de forma más precisa la ocurrencia de epistasia o aditividad.

Con el objetivo de estudiar eventuales relaciones funcionales entre los genes descritos en esta memoria y otros que también afectan a la función del cloroplasto, con anterioridad a este trabajo se

realizaron cruzamientos entre los mutantes *rug2-2*, *crd2-1*, *crd4*, *mda1-1*, *mterf9* y *sca3-2* (Valderrama Pérez, 2014). En este trabajo, se han obtenido y analizado los dobles mutantes *rug2-2 crd2-1*, *rug2-2 crd4*, *mda1-1 sca3-2* y *mterf9 sca3-2*. El fenotipo aditivo de *crd2-1 rug2-2* y *crd4 rug2-2* sugiere la ausencia de una relación funcional entre *RUG2* y los genes *CRD2* y *CRD4*. También resultaron aditivas las interacciones genéticas entre el mutante *mterf9* y los *crd3* y *crd4*, así como entre *mda1-1* y *crd3*, descritas con anterioridad a este trabajo (Robles et al., 2015). Por el contrario, el doble mutante *mterf9 sca3-2* presentó un fenotipo sinérgico, mientras que *sca3-2* resultó epistático frente a *mda1-1*, lo que sugiere una relación funcional entre *SCA3* y los genes *mTERF MDA1* y *MTERF9*. La epistasia de *SCA3* sobre *MDA1* podría explicarse debido a que el producto del primero es la polimerasa de ARN del cloroplasto RpoTp, que actúa muy tempranamente en el desarrollo posibilitando la diferenciación de los proplastidios en cloroplastos en respuesta a la luz (Hricová et al., 2006). *MDA1* se requeriría más tardíamente que *SCA3* y actuaría “aguas abajo” de este último en los procesos de desarrollo del cloroplasto. La redundancia funcional con otros *mTERF* que también actuarán tempranamente, podría limitar los efectos de la pérdida de función de *MDA1*. Un candidato sería *MTERF9*, funcionalmente relacionado con *MDA1* (el doble mutante presenta un fenotipo sinérgico) y que también actúa muy tempranamente en el desarrollo: las plántulas *mterf9* presentan cotiledones más despigmentados similares a los de *sca3-2* (Robles et al., 2012b; 2015).

En este trabajo se ha iniciado la caracterización de un nuevo mutante, *mterf6*. Se ha determinado la existencia de una inserción de ADN-T en el gen presuntamente afectado por la mutación (At4g38160) y se ha analizado su respuesta frente al estrés abiótico durante la germinación y el crecimiento temprano. *mterf6* presentó una respuesta alterada frente a distintos agentes productores de estrés abiótico. No obstante, a diferencia de los resultados obtenidos con otros mutantes *mterf* como *mda1* y *mterf9*, más insensibles que el silvestre a este tipo de estreses (Robles et al., 2012b; 2015), *mterf6* mostró una sensibilidad aumentada a la inhibición que ejercen sobre la germinación y el crecimiento temprano las concentraciones elevadas de NaCl, manitol y ABA. La menor tolerancia del mutante frente a la salinidad y al estrés osmótico podría atribuirse a su sensibilidad incrementada frente al ABA, ya que esta hormona desempeña una función clave en la respuesta y la adaptación de las plantas frente al estrés abiótico (Quesada, 1999). Proponemos que *MTERF6* podría actuar como un regulador negativo de la respuesta frente al ABA y por ende al estrés abiótico, al menos en etapas muy tempranas del desarrollo.

La pérdida de pigmentación de los mutantes *crd* y *mterf6*, su menor tamaño y crecimiento así como la alteración que presentan los primeros en el desarrollo de sus cloroplastos (Robles y Quesada, resultados sin publicar) sugería que su crecimiento fotoautotrófico podría estar alterado. El cultivo de los mutantes y de su silvestre en ausencia y presencia de sacarosa reveló una mayor sensibilidad de los mutantes a la falta de sacarosa en el medio, diferencias que fueron más acusadas en el caso de los mutantes *crd1* y *crd2-1*.



## 6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este trabajo hemos obtenido varios dobles mutantes cuyo análisis morfológico sugiere la existencia de relaciones funcionales entre algunos de los genes afectados. De este modo, nuestros resultados nos llevan a proponer que *CRD2* es epistático sobre *CRD3* y *CRD4*, mientras que *CRD4* lo sería sobre *CRD3*. A su vez, *SCA3* sería epistático sobre *MDA1*, presentando una relación de sinergia con *MTERF9*. Por el contrario, hemos interpretado como aditivos los fenotipos morfológicos de los dobles mutantes *rug2-2 crd2-1* y *rug2-2 crd4*, lo que descartaría una relación funcional entre *RUG2* y los genes *CRD3* y *CRD4*.

Hemos iniciado la caracterización del mutante *mterf6*, que presenta un crecimiento retardado y un menor tamaño y pigmentación que la estirpe silvestre. Hemos confirmado la presencia de la inserción de ADN-T en el gen At4g38160, presuntamente afectado en *mterf6*. El mutante *mterf6* resultó ser más sensible al estrés iónico producido por el NaCl, al osmótico debido al manitol y a la hormona vegetal ABA. Proponemos que *MTERF6* podría actuar como un regulador negativo de la respuesta al ABA y al estrés abiótico. Aunque este trabajo se engloba dentro de la investigación básica, es obvio que los nuevos conocimientos que se obtengan sobre los mecanismos de detección y respuesta de las plantas al estrés abiótico, podrían ser útiles para futuras aplicaciones biotecnológicas que permitan obtener variedades resistentes al estrés mediante mejora genética o utilizando herramientas de ingeniería genética.

El crecimiento fotoautotrófico está afectado en los mutantes *mterf6* y *crd*, fundamentalmente en el caso de *crd1* y *crd2-1*, en consonancia con su pérdida de pigmentación, menor tamaño y crecimiento.

Como continuación a este Trabajo Fin de Grado, se completará el genotipado mediante PCR de los dobles mutantes descritos en esta Memoria y se confirmará en F<sub>3</sub> el fenotipo del doble mutante *crd3 crd4*. Se continuará con el análisis genético, fenotípico y molecular del mutante *mterf6*, que se ha iniciado en este trabajo. Se hará especial énfasis en el estudio de su respuesta frente al estrés abiótico (p.e. en etapas del desarrollo posteriores a las analizadas en esta Memoria), así como en sus eventuales interacciones genéticas con mutantes afectados en genes *mTERF* y con otros portadores de mutaciones en genes también implicados en la expresión del genoma cloroplástico. Así por ejemplo, se obtendrá y se caracterizará el doble mutante *mterf6 sca3-2* a partir del análisis de las poblaciones F<sub>2</sub> ya obtenidas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., *et al.* (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Alonso, J.M., y Ecker, J.R. (2006). Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. *Nat. Rev. Genet.* 7, 524-536.
- Babiychuk, E., Vandepoele, K., Wissing, J., Garcia-Diaz, M., De Rycke, R., Akbari, H., Joubès, J., Beeckman, T., Jänsch, L., Frentzen, M., Van Montagu, M.C., y Kushnir, S. (2011). Plastid gene expression and plant development require a plastidic protein of the mitochondrial transcription termination factor family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 108, 6674-6679.
- Bartoli, C.G., Pastori, G.M., y Foyer, C.H. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol.* 123, 335-344.
- Cámara, Y., Asín-Cayueta, J., Park, C.B., Metodiev, M.D., Shi, Y., Ruzzenente, B., Kukat, C., Habermann, B., Wibom, R., Hultenby, K., Franz, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hallberg, B.M., Gustafsson, C.M., y Larsson, N.G. (2011). MTERF4 regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab.* 13, 527-539.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep. *Plant Mol. Biol. Reporter* 4, 19-21.
- Gea Caselles, F. (2012). Análisis genético de mutantes afectados en proteínas cloroplásticas de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo Fin de Máster.
- Gong, X., Jiang, Q., Xu, J., Zhang, J., Teng, S., Lin, D., y Dong Y. (2013). Disruption of the rice plastid ribosomal protein s20 leads to chloroplast developmental defects and seedling lethality. *G3 (Bethesda)* 3, 1769-1777.
- Gray, M.W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 678-687
- Gueguen, V., Macherel, D., Jaquinod, M., Douce, R., y Bourguignon, J. (2000). Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275, 5016-5025.
- Hammani, K. y Barkan, A. (2014). An mTERF domain protein functions in group II intron splicing in maize chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* 42, 5033-5042.
- Hess, W. R., y Börner, T. (1999). Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 190, 1-59.
- Hricová, A., Quesada, V., y Micol, J.L. (2006). The *SCABRA3* nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141, 942-956.
- Hsu, Y.W., Wang, H.J., Hsieh, M.H., Hsieh, H.L., y Jauh, G.Y. (2014). *Arabidopsis* mTERF15 is required for mitochondrial nad2 Intron 3 splicing and functional complex I activity. *PLoS ONE* 9 e112360.
- Igloi, G.L., y Kössel, H. (1992). The transcriptional apparatus of chloroplasts. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 525-558.
- Kanamaru, K., y Tanaka, K. (2004). Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2215-2223.
- Kim, M., Lee, U., Small, I., des Francs-Small, C.C., y Vierling, E. (2012). Mutations in an *Arabidopsis* mitochondrial transcription termination factor-related protein enhance thermotolerance in the absence of the major molecular chaperone HSP101. *Plant Cell* 14, 3349-3365.
- Kleine, T. (2012). *Arabidopsis thaliana* mTERF proteins: evolution and functional classification. *Front. Plant Sci.* 3, 233.
- Kleine, T., y Leister, D. (2015). Emerging functions of mammalian and plant mTERFs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1847, 786-797.

- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in Arabidopsis. Arabid. Inf. Serv. 24.
- Lang, B.F., Gray, M.W., y Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 33, 351-397.
- Liere, K., y Maliga, P. (2001). Plastid RNA polymerases in higher plants. En "Regulation of Photosynthesis" (E. M. Aro, Ed.), p. 29-49. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lin, D., Jiang, Q., Zheng, K., Chen, S., Zhou, H., Gong, X., Xu, J., Teng, S., y Dong, Y. (2015). Mutation of the rice ASL2 gene encoding plastid ribosomal protein L21 causes chloroplast developmental defects and seedling death. Plant Biol (Stuttg) 17, 599-607.
- Linder, T., Park, C.B., Asin-Cayuela, J., Pellegrini, M., Larsson, N.G., Falkenberg, M., Samuelsson, T. y Gustafsson, C.M. (2005). A family of putative transcription termination factors shared amongst metazoans and plants. Curr. Genet. 48, 265-269.
- Manuell, A.L., Quispe, J., y Mayfield, S.P. (2007). Structure of the chloroplast ribosome: novel domains for translation regulation. PloS Biol. 5(8), e209.
- Meinke, D., y Koornneef, M. (1997). Community standards for Arabidopsis. Plant J. 12, 247-253.
- Meskauskiene, R. Wüsch M., Laloi, C., Vidi, P.A., Coll N.S., Kessler, F., Baruah, A., Kim, C. y Apel, K. (2009). A mutation in the Arabidopsis mTERF-related plastid protein SOLDAT10 activates retrograde signaling and suppresses (1)O(2)-induced cell death. Plant J. 60, 399-410.
- Morita-Yamamuro, C., Tsutsui, T., Tanaka, A., y Yamaguchi, J. (2004). Knock-out of the plastid ribosomal protein S21 causes impaired photosynthesis and sugar-response during germination and seedling development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 45, 781-788.
- Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., y Micol, J.L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. Trends Genet. 25, 368-376.
- Pesaresi, P., Varotto, C., Meurer, J., Jahns, P., Salamini, F., y Leister, D. (2001). Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in Arabidopsis: effects on mRNA translation and photosynthesis. Plant J. 27, 179-189.
- Pyke, K., Zubko, M.K., y Day, A. (2000). Marking cell layers with spectinomycin provides a new tool for monitoring cell fate during leaf development. J. Exp. Bot. 51, 1713-1720.
- Quesada, V. (1999). Aislamiento y caracterización de mutantes halotolerantes en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral.
- Quesada, V., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2000). Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 154, 421-436.
- Quesada, V., Sarmiento-Mañús, R., González-Bayón, R., Hricová, A., Pérez-Marcos, R., Graciá-Martínez, E., Medina-Ruiz, L., Leyva-Díaz, E., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2011). Arabidopsis *RUGOSA2* encodes an mTERF family member required for mitochondrion, chloroplast and leaf development. Plant J. 68, 738-753.
- Rébeillé, F., Macherel, D., Mouillon, J.M., Garin, J., y Douce, R. (1997). Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria. EMBO J. 16, 947-957.
- Roberti, M., Bruni, F., Polosa, P.L., Gadaleta, M.N., y Cantatore, P. (2006). The Drosophila termination factor DmTTF regulates in vivo mitochondrial transcription. Nucleic Acids Res. 34, 2109-2116.
- Roberti, M., Polosa, P.L., Bruni, F., Manzari, C., Deceglie, S., Gadaleta, M.N., y Cantatore, P. (2009). The MTERF family proteins: mitochondrial transcription regulators and beyond. Biochim. Biophys. Acta 1787, 303-311.
- Robles, P., Micol, J.L., y Quesada, V. (2012a). Unveiling Plant mTERF Functions. Molecular Plant 5, 294-296.

- Robles, P., Micol, J.L., y Quesada, V. (2012b). *Arabidopsis MDAI*, a nuclear-encoded protein, functions in chloroplast development and abiotic stress responses. *PLoS ONE* 7 e42924.
- Robles, P., Micol, J.L., y Quesada, V. (2015). Mutations in the plant-conserved MTERF9 alter chloroplast gene expression, development and tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 154, 297-313.
- Romani, I., Tadini, L., Rossi, F., Masiero, S., Pribil, M., Jahns, P., Kater, M., Leister, D., y Pesaresi, P. (2012). Versatile roles of *Arabidopsis* plastid ribosomal proteins in plant growth and development. *Plant J.* 72, 922-934.
- Schonfeld, C., Wobbe, L., Borgstadt, R., Kienast, A., Nixon, P.J., y Kruse, O. (2004). The nucleus-encoded protein MOC1 is essential for mitochondrial light acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 279, 50366-50374.
- Sharma, M.R., Wilson, D.N., Datta, P.P., Barat, C., Schluenzen, F., Fucini, P., y Agrawal, R.K. (2007). Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19315-19320.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., y Small, R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.* 94, 275-288.
- Song, J., Wei, X., Shao, G., Sheng, Z., Chen, D., Liu, C., Jiao, G., Xie, L., Tang, S., y Hu, P. (2014). The rice nuclear gene WLP1 encoding a chloroplast ribosome L13 protein is needed for chloroplast development in rice grown under low temperature conditions. *Plant Mol. Biol.* 84, 301-14.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H., y Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6613-6617.
- Taylor, N.L., Tan, Y.F., Jacoby, R.P., y Millar, A.H. (2009). Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *J. Proteomics* 72, 367-378.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Tiller, N., Weingartner, M., Thiele, W., Maximova, E., Schöttler, M.A., y Bock, R. (2012). The plastid-specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. *Plant J.* 69, 302-316.
- Tiller, N., y Bock, R. (2014). The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Mol. Plant* 7, 1105-1120.
- Valderrama Pérez, M. (2014). Caracterización genética y fisiológica de mutantes *mTERF* y *crd* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo Fin de Máster.
- Wang, Y., Duby, G., Purnelle, B., y Boutry, M. (2000). Tobacco VDL gene encodes a plastid DEAD box RNA helicase and is involved in chloroplast differentiation and plant morphogenesis. *Plant Cell* 12, 2129-2142.
- Wredenberg, A., Lagouge, M., Bratic, A., Metodiev, M.D., Spåhr, H., Mourier, A., Freyer, C., Ruzzenente, B., Tain, L., Grönke, S., Baggio, F., Kukat, C., Kremmer, E., Wibom, R., Polosa, P.L., Habermann, B., Partridge, L., Park, C.B., y Larsson N.G. (2013). MTERF3 regulates mitochondrial ribosome biogenesis in invertebrates and mammals. *PLoS Genet.* 9 e1003178.
- Wycliffe, P., Sitbon, F., Wernersson, J., Ezcurra, I., Ellerström, M., y Rask, L. (2005). Continuous expression in tobacco leaves of a *Brassica napus* PEND homologue blocks differentiation of plastids and development of palisade cells. *Plant J.* 44, 1-15.
- Yamaguchi, K., y Subramanian, A.R. (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J. Biol. Chem.* 275, 28466-28482.
- Yamaguchi, K., von Knoblauch, K., y Subramanian, A.R. (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *J. Biol. Chem.* 275, 28455-28465.