



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Regulación de la biosíntesis de isoprenoides en *Arabidopsis thaliana*: Caracterización del mutante *rif35*

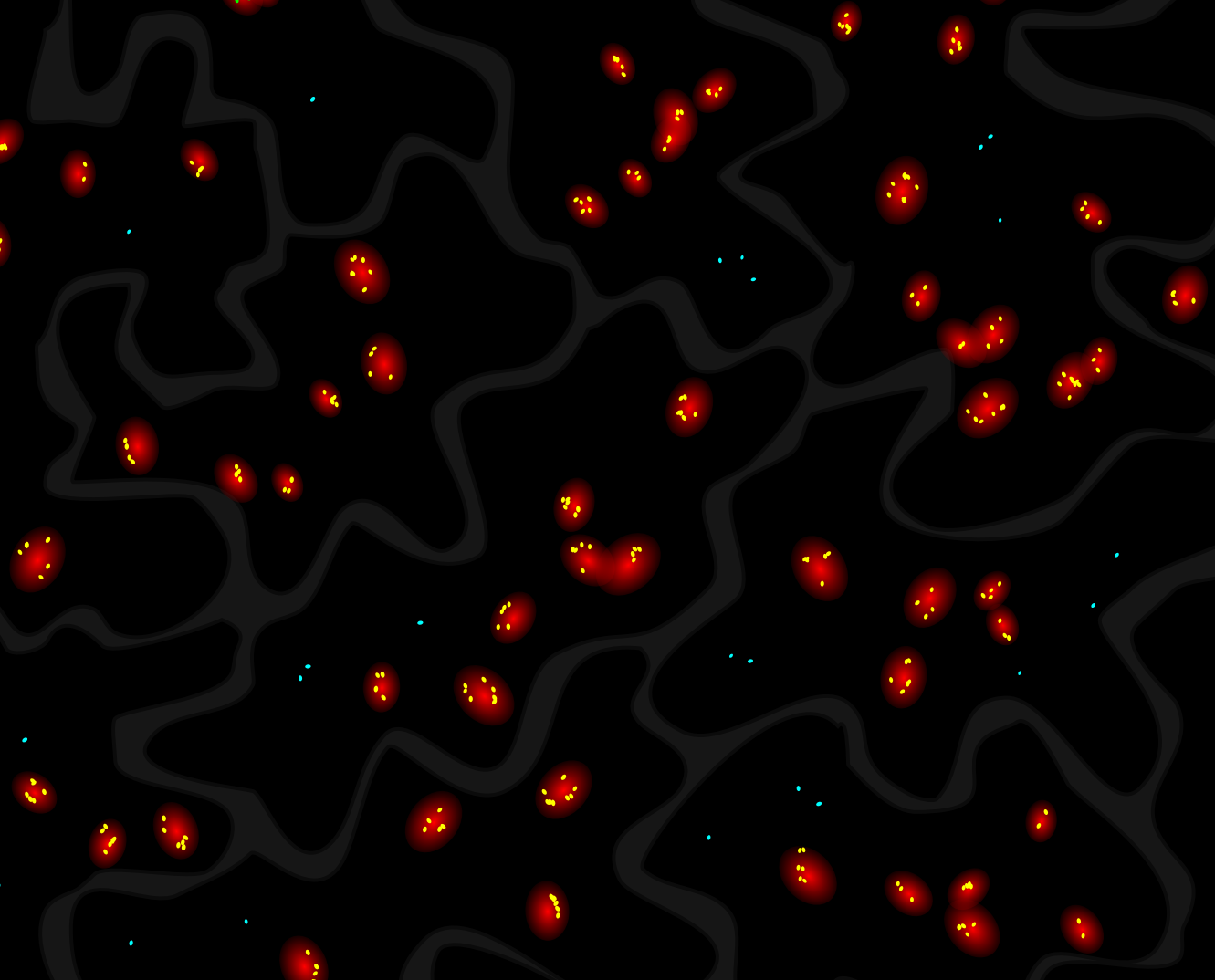
Idalia Lizbeth Villavicencio Contreras



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



Regulación de la biosíntesis de
isoprenoides en *Arabidopsis thaliana*:
Caracterización del mutante *rif35*

Idalia L. Villavicencio C.

Barcelona, 2015



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPTO. DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR



REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN *Arabidopsis thaliana*: CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE *rif35*

Memoria presentada por Idalia Lizbeth Villavicencio Contreras; Ingeniera Agrónoma egresada de la Universidad de Panamá; para optar al grado de Doctora en Biotecnología por la Universidad de Barcelona

Idalia Lizbeth Villavicencio Contreras
Autora

Dr. Albert Boronat i Margosa
Director y Tutor

Barcelona, 2015

Esta tesis doctoral fue desarrollada en el Grupo de Investigación de Metabolismo e Ingeniería Metabólica de Plantas en el Centro de Recerca en Agrigenómica (CRAG) en consorcio con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. El desarrollo experimental y todo el marco operativo de la tesis doctoral tuvo el apoyo financiero de la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología y el Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos de Panamá bajo el Programa de Becas Doctorales y Post-doctorales SENACYT – IFARHU.



AGRADECIMIENTOS

Primero que todo doy las gracias al Programa de Becas Doctorales y Post-doctorales SENACYT – IFARHU de Panamá por haberme otorgado la beca, dándome la oportunidad de enriquecer mis conocimientos, mejorar mi calidad de vida y así aportar al desempeño y desarrollo de mi país.

Agradezco al Dr. Albert Boronat por la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por la tranquilidad y paciencia que muchas veces me ayudaron a encontrar la solución en los momentos de bloqueo mental. Ha sido un placer tenerle como director y tutor.

A todos los investigadores, doctorandos, másters, estudiantes de licenciatura del CRAG y del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la UB, con los que compartí horas y horas de alegrías y penas, en especial al grupito de los fines de semana por los ánimos. Quiero dedicar un agradecimiento especial al hoy en día Dr. Eduard Pérez Massot por el excelente trabajo en equipo, por las conversaciones en catañol dentro y fuera del laboratorio.

Al personal técnico del Campus experimental de la UB, en especial a Josep, no habría acabado a tiempo de no ser por el empeño que le dedicaste a mis experimentos, gracias por cuidar de nuestras hijas las plantitas y por tus palabras de ánimo muy atinadas.

Al personal técnico del CRAG (Albert, Alejandro, Ángel, Eva, Joana, Mennana, Mercè, Mireia, Montse, Oriol, Pilar, Sami y Sara) quienes siempre estuvieron prestos a enseñarme nuevas técnicas en su área de experticia. Al personal de Compras, Informática y Mantenimiento quienes en muchas ocasiones me sacaron de mis apuros.

No puedo dejar de agradecer a David Manzano, Montserrat Busquets, Montserrat Arró y Narciso Campos por su amabilidad, su consejo y su experiencia.

Agradezco también a mis familiares, mis tíos putativos (Comunidad Neocatecumenal), amigos de España y Panamá, a mi Comunidad Neocatecumenal en Santa Juaquina de Vedruna, por sus oraciones, constante amor y apoyo incondicional.

Finalmente el más notable de los agradecimientos a Dios, mi madre Idalides, mi hermano Gabriel y su bastón, mi cuñada Lourdes, y a mi esposo Julián, por estar allí cuando las fuerzas se agotaban para recargarme las pilas y ser mi motor de arranque.

*Dedico esta tesis muy especialmente
a mi madre Idalides,
mi esposo Julián y mi hijo Joaquim
por darme motivos suficientes para luchar
“Los Amo”*

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	V
TABLA DE CONTENIDO	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
INTRODUCCIÓN	3
1 Los isoprenoides: interés básico y aplicado	3
2 Vía del MVA.....	6
3 Vía del MEP.....	8
3.1 Regulación de la vía del MEP.....	8
3.2 Inhibidores de la vía del MEP.....	10
4 Intercambio del IPP y DMAPP entre compartimentos subcelulares.....	12
5 Caracterización de mutantes resistentes a la inhibición de las rutas del MEP y del MVA.....	14
6 El mutante <i>rif35</i>	18
OBJETIVOS.....	23
RESULTADOS	27
1 Caracterización genética y fenotípica del mutante <i>rif35</i>	27
1.1 Organización de la región genómica flanqueante a la inserción del T-DNA <i>rif35b</i>	27
1.2 Análisis genético y fenotípico del mutante <i>rif35</i> en relación con las inserciones de los T-DNAs <i>rif35a</i> y <i>rif35b</i>	28
1.3 Análisis ultraestructural de los cloroplastos presentes en el mutante <i>rif35</i>	
33	
2 Validación experimental de las variantes de splicing descritas para el locus At1g73470.....	36

3	Cuantificación de los niveles de expresión de los transcritos correspondientes a las variantes de splicing <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35.3</i>	39
3.1	Diseño de estrategias para cuantificar la expresión de los transcritos <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35.3</i>	39
3.2	Cuantificación de los niveles de expresión de los transcritos <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35.3</i> en el mutante <i>rif35</i>	50
3.3	Estudio de los niveles de expresión de los transcritos <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35.3</i> durante el crecimiento y desarrollo de <i>Arabidopsis</i>	51
4	Caracterización de las proteínas <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35.3</i>	53
4.1	Análisis in silico de las proteínas <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35</i>	53
4.2	Localización subcelular de las proteínas <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35.3</i> .	58
5	Caracterización del mutante defectivo en el gen <i>At1g73470</i>	62
6	Generación y caracterización de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que sobreexpresan las variantes de splicing <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35.3</i>	68
6.1	Generación de las plantas transgénicas que sobreexpresan de forma individual las variantes del locus <i>At1g73470</i>	68
6.2	Fenotipo de resistencia de las líneas sobreexpresoras.....	70
6.3	Estudio de los niveles de expresión del transgén en las transgénicas <i>OE35.1</i> , <i>OE35.2</i> y <i>OE35.3</i>	74
6.4	Características de crecimiento y desarrollo de las plantas transgénicas <i>OE35.1</i> , <i>OE35.2</i> y <i>OE35.3</i>	75
6.5	Análisis de los niveles de RNA y proteína de las enzimas <i>DXS</i> y <i>DXR</i> en las líneas sobreexpresoras.....	76
	DISCUSIÓN.....	83
1	El mutante <i>rif35</i> y su interés en el estudio del metabolismo de los isoprenoides.....	83
2	Caracterización genética y fenotípica del mutante <i>rif35</i>	84

3 Caracterización de las variantes de splicing descritas para el locus At1g73470.....	87
4 Caracterización de las proteínas RIF35.1, RIF35.2 Y RIF35.3	90
5 Caracterización de líneas transgénicas que sobreexpresan las variantes de splicing <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35</i>	94
CONCLUSIONES	99
MATERIALES Y MÉTODOS	105
1 Material Biológico	105
1.1 Material vegetal.....	105
1.2 Cepas bacterianas.....	106
1.3 Vectores	106
2 Medios de cultivo.....	107
2.1 Medios de cultivo de plantas.....	107
2.2 Medios de cultivo de bacterias.....	108
3 Condiciones de cultivo.....	109
3.1 Plantas	109
3.2 Cepas bacterianas.....	111
4 Técnicas de bioquímica y biología molecular.....	114
4.1 Genómica	114
4.2 Técnicas de transferencia génica.....	119
4.3 Técnicas de manipulación de proteínas.....	125
4.4 Métodos de microscopía e imagen.....	131
4.5 Fotografía e imagen	133
4.6 Software y base de datos.....	133
ANEXO A.....	139

1	Secuencia de nucleótidos de los cDNAs <i>RIF35.1</i> , <i>RIF35.2</i> y <i>RIF35.3</i> del locus At1g73470	139
1.1	<i>RIF35.1</i>	139
1.2	<i>RIF35.2</i>	140
1.3	<i>RIF35.3</i>	141
	BIBLIOGRAFÍA.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AGI	<i>Arabidopsis Genome Initiative Number</i>
CLM	Clomazona
Clp	Complejo proteasa Clp
Col-0	Columbia-0
Col-2	Columbia-2
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DXR	1-Deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
DXS	1-Deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa
FSM	Fosmidomicina
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
IPP	Isopentenil pirofosfato
LD	<i>Long day</i>
MEP	Metileritritol 4-fosfato
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVA	Mevalonato
O/N	<i>Overnight</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>
<i>rif</i>	Resistente al inhibidor fosmidomicina
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SD	<i>Short day</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SE	<i>Seedling establishment</i>
wt	<i>Wild type</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 Los isoprenoides: interés básico y aplicado

Se denomina Plantas a todo ser vivo fotosintético, sin capacidad locomotora y cuyas paredes celulares se componen principalmente de celulosa. Estos organismos pertenecientes al Reino Plantae son esenciales para la vida, principalmente por ser fijadores de CO₂ atmosférico y liberar oxígeno. Se han descrito, hasta el año 2011, más de 300.000 especies pertenecientes a este Reino (Mora, et al. 2011).

A diferencia de otros Reinos, las plantas cumplen funciones especiales para las cuales requieren de procesos y mecanismos de adaptación desde el nivel molecular hasta la arquitectura vegetal, los cuales se originan a partir de la información genética de cada especie vegetal. La presencia de plastos y otros compartimentos subcelulares las distingue del resto de células eucariotas y las dota de rutas metabólicas y metabolitos únicos, lo que genera un elevado nivel de complejidad. Una de estas rutas es la biosíntesis de isoprenoides (también conocidos como terpenoides).

En la actualidad se han identificado más de 50.000 moléculas isoprenoides diferentes en plantas, animales, bacterias y otros organismos (Withers y Keasling 2007; Pruitt y Meyerowitz 1986; Thulasiram, Erickson, y Poulter 2007), encontrándose la mayor diversidad de estos compuestos en las plantas, donde intervienen en diversas funciones esenciales primarias y secundarias. Como metabolitos primarios los isoprenoides son importantes para el mantenimiento de la fluidez de las membranas (esteroles), intervienen en procesos de modificación pos-traducciona l de proteínas tales como la prenilación (grupos prenil) y la glicosilación (dolicoles) y también forman parte de las cadenas de transporte electrónico (prenilquinonas). Las funciones que desarrollan como metabolitos secundarios son relevantes para la interacción de

las plantas con su entorno, como son las funciones defensivas contra patógenos y herbívoros, y proporcionan la pigmentación de flores y frutos para la atracción de animales para favorecer la polinización y la dispersión de semillas (Vranova, Coman, y Gruissem 2013; Bouvier, Rahier, y Camara 2005; Croteau, Kutchan, y Lewis 2000).

Muchos de los metabolitos secundarios de naturaleza isoprenoide tienen también interés comercial como aromas, pigmentos, fibras o ceras (Croteau, Kutchan, y Lewis 2000; Bouvier, Rahier, y Camara 2005). Por otro lado, algunos tienen también aplicaciones farmacéuticas como es el caso concreto del taxol, un potente antitumoral producido por los árboles de la familia de los tejos o, en su conjunto, los carotenoides y los tocoferoles que ayudan a prevenir diferentes tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares debido sus capacidades antioxidantes (Fraser y Bramley 2004). Tanto por su importancia en el metabolismo de todos los seres vivos, y muy especialmente en el de las plantas, como por las aplicaciones comerciales derivadas de sus propiedades, el estudio de las rutas biosintéticas de los isoprenoides y su regulación constituye un área de gran interés.

Todos los isoprenoides derivan de dos precursores comunes de cinco átomos de carbono (C_5), el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero el dimetilalil difosfato (DMAPP). El IPP y el DMAPP se condensan por acción de las enzimas prenil transferasas para formar geranil difosfato (GPP, C_{10}), farnesil difosfato (FPP, C_{15}) y geranilgeranil difosfato (GGPP, C_{20}), compuestos que constituyen las unidades estructurales de las cuales derivan el conjunto de isoprenoides (Figura 1).

El IPP y el DMAPP se pueden generar a partir de dos rutas metabólicas diferentes, la ruta del mevalonato (MVA) y la ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), en las cuales estos compuestos son interconvertibles gracias a la acción de enzima isopentenil difosfato isomerasa (IDI) (Bouvier, Rahier, y Camara 2005; Hemmerlin, Harwood, y Bach 2012). La ruta del MVA está

presente en algunos procariontes Gram positivos y en arqueobacterias, hongos, algas, plantas y animales, mientras que la ruta del MEP se encuentra en la mayoría de las eubacterias, algas verdes, plantas y algunos protozoos. Las plantas utilizan ambas rutas para sintetizar IPP y DMAPP, hecho que no ocurre en la mayoría de los organismos, que utilizan únicamente una de ellas (Hemmerlin, Harwood, y Bach 2012).

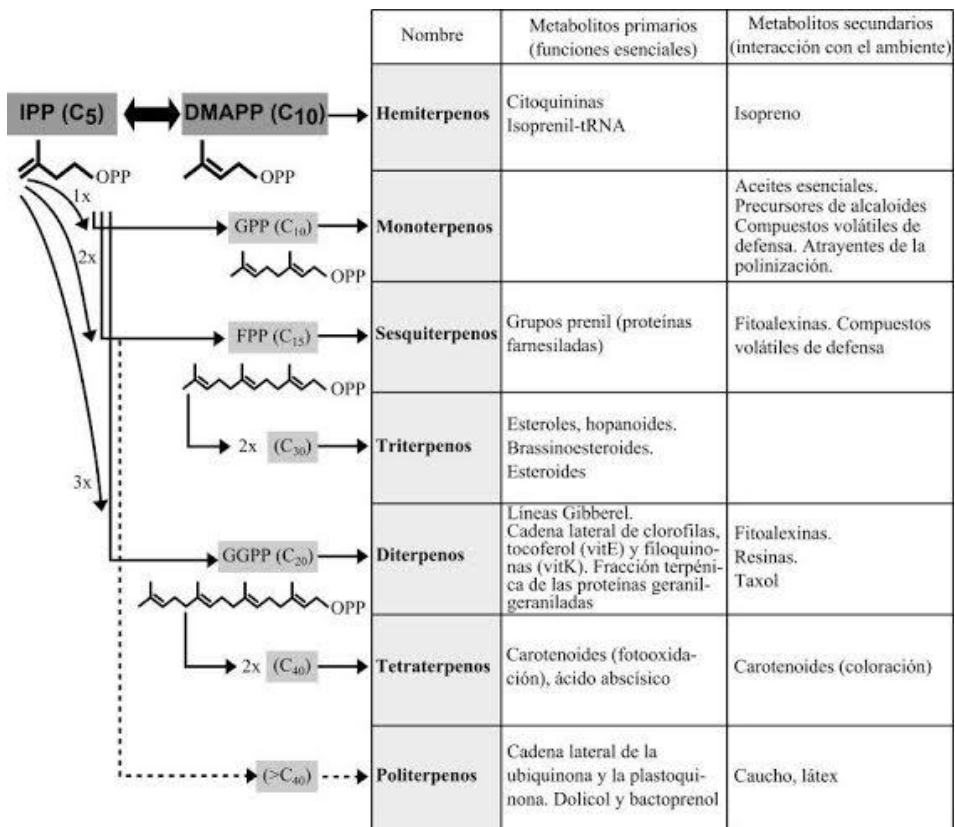
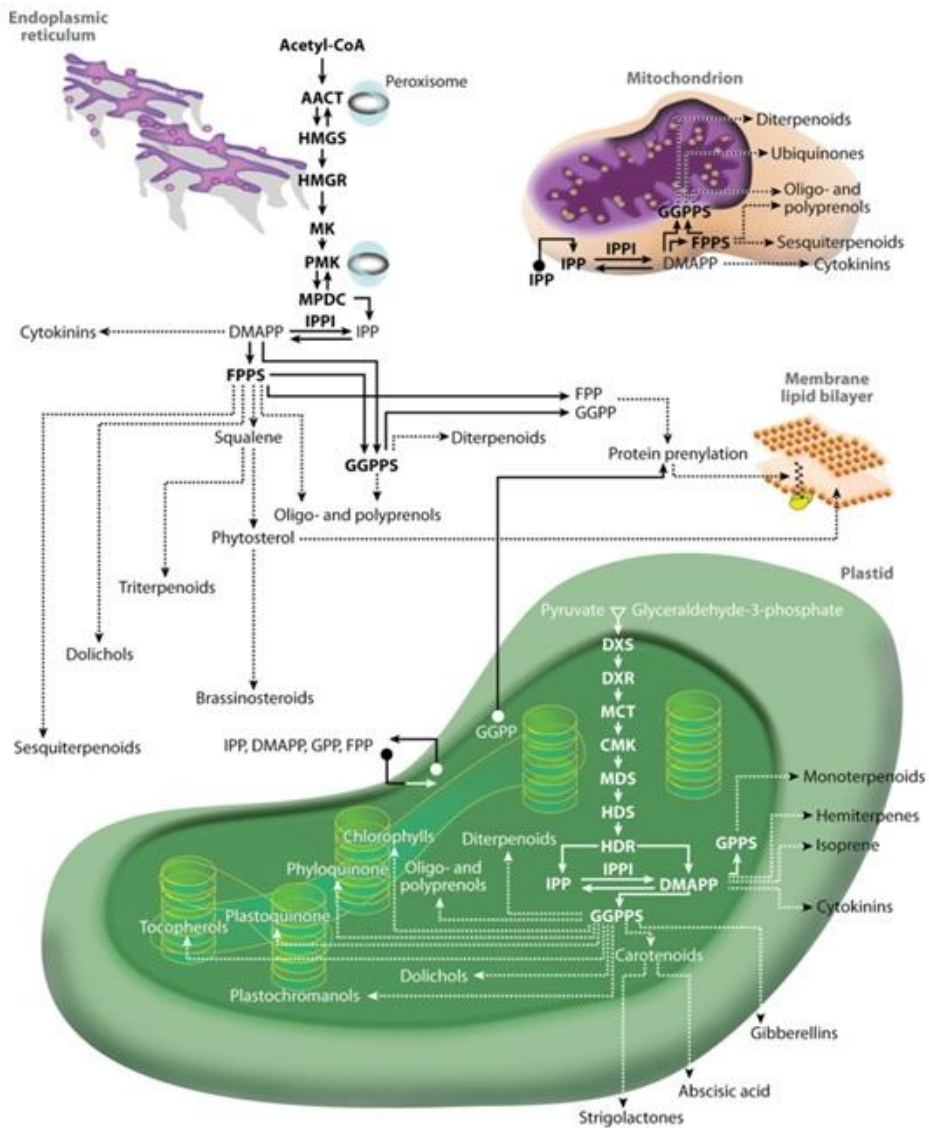


Figura 1 Clasificación de los isoprenoides en función del número de átomos de carbono (Cn) presentes en su molécula. Tomada de (Cairó 2009)

2 Vía del MVA

La ruta de MVA opera en el citosol-RE generando IPP a partir de acetil-CoA. La condensación secuencial de 3 moléculas de acetil-CoA en dos pasos enzimáticos forma sucesivamente acetoacetil-CoA y 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA). Estas reacciones están catalizadas por la enzimas acetoacetil-CoA tiolasa (AACT) y HMG-CoA sintasa (HMGS) respectivamente. A continuación, la enzima HMG-CoA reductasa (HMGR) cataliza la reducción del HMG-CoA para formar MVA. El MVA es el primer intermediario específico de la ruta. Posteriormente el MVA es fosforilado por la enzima MVA quinasa (MVK) a MVA 5-fosfato (MVA-P) y la fosforilación de éste por la enzima MVA-P quinasa (PMK) forma MVA 5-difosfato (MVA-PP). La descarboxilación de este intermediario por acción de la MVA-PP descarboxilasa (PMD) forma IPP y a partir de este, y por la acción de la enzima IDI se forma el DMAPP (Hemmerlin, Harwood, y Bach 2012) (Figura 2).

El primer nivel de regulación de la ruta del MVA se encuentra en el control del flujo de intermediarios a través de la regulación de determinadas etapas enzimáticas de la vía. En este sentido, la enzima HMGR constituye la etapa más importante en el control metabólico de la ruta del MVA en las plantas, de forma similar a como se había demostrado previamente en animales y levaduras (Hemmerlin, Harwood, y Bach 2012; Rodríguez-Concepción y Boronat 2015). Según la concepción clásica de control metabólico, la reacción catalizada por la HMGR correspondería a la etapa limitante que controlaría el flujo en la ruta del MVA (Thomas y Fell 1998). Se trata de una enzima que cataliza una reacción irreversible y que se encuentra regulada por múltiples mecanismos que actúan tanto a nivel transcripcional como pos-transcripcional (Hemmerlin, Harwood, y Bach 2012; Hemmerlin 2013; Rodríguez-Concepción y Boronat 2015).




 Vranová E, et al. 2013.
Annu. Rev. Plant Biol. 64:665–700

Figura 2 Esquema de las rutas de biosíntesis de isoprenoides y sus precursores (IPP y DMAP) en una célula vegetal. Enzimas de la ruta del MVA: Acetil-CoA C-acetiltransferasa (ACCT), 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA sintasa (HMGS), 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), MVA kinasa (MVK), Fosfo-MVA kinasa (PMK), Difosfo-MVA decarboxilasa (MVD). Enzimas de la ruta del MEP: DXP sintasa (DXS), DXP reductoisomerasa (DXR), CDP-MEP sintasa (MCT), CDP-MEP quinasa (CMK), ME-cPP sintasa (MDS), HMBPP sintasa (HDS), HMBPP reductasa (HDR).

3 Vía del MEP

En la ruta del MEP, que está localizada en los plastos, las unidades isoprenoides IPP y DMAPP se forman a partir de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (GAP). La primera reacción de la vía del MEP es la condensación de la (hidroxietil)-tiamina derivada del GAP con el piruvato para producir D-desoxixilulosa 5-fosfato (DXP) mediante la acción de la enzima DXP sintasa (DXS). Posteriormente esta molécula es convertida a 2-C-metil-eritritol 4-fosfato (MEP) en una reacción catalizada por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR), formando así el primer intermediario específico de la vía. A continuación, el MEP y el CTP son utilizados como sustratos para la síntesis de 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) por acción de la enzima 4-MEP citidiltransferasa (MCT). Seguidamente, el CDP-ME es fosforilado por la enzima CDP-ME kinasa (CMK) a CDP-ME 2-fosfato (CDP-MEP), que a su vez es convertido a 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) por la acción de la enzima ME-cPP sintasa (MDS). Como paso siguiente la ME-cPP se reduce por la acción de la enzima hidroximetil butenil difosfato sintasa (HDS) a HMBPP. Finalmente se obtiene IPP y DMAPP conjuntamente en proporción 5:1 gracias a la reducción de la molécula anterior por la acción de la HMBPP reductasa (HDR). Las enzimas de esta ruta, que están codificadas por genes nucleares, se sintetizan en el citosol y son posteriormente importadas a los plastos (Rodríguez-Concepción y Boronat 2002; Bouvier, Rahier, y Camara 2005; Rodríguez-Concepción, et al. 2013) (Figura 2).

3.1 Regulación de la vía del MEP

Algunos estudios indican que diferentes enzimas colaboran en el control del flujo metabólico de la ruta del MEP, siendo la más importante la enzima DXS, seguida de la DXR y la HDR (Carretero-Paulet, et al. 2006; Botella-Pavia, et al. 2004; Walter, Hans, y Strack 2002). DXS es la única enzima de la vía del MEP para la que se han identificado una familia multigénica en *Arabidopsis*,

varios genes homólogos, el At4g15560 (*DXS1*), At3g21500 (*DXS2*) y At5g11380 (*DXS3*) (Rodríguez-Concepción y Boronat 2002). No obstante, estudios reciente han mostrado que el gen At3g21500 corresponde a un gen no esencial que codifica para una proteína que no tiene actividad DXS (Carretero-Paulet, et al. 2013). La proteína codificada por el At5g11380 presenta cambios en su secuencia de aminoácidos que indicarían que tampoco tiene actividad DXS (Carretero-Paulet, et al. 2013). El resto de enzimas de la vía del MEP están codificadas por genes de copia única, mientras DXR está codificada por un único gen que está expresado en toda la planta, especialmente en plántulas e inflorescencias (Phillips, et al. 2008; Rodríguez-Concepción, et al. 2013). Está actualmente bien documentado que la DXS, la DXR y la HDR juegan un papel regulador importante en el flujo metabólico a través de la vía del MEP (Botella-Pavia, et al. 2004; Carretero-Paulet, et al. 2006; Wright y Phillips 2014).

Se ha descrito que la vía del MEP es especialmente activa en aquellas etapas del desarrollo y/o en los tejidos en que se requiere un mayor aporte de los precursores de isoprenoides plastídicos y se correlaciona con una activación de la expresión de los genes codificantes para las enzimas de la vía. Con respecto a la expresión de los genes de la vía del MEP en determinados tipos celulares, se ha descrito que puede existir una traslocación de intermediarios entre diferentes tipos celulares. Así, se ha observado que en la síntesis de alcaloides indol monoterpénicos en *Catharanthus roseus*, la expresión de los genes *DXS*, *DXR* y *MDS* tiene lugar en células parenquimáticas del floema interno, mientras que los genes que codifican para las siguientes enzimas en la síntesis de dichos alcaloides se expresaban en la epidermis (Burlat, et al. 2004). Otros factores que pueden provocar cambios en los niveles de transcrito en los genes de la ruta estudiada, son factores ambientales como la luz, el estrés abiótico, el estrés biótico y señales nutricionales (Carretero-Paulet, et al. 2002; Guevara-Garcia, et al. 2005; Hemmerlin, Harwood, y Bach 2012; Banerjee y Sharkey 2014; Rodríguez-Concepción, et al. 2013). Algunos genes de la vía del MEP, así como genes de las vías de biosíntesis de los tocoferoles, carotenoides y de la

biosíntesis del ABA tienen patrones de expresión circadiano (Cordoba, Salmi, y Leon 2009).

Tomando en cuenta que los precursores de la ruta del MEP, el piruvato y el GAP, derivan de la fotosíntesis o la glucólisis, se ha propuesto que los niveles de azúcares tienen un papel importante en la regulación de la biosíntesis de isoprenoides plásticos. Así pues, existen estudios que muestran que azúcares como la sacarosa tienen la capacidad de aumentar la acumulación de transcritos de varios de los genes de la ruta del MEP en plantas cultivadas en oscuridad (Hsieh y Goodman 2005).

Además del control transcripcional de la expresión de los genes de la ruta del MEP, se han descrito mecanismos de control post-transcripcionales que afecten los niveles de proteínas, la actividad enzimática o la síntesis de metabolitos y que determinen el flujo de intermediarios de la vía (Vranova, Coman, y Gruissem 2013; Hemmerlin 2013; Rodríguez-Concepción y Boronat 2015).

3.2 Inhibidores de la vía del MEP

Tanto la vía del MVA como la del MEP pueden ser inhibidas por la acción de compuestos específicos. La fosmidomicina (FSM) y la clomazona (CLM) son inhibidores ampliamente utilizados en para el bloqueo farmacológico de vía del MEP en plantas. La FSM actúa inhibiendo la enzima DXR, mientras que la CLM actúa a nivel de la DXS. La adición de estos compuestos al medio de crecimiento genera un fenotipo albino en *Arabidopsis* y el bloqueo del desarrollo de las hojas verdaderas (Figura 3) (Carretero-Paulet, et al. 2006; Laule, et al. 2003) y pone de manifiesto el papel esencial de los isoprenoides para el desarrollo de las plantas.



Figura 3 Efecto de los inhibidores de la vía del MEP (CLM y FSM) en el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*

La FSM es un antibiótico, originalmente aislado de *Streptomyces lavendulae* que, debido a su analogía estructural con el intermediario 2-C-metileritrosa 4-fosfato de la reacción catalizada por la DXR, compite con éste por la unión con la enzima (Kuzuyama, et al. 1998). La FSM es también conocida por su alta eficacia como herbicida, ya que actúa alterando diversos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas debidos a la inhibición en la formación de isoprenoides sintetizados a partir del IPP plastídico (Okada, et al. 2002). La CLM es otro herbicida conocido desde los años 80 con un efecto similar al de la FSM en cuanto al bloqueo en la acumulación de los isoprenoides plastídicos (Zeidler, et al. 2000).

Una diferencia entre el fenotipo de las plántulas crecidas en un medio suplementado con CLM o FSM es que a bajas concentraciones la CLM sólo causa un blanqueamiento de las hojas verdaderas pero no de los cotiledones, mientras que de plántulas tratadas con FSM la reducción de los niveles de pigmentos fotosintéticos se produce tanto en los cotiledones como la hojas verdaderas. Esta diferencia se debe a que la CLM no es una molécula activa en si misma sino que debe convertirse en ceto-clomazona en las hojas para ser un inhibidor biológicamente activo (Matsue, et al. 2010; Zeidler, et al. 2000)

Además del interés que tienen estos inhibidores en el estudio de la biosíntesis de isoprenoides, el hecho de que la vía del MEP se encuentre en la mayoría de eubacterias y en los plastos de las plantas, y en cambio no se encuentre en animales, la convierte en una nueva y prometedora diana para el desarrollo de inhibidores específicos de las enzimas altamente conservadas de la

vía del MEP, que funcionen como nuevos antibióticos y herbicidas de amplio espectro sin toxicidad para el hombre (Rodríguez-Concepción 2004). La gran mayoría de bacterias patógenas en humanos de gran impacto como *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum* o *Vibrio cholerae* sintetizan los isoprenoides exclusivamente a través de la ruta del MEP (Eisenreich, Rohdich, y Bacher 2001; Lichtenthaler, et al. 2000). Además se ha demostrado que los inhibidores de la ruta del MEP tienen actividad anti-malárica (Guggisberg, Amthor, y Odom 2014).

Por otra parte, para el desarrollo de antibióticos eficaces de la ruta del MEP también es necesario conocer si existen actividades que permitan superar un bloqueo enzimático de la ruta y en consecuencia permitir la supervivencia de las bacterias en presencia del antibiótico (Sauret-Güeto, et al. 2006b; Perez-Gil, et al. 2012).

4 Intercambio del IPP y DMAPP entre compartimentos subcelulares

Los primeros resultados relacionados con el intercambio de IPP u otros prenildifosfatos entre el citosol y los plastos están descritos desde poco después del descubrimiento de la vía del MEP isoprenoides (Lichtenthaler, Rohmer, y Schwender 1997; Lichtenthaler 1999; Rohmer 1999). Así, en algunas especies se ha puesto de manifiesto el intercambio limitado de prenil difosfatos entre la ruta del MVA y la ruta del MEP. Este intercambio de precursores se ha estimado por debajo del 1 % en plantas intactas y en condiciones fisiológicas (Eisenreich, Rohdich, y Bacher 2001), por lo que no parece ser suficiente para rescatar la síntesis de isoprenoides tras el bloqueo genético o farmacológico de una de las dos rutas en plantas de *Arabidopsis*. Los niveles más elevados de intercambio se han detectado en cultivos celulares en presencia de desoxixilulosa (DX) o MVA exógeno (Eisenreich, Rohdich, y Bacher 2001). Sin embargo, concentraciones elevadas de estos compuestos, que normalmente no se acumulan en las células,

podrían alterar las rutas y sobreestimar su contribución real en la producción de un determinado isoprenoide (Rohmer 1999).

El intercambio entre las dos rutas se ha demostrado, por ejemplo, en cultivos de tejidos no fotosintéticos de *Ginkgo biloba* utilizando MVA o glucosa marcados con ^{13}C . En esta especie, los derivados diterpénicos del metabolismo secundario se originaron mayoritariamente a partir de la ruta del MEP pero entre 1-2 % tuvieron un origen mixto, con 3 unidades derivadas de la ruta del MVA y una de la ruta del MEP (Schwarz 1994).

Se ha propuesto que la contribución relativa de la ruta del MVA y del MEP depende de los precursores suministrados y del isoprenoide final analizado, de forma que el nivel de intercambio dependería en gran manera de las condiciones experimentales (Hemmerlin, et al. 2003). Así, se ha sugerido que los parámetros del flujo metabólico de cada ruta y de la tasa de transporte entre membranas deben estar sujetos a regulaciones complejas que presumiblemente se ven afectadas por el suministro de intermediarios exógenos. Este intercambio se ha estimado a partir de la capacidad de los precursores de una ruta de rescatar el fenotipo derivado del bloqueo de la otra ruta. Experimentalmente el bloqueo del desarrollo de las plántulas silvestres por la inhibición de la ruta del MVA con mevinolina (MEV, inhibidor de la HMGR) se rescató parcialmente con DX. También se observó que, concentraciones elevadas de DX afectaban el desarrollo normal de las plántulas de *Arabidopsis*, indicando un posible papel tóxico de esta molécula. Sin embargo, el intercambio en el sentido citosol-plastos parecía menos efectivo, ya que mientras la DX exógena rescató la síntesis de clorofilas y carotenoides en el mutante *cla1-1* (defectivo en DXS), el fenotipo albino no se pudo revertir con MVA, aunque se observó una pequeña acumulación de pigmentos (Kasahara, et al. 2002). En este sentido se ha sugerido que algunos productos derivados de la vía del MVA serían los responsables del rescate parcial del fenotipo causado por el bloqueo de la ruta del MEP en *Arabidopsis* (Nagata, et al. 2002).

Existen pruebas del estudio de esta interacción a nivel metabólico y transcripcional en plantas de *Arabidopsis* tratadas con MEV o FSM (Laule, et al. 2003). En el bloqueo de la ruta del MEP con FSM, los niveles de clorofilas y carotenoides no se recuperaron y los niveles de todos los metabolitos acabaron disminuyendo, contrariamente a lo sucedido en el bloqueo de la ruta de MVA con MEV. Los autores interpretaron que el déficit en una ruta se intentaba compensar activando el flujo en la otra ruta, aunque la capacidad de intercambiar precursores parecía ser más eficiente en el sentido plástido-citosol. También se ha demostrado un intercambio de precursores entre distintos compartimentos subcelulares mediante intermediarios marcados y el análisis de mutantes. No obstante, al parecer este intercambio es limitado (Rodríguez-Concepción, et al. 2004).

Estudios recientes basados en análisis globales de redes de co-expresión génica en *Arabidopsis* ha mostrado que existe muy poca interacción entre las rutas del MVA y del MEP, hecho que sugiere la regulación independiente de cada vía (Vranová, Coman, y Gruissem 2012; Vranova, Coman, y Gruissem 2013). Como se ha indicado anteriormente, ambas vías están reguladas independientemente a nivel transcripcional y postranscripcional (Hemmerlin, Harwood, y Bach 2012; Hemmerlin 2013; Rodríguez-Concepción y Boronat 2015).

5 Caracterización de mutantes resistentes a la inhibición de las rutas del MEP y del MVA

En el estudio de nuevos factores reguladores de la ruta del MEP en plantas, las colecciones de mutantes de “activation tagging” han demostrado ser una herramienta muy eficaz y prometedora. Estos mutantes fueron creados mediante la inserción de un T-DNA diseñado a tal efecto en el genoma de la planta. Estos T-DNAs pueden variar dependiendo de la colección, pero como elemento común poseen “enhancers” localizados en la zona próxima al

“right-border” (RB) que tienen la capacidad de activar promotores cercanos al lugar de inserción, induciendo de esta manera la transcripción de los genes que están bajo su control (Weigel, et al. 2000; Tani, et al. 2004).

Con esta aproximación técnica se pueden obtener dos tipos de mutantes en función del lugar de inserción del T-DNA. Por un lado se pueden generar mutantes de pérdida de función si el T-DNA se inserta en la región transcrita de un gen y, por otro lado, mutantes de ganancia de función por la activación de la expresión de genes próximos al lugar de inserción (Figura 4).

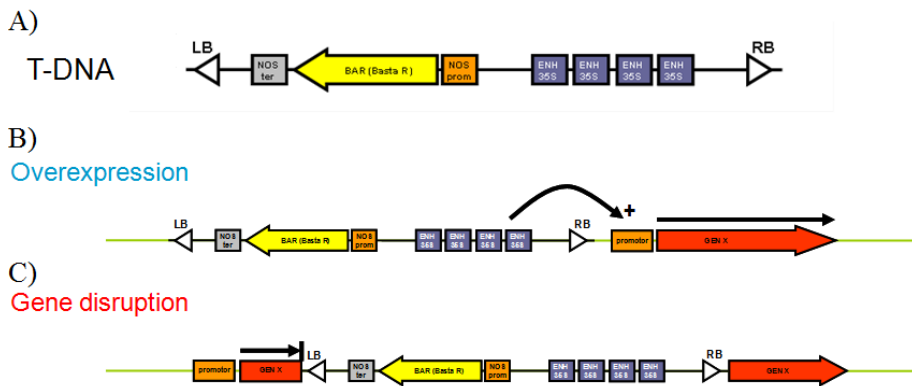


Figura 4 A) Representación esquemática del T-DNA de la colección de mutantes de “activation tagging” de Scheible-Sommerville. B) Mutante de ganancia de función por la activación del promotor de un gen próximo al T-DNA en su extremo RB. C) T-DNA insertado en la zona transcrita de un gen que generaría un mutante de pérdida de función.

La identificación y caracterización de mutantes de *Arabidopsis* capaces de superar ya sea la inhibición de la vía de MVA o la vía MEP se ha llevado a cabo por diferentes grupos de investigación como una estrategia para descubrir los mecanismos subyacentes a la regulación de pasos específicos de estas vías metabólicas o el intercambio de IPP/DMAPP entre el citosol y los plástidos.

El mutante *rim1*, resistente tanto a MEV como a FSM ha mostrado ser defectivo en el fitocromo b, el principal fotoreceptor de la luz en las plantas. El fenotipo de resistencia a MEV de dicho mutante se debe a un aumento de los

niveles de actividad de la HMGR resultante de una activación en la expresión del gen HMG1. Ya que no se encontraron evidencias de un incremento en la expresión de genes de la vía del MEP que pudieran explicar la resistencia a la FSM se considera que la resistencia a la FSM en el mutante *rim1* se debe a un mayor aporte de precursores isoprenoides derivados de la vía MVA a los cloroplastos (Rodríguez-Concepción, et al. 2004).

El mutante *loi1*, resistente a la lovastatina (una denominación alternativa de la mevinolina) y a la CLM, se identificó a partir de la colección de *activation tagging* RIKEN GSC (Kobayashi, et al. 2007). El fenotipo resistente a la lovastatina en dicho mutante deriva de la activación post-transcripcional de la HMGR. El mutante *loi1* es defectivo en el gen LOI1 (At4g14850), que codifica una nueva proteína del tipo *pentatricopeptide repeat* (PPR). Se cree que las proteínas PPR regulan la expresión de genes codificados por los genomas de los plástidos y las mitocondrias. Se predijo que la proteína LOI1 está localizada en las mitocondrias y tiene la capacidad de unirse a ácidos nucleicos de cadena sencilla, lo que sugiere que la regulación post-transcripcional del ARN mitocondrial también puede estar implicada en la biosíntesis de isoprenoides, tanto por la vía del MVA como por la del MEP (Kobayashi, et al. 2007; Tang, et al. 2010).

Se han caracterizado también mutantes de *Arabidopsis* resistentes a la inhibición de la FSM (mutantes *rif*) aislados de colección de “*activation tagging*” de Weigel (Weigel, et al. 2000). En dos de estos mutantes (*rif1* y *rif10*) se identificó un incremento de la actividad de enzimas que controlan el flujo de la vía MEP. En ambos mutantes, el fenotipo resistente a la FSM está ligado a una disminución de la acumulación de carotenoides y clorofilas, que resulta en plantas que son más pálidas y más pequeña que las de tipo salvaje. El mutante *rif10* está afectado en el procesamiento del ARN de los plástidos debido a una mutación en el gen At3g03710 codifica para la enzima exoribonucleasa polirribonucleótido fosforilasa cloroplastídica. También se observó resistencia a la FSM y otros fenotipos similares al del mutante *rif10* en plantas de

Arabidopsis, tomate y arroz cultivadas en presencia de concentraciones subletales de cloramfenicol (un inhibidor de la síntesis de proteínas en los plástidos). Por el contrario, el tratamiento con norflurazon (un inhibidor de la biosíntesis de carotenoides que causa un fenotipo pálido similar) no resultó en resistencia a la FSM. En su conjunto, estos resultados apoyan la idea de que las proteínas codificadas por el genoma plastídico están involucradas en la regulación negativa de la acumulación post-transcripcional de enzimas de la ruta MEP en los cloroplastos (Sauret-Güeto, et al. 2006a). En el mutante *rif1*, se ha descrito que la activación post-transcripcional de enzimas de la ruta MEP se debe a la pérdida de función de la proteína plastídica codificada por el gen At3g47450 que muestra homología con la proteína de *Bacillus subtilis* YqeH, una GTPasa necesaria para el ensamblaje de los ribosomas en este microorganismo (Flores-Perez, et al. 2008). Las plántulas Rif1 muestran una reducción de los niveles de proteínas codificadas por el genoma plastídico con la excepción de ClpP1, una subunidad catalítica del complejo proteasa Clp plastídica. Se ha propuesto que la degradación de enzimas de la ruta MEP mediada por ClpP1 podría representar un mecanismo para regular el nivel de enzimas de la ruta MEP y, en consecuencia, la biosíntesis de isoprenoides en los plastos (Flores-Perez, et al. 2008; Pulido, et al. 2013).

Otros mutantes *rif* de Arabidopsis fueron obtenidos y caracterizados de forma preliminar en nuestro grupo en el marco del desarrollo de la tesis doctoral de Albert Cairó (Cairó, 2009). Para la selección de estos mutantes se realizó un cribado de la colección de “activación-tagging” de Scheible-Somerville (<http://www.arabidopsis.org/abrc/Scheible.jsp>). Dicha colección está formada por plantas de *Arabidopsis thaliana* Ecotipo Columbia-2 (Col2) que poseen el T-DNA proveniente del vector pSKI015 que confiere resistencia a Basta (*BAR*) y contiene 4 enhancers del promotor CaMV 35S en el extremo RB. Dicha colección se ha generado en los laboratorios de los doctores Chris Somerville (Department of Plant Biology, The Carnegie Institution of Washington) y Wolf

Scheible (system Regulation Group, Department 2: Metabolic Networks, Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie).

La colección Scheible-Somerville fue escrutada con el objetivo de aislar mutantes, que estuvieran afectados en algún mecanismo regulador de la vía del MEP o en el intercambio de IPP (u otros prenilfosfatos) entre el citosol y los plastos. Para ello se seleccionaron mutantes resistentes a la FSM y, entre estos, los que a su vez fueran también resistentes a la CLM. Se obtuvieron 16 mutantes *rif* que fueron evaluados por su nivel de resistencia a dichos inhibidores. En estos mutantes se evaluaron los niveles de proteína DXR y DXS y sus correspondientes transcritos y, además, el contenido de clorofila y carotenoides (Cairó 2009).

El análisis de la secuencia de las regiones que flanquean los sitios de inserción de T-DNA en estos mutantes puso de manifiesto que, de manera similar a los mutantes *rif* descritos anteriormente, los genes afectados en estos mutantes (ya sea por activación o por disrupción) no estaban directamente relacionados con las vías del MEP o del MVA (Cairó 2009; Cairó y Boronat, resultados no publicados). Tomados en su conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que la biosíntesis de isoprenoides en las células vegetales se puede ver afectada por una gran variedad de procesos celulares.

6 El mutante *rif35*

Los estudios realizados en la presente tesis doctoral se han centrado en la caracterización del mutante *rif35*, aislado y caracterizado de forma preliminar en nuestro grupo (Cairó 2009). Este mutante, muestra fenotipo clorótico en las hojas jóvenes de la roseta y retraso en el desarrollo (Figura 5), presenta resistencia a la FSM y también a la CLM (Cairó 2009).

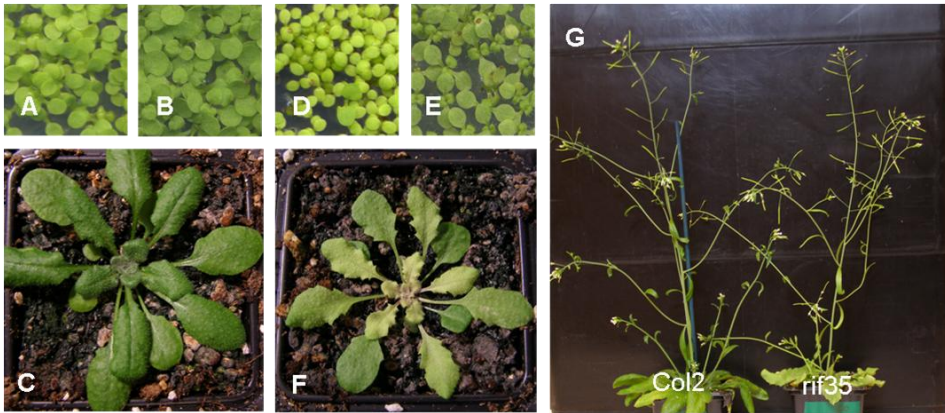


Figura 5 Fenotipo del mutante *rif35* y del wt *Col2* durante diferentes etapas de su desarrollo. A, B y C corresponden a *Col2*. D, E y F corresponden a *rif35*. Se muestra el fenotipo de plántulas a los 5 (A y D) y a los 10 días (B y E) de crecimiento en condiciones de día largo. (C y F) corresponde a plantas crecidas durante 40 días en condiciones de día corto. G muestra plantas adultas después de 2 meses de crecimiento en día corto. Imágenes tomadas de (Cairó 2009).

Los niveles de los transcrito de DXS y DXR en el mutante *rif35* son muy similares los de las plantas wt (*Col2*), mientras que los niveles basales e inducibles de las proteínas correspondientes parecían presentar un ligero aumento. Así, se determinó que el mutante *rif35* presenta unos niveles de proteína DXR 1.7 veces superior a los de las plantas *Col2*, y éste aumenta hasta 3 veces después del tratamiento con FSM. Los niveles de la proteína DXS muestran un comportamiento semejante. Estos niveles incrementados de las proteínas DXS y DXR podrían ser suficientes para explicar la resistencia a la FSM y a la CLM. Por otra parte se observó que los niveles de clorofila y carotenoides son ligeramente inferiores a los de las plantas *Col2* (Cairó 2009). Por otra parte, se ha descrito que el mutante *rif35* no parece estar afectado en la respuesta a condiciones de estrés abiótico, ya que su sensibilidad a estrés salino y osmótico es muy similar al de las plantas *Col0* (Pérez-Massot 2010).

A nivel genético se determinó que el mutante *rif35* contiene por lo menos dos inserciones del T-DNA, ambas en el cromosoma 1 (Cairó 2009). Uno de los T-DNAs (a partir de ahora denominado T-DNA *rif35a*) se localizó en la región intergénica entre los genes *At1g73470* y *At1g73480*, lo cual era

compatible con la activación de la expresión del gen de estudio, At1g73470 (Figura 6). Según la base de datos TAIR, el gen At1g73470 codificaría para una proteína plastídica de función desconocida. El otro T-DNA (a partir de ahora denominado T-DNA *rif35b*) se localizó en la región intergénica entre los genes At1g08020 y At1g08030, hecho que sugirió que dicha inserción solo debería resultar en la activación del gen At1g08010, cuya anotación no estaban bien definida (Figura 6).

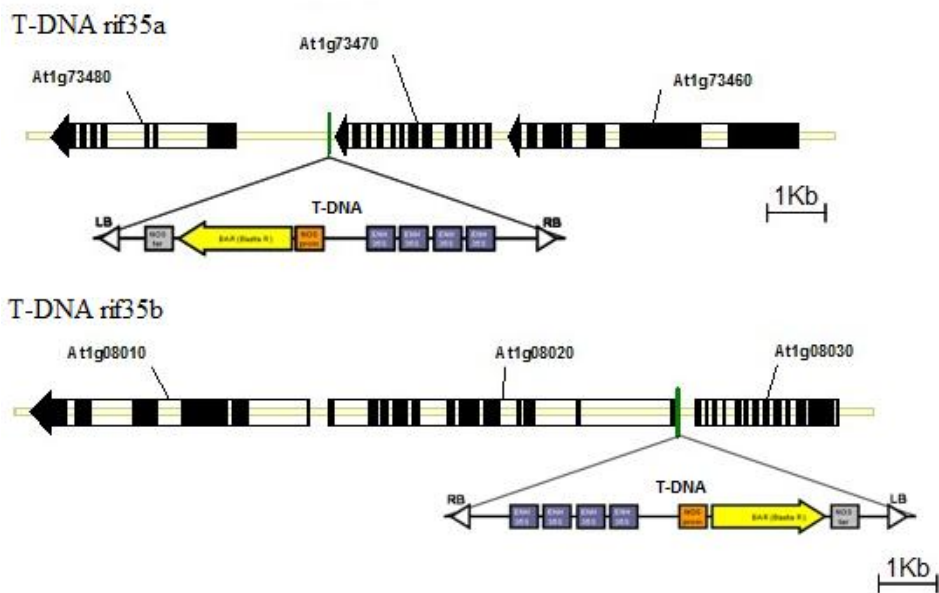


Figura 6 Región genómica en la que están insertados los T-DNAs *rif35a* y *rif35b* en el mutante *rif35*. Se muestran los T-DNAs (no dibujados a escala) y su orientación relativa. Imagen extraída de (Cairó 2009)

La sobreexpresión del cDNA correspondiente al gen At1g73470 en plantas transgénicas de *Arabidopsis* indicó que dicho gen estaba implicado en el fenotipo de resistencia a FSM observado en el mutante *rif35* (Cairó 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis se ha centrado en el análisis fenotípico, bioquímico y molecular del mutante *rif35* de *Arabidopsis thaliana*. Este mutante está afectado en la funcionalidad del gen At1g73470, que codifica para una proteína de función desconocida altamente conservada en todas las plantas. Es por ello que se ha considerado que dicha proteína puede desempeñar un papel relevante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Dado que la característica principal del mutante *rif35* es su resistencia a la inhibición farmacológica de la vía del MEP se ha considerado que el estudio detallado de dicho mutante y la caracterización tanto del gen afectado como de la(s) proteína(s) correspondiente(s) debería permitir la identificación de nuevos mecanismos implicados en la organización y regulación de la biosíntesis de isoprenoides en las plantas. Dentro de este contexto se han abordado los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio genético y fenotípico del mutante *rif35* y de mutantes defectivos en el gen At1g73470.
2. Validación de las variantes de splicing descritas para el locus At1g73470 y estudio de sus patrones de expresión.
3. Estudio de las proteínas correspondientes a las variantes de splicing del gen At1g73470.
4. Generación y caracterización de líneas transgénicas que sobreexpresan los cDNAs correspondientes a las variantes de splicing de At1g73470.

RESULTADOS

RESULTADOS

1 Caracterización genética y fenotípica del mutante *rif35*

1.1 Organización de la región genómica flanqueante a la inserción del T-DNA *rif35b*.

Tal como se ha descrito anteriormente, el mutante *rif35* contiene dos inserciones del T-DNA de “activation tagging” en su genoma. Dichos T-DNAs se han denominado T-DNA *rif35a* y T-DNA *rif35b* (Figura 6). Poco después del inicio del presente trabajo tuvo lugar una actualización de la base de datos TAIR que afectó a la organización de diversas regiones genómicas de *Arabidopsis*. Entre ellas se encontraba la región del cromosoma 1 en la que está insertado el T-DNA *rif35b* mostrada en la Figura 6. La nueva organización génica de la región flanqueante a la inserción del T-DNA *rif35b* en comparación con la descrita anteriormente se muestra en la Figura 7. El locus At1g08010 se redujo en su longitud a 1.201 pb, mientras que el At1g08020 fue remplazado por At1g08030, manteniendo la secuencia anterior. Por otra parte, el locus que antes se había nombrado como At1g08030 fue renombrado a At1g08040. Tanto el locus At1g08030 como el At1g08040 también redujeron su extensión a 3.167 y 2.467 pb respectivamente. De forma adicional a estos cambios se asignaron los nuevos genes At1g08000, At1g08005, At1g08032 y At1g08035, siendo los tres últimos muy pequeños y conformados por uno o dos exones. En base a la nueva organización de esta región cromosómica y las características de activación del T-DNA es posible que se pueda producir la activación de tres de los genes presentes en dicha región: At1g08032, At1g08035 y At1g08030. La anotación actual de los genes indicados anteriormente se muestra en la tabla 1.

AGI	Descripción	Secuencia (pb)	Secuencia (aa)
At1g08000	Factor de transcripción GATA 10	1105	308
At1g08005	SIT4 fosfatasa. Proteína de la familia asociada a At1g07990	168	55
At1g08010	Factor de transcripción GATA 11	1201	303
At1g08030	Tirosil sulfotransferasa (TPST)	3167	500
At1g08032	Proteína de función desconocida	193	36
At1g08035	Proteína de función desconocida	378	125
At1g08040	Proteína de función desconocida	2467	382

Tabla 1 Datos de los genes que conforman la región genómica donde está ubicada la inserción del T-DNA *rif35b* en el mutante *rif35*. Se indica su identificador AGI (Arabidopsis Genome Initiative Number), descripción o función de la proteína y la longitud del gen (pares de bases, pb) y la proteína correspondiente (aminoácidos, aa)

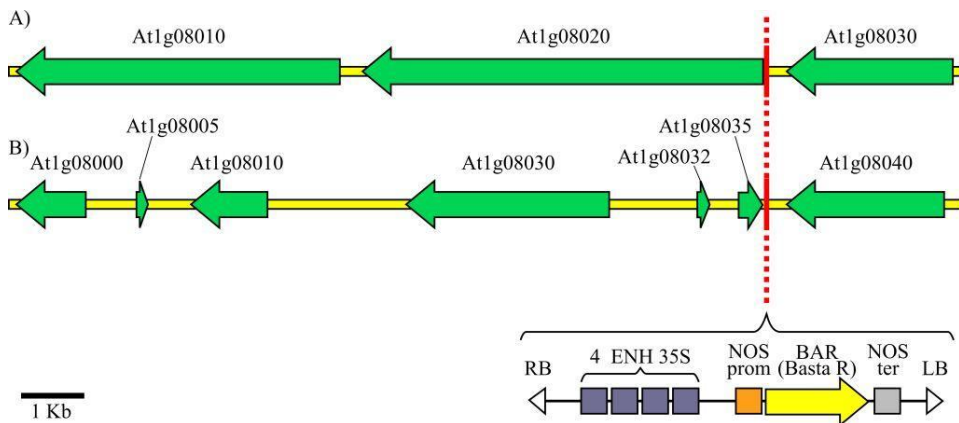


Figura 7 Región genómica en la que se encuentra insertado el T-DNA *rif35b*. A) Antigua organización descrita en Cairó (2009). B) Versión actual de dicha región genómica. Ambas regiones cromosómicas están a escala y en ellas se muestra la posición del T-DNA *rif35b* (línea roja). En la parte inferior se muestra la orientación relativa del T-DNA

1.2 Análisis genético y fenotípico del mutante *rif35* en relación con las inserciones de los T-DNAs *rif35a* y *rif35b*

Algunos aspectos del fenotipo del mutante *rif35* han sido ya descritos por Cairó (2009). Mientras que el fenotipo de resistencia a la FSM se atribuyó a la sobreexpresión del gen At1g73470, adyacente a la inserción del T-DNA *rif35a*, no fue posible determinar si las alteraciones en el crecimiento del

mutante y, en particular, la clorosis se debían a la inserción del T-DNA *rif35a* o a la del T-DNA *rif35b*. Con el fin de evaluar si era posible segregar de forma independiente las dos inserciones de T-DNA se decidió estudiar la zigosis de ambas inserciones en la población de semillas que ha constituido el material de partida del presente trabajo. Para ello se procedió al genotipado de ambas inserciones en muestras de ADN genómico obtenido de plántulas de 15 días. El análisis se realizó mediante PCR utilizando un conjunto de oligonucleótidos diagnósticos (*g35aF*, *g35aR*, *g35bF*, *g35bR* y *ATC12*) que permitían discriminar la inserción del T-DNA y la secuencia genómica intacta (Figura 8). La secuencia de dichos oligonucleótidos se muestra en Materiales y Métodos (Tabla 7), Sección de Genotipados). Como control se utilizaron muestras de DNA correspondientes a la variedad silvestre *Col2*. En todos los casos se realizaron dos réplicas de cada reacción de PCR.

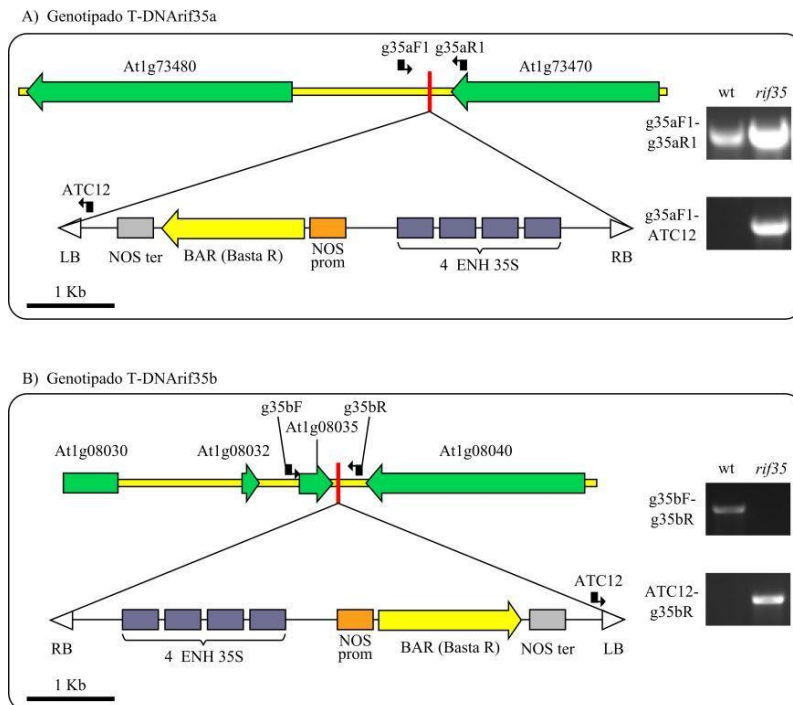


Figura 8 Genotipado de las dos inserciones de T-DNA presentes en el mutante *rif35*. A) Esquema de la ubicación de los primers y resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con los primers específicos de la inserción T-DNArif35a y de la secuencia correspondiente a dicha región sin la inserción. B) Esquema de la ubicación de los primers y resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con los primers específicos de la inserción T-DNArif35b y de la secuencia correspondiente a dicha región sin la inserción

Los resultados obtenidos mostraron que todas las plantas analizadas (100 en total) eran hemizigotas para la inserción del T-DNA *rif35a* y homocigotas para la inserción del T-DNA *rif35b* (Figura 8). Cabe notar que curiosamente los resultados en relación con la inserción del T-DNA *rif35a* no mostraron una segregación mendeliana (25% con el alelo silvestre, 25% homocigotas para la inserción y 50% hemizigotas), encontrándose únicamente plantas hemizigotas.

Es interesante destacar también la presencia de dos fenotipos distintos en las plantas adultas que no se utilizaron en el genotipado. Uno de ellos era similar al descrito anteriormente por Cairó (2009) y se denominó CHDN (“fenotipo clorótico y hojas con disposición normal”), por mostrar hojas jóvenes con aspecto amarillento que, no obstante, recuperaban el color verde propio de las plantas wt en estadios de desarrollo más avanzados. Dichas plantas presentaban una disposición normal de las hojas de la roseta, aunque su tamaño era menor a lo largo de los diferentes estadios de desarrollo. El segundo fenotipo encontrado se denominó CHDE “fenotipo clorótico con hojas en disposición elevada” por presentar un crecimiento de las hojas de la roseta direccionado hacia arriba además del fenotipo clorótico (Figura 9).

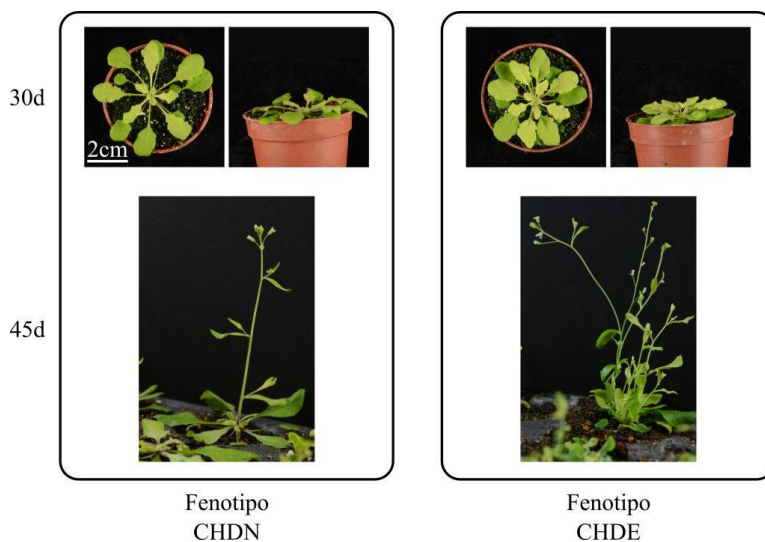


Figura 9 Fenotipos del mutante *rif35* presentado crecido en condiciones de día corto mostrando fenotipo clorótico tanto en las hojas con disposición normal (CHDN) como en las hojas con disposición elevada (CHDE)

Al detectarse estos dos fenotipos se decidió estudiar si estaban relacionados genóticamente con las inserciones de los T-DNAs rif35a y rif35b. Para ello se procedió a genotipar plantas que presentaban ambos fenotipos utilizando hojas de plantas que habían continuado su desarrollo en condiciones de día largo durante 30 días. Los resultados obtenidos mostraron que tanto las plantas que mostraban el fenotipo CHDN como las que presentaban el fenotipo CHDE eran hemizigotas para el T-DNA rif35a y homocigotas para el T-DNA rif35b. Para estudiar la posible segregación de los fenotipos CHDN y CHDE y su relación con la inserción de los T-DNAs rif35a y rif35b se procedió a recolectar semillas de plantas individuales mostrando cada fenotipo y estudiar su descendencia a nivel fenotípico y genotípico (Figura 10).

Para este estudio se tomaron 250 individuos de cada fenotipo y se procedió a su genotipado utilizando hojas de plantas de 30 días crecidas en condiciones de día largo. Se observó que mientras que toda la descendencia de las plantas con fenotipo CHDE tenía el fenotipo CHDE, las descendientes de las plantas CHDN presentaban los dos fenotipos, CHDN y CHDE en un 75 y 25% respectivamente. Además, todas las plantas analizadas mostraron el mismo genotipo: eran hemizogotas para el T-DNA rif35a y homocigotas para el T-DNA rif35b (Figura 10) Esto se repitió nuevamente en la siguiente generación sin obtener segregación del T-DNA rif35a, que se mantuvo siempre en hemizogosis (Figura 10).

Al observar que no hubo segregación mendeliana para el T-DNA rif35a se decidió diseñar dos nuevas parejas de primers que detectaran la región genómica sin la presencia del T-DNA. El objetivo era confirmar los resultados obtenidos anteriormente al descartar homologías cruzadas de los primers g35aF y g35aR con otras secuencias del genoma de Arabidopsis. La secuencia de nucleótidos de dichos primers (denominados g35aF2, g35aR2, g35aF3 y g35aR3) se indican en materiales y métodos (Tabla 7), Sección de Genotipados) y su posición se muestra en la figura 11. Los resultados obtenidos confirmaron los genotipados obtenidos anteriormente.

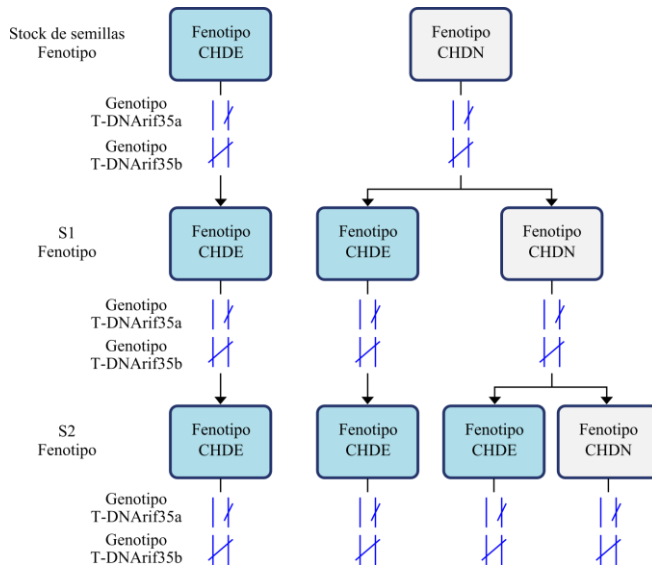


Figura 10 Segregación del genotipo y fenotipo del mutante *rif35*. Genotipo homocigoto para el T-DNA *rif35b* y hemizigoto para el T-DNA *rif35a*. Fenotipos presentes en la segregación del mutante *rif35*, el fenotipo clorótico (CHCN) y el fenotipo clorótico de hojas con crecimiento elevado (CHDE)

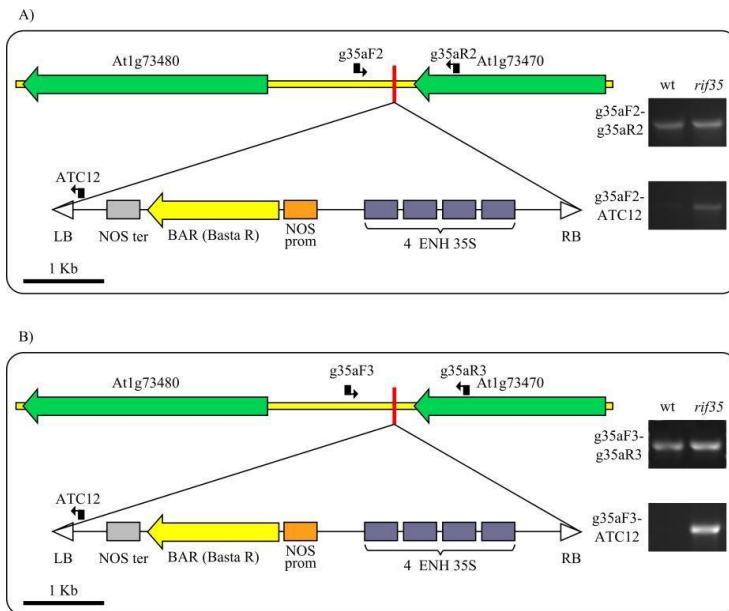


Figura 11 Genotipado de la inserción del T-DNArif35a presente en el mutante *rif35* con dos parejas de primers. A) Esquema de la ubicación de los primers g35aF y R2 y resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con dichos primers. B) Esquema de la ubicación de los primers g35aF y R3 y resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con dichos primers. Estos resultados se repitieron a lo largo de todas las pruebas sin variante alguna

Estos resultados fueron sorprendentes y de difícil explicación debido a los siguientes aspectos: 1) por una parte la segregación de dos fenotipos a partir de las plantas con fenotipo CHDN en proporción 1:3 pero no a partir de las plantas con fenotipo CHDE, y 2) La ausencia de segregación mendeliana de la inserción del T-DNA *rif35a*, que siempre se mantenía en hemizogosis. En relación con este segundo aspecto se podría pensar que en un fondo genético homocigoto para la inserción T-DNA *rif35b* las plantas azigotas y homocigotas para la inserción de T-DNA *rif35a* no son viables.

1.3 Análisis ultraestructural de los cloroplastos presentes en el mutante *rif35*

Como ya se ha indicado anteriormente, el mutante *rif35* presenta un fenotipo clorótico en sus hojas jóvenes que remite gradualmente a medida que se completa su desarrollo. Dicho fenotipo presenta cierta similitud con el descrito en los mutantes *rif1* y *Clp6* (Figura 1212). Además, tanto el mutante *rif1* como el *Clp6* presentan una morfología irregular en los cloroplastos. Todo ello hizo pensar en la posibilidad de que el fenotipo clorótico del mutante *rif35* pudiera estar relacionado con una alteración en la funcionalidad de los cloroplastos que se viese reflejada también a nivel de cambios en su morfología. Para estudiar este aspecto se realizó un análisis de la ultraestructura de los cloroplastos de dicho mutante mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Para llevar a cabo dichos análisis se tomaron muestras de hojas jóvenes de la roseta (amarillentas) y de hojas maduras (verdes) de las plantas *rif35* y de las correspondientes plantas wt, todas ellas crecidas durante 30 días en condiciones de día corto (SD) y de día largo (LD).

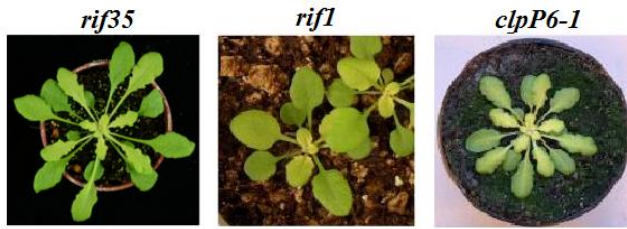


Figura 12 Fenotipo de los mutantes *rif35*, *rif1* y *clpP6-1*. La imagen correspondiente a *rif1* muestra una planta de 4 semanas crecida en condiciones de día largo, mientras que las de *rif35* y *clpP6-1* muestra plantas de 6 semanas crecidas en día corto. La imagen de *rif1* fue tomada de (Flores-Perez, et al. 2008) y la de *clpP6-1* de (Sjögren, et al. 2006)

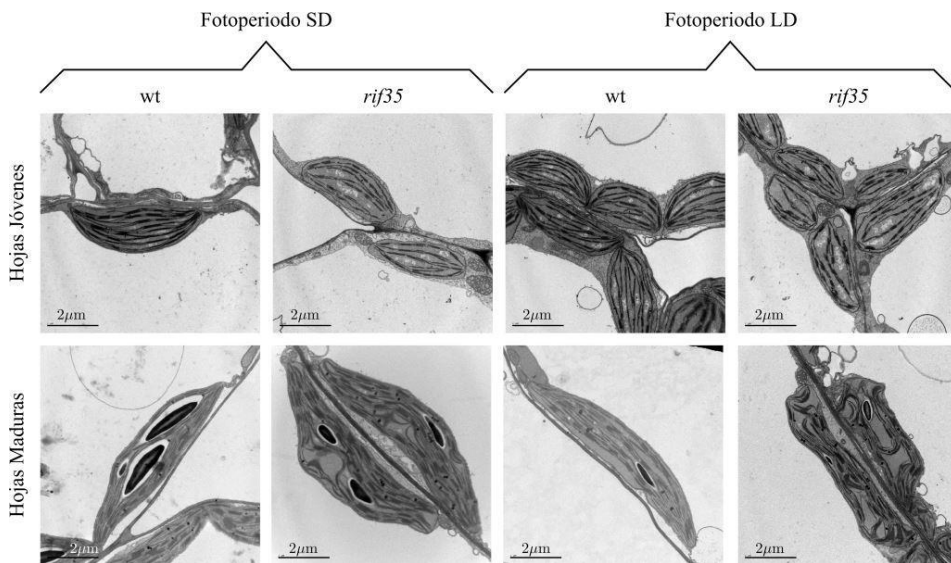


Figura 13. Cloroplastos de hojas del mutante *rif35* y de plantas wt Col2, crecidas durante 30 días en condiciones de día corto (SD) y día largo (LD). En las hojas jóvenes del mutante *rif35*, se puede apreciar un número reducido de tilacoides, mientras que en hojas maduras se muestra la morfología irregular del cloroplasto sumado a una red de tilacoides abundantes pero totalmente desorganizada y de granas más alargadas que forman estructuras circulares o semi-circulares; características que fueron más evidentes en condiciones de día largo

En las imágenes mostradas en la figura13 se puede observar que el mutante *rif35* contiene dos tipos de cloroplastos. En las hojas jóvenes los cloroplastos tienen una tendencia a ser más pequeños que los presentes en las hojas maduras y con un sistema membranoso poco desarrollado, así como también un número reducido de tilacoides y granas, con respecto a los presentes

en las plantas wt. En las hojas maduras presenta unos cloroplastos cuya morfología es totalmente irregular, con una red de tilacoides abundantes pero totalmente desorganizada y granas más alargadas que forman estructuras circulares o semi-circulares. Sin embargo el tamaño de los cloroplastos es similar al de las plantas wt y, de igual forma, se pudo observar la presencia de granos de almidón. No obstante, vale la pena resaltar que en condiciones de día corto, las hojas maduras del mutante presentaban las características mencionadas con anterioridad de forma más sutil y no tan extremas como sí se podían apreciar en las hojas maduras del mutante desarrolladas en día largo, lo que nos da un claro indicio de que el fotoperiodo afecta las características del cloroplasto del mutante. Es decir, un aumento de las horas de luz acelera el proceso de alteración de los cloroplastos en el mutante.

Se realizaron también estudios en plántulas de 15 días, si bien en este caso se crecieron únicamente en condiciones de día largo. Las plántulas del mutante crecidas en estas condiciones no muestran una clorosis considerable, por lo que no se esperaban diferencias significativas en la morfología de los cloroplastos con respecto a los de las plantas wt. Los resultados obtenidos mostraron que, efectivamente, los tamaños eran similares, con una red de tilacoides muy parecida, si bien ya se evidenció una cierta desorganización en la red de los tilacoides que dejaban pequeños espacios vacíos en el estroma (Figura 14).

En la Figura 14B se puede observar, no obstante, un cambio muy evidente en la morfología de los cloroplastos del mutante si se compara con los resultados de las hojas de las plántulas de 15 días con respecto a las que tienen 30 días en las mismas condiciones de desarrollo. Mientras que los cloroplastos de las hojas de plántulas de 15 días muestran una morfología y tamaño bastante similar a los del wt, pasado 15 días más en las mismas condiciones de desarrollo tanto las hojas jóvenes cloróticas como las hojas maduras muestran una clara diferencia en la morfología y tamaño de sus cloroplastos, como ya hemos descrito con anterioridad.

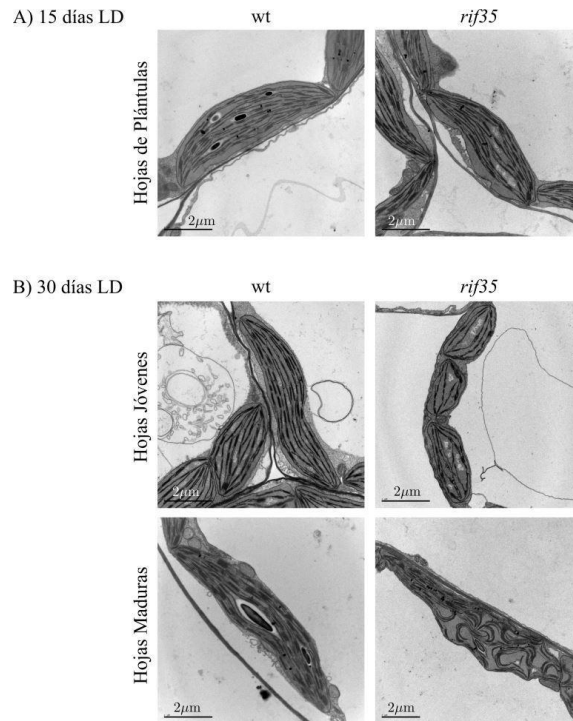


Figura 14 Análisis comparativo de la ultraestructura de los cloroplastos del mutante *rif35* y el Col2, crecidas en condiciones de día largo **A)** hojas de plántulas de 15 días **B)** Hojas Jóvenes y maduras de plantas de 30 días de desarrollo

2 Validación experimental de las variantes de splicing descritas para el locus *At1g73470*.

También al inicio del presente trabajo apareció en la página web de TAIR nueva información relacionada con el locus *At1g73470*. Dicha información hacía referencia a su organización en exones e intrones y se muestra en la Figura 15. En azul se muestran tres variantes de splicing denominadas *At1g73470.1*, *At1g73470.2* y *At1g73470.3*. En verde se indican también la organización de exones e intrones deducida a partir de secuencias de EST correspondientes a dicho locus y depositadas en GenBank.

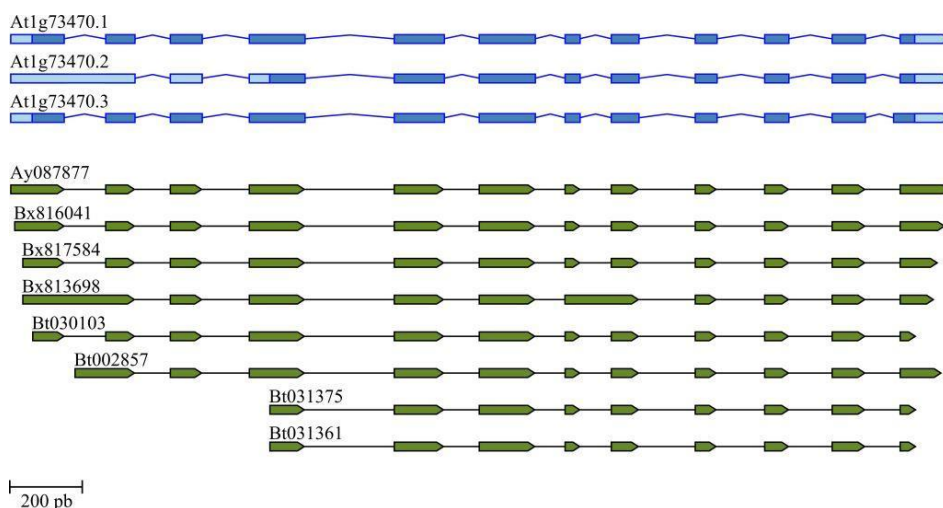


Figura 15 Variantes de splicing alternativo (a escala) predichas en la base de datos del TAIR para el locus At1g73470. En azul se indican los modelos predichos y en verde otras posibles variantes deducidas a partir de la secuenciación de clones de cDNA (ESTs) depositadas en GenBank. En las tres variantes de splicing mostradas en la parte superior, la región codificante se muestra en azul oscuro y las secuencias 5'- y 3-UTR en azul claro

Con el fin de confirmar dichas variantes de splicing y tener una primera estimación de sus niveles relativos de expresión en un material biológico de referencia se realizó una amplificación mediante RT-PCR utilizando RNA total obtenido de plántulas de 15 días (crecidas en condiciones de día largo). Los primers utilizados (rif35allsplicingF y rif35allsplicingR, tabla 7 de Materiales y Métodos) se diseñaron sobre secuencias correspondientes al primer y último exón comunes a las tres variantes de splicing. Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pBluescript utilizando las dianas XbaI y EcoRV introducidas en los extremos 5' y 3', respectivamente, del producto de PCR. Dichas dianas se escogieron por estar ausentes en los cDNAs de las tres variantes. Tras secuenciar el inserto presente en los plásmidos recombinantes aislados de 65 colonias transformantes seleccionadas al azar se observó que 60 de ellos correspondieron a la variante At1g73470.1 y 5 a la variante At1g73470.2. A pesar de no haberse identificado ningún clon correspondiente a la variante At1g73470.3, su existencia estaba validada por el aislamiento previo en el grupo de un clon de cDNA correspondiente a dicha variante (Cairó, 2009).

En su conjunto, estos resultados validaron la existencia de las tres variantes de splicing At1g73470.1, At1g73470.2 y At1g73470.3 y pusieron de manifiesto su expresión diferencial, siendo la variante At1g73470.1 la que se expresaría de forma mayoritaria durante las primeras etapas de desarrollo de la planta. El estudio detallado del patrón de expresión de las variantes de splicing At1g73470.1, At1g73470.2 y At1g73470.3 se describe con detalle en el apartado 3.3. Con el fin de simplificar la nomenclatura relacionada con el locus At1g73470 y sus variantes de splicing se decidió renombrar a dicho gen como *RIF35* (en relación con el fenotipo asociado de resistencia a la inhibición por *FSM*) y *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* a los transcritos correspondientes a las tres variantes de splicing. La secuencia de nucleótidos de los mRNAs *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* se muestra en el anexo A.

La organización de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en relación con los exones presentes en cada uno de ellos se muestra en la figura 16. Los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.3* contienen 12 exones y únicamente difieren en la longitud del exón 12, que muestra 18 nucleótidos adicionales en la región codificante en el transcrito del *RIF35.3*. El transcrito *RIF35.2* está compuesto por 11 exones ya que el primer exón corresponde con las secuencias de los exones 1 y 2 presentes en los transcritos *RIF35.1* y *RIF35.3* fusionadas a la secuencia correspondiente al primer intrón (Figura 16).

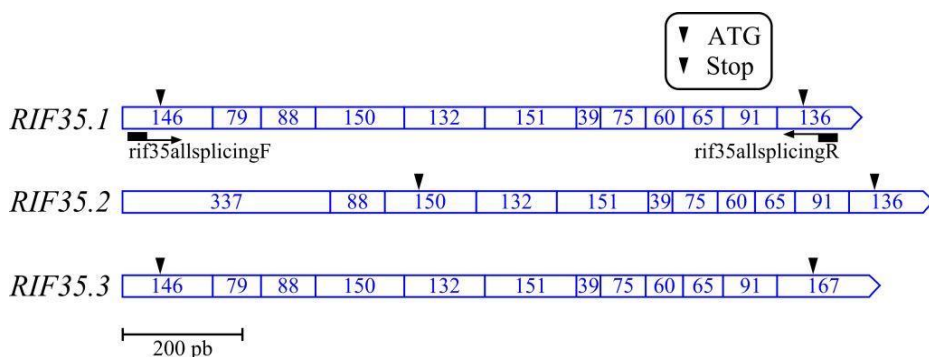


Figura 16 Representación esquemática de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* y la ubicación de los primers *rif35allsplicingF* y *rif35allsplicingR*, empleados para la obtención de los productos de PCR que se clonaron en el vector pBluescript. Los números dentro de cada cuadrante indica la longitud (en pb) de cada exón. La ubicación de los codones de inicio parada de la traducción está representada con un triángulo

3 Cuantificación de los niveles de expresión de los transcritos correspondientes a las variantes de splicing *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*

3.1 Diseño de estrategias para cuantificar la expresión de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*

La peculiar organización de los exones presentes en las variantes de splicing *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* puso de manifiesto las dificultades para poner a punto un protocolo que permitiera evaluar con precisión los niveles de expresión de los mRNAs correspondientes tanto en el mutante *rif35* como en las plantas silvestres. Si bien inicialmente se consideró la posibilidad de utilizar técnicas tales como protección a la RNasa y “Primer Extension”, éstas se descartaron al no ser adecuadas a este caso en particular. Como alternativa se visualizó el uso de técnicas basadas en PCR, tales como la PCR semi-cuantitativa (SQ-PCR) y la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), utilizando primers específicos para cada transcrito. Aunque teóricamente factible, el problema residía en la imposibilidad de diseñar parejas de primers específicas para la cuantificación individual de cada uno de los transcritos. Es decir, siempre habría una pareja de primers que amplificaría dos de los transcritos simultáneamente.

Así por ejemplo, en el caso de la técnica de PCR semi-cuantitativa, se estudió el uso de primers específicos que amplificarían las zonas diagnósticas de interés, pero por las características de las secuencias no fue posible establecer parejas de primers específicos para cada mRNA. Ocurría lo mismo en el caso de la qPCR. Sin embargo la elevada sensibilidad de dicha técnica ofrecía la posibilidad de discriminar por lo menos una de las tres variantes, la *RIF35.2*, de forma confiable. Así pues, y considerando que la qPCR permitía discriminar claramente a uno de los tres transcritos, se decidió trabajar con la variante qPCR basada en el uso de sondas TaqMan. Dicha técnica tenía ventajas con respecto a

la qPCR utilizando SYBR Green en cuanto a que tiene mayor especificidad, una mayor sensibilidad en el caso de bajo número de copias (1-10) y una elevada reproducibilidad.

La qPCR utilizando sondas TaqMan, se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa para hidrolizar una sonda complementaria a la secuencia diana de interés que contiene un doble marcaje (un fluoróforo reportero en el extremo 5' y un "quencher" del fluoróforo en el extremo 3'). La hidrólisis de la sonda separa el fluoróforo reportero del "quencher", hecho que resulta en la generación de una señal fluorescente del fluoróforo reportero. (Figura 17). La fluorescencia detectada en la reacción es proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, en consecuencia, a la cantidad de molde presente en la muestra.

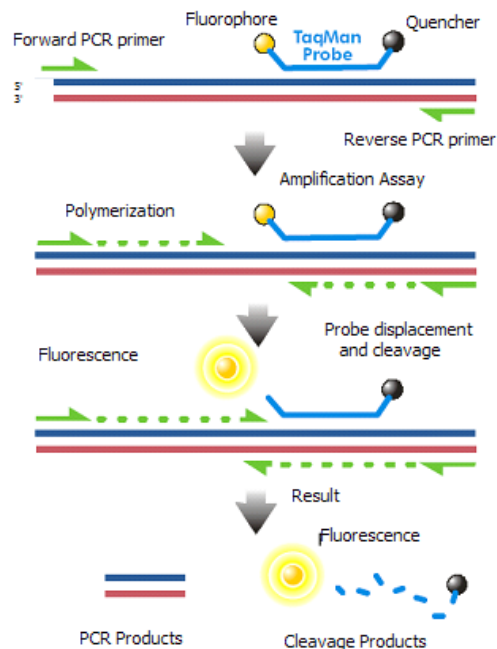


Figura 17 Esquema del método de Qpcr/Sondas TaqMan. Imagen tomada de <http://epidemiologiamolecular.com/estudio-virolgico-virus-gripe>

Al igual que en otros métodos basados en PCR en tiempo real, la señal de fluorescencia resultante permite mediciones cuantitativas de la acumulación del producto durante la etapa exponencial de la PCR. Sin embargo, el uso de la sonda TaqMan aumenta significativamente la especificidad y la sensibilidad de la detección.

El ensayo consta de tres fases: excitación, emisión y recogida de datos. En la fase de excitación, el equipo StepOne™ Real-Time PCR System ilumina todos los pocillos de la placa de reacción para excitar los fluoróforos liberados en cada mezcla de reacción. En la emisión, la óptica del instrumento StepOne capta la fluorescencia residual que se emite desde los pocillos de la placa de reacción. La imagen resultante que capta el dispositivo sólo consta de luz que se corresponde con el rango de las longitudes de onda de emisión. En la fase de recogida de datos, el equipo StepOne™ crea una representación digital de la fluorescencia residual recogida en un intervalo de tiempo fijado. En cada ciclo, se separan moléculas de fluoróforo de sus respectivas sondas, lo que produce un aumento de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de amplicón producido. Cuanto más alto sea el número inicial de copias de la molécula de ácido nucleico diana, antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia.

3.1.1 Diseño de primers y sondas TaqMan para la cuantificación de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*

Las sondas TaqMan son sintetizadas de forma exclusiva por la empresa Roche Molecular Systems, Inc. Existen varios programas para el diseño de los primers y las sondas TaqMan, como es el caso de Beacon Designer™, AlleleID® y Primer Express. Desafortunadamente, los primers y las sondas sugeridos por estos programas no eran en absoluto adecuadas para su uso en el presente trabajo. Es por ello que fue necesario proceder a su diseño específico e individualizado para cada uno de los transcritos. Para ello se tuvieron en cuenta

toda una serie de parámetros recomendados a tal fin y que se detallan a continuación en la Tabla 2 .

Primers	Sondas
Longitud de 15-30pb	No iniciar con una G en el extremo 5'
Tm entre 58 y 60 °C. La TM de ambos primers deberían ser iguales	Tm 10 °C por encima de la TM de los primers
El número total de G y C en los últimos cinco nucleótidos del extremo 3' no debe exceder de dos	El contenido de G+C debe ser entre 30 y 80 %. Si es mayor es esencial el uso de una Tm mayor y el uso co-disolventes como el glicerol
	No debe tener repeticiones consecutivas de nucleótidos idénticos, especialmente 4 o más G.
La longitud del amplicón no debe exceder los 400 pb (ideal entre 50 y 150 pb)	

Tabla 2 Parámetros recomendados para el diseño de primers y sondas TaqMan

Las características de la secuencia de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* no permitieron tomar en cuenta todos los parámetros para el diseño de los primers y las sondas TaqMan. Es por ello que se realizó un diseño específico ajustado a las características de los transcritos que se querían cuantificar. En dicho diseño se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: 1) longitud y Tm de los primers, 2) evitar una G en el extremo 5' de las sondas, 3) un contenido de G y C que evitara las repeticiones consecutivas de dichos nucleótidos, 4) el valor de Tm, y 5) la longitud del amplicón.

Teniendo en cuenta estos parámetros se diseñaron sondas que permitían discriminar los transcritos *RIF35.2* y *RIF35.3* pero no *RIF35.1*, ya que éste no contiene ninguna secuencia que no esté presente también en *RIF35.2* y *RIF35.3*. No obstante la elevada sensibilidad de la técnica debería permitir cuantificar la variante *RIF35.1* restando el valor obtenido con la sonda específica para *RIF35.3* tras amplificar los dos transcritos simultáneamente con primers comunes flanqueantes a la sonda1.

En la figura 18 se muestra como las sondas TaqMan 2 y la 3 se anclan en secuencias específicas de las variantes *RIF35.2* y *RIF35.3*, respectivamente. Así, la sonda TaqMan 2 se ancla en la secuencia de los 112 nt específica de la variante *RIF35.2*. Por otra parte, la sonda TaqMan 3 se ancla sobre una secuencia que incluye los 18 nt específicos del exón 12 de la variante *RIF35.3*.

Como ya se ha indicado, la variante *RIF35.1* no contiene ninguna secuencia que no esté presente también en las variantes *RIF35.2* y *RIF35.3*. Al diseñar la sonda TaqMan 1 justo en la zona de splicing de la variante *RIF35.2* (entre los exones 1 y 2) se descartó la detección de la expresión de la variante *RIF35.2* en su cuantificación. No obstante el resultado de dicha cuantificación incluye los transcritos de las variantes *RIF35.1* y *RIF35.3*, por lo que para conocer el nivel de expresión de *RIF35.1* real se debe restar el valor resultante de la cuantificación del transcrito *RIF35.3* con la sonda TaqMan 3, específica para la cuantificación de dicha variante (Figura 18).

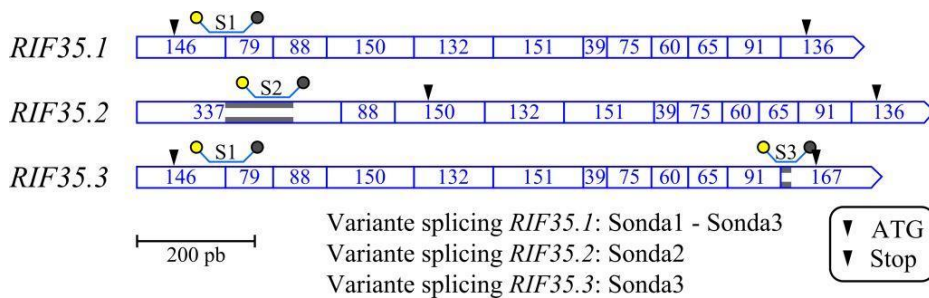


Figura 18 Estrategia implementada para la cuantificación de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2*, *RIF35.3* utilizando las sondas TaqMan diseñadas (S1: sonda TaqMan1, S2, sonda TaqMan 2 y S3, sonda TaqMan 3). Los niveles de transcrito de las variantes *RIF35.2* y *RIF35.3* se obtienen con las sondas S2 y S3, respectivamente, mientras que la cuantificación del transcrito *RIF35.1* se obtiene a partir de la sustracción del número de copias estimada con la sonda 3 al número de copias estimadas con la sonda S1. Adicional en la figura se detallan los exones. Los números dentro de cada cuadrante indican la longitud de los exones (en pb). La ubicación de los codones de inicio parada de la traducción está representada con un triángulo y las secuencias específicas de cada variante se encuentran representadas con una doble línea gris

Para asegurar que tanto los primers como las sondas TaqMan funcionarían correctamente, antes de sintetizar dichas sondas se analizaron

ciertos aspectos de su secuencia con los programas Design Tools (SIGMA ALDRICH) y el Oligo Analyzer 3.1 (IDT Integrated DNA Technologies). Estos programas permitieron evaluar y confirmar la T_m , el porcentaje de G y C, la presencia de estructuras secundarias, “hairpins”, dímeros y hetero-dímeros. De forma adicional se confirmó la especificidad de los primers y las sondas alineándolos con las secuencias depositadas en bancos de datos utilizando el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®). El detalle de los amplicones y los correspondientes primers y sondas TaqMan diseñadas se muestra en la figura 19 y la tabla 8.

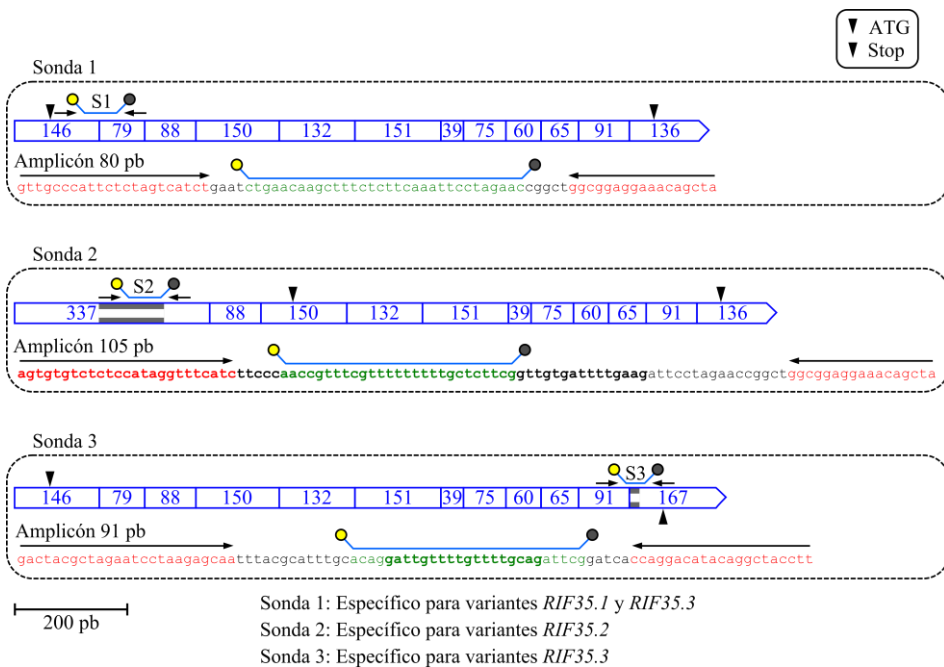


Figura 19 Detalle de los amplicones y sus correspondientes primers y sondas diseñados para cada una de las tres variante de splicing del locus At1g73470. Sonda 1 (S1), con un amplicón de 80 pb ubicada entre los exones 1 y 2, lo cual descarta a la variante *RIF35.2* pero no a la *RIF35.3*. S2 con un amplicón de 105 pb y específica para la variante *RIF35.2* al reconocer una secuencia exónica específica del transcrito *RIF35.2*. S3, que es específica para la variante *RIF35.3* con un amplicón de 91 pb. Se indican los exones y el número de pb de cada uno de ellos. La posición de los codones de inicio y parada de la traducción se indica con triángulos. Las regiones específicas de los transcritos *RIF35.2* y *RIF35.3* se indican con líneas grises horizontales

3.1.2 Validación experimental de los primers y sondas TaqMan

Una vez preparadas las mezclas de reacción conteniendo los primers y las sondas TaqMan específicas para los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2*, *RIF35.3* y actina-2 (utilizado como gen “housekeeping” normalizador) se evaluaron los siguientes parámetros en este orden: 1) la eficiencia de la reacción de qPCR, 2) la curva de “melting”, 3) la secuencia de nucleótidos de los productos obtenidos, 4) análisis de las mezclas de reacción (Mix) con muestras de cDNA preparadas a partir de plántulas de *Arabidopsis*.

3.1.2.1 Eficiencia de la reacción de qPCR

Se realizaron varias pruebas de qPCR utilizando las sondas TaqMan para evaluar la eficiencia de la qPCR mediante la estimación de los Cts resultantes para cada sonda y evaluar que estuvieran tanto dentro de un rango de valor comprendido entre 16 y 35 como que se mantuvieran constantes en las réplicas experimentales. Para cada sonda TaqMan se llevaron a cabo 2 réplicas biológicas con 3 réplicas experimentales.

Para la puesta a punto de la técnica se preparó RNA a partir de plántulas de 15 días del tipo silvestre Col0 crecidas en condiciones de día largo. Para la síntesis de cDNA se tomó en cuenta la ubicación de las sondas TaqMan. Así pues, para las sondas S1 y S2 el cDNA se sintetizó utilizando el oligonucleótido específico RT2 localizado cerca del extremo 5'. Para la sonda S3 el cDNA se generó utilizando oligo dT. En la figura 20 se muestra de forma esquemática la preparación de las mezclas de reacción (Mix) en las placas de qPCR a partir de los diversos cDNA sintetizados.

Una vez obtenido el cDNA, se prepararon las Mix (por triplicado) conteniendo los primers/sondas TaqMan correspondientes y 2 µl de muestra de cDNA (10 ng/µl) por reacción. Se preparó también un Mix (primer/sonda TaqMan) correspondiente al gen normalizador (actina 2) para la cuantificación

relativa de los Cts. A continuación se detalla el contenido de las Mix y el tiempo y temperatura de cada ciclo de reacción de PCR.

Reacción:

Agua grado PCR..... 2 μ l
Light Cycler 480 Probe Master, 2 X..... 5 μ l
Mix primers/sonda TaqMan 10 X 1 μ l
2 μ l de muestra de cDNA en un total de 10 μ l.

Equipo Light Cycler 480 Programa de qPCR:

Formato de detección: Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe
Pre-incubación..... 10 min/95 °C
Amplificación (45 ciclos)..... 15 seg/95 °C y 1 min/60 °C
Enfriamiento..... 30 seg/40 °C

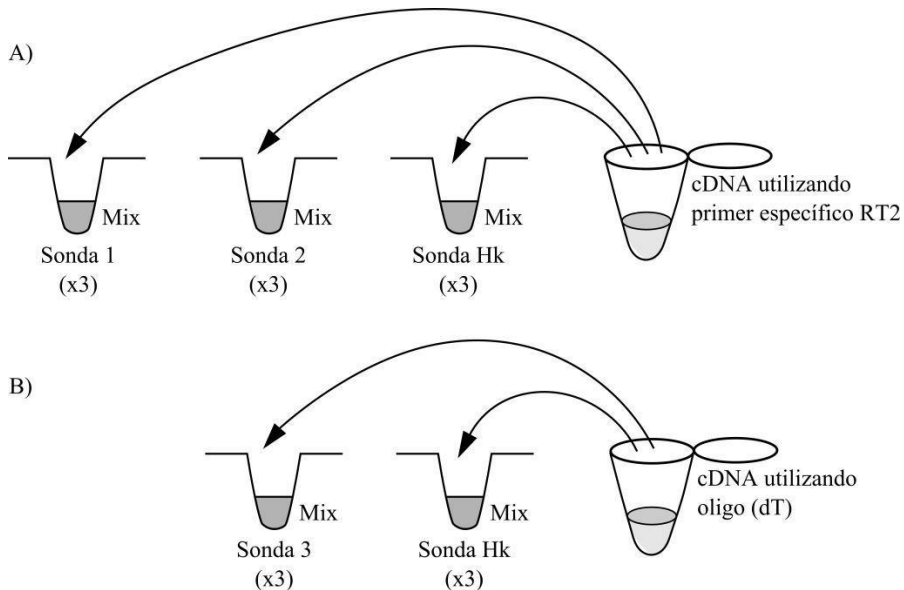


Figura 20 Esquemas de la preparación de las Mix para qPCR utilizando los cDNAs sintetizados a partir de RNA de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días. A) cDNA preparado con el primer específico RT2, B) cDNA preparado con oligo-dT. La sonda Hk (housekeeping) corresponde a la del gen normalizador actina 2

Réplica Biológica	1			2		
Réplica Experimental	1	2	3	1	2	3
Muestras						
Sonda 1	23.68	23.54	23.80	23.54	23.82	23.69
Sonda 2	26.45	26.34	26.37	26.37	26.33	26.44
Actina 2 (Primer específico)	27.56	27.62	27.68	27.55	27.62	27.67
Sonda 3	28.89	29.16	28.83	28.90	29.10	28.96
Actina 2 (oligo dT)	19.49	19.52	19.50	19.50	19.47	19.51

Tabla 3 Valor de los Cts obtenidos con las sondas 1, 2, 3 y Actina2 en muestras de plántulas de 15 días de wt (Col0) crecidas en condiciones de día largo. Los valores obtenidos se mantienen constantes tanto en las réplicas experimentales como en las biológicas, y todos están dentro de los rangos esperados

Los resultados obtenidos mostraron que los valores de Ct eran constantes y estaban dentro de los rangos adecuados (Tabla 3), confirmando así los resultados esperados.

.3.1.2.2 Curvas de “melting”

Con el objetivo de descartar la presencia de un amplicón inesperado (otro producto de amplificación) o dímeros se realizaron ensayos de qPCR utilizando SYBR Green con los oligonucleótidos diseñados para cada variante. Esta prueba permitía su estudio mediante el análisis de las curvas de la temperatura de fusión (curva de melting) que se expresa en una curva cuya forma se relaciona con el contenido de G y C, el tamaño de los amplicones y la secuencia de los mismos.

El análisis de las curvas de “melting” para cada pareja de primers mostró un amplicón simple (Figura 21). No obstante analizar las muestras obtenidas con los primers específicos para *RIF35.1* y *RIF35.2* mediante electroforesis en geles de agarosa se observaron dos bandas con tamaños correspondientes a los amplicones esperados. Como era de esperar esto no ocurrió con los primers del transcrito *RIF35.3*, ya que la diferencia en el número de pares de bases de los productos amplificados es de tan solo 18 pb.

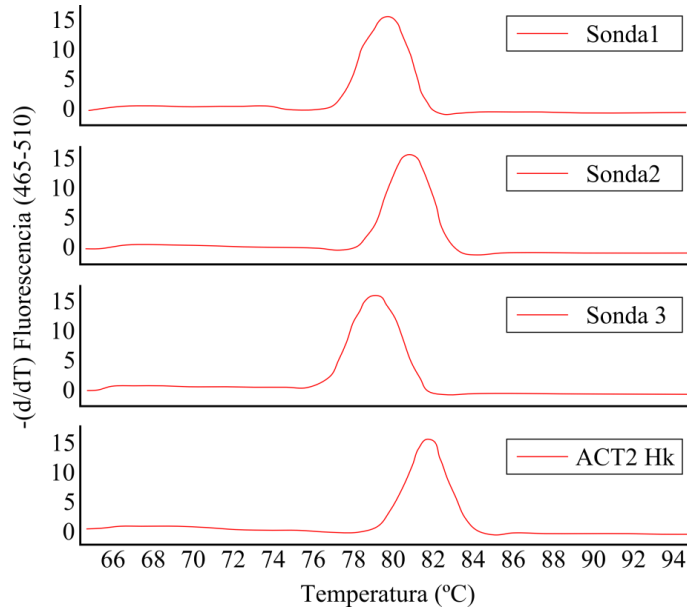


Figura 21 Amplicones derivados de muestras de plántulas de 15 días con el uso de los primers, diseñados para la técnica de qPCR con sondas TaqMan, mediante el análisis de la curva de Curva de “melting”

.3.1.2.3 Secuencia de los productos de amplificación obtenidos

Los productos de PCR obtenidos durante el desarrollo de los apartados 3.1.2.1 y 3.1.2.2 fueron purificados, algunos a partir de bandas de geles de agarosa y otros directamente por cromatografía en columna, y posteriormente secuenciados. Las secuencias de nucleótidos obtenidas correspondieron exactamente con las esperadas.

.3.1.2.4 Análisis de los niveles de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en muestras de plántulas de *Arabidopsis Col0*

Una vez validados los parámetros de los primers y sondas TaqMan se abordó la cuantificación de los niveles de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en muestras de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días (*Col0*). Se escogió este material ya que se correspondía con el que se había utilizado en los experimentos de validación de las variantes de splicing *RIF35.1*, *RIF35.2* y

RIF35.3 mostrados en el apartado 2 y de los cuales se tenía una estimación aproximada de la abundancia relativa de los transcritos correspondientes.

Para realizar estos experimentos se realizaron 2 réplicas biológicas y 3 réplicas experimentales de cada una de ellas. Los resultados mostrados en la figura 22 indican claramente que el transcrito *RIF35.1* es el que tiene una expresión mayoritaria en las muestras analizadas. El nivel de expresión de *RIF35.2* es mucho menor y el de *RIF35.3* es prácticamente indetectable. Es interesante resaltar que estos resultados son equivalentes a los obtenidos en los experimentos de clonación y secuenciación de clones de cDNA al azar mostrado en el apartado 2. En la tabla 4 se muestra la estimación de los niveles relativos de expresión de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* obtenidos en ambos casos. Cabe destacar, no obstante, que la estimación a partir de la secuenciación al azar de clones de cDNA es cuantitativamente poco fiable debido al número relativamente bajo de clones analizados.

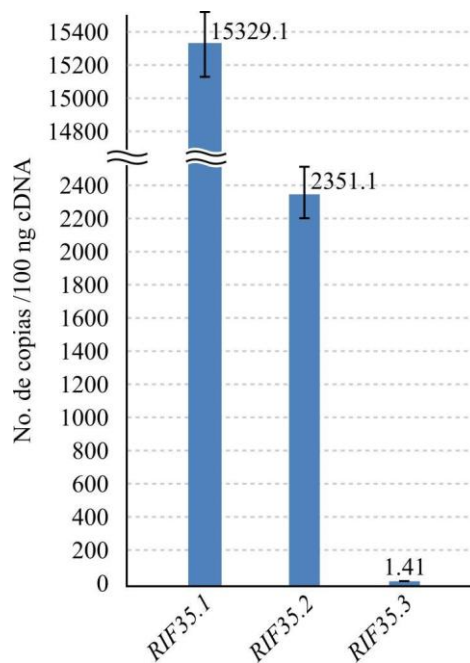


Figura 22 Cuantificación de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* utilizando sondas TaqMan en muestras de RNA obtenidas de plántulas de *Arabidopsis* (Col0) de 15 días

Variante splicing	Secuenciación de cDNAs (%)	qPCR/Sondas TaqMan (%)
<i>RIF35.1</i>	93	86.69
<i>RIF35.2</i>	7	13.30
<i>RIF35.3</i>	0	0.01

Tabla 4 Abundancia relativa (expresada en %) de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* utilizando secuenciación al azar de clones de cDNA y qPCR con sondas TaqMan

3.2 Cuantificación de los niveles de expresión de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en el mutante *rif35*

Una vez puesto a punto el protocolo de cuantificación de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* mediante qPCR utilizando sondas TaqMan se procedió al análisis de los niveles de expresión de dichos transcritos en plántulas de 15 días del mutante *rif35*, y así poder evaluar los niveles de expresión de los diversos transcritos del gen en relación con la resistencia a FSM en dicho mutante. Los análisis se llevaron a cabo con 2 réplicas biológicas y 3 réplicas experimentales.

Como era de esperar, la activación de la expresión del locus At1g73470 debida a la inserción del T-DNA *rif35a* resultó en un aumento en el nivel de los tres transcritos (Figura 23). En el caso de los transcritos *RIF35.1* y *RIF35.2* dicho aumento fue de aproximadamente 15 veces en relación con las plantas wt. En el caso *RIF35.3* dicho aumento relativo fue 7 veces.

Es interesante mencionar que este aumento lleva el mismo patrón de expresión que los reflejados por el wt en los experimentos de clonación y secuenciación de clones de cDNA al azar y el de qPCR con sondas TaqMan realizados en el contexto de los estudios de validación de las variantes de splicing mostrados en el apartado 2 y la puesta a punto del protocolo de qPCR con sondas TaqMan del apartado 3.1.2.4, respectivamente. Siendo el transcrito *RIF35.1* el de mayor expresión, seguido del *RIF35.2* y por último el *RIF35.3*.

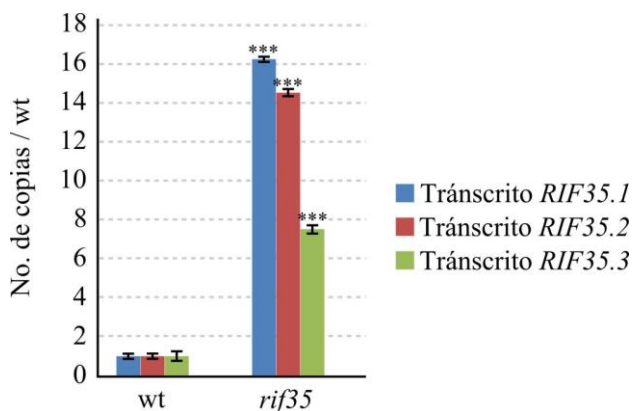


Figura 23 Cuantificación del número de copias de cada variante de splicing del locus At1g73470, en el mutante *rif35* con respecto a su parental Col0, en plántulas de 15 días crecidas en condiciones de día largo. Análisis mediante qPCR con sondas TaqMan

3.3 Estudio de los niveles de expresión de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* durante el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*

El hecho de disponer de una técnica validada para la cuantificación de los transcritos del gen *RIF35* (apartado 3.1.2) permitió estudiar el patrón de expresión de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* durante el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*, hasta ahora desconocidos. Para ello se emplearon muestras de RNA de plántulas, raíces de plántulas de 15 días, hojas de plantas de 30 días y flores, tallos y silicuas de plantas de 45 días, siempre crecidas en condiciones de día largo. Se utilizaron 2 réplicas biológicas con 3 réplicas experimentales. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24.

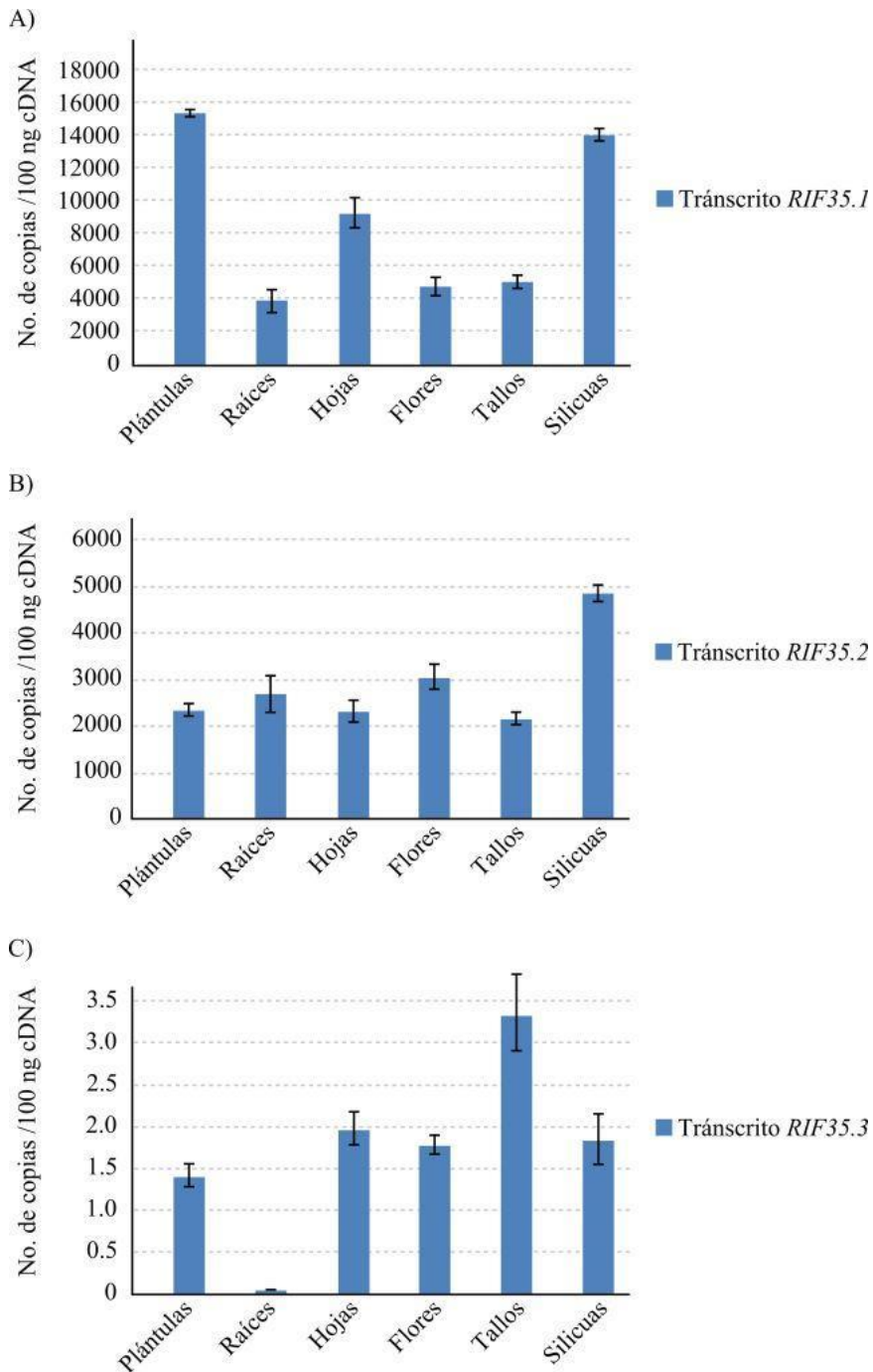


Figura 24 Cuantificación del número de copias de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en diversos tejidos y estadios de desarrollo de plantas de *Arabidopsis* (ecotipo Col0) crecidas en condiciones de día largo. Plántulas de 15 días, raíces de plántulas de 15 días, hojas de plantas de 30 días y flores, tallo y silicuas de plantas de 45 días.

Se puede observar que el transcrito *RIF35.1* es siempre el más abundante en todos los tejidos y que *RIF35.3* se detecta a niveles muy bajos. El transcrito *RIF35.2* muestra unos niveles de abundancia intermedios. Si bien en las plántulas los niveles de transcrito *RIF35.2* representan el 15% de los de *RIF35.1*, esta relación es considerablemente mayor en otros tejidos de la planta. Así, en las muestras de plántulas, hojas, tallos y silicuas esta relación es del orden del 40% y en el caso de raíces y flores llega a representar el 69% y el 64% respectivamente. Estos resultados que indican que en ciertos tejidos los transcritos *RIF35.1* y *RIF35.2* están presentes en niveles relativamente similares. El transcrito *RIF35.3* presenta siempre un número de copias muy inferior a *RIF35.1* y *RIF35.2*. Es de destacar, no obstante, que los niveles del transcrito *RIF35.3* presenta valores muy dispares en los diferentes tejidos de la planta, siendo relativamente elevado en tallo y prácticamente indetectable en raíces.

4 Caracterización de las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3

4.1 Análisis in silico de las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3

Las proteínas codificadas por los mRNAs correspondientes a las variantes de splicing *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* se denominaron RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3 se muestran alineadas en la figura 25. Las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3 tienen 351, 248 y 357 aminoácidos y pesos molecular aparentes de 38,8, 27,5 y 39,5 kDa respectivamente. Mientras que RIF35.1 y RIF35.3 difieren únicamente en una secuencia adicional de 6 aminoácidos presente en la región C-terminal de RIF35.3, la proteína RIF35.2 es considerablemente más corta en su extremo N-terminal debido a que el codón de inicio de traducción se encuentra localizado en el tercer intrón (Figura 25). Es por ello que las proteínas maduras de RIF35.1 y RIF35.3 cuentan con 45 aminoácidos adicionales a la proteína RIF35.2 en la región N-terminal. A partir del residuo de metionina codificado por el codón de inicio de traducción del

tránsito *RIF35.2* la proteína *RIF35.2* es idéntica a la parte correspondiente de *RIF35.1* (Figura 25).

La información disponible en la base de datos TAIR indica que las proteínas *RIF35.1* y *RIF35.3* estarían localizadas en los plastos. El péptido de tránsito predicho en dichas proteínas se indica en la figura 25. En consecuencia, la longitud de las proteínas *RIF35.1* y *RIF35.3* una vez importadas al cloroplasto sería de 293 y 299 aminoácidos respectivamente.

```

35.1 1 MTSVSVAVVAPPHRCPFSSHLNLNKLSLQIPRTGWRRKQLGFALASTAAASESPSEATYDP
35.2 1 -----
35.3 1 MTSVSVAVVAPPHRCPFSSHLNLNKLSLQIPRTGWRRKQLGFALASTAAASESPSEATYDP

35.1 61 ELRLVFE LATDSELYELEKILFGPSYFSPLLKSI PNKGGGDRLMIGQDIEVRDGFIEALE
35.2 1 -----MIGQDIEVRDGFIEALE
35.3 61 ELRLVFE LATDSELYELEKILFGPSYFSPLLKSI PNKGGGDRLMIGQDIEVRDGFIEALE

35.1 121 SRFLFLAADARSTLRGWRPSYRNVLLAVRNNLNIPCSSLPTEDLEAEIFLYLVDNFSSE
35.2 18 SRFLFLAADARSTLRGWRPSYRNVLLAVRNNLNIPCSSLPTEDLEAEIFLYLVDNFSSE
35.3 121 SRFLFLAADARSTLRGWRPSYRNVLLAVRNNLNIPCSSLPTEDLEAEIFLYLVDNFSSE

35.1 181 ASGVFPGMWENSEVSEAEGSLELGLSKWKVELLAAALQVGATEVQSMILKGGGMITFAKVV
35.2 78 ASGVFPGMWENSEVSEAEGSLELGLSKWKVELLAAALQVGATEVQSMILKGGGMITFAKVV
35.3 181 ASGVFPGMWENSEVSEAEGSLELGLSKWKVELLAAALQVGATEVQSMILKGGGMITFAKVV

35.1 241 QLLAKKLSGKVFLEAANYQIRKEMLKKGGQFAAINLESRAALLAAKHGFAGAASRYIGLK
35.2 138 QLLAKKLSGKVFLEAANYQIRKEMLKKGGQFAAINLESRAALLAAKHGFAGAASRYIGLK
35.3 241 QLLAKKLSGKVFLEAANYQIRKEMLKKGGQFAAINLESRAALLAAKHGFAGAASRYIGLK

35.1 301 TAMQLLGPMMWGTL LADLVIQMLETDYARILRAIYAFQ-----IRITRTRYLPCK
35.2 198 TAMQLLGPMMWGTL LADLVIQMLETDYARILRAIYAFQ-----IRITRTRYLPCK
35.3 301 TAMQLLGPMMWGTL LADLVIQMLETDYARILRAIYAFQDCFVLQIRITRTRYLPCK
    
```

Figura 25 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*. Los residuos de las cajas negras son idénticos en las 3 proteínas. El sombreado amarillo corresponde con el péptido de tránsito plastídico predicho para las proteínas *RIF35.1*, *RIF35.3*. En verde se indica la secuencia adicional presente en *RIF35.3*

La función de las proteínas *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* es aún desconocida. Para obtener más información sobre estas proteínas que aportara algún indicio sobre su posible función se llevó a cabo un análisis bioinformático de las mismas

Las proteínas *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* no presentan similitud con ninguna otra proteína codificada en el genoma de *Arabidopsis*. Una búsqueda

mediante BLAST-P utilizando la proteína RIF35.1 como referencia identificó la presencia de proteínas ortólogas en diferentes familias de plantas. Dichas proteínas muestran la presencia de 3 zonas o bloques de dominios altamente conservados, así como una región altamente variable en el extremo N-terminal, que correspondería al péptido de tránsito a plastos (Figura 26).

Las proteínas ortólogas identificadas en otras plantas muestran una identidad del 55 al 89 % y una similitud entre un 72 y 96 % con RIF35.1 (Tabla 5). El análisis filogenético de estas proteínas se muestra en la figura 27.

Proteína	Identidad (%)	Similitud (%)
RIF35.1	100	100
<i>Brassica napus</i>	89.83	96.61
<i>Citrus clementina</i>	75.68	86.3
<i>Theobroma cacao</i>	73.04	87.71
<i>Fragaria vesca</i>	73.54	86.25
<i>Gossypium arboreum</i>	74.74	86.51
<i>Vitis vinifera</i>	71.58	84.59
<i>Malus domestica</i>	71.82	86.94
<i>Populus trichocarpa</i>	70.99	83.96
<i>Ricinus communis</i>	71.48	83.16
<i>Cucumis melo</i>	68.94	81.23
<i>Phaseolus vulgaris</i>	66.33	79.59
<i>Citrus sinensis</i>	76.11	87.45
<i>Glycine max</i>	64.31	76.43
<i>Solanum lycopersicum</i>	65.4	79.24
<i>Oryza sativa Japonica</i>	60.07	74.91
<i>Zea mays</i>	55.75	72.82
<i>Picea sitchensis</i>	54.98	73.2

Tabla 5 Porcentaje de identidad y similitud entre RIF35.1 y sus proteínas ortólogas en otras plantas

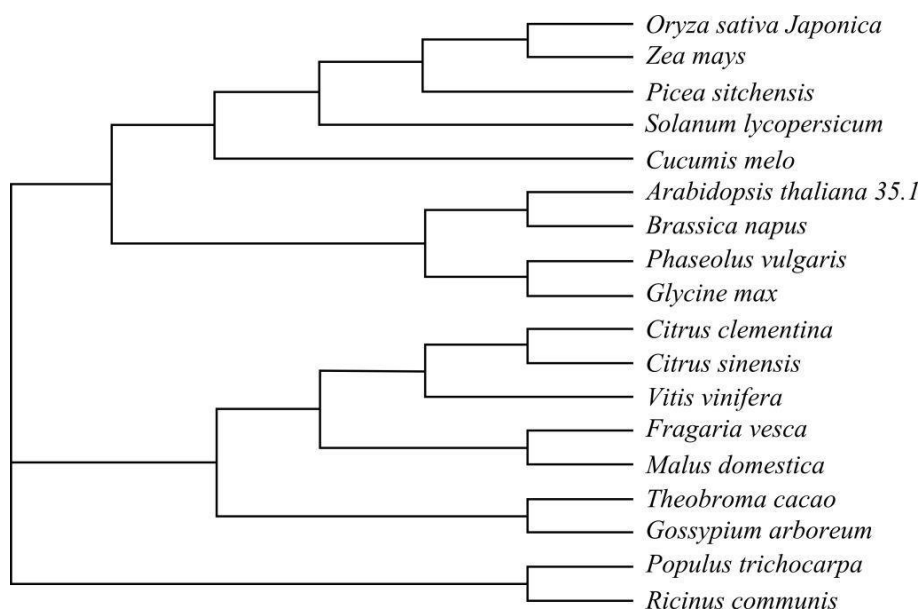


Figura 27 Árbol filogenético realizado con la variante proteica RIF35.1 y las 18 proteínas ortólogas empleadas en el alineamiento de la figura 26

Los alineamientos de las proteínas RIF35.2 y RIF35.3 con las proteínas depositadas en la base de datos GenBank han identificado la presencia de ortólogos de RIF35.2 en *Nicotiana tomentosiformis* y *Nicotiana sylvestris*, mientras que en el caso de la proteína RIF35.3 no se ha encontrado aún ninguna proteína equivalente.

Los resultados del programa de predicción de estructuras PsiPred indicaron que la estructura secundaria de las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3 estaría formada básicamente por hélices- α , la de mayor longitud estando formada por 92 aminoácidos y localizada en el extremo C-terminal de dichas proteínas. Curiosamente, excepto en la proteína RIF35.3 no se predice ninguna hoja beta.

En la figura 28 se muestra el alineamiento de las estructuras secundarias de las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3. La única diferencia a resaltar sería la existencia de una pequeña hoja- β en el extremo C-terminal de RIF35.3 que implicaría a la secuencia de 6 aminoácidos específica de dicha variante. Dichas

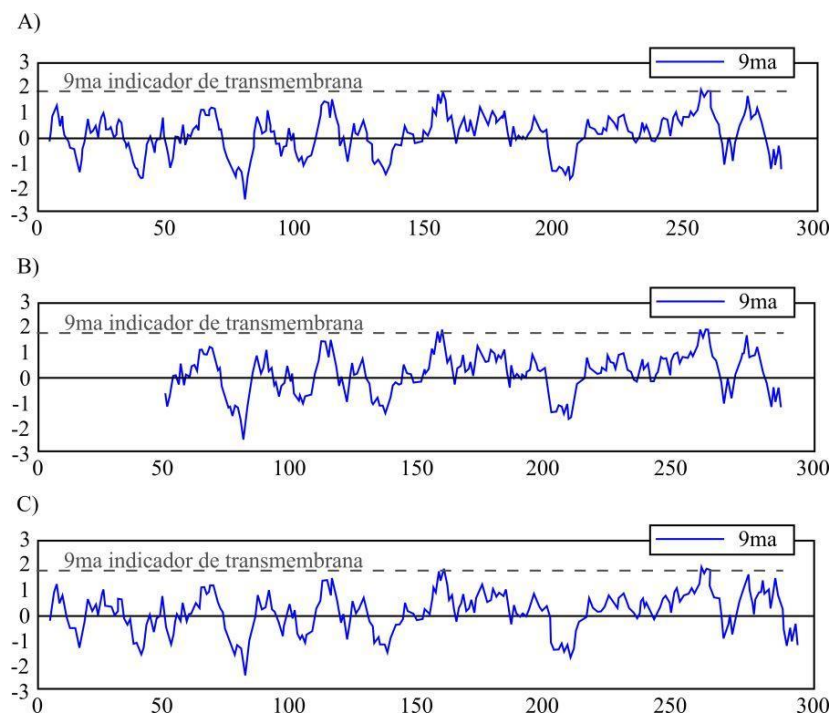


Figura 29 Perfil hidropático de las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3 predicho por el programa ExPASy ProtScale. A) RIF35.1. B) RIF35.2. C) RIF35.3

RIF35.2 fue variable en función del programa utilizado, siendo indefinida en muchos de los casos.

En primera instancia se procedió a confirmar la localización plástica de RIF35.1 y RIF35.3 mediante expresión transitoria (microbombardeo con partículas) en células epidérmicas de hojas de *Arabidopsis* de una proteína quimérica que contenía el péptido de tránsito predicho para dichas proteínas (58 aminoácidos) (denominado TP35.1/3, ya que en realidad es el mismo para las dos proteínas) fusionado al extremo N-terminal de la *Green Fluorescent Protein* (eGFP) (Figura 30). Dicha proteína se expresó bajo el control del promotor CaMV 35S. El patrón de localización subcelular determinado mediante microscopía láser confocal mostró la presencia de la proteína TP35.1/3: GFP en los cloroplastos (Figura 31)

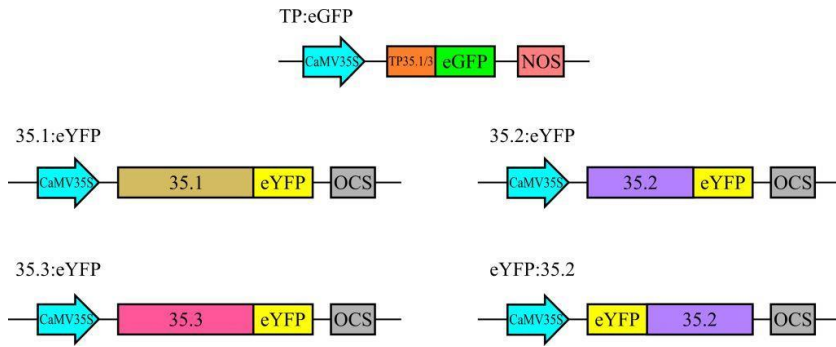


Figura 30 Esquema de las construcciones utilizadas en el estudio de localización subcelular de las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3. En las construcciones fusionadas con eYFP se utilizó la región codificante de cada variante, mientras que en la construcción con eGFP solo se fusionó la región predicha como péptido de tránsito a plastos en RIF35.1 y RIF35.3

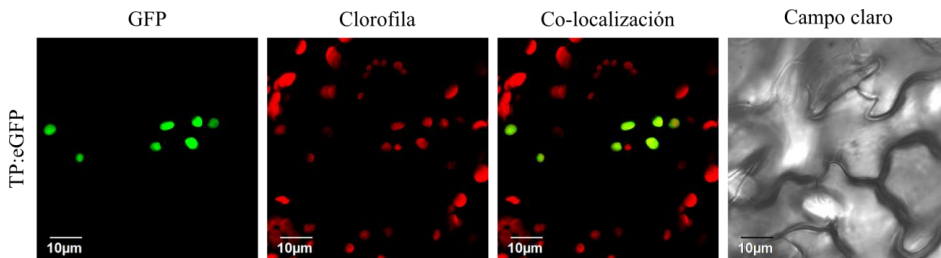


Figura 31 Localización subcelular de la proteína TP35.1/3:eGFP mediante microbombardeo de células epidérmicas de hoja de *Arabidopsis*

Para estudiar con detalle la localización de las tres proteínas por separado se procedió a fusionar la región codificante de los cDNAs correspondientes a las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3 con la región codificante de la *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) para expresar dichas proteínas quiméricas bajo el control del promotor CaMV35S. Para ello, la región codificante de cada una de las proteínas se amplificó mediante PCR sin el codón de parada y se clonaron en el vector pEarlyGate101 (CD3-683) que permite la fusión de la YFP en posición C-terminal. Para la variante RIF35.2 se generó una segunda construcción en el vector pEarlyGate104 (CD3-686) que permite la fusión de la YFP en posición N-terminal (Figura 30). Las construcciones obtenidas permitieron la expresión transitoria de dichas proteínas en hojas de

Nicotiana benthamiana mediante la técnica de agroinfiltración. La distribución intracelular de la fluorescencia se observó mediante microscopía láser confocal.

Los resultados obtenidos revelaron que las proteínas 35.1:eYFP y 35.3:eYFP se localizan en los cloroplastos pero con un patrón punteado (Figura 32). Se desconoce con detalle el compartimento suborganelar en el que se acumulan las proteínas 35.1:eYFP y 35.3:eYFP. En cualquier caso, los resultados indican que la secuencia madura de las proteínas RIF35.1 y RIF35.3 contiene alguna señal para redirigir dichas proteínas a lugares concretos tras ser trasladadas a los cloroplastos.

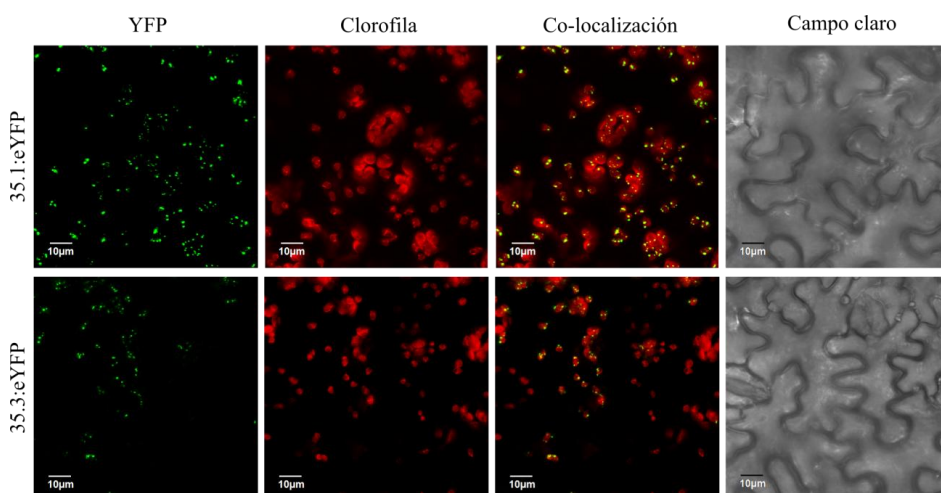


Figura 32 Localización subcelular de las proteínas RIF35.1 y RIF35.3 en células epidérmicas de hojas de *Nicotiana*

Para la variante RIF35.2 solo se observó fluorescencia en la versión eYFP:35.2. Dicha fluorescencia se observó en forma de un patrón punteado que no colocalizaba con los cloroplastos. Estudios posteriores utilizando distinto marcadores subcelulares mostraron que la proteína eYFP:35.2 se localiza en los peroxisomas (Figura 33)

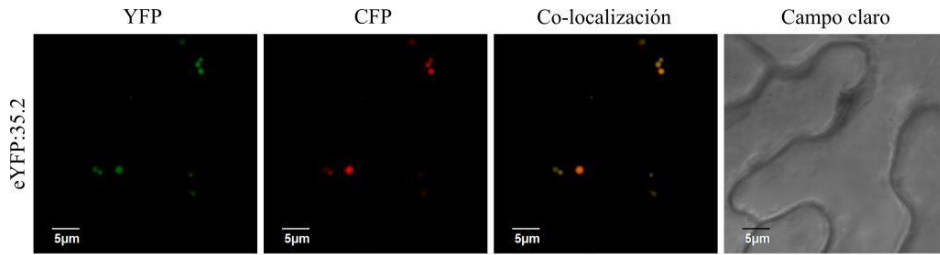


Figura 33 Localización subcelular de la variante proteica RIF35.2 fusionada en la región N-terminal y co-infectada con el marcador eCFP-peroxisomas, en células epidérmicas de hojas de *Nicotiana*

Las proteínas dirigidas a los peroxisomas lo pueden hacer por dos vías que utilizan señales PTS (Peroxisomal-Targeting Sequences) distintas. Una de ellas utiliza una secuencia de 9 aminoácidos localizada en el extremo N-terminal (denominada PTS2) y que no estaría implicada en este caso. La otra vía de importación utiliza un tripéptido presente en el extremo C-terminal (denominado PTS1), siendo ésta la más común. Las secuencias PTS1 y PTS2 son reconocidas por receptores diferentes y después se transfieren a un complejo de traslocación que media su transporte a través de la membrana del peroxisoma.

En la actualidad se conocen varias dianas PTS1 en el proteoma de *Arabidopsis*, que dirigen las proteínas a los peroxisomas, no obstante el tripéptido del extremo C-terminal de la variante RIF35.2 (PCK) no coincide con ninguna de las dianas descritas hasta el momento.

5 Caracterización del mutante defectivo en el gen *At1g73470*

Con el fin de obtener información sobre la función de las proteínas codificadas por el gen *RIF35* se procedió a la caracterización del mutante SAIL_615_E08, que contiene un T-DNA insertado en el exón número 5 de las variantes de splicing 1 y 3 y que corresponde con el exón número 4 de la variante 2 (Figura 34). Asumiendo que dicho mutante estaría afectado en la funcionalidad del gen *RIF35* se le denominó KO35.

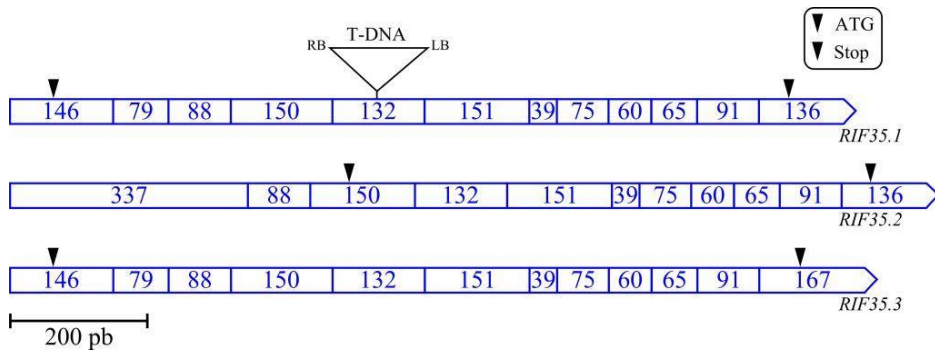


Figura 34 Esquema de la posición del T-DNA presente en el mutante KO35. De forma adicional se detallan los exones y su tamaño (en pb). Los codones de inicio y parada de la traducción están representados con un triángulo

Tal como se describe en el apartado 4.1, las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3 no presentan una homología significativa con ninguna otra proteína codificada en el genoma de Arabidopsis, de manera que podría tratarse de la única proteína de la planta capaz de realizar una determinada función a nivel molecular. Además, también se ha comprobado que como mínimo existen ortólogos de las proteínas RIF35.1 y RIF35.2 en diferentes especies de plantas con genomas secuenciados, entre las cuales encontramos tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Este hecho sugiere que dichas proteínas desarrollarían una función importante en todas las plantas. Teniendo en cuenta estas dos premisas, se esperaría que la ausencia de función de estas proteínas debiera provocar la aparición de un fenotipo característico. No obstante, los resultados mostrados en la figura 35 indican que el mutante KO35, homocigoto para la inserción del T-DNA, no muestra ningún defecto en su crecimiento o desarrollo. Más bien al contrario, llama la atención el hecho que el mutante KO35 muestra un desarrollo mayor que las plantas de las correspondientes plantas silvestres de Col0.



Figura 35 Fenotipo del mutante KO35 en comparación con la variedad wt (Col0) y *rif35*, en condiciones de día largo. En la parte superior se muestra el crecimiento en medio MS0.5 a los 15 días. En la parte inferior se muestran plantas de 30 días crecidas en tierra en condiciones de día largo

Estas observaciones sugirieron que el gen *RIF35* podría estar expresándose de alguna forma en el mutante KO35, hecho que había descrito con anterioridad durante el genotipado de dicho mutante (Perez-Massot, 2009). Por este motivo, se procedió a estudiar con detalle la expresión de posibles transcritos derivados del gen *RIF35* en el mutante KO35 mediante RT-PCR. Para ello se diseñó un conjunto de primers que permitían amplificar tanto el transcrito entero como las regiones correspondientes a 5' y 3' relativas al lugar de inserción del T-DNA (Figura 36).

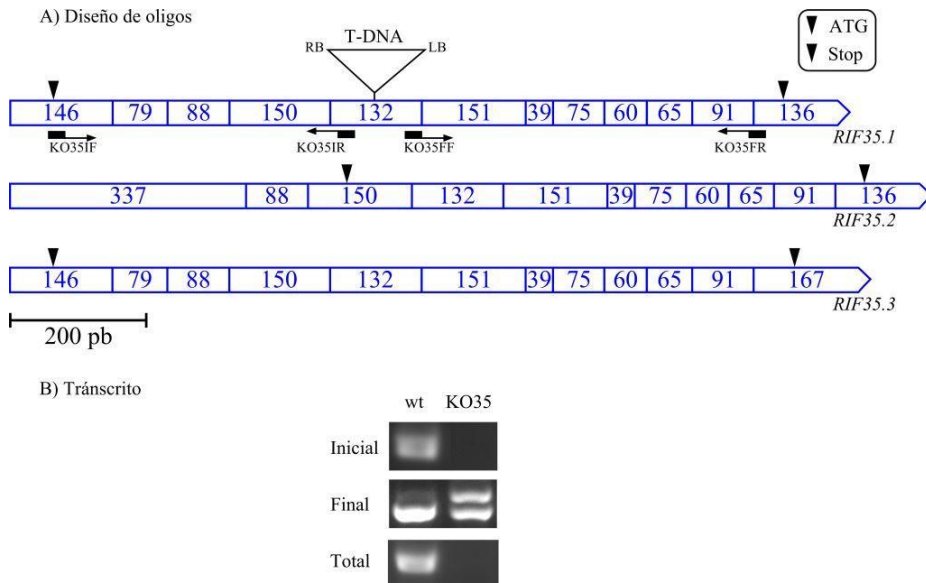


Figura 36 Estudio de la expresión del mRNA del gen *RIF35* en el mutante *KO35* A) Representación esquemática de la posición del T-DNA y los oligonucleótidos diseñados (no dibujados a escala) para amplificar las secuencias específicas del transcrito: Parte inicial (KO35IF y KO35IR), total (KO35IF y KO35FR) y parte final (KO35FF y KO35FR). Adicional en la figura se detallan los exones y su tamaño (en pb). La ubicación del codón de inicio de traducción y del codón de stop está representada por un triángulo. B) Análisis de los productos de RT-PCR obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa

Los resultados obtenidos utilizando muestras de RNA total obtenidas del mutante *KO35* y de las correspondientes plantas *wt* indican la presencia de dos productos de amplificación en el mutante *KO35* cuando se utilizaron los primers *KO35FF* y *KO35FR*, diseñados para amplificar la región 3' del mRNA, uno de los productos corresponde con el esperado en *wt* ≈ 530 pb y el otro de tamaño superior de unos ≈ 600 pb (Figura36).

Para asegurar que no se trataba de un artefacto, y que los productos de PCR amplificados en el mutante *KO35* correspondían a fragmentos de transcritos del gen *RIF35*, se procedió a su aislamiento y secuenciación en paralelo con el fragmento obtenido a partir de las plantas *wt*. Los resultados de la secuenciación revelaron que la banda inferior de las muestras *KO35* y la banda *wt* correspondían al fragmento de transcrito amplificado por los primers *KO35FF* y *KO35FR* y que, sorprendentemente, la banda de tamaño superior en

el mutante KO35 contenía este fragmento final de transcrito con el séptimo intrón del gen insertado en su secuencia quedando el mRNA como se muestra en la Figura 377. Aunque predicho en la base de datos TAIR, dicho intrón no había sido detectado en ninguna de las variantes de splicing del gen *RIF35* identificadas anteriormente.

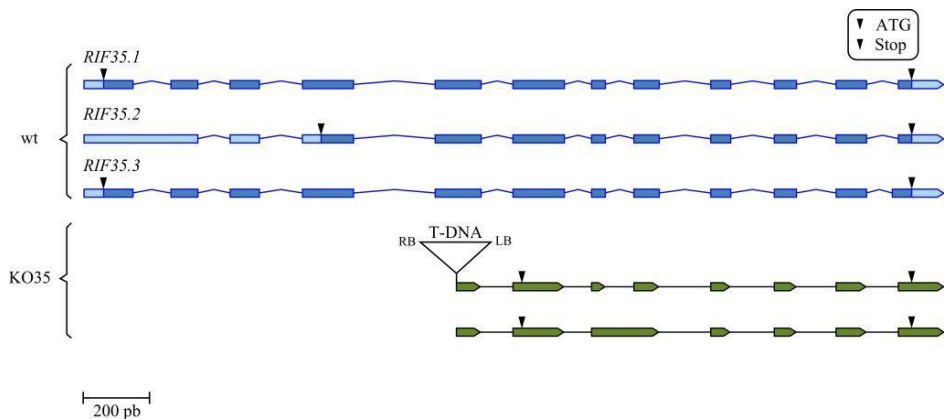


Figura 37 Comparativa de las secuencias de cDNA encontradas en el mutante KO35 con respecto al tipo silvestre. En la parte superior se muestra una representación esquemática de los diferentes transcritos para el gen *RIF35* (en azul). En la parte inferior se identifican (en verde) las dos secuencias que se expresan en el mutante KO35. La ubicación de los codones de inicio y parada de la traducción está representada con un triángulo

En vista de estos resultados se estudió la posibilidad de que la expresión de estos transcritos pudiera venir dada por algún elemento situado en el T-DNA, de manera que se buscaron posibles secuencias promotoras en la región del “left border” del mismo. Se detectó una secuencia homóloga a la secuencia de unión al factor de transcripción OCSTF, situada aproximadamente a 500 bp del punto de inserción del T-DNA y en el sentido apropiado para dirigir la expresión de un transcrito que incluya la parte final del gen.

A pesar de que el fragmento del gen *RIF35* situado “downstream” del T-DNA es transcrito a mRNA, hay diversos factores que hacen improbable la traducción de este mRNA a proteína. En primer lugar, todos los codones de inicio de la traducción (ATG) situados en la parte correspondiente al T-DNA se encuentran en fase con codones de parada que detendría la traducción antes de

alcanzar a la región genómica. Por tanto, la traducción debería comenzar en la primera metionina (Met188) en la región correspondiente a RIF35. Hay que tener en cuenta que este codón de iniciación carecería de los lugares de unión al ribosoma (RBS) y la secuencia consenso Kozac, dos elementos relevantes para el inicio de la traducción.

Si aún así se pudiera llevar a cabo la traducción de dicho transcrito el resultado sería una proteína carente de 129 aminoácidos de la parte N-terminal en relación con la proteína madura RIF35.1 y RIF35.3 y, además, no podría ser transportada al cloroplasto, por lo que podría ser transportada posiblemente a los peroxisomas, como es el caso de la variante RIF35.2 descrita en el apartado 4.2. La proteína resultante tendría 164 aminoácidos (sin incluir los 28 aminoácidos adicionales en el caso de la variante que incluye la secuencia intrónica adicional) y no contendría dos de los dominios altamente conservados de las proteínas RIF35.

Tal como se evidencia en los resultados mostrados en la figura 38 el mutante KO35 no muestra resistencia a la FSM. Estos resultados sugieren que la proteína RIF35 no es funcionalmente activa y, consecuentemente, debería ser considerado como un mutante de pérdida de función del gen *RIF35*.

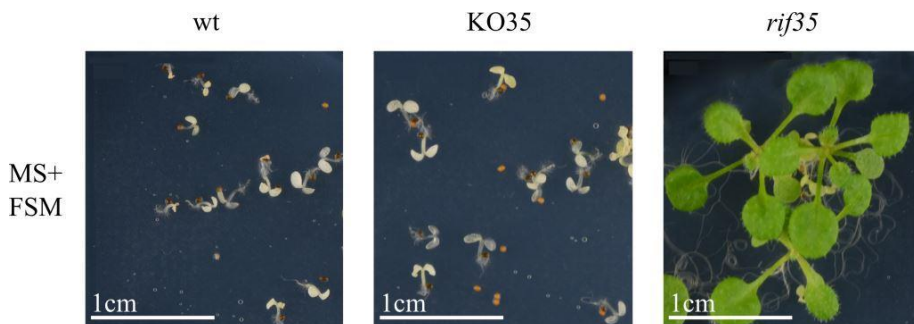


Figura 38 Ensayo de resistencia a la FSM del mutante KO35 (plántulas de 15 días crecidas en condiciones de día largo). Como control negativo se utilizaron plantas wt (Col0) y como control positivo el mutante *rif35*

6 Generación y caracterización de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan las variantes de splicing *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*

6.1 Generación de las plantas transgénicas que sobreexpresan de forma individual las variantes del locus *At1g73470*

Con el fin de estudiar la función de las proteínas *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en relación al fenotipo de resistencia a la FSM mostrado por el mutante *rif35*, se procedió a generar plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaran de forma individualizada los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*.

Dichas plantas transgénicas se generaron mediante la clonación de la región codificante de los cDNAs correspondientes a cada variante de splicing, en el vector pENTR/D-TOPO, creando tres clones diferentes denominados pENTR/D-TOPO-35.1, pENTR/D-TOPO-35.2 y pENTR/D-TOPO-35.3, los cDNAs se generaron a partir de reacciones de PCR con primers especiales (Tabla 7, sección de Gateway Topo). Posteriormente cada uno de estos clones fueron recombinados con el vector pEarlyGate 100 35S-Gateway-OCS 3' (CD3-724), siguiendo los métodos de clonación y recombinación de GATEWAY. En los vectores de expresión generados la expresión está dirigida por el promotor constitutivo CaMV35S y contienen también el terminador OCS (del gen de octopina sintasa de *Agrobacterium*). Los vectores de expresión obtenidos se denominaron p35S:*RIF35.1*, p35S:*RIF35.2* y p35S:*RIF35.3* (Figura 39).

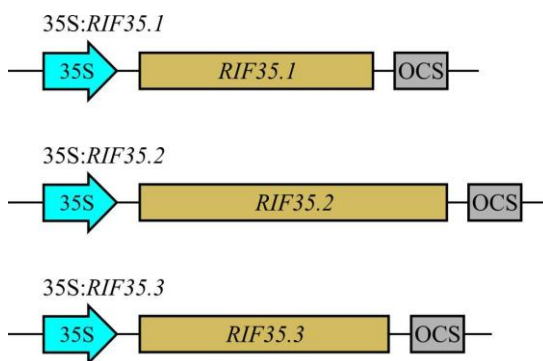


Figura 39 Estructura de las construcciones utilizadas en la creación de las transgénicas sobreexpresoras para el estudio de las variante de splicing del locus At1g73470

Estas construcciones se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 y se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis Col0* según se describe en la sección 4.2.1 de Materiales y Métodos. Para la obtención de líneas homocigotas para los distintos transgenes se utilizó la resistencia al herbicida BASTA que confiere el gen BAR incluido en el T-DNA. Las semillas obtenidas de las planta transformadas T0 fueron sembradas en su totalidad en tiestos, en paralelo con plantas wt y plantas control resistentes a BASTA (indicar). La primera fumigación con BASTA al 0.0004 % se realizó cuando las plántulas tuvieron el primer par de hojas verdaderas desarrolladas. Posteriormente se realizó una segunda fumigación a los 5 días después de la primera y una tercera transcurridos 5 días de la segunda. La segunda y tercera aplicación tuvieron como objetivo descartar falsos positivos.

Las plántulas T1 resistentes a BASTA fueron trasplantadas a tiestos individuales para completar su ciclo. Estas semillas fueron sembradas en tiestos, donde fueron sometidas de nuevo al proceso de selección con BASTA antes mencionado.

La generación T2 obtenida se analizó para determinar el número de copias de T-DNA que se incorporaron al genoma. Para ellos se estudió el carácter de resistencia al marcador de selección. Las líneas que segregaron en proporción mendeliana 1:3, en donde 1 es las proporción sensible y 3 la

resistente; se escogieron ya que representan un único locus para el transgén en el genoma de la planta. De cada línea se escogieron 10 individuos, que fueron trasplantados a tiestos individuales para completar su ciclo y obtener sus semillas. Para seleccionar las líneas homocigotas se confirmó que todas las semillas descendientes (T3) eran resistentes al marcador de selección.

6.2 Fenotipo de resistencia de las líneas sobreexpresoras

6.2.1 Estudio del nivel de resistencia a la FSM de las líneas transgénicas diseñadas para la sobreexpresión de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*

El primer aspecto que se abordó para la caracterización de las líneas transgénicas generadas y portadoras de las construcciones p35S:*RIF35.1*, p35S:*RIF35.2* y p35S:*RIF35.3* fue el estudio de su nivel de resistencia a la FSM. De forma adicional se quiso evaluar los efectos de la sacarosa sobre la resistencia a la FSM, ya que está descrito que este azúcar actúa como potenciador de la misma (Flores-Perez, et al. 2010). Es por ello que en primera instancia los ensayos se realizaron en medio MS 0,5 suplementado con sacarosa.

En la figura 40 se puede apreciar claramente que todas las líneas transgénicas muestran niveles de resistencia a la FSM superiores a los niveles basales mostrados por las plantas wt. Sorprendentemente el nivel de resistencia de las plantas transgénicas fue en todos los casos considerablemente inferior al del mutante *rif35*.

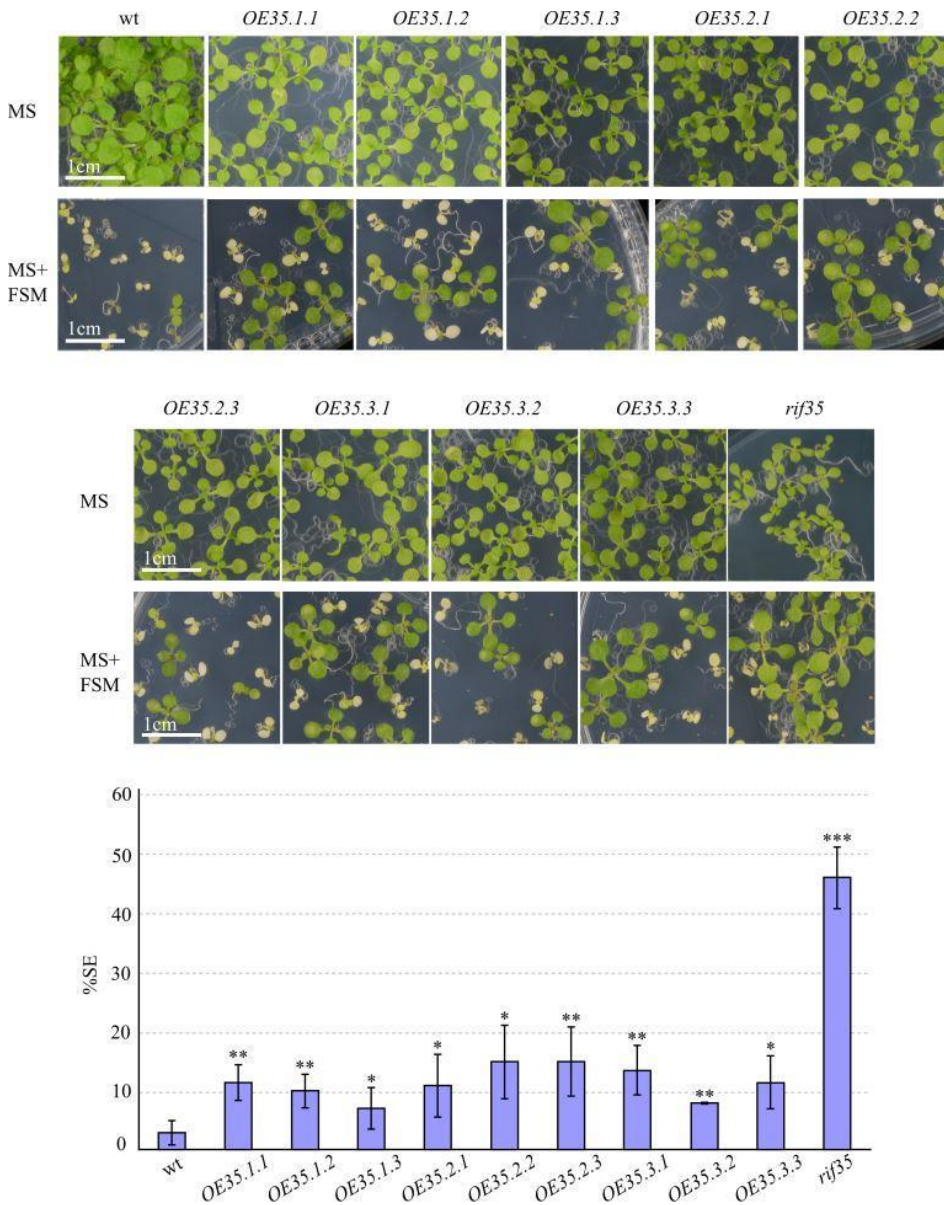


Figura 40 Cuantificación de la resistencia a la FSM (50µM) de las plantas transgénicas homocigotas sobreexpresoras de las diferentes variantes de splicings. Parte superior: plantas crecidas en MS0.5 suplementado con sacarosa en condiciones de día largo en ausencia y presencia de FSM 50 µM. Parte inferior: la resistencia se estimó con poblaciones de más de 50 individuos utilizando el porcentaje de “seedlings establishment” (% SE) a los 15 días de desarrollo

Las líneas transgénicas portadoras de la construcción p35S:RIF35.1 (*OE35.1.1*, *OE35.1.2* y *OE35.1.3*) mostraron una resistencia poblacional bastante similar y los mismo ocurrió con las líneas de la transgénicas portadoras

de la construcción p35S:RIF35.2 (*OE35.2.1*, *OE35.2.2* y *OE35.2.3*). Este no fue el caso en las líneas transgénicas correspondientes a la construcción p35S:RIF35.3, donde la línea *OE35.3.2* muestra una resistencia mucho menor que las líneas *OE35.3.1* y *OE35.3.3*.

Para seleccionar las líneas con las que realizar el resto de ensayos se consideraron aquellas que tuvieran un valor medio de resistencia mayor y más significativo. Es por ello que se decidió continuar con las líneas *OE35.1.1*, *OE35.2.2* y la *OE35.3.1*, las cuales, y para simplificar, se pasaron a denominar *OE35.1*, *OE35.2* y *OE35.3* respectivamente. La línea *OE35.2.2* se consideró más adecuada que la línea *OE35.2.3* por tener mayor vigor en el desarrollo.

Una vez seleccionadas las líneas *OE35.1*, *OE35.2* y *OE35.3* se procedió a la evaluación de su resistencia a la FSM (50 μ M) en un medio sin sacarosa. Los resultados obtenidos mostraron una gran diferencia en relación con los obtenidos anteriormente en presencia de sacarosa (Figura 41). Las plantas transgénicas *OE35.1* y *OE35.3* mostraron valores de resistencia extraordinariamente bajos, con porcentajes de SE de tan solo 1.5-2 %. Curiosamente las plantas transgénicas *OE35.2* mostraron valores SE próximos al 7%. Cabe resaltar que en estas condiciones de ensayo el mutante *rif35* muestra valores de SE del orden del 25%. Es importante resaltar que la disminución relativa del porcentaje de SE del mutante *rif35* en ausencia de sacarosa es similar al observado para la línea *OE35.2*, unas dos veces aproximadamente. Estos resultados inducen a pensar que la proteína codificada por la variante de splicing *RIF35.2* es la que desempeñaría un papel más relevante en la adquisición de la resistencia a la FSM en el mutante *rif35*.

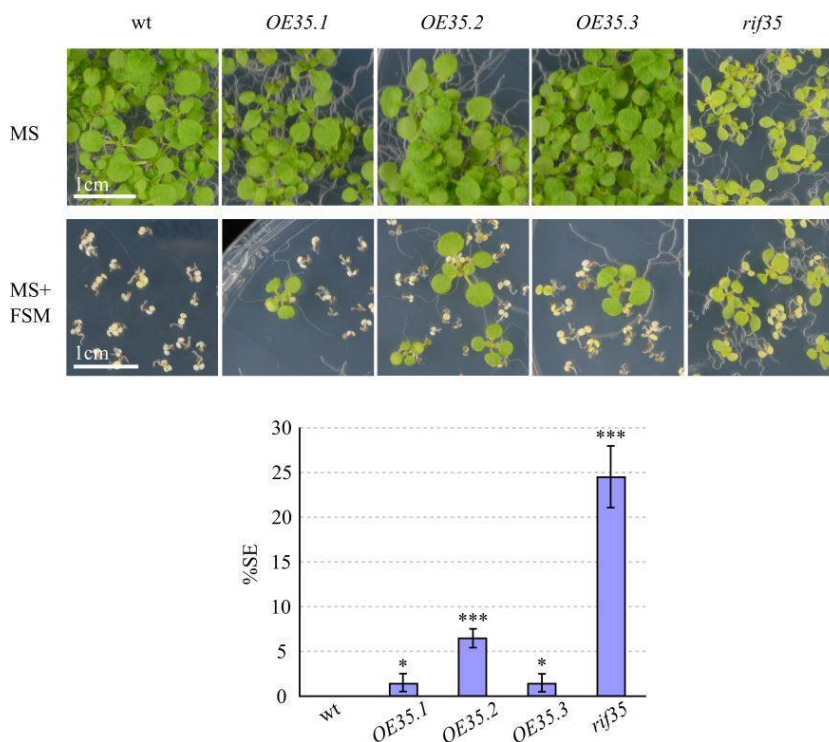


Figura 41 Estudio de la cuantificación de la resistencia a la FSM 50 μ M de las plantas transgénicas de las diferentes variantes de splicings. Plantas crecidas en MS0.5 en condiciones de día largo. La resistencia se estimó con poblaciones de más de 50 individuos utilizando el porcentaje de seedlings establishment (% SE) a los 15 días de desarrollo

6.2.2 Estudio del nivel de resistencia a CLM de las líneas transgénicas *OE35.1*, *OE35.2* y *OE35.3*

Como se ha indicado anteriormente, la resistencia a la FSM puede venir dada por diferentes causas, la más evidente sería un incremento en la actividad DXR. Alternativamente, también podría tratarse de una inducción de la enzima DXS o bien una activación generalizada de toda la ruta del MEP. En ambos casos, las plantas deberían ser también resistentes a la inhibición por la CLM, un inhibidor específico de la enzima DXS. Es por este motivo que se estudió si alguna de las líneas transgénicas seleccionadas presentaba de forma adicional resistencia a la CLM. Para ello se realizaron ensayos en medio MS 0.5 suplementado con CLM 6 μ M. Como se muestra en la figura 42 las tres líneas transgénicas mostraron ser sensibles a la CLM.

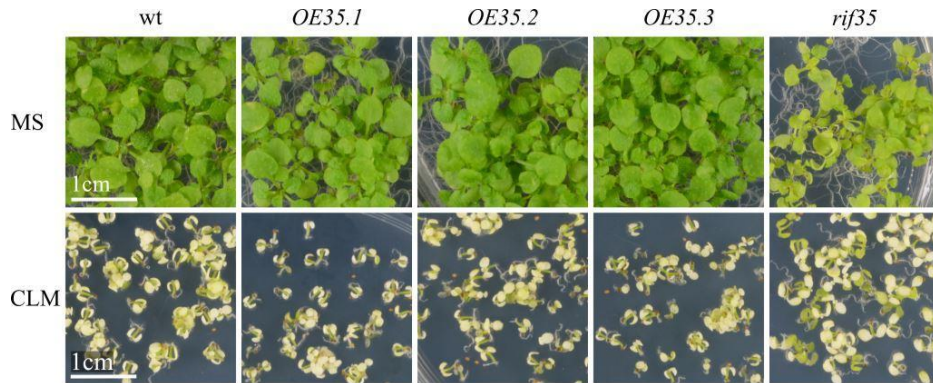


Figura 42 Ensayo de resistencia a la CLM de las plantas transgénicas *OE35.1*, *35.2* y *35.3*. La plantas fueron crecidas en medio MS0.5 suplementado con CLM 6 μ M en condiciones de día largo.

6.3 Estudio de los niveles de expresión del transgén en las transgénicas *OE35.1*, *OE35.2* y *OE35.3*

Para evaluar la expresión de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en las plantas transgénicas homocigotas *OE35.1*, *OE35.2* y *OE35.3* se tomaron muestras de plántulas de 15 días desarrolladas en condiciones de día largo, que fueron analizadas por medio de qPCR con las sondas TaqMan descritas en el apartado 3.1.1.

Se esperaba que los niveles de expresión de los mRNAs correspondientes en cada línea transgénica fuera mayor respecto a los del wt. Así pues, para las plantas transgénica *OE35.1* se esperaba un nivel de expresión del transcrito *RIF35.1* mayor que las otras variantes con respecto al wt, de igual forma para las plantas transgénicas *OE35.2* y *OE35.3*.

Como se muestra en la figura 43, estos resultados fueron confirmados para tres líneas transformantes seleccionadas previamente. Con respecto al wt la transgénica *OE35.1* tiene una mayor expresión de la variante *RIF35.1* que de los otros transcritos, la transgénica *OE35.2* del transcrito *RIF35.2* y la transgénica *OE35.3* del *RIF35.3*. Otro dato a resaltar es que las transgénicas *OE35.1* y *OE35.2* no expresan la variante *RIF35.3*. Y las transgénicas *OE35.2* y *OE35.3*

presentan altos niveles de la variante *RIF35.1*, en el caso de la transgénica *OE35.3* superó la expresión presente en la transgénica *OE35.1*.

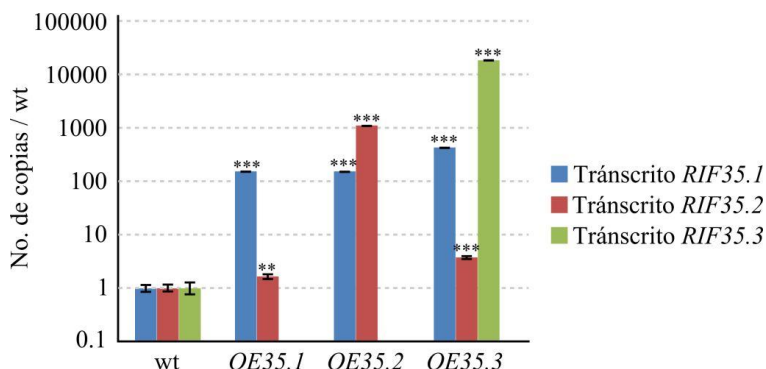


Figura 43 Cuantificación del número de copias de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en plantas transgénicas sobreexpresoras previamente seleccionadas con respecto a su parental Col0 (plántulas de 15 días crecidas en condiciones de día largo)

6.4 Características de crecimiento y desarrollo de las plantas transgénicas *OE35.1*, *OE35.2* y *OE35.3*

Una de las características del mutante *rif35*, que sobreexpresa de forma simultánea los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*, es la clorosis de las plántulas y las hojas jóvenes de la roseta y un retraso general en el crecimiento. Es por ello que se quiso estudiar si la sobreexpresión individualizada de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* resultaba también en un fenotipo similar.

Para ello, se compararon las características de crecimiento y desarrollo que presentan las plantas transgénicas seleccionadas en relación con las plantas wt y las del mutante *rif35*. En los resultados mostrados en la Figura 44 se puede observar que en los primeros estadios de desarrollo ninguna de las plantas transgénicas muestra diferencias significativas con respecto a las plantas wt, mientras que, como era de esperar, el mutante *rif35* presentó un ligero retraso en el crecimiento y un color verde pálido. Durante la formación de la roseta

tampoco se observaron cambios en cuanto tamaño y al color de las hojas con respecto al wt, que si se apreció claramente en el mutante *rif35*.

No obstante, a los 40 días las plantas transgénicas *OE35.1* y *OE35.3* presentaron un desarrollo de la roseta mayor que el de las plantas wt, una característica propia del mutante KO35. Ello era especialmente notorio en las plantas *OE35.3*. Además, en todas las plantas transgénicas las hojas jóvenes mostraron los bordes ligeramente dentados, siendo perfectamente apreciable a los 40 días. Esta característica fue especialmente pronunciada en las plantas transgénicas *OE35.3* y en menor grado en las *OE35.2*. Cabe resaltar que esta es una morfología típica de las hojas jóvenes cloróticas del mutante *rif35*.

6.5 Análisis de los niveles de RNA y proteína de las enzimas DXS y DXR en las líneas sobreexpresoras

Se conoce que *Arabidopsis* tiene la capacidad de responder al bloqueo provocado por la FSM aumentando sus niveles de proteína DXR (Carretero-Paulet, 2003). No obstante este aumento no es suficiente para que la planta pueda superar el bloqueo de la ruta del MEP. El mutante *rif35* es resistente a la FSM y dicha resistencia podría explicarse por los niveles basales incrementados de DXR, pero sobre todo por los niveles inducibles de dicha enzima (Cairó, 2009). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el mutante *rif35* presenta la sobreexpresión de las 3 variantes de splicing del locus At1g73470 a la vez, y no se ha determinado aún cuál de estas variantes, o que combinación de ellas produce dicha resistencia. Es por ello que se planteó estudiar los niveles de transcrito y proteína de DXR de las líneas transgénicas sobreexpresoras. Al mismo tiempo, aunque las líneas sobreexpresoras resultaron no resistentes a la CLM se planteo también estudiar los niveles de transcrito y proteína DXS con el fin de profundizar en dichos resultados.

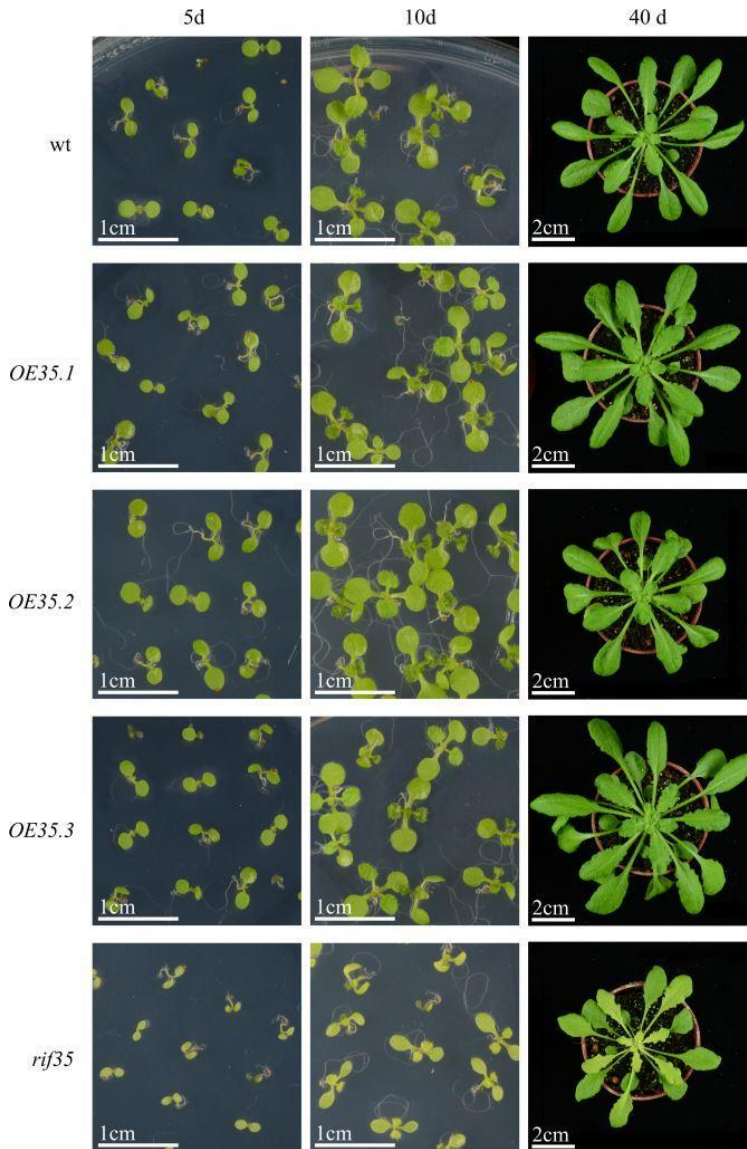


Figura 44 Estudio del fenotipo de plantas transgénicas sobreexpresoras de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* previamente seleccionadas con respecto a su parental Col0 y al mutante *rif35* (crecidas en condiciones de día largo). Las plantas se crecieron medio MS0.5 durante 15 días en condiciones de día largo, posteriormente fueron trasplantadas a tiestos y continuaron su desarrollo en condiciones de día corto con el objetivo de favorecer el desarrollo de la roseta.

Una vez puesto a punto el protocolo de cuantificación de los transcritos de DXR y DXS mediante qPCR y de sus proteínas correspondientes utilizando la técnica de Western blot se procedió a la cuantificación en las plantas transgénicas *OE35.1*, *OE35.2* y *OE35.3*. Para ello se tomaron muestras de

plántulas de 15 días de las tres líneas transgénicas, del ecotipo silvestre Col0 y del mutante *rif35*. El análisis se llevó a cabo en 2 réplicas biológicas y 3 réplicas experimentales.

Los resultados mostrados en la figura 45, indicaron que las líneas *OE35.1* y *OE35.3* presentan niveles de transcrito *DXR* más elevados (entre 1,7 y 2 veces) que los del parental Col0. Curiosamente los niveles de proteína *DXR* solo aumentaron de forma muy ligera, aunque significativa. En la línea *OE35.2* no se observaron cambios significativos en los niveles de transcrito y proteína *DXR*. Por otro lado tanto los niveles de transcrito y proteína *DXS* son en todos los casos muy similares a los estimados en las plantas wt (Figura 46)

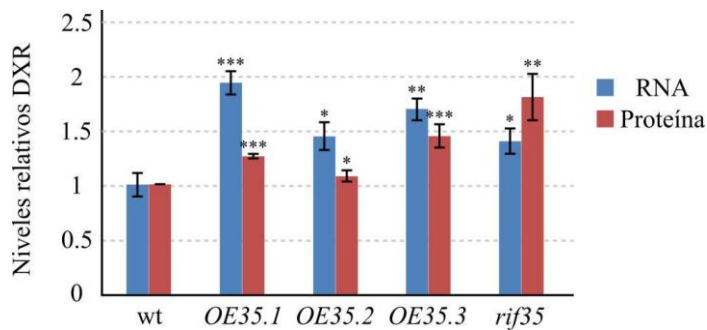


Figura 45 Análisis de la expresión génica y los niveles de proteínas de la enzima *DXR* de la vía del MEP, en plántulas de 15 días de desarrollo en condiciones de día largo de las líneas transgénicas de sobreexpresión de las diferentes variantes del gen At1g73470

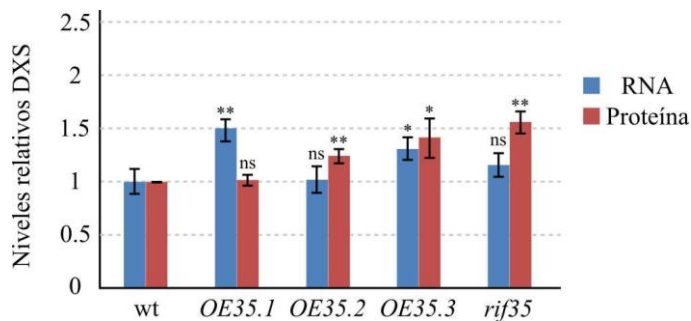


Figura 46 Análisis de la expresión de génica y los niveles de proteínas de la enzima *DXS* de la vía del MEP, en plántulas de 15 días de desarrollo en condiciones de día largo de las líneas transgénicas de sobreexpresión de las diferentes variantes del gen At1g73470

Considerados en su conjunto, estos resultados sugieren que la resistencia a la FSM podría venir dada mediante dos mecanismos independientes que podrían actuar de forma sinérgica. Mientras las proteínas RIF35.1 y RIF35.3 podrían actuar a nivel plastídico activando los niveles de expresión de DXR, la proteína RIF35.2 intervendría en algún proceso en los peroxisomas que indirectamente contribuiría a conferir resistencia a la FSM a través de un mecanismo todavía desconocido.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1 El mutante *rif35* y su interés en el estudio del metabolismo de los isoprenoides

Las plantas poseen dos rutas metabólicas independientes para la síntesis de IPP y DMAPP, los precursores específicos utilizados en la síntesis de la gran diversidad de isoprenoides presentes en estos organismos: la ruta del MVA, localizada en el citosol/retículo endoplasmático, y la ruta del MEP, de localización plasmática. Ambas rutas son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. El estudio de la organización y regulación de las rutas del MEP y del MVA y de los mecanismos implicados en el intercambio de intermediarios entre ellas se ha convertido en un aspecto de gran interés en los últimos años. Los datos disponibles actualmente indican que estos procesos son muy complejos y pueden estar relacionados con una gran variedad de procesos celulares (Hemmerlin et al., 2012; Hemmerlin, 2013; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2015)

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la regulación de la actividad las enzimas clave en el control de la ruta MEP y de procesos potencialmente implicados en el intercambio de IPP entre el citosol y el cloroplasto, en el presente trabajo se ha procedido a la caracterización del mutante *rif35* de *Arabidopsis thaliana*. Dicho mutante es resistente a la FSM, un inhibidor específico de la enzima DXR, y fue aislado de una colección de mutantes de T-DNA “activation tagging” (Cairó, 2009). Entre los diferentes mecanismos que podrían conferir resistencia a la FSM al mutante *rif35* cabe mencionar algunos particularmente interesantes. Por una parte, la resistencia a la FSM podría venir dada por un aumento de la actividad DXR (la diana del inhibidor) como consecuencia del incremento en los niveles de transcripción del gen *DXR* (individual o conjuntamente con otros genes de la vía del MEP) o de la activación de algún mecanismo que actuara a nivel post-transcripcional o post-

traduccional que resultase en un incremento en los niveles de proteína o actividad de la DXR. Por otra parte, la resistencia a la FSM podría también venir dada por un incremento en la tasa de importe de IPP (u otro prenilidifosfato) derivado de la vía del MVA.

Al inicio del presente trabajo se había descrito que el mutante *rif35* contiene inserciones del T-DNA, ambas en el cromosoma 1 (Cairó, 2009). Uno de los T-DNAs está localizado entre los genes At1g73470 y At1g73480, siendo el primero de ellos el candidato a ser activado como consecuencia de dicha inserción. Según la información al inicio del proyecto de tesis, el gen At1g73470 codifica para una proteína plastídica de función desconocida. El otro T-DNA se localizó en la región comprendida entre los genes At1g08020 y At1g08030, y se sugirió que dicha inserción podría resultar en la activación del gen At1g08010, cuya anotación no estaba bien definida. Además de ser resistente a la FSM y a la CLM, el mutante *rif35* muestra un fenotipo clorótico en las hojas jóvenes de la roseta y un retraso en el desarrollo (Cairó 2009). La sobreexpresión de un cDNA correspondiente al gen At1g73470 en plantas transgénicas de *Arabidopsis* confirmó que la activación de la expresión de dicho gen estaba relacionada con resistencia a la FSM observada en dicho mutante (Cairó, 2009).

En base a estos antecedentes en el presente proyecto de tesis se ha profundizado en la caracterización genética y fenotípica del mutante *rif35* y en el estudio de la organización y expresión del gen At1g73470. También se han estudiado diversos aspectos relacionados con la caracterización de las proteínas codificadas por dicho gen.

2 Caracterización genética y fenotípica del mutante *rif35*

Se ha descrito anteriormente que el mutante *rif35* contiene dos inserciones de T-DNA en su genoma, el T-DNA *rif35a* y el T-DNA *rif35b*. Justo al inicio del presente trabajo tuvo lugar una actualización de la base de datos TAIR que comportó cambios en la organización de diversas regiones genómicas

de *Arabidopsis*. Entre ellas se encontraba la región del cromosoma 1 en la que está insertado el T-DNA *rif35b*. La nueva organización génica de la región flanqueante a la inserción del T-DNA *rif35b* en comparación con la descrita anteriormente se ha indicado con detalle en el apartado 1.1 de Resultados. En base a ello es posible que el T-DNA pueda activar tres de los genes presentes en dicha región: *At1g08032*, *At1g08035* y *At1g08030*. Mientras que los genes *At1g08032* y *At1g08035* codifican para proteínas de tamaño relativamente pequeño y de función desconocida, el gen *At1g08030* codifica para la proteína tirosil sulfotransferasa (TPST) (Komori, et al. 2009). La sulfatación de tirosina es una modificación postraduccional común en péptidos y proteínas sintetizadas por la vía secretora en la mayoría de los eucariotas. En las plantas, esta modificación es crítica para las actividades biológicas de un subconjunto de hormonas peptídicas. El mutante de pérdida de función de TPST muestra, entre otras características, un fenotipo enano, hojas de color verde pálido, senescencia temprana y un número reducido de flores y silicuas.

Una de las características fenotípicas de mutante *rif35* es la clorosis de las plántulas y de las hojas jóvenes de la roseta. Dado que otros mutantes resistentes a la FSM descritos en la literatura muestran también clorosis, se ha considerado la posibilidad que dicho fenotipo en el mutante *rif35* estuviera relacionado con el gen responsable de conferir la resistencia a la FSM. No obstante, es posible que en el caso del mutante *rif35* el fenotipo clorótico se deba a la activación del gen *At1g08030* que codifica para TPST debida a la inserción del T-DNA *rif35b*.

La nueva organización de la región genómica flanqueante a la inserción del T-DNA *rif35b* en el mutante *rif35* planteó retomar su estudio a fin de identificar la base genética del fenotipo clorótico, ya que dicho fenotipo podría estar relacionado tanto con la activación del gen *At1g73470*, asociado al T-DNA *rif35a*, como a la del gen *At1g08030* asociada al T-DNA *rif35b* indicada anteriormente. Es por ello que se decidió estudiar la zigosidad del mutante *rif35* en relación con las inserciones de los T-DNAs *rif35a* y *rif35b*. Los análisis de

genotipado de la población de semillas utilizada como material de partida en el presente trabajo mostró que todas las plantas eran hemizigotas para la inserción del T-DNAs *rif35a* y homocigota para la inserción del T-DNAs *rif35b* (apartado 1.2 de Resultados). Aunque inesperada, esta situación se consideró de interés ya que debería posibilitar la segregación del T-DNA *rif35a* para generar plantas que solamente tuvieran la inserción del T-DNA *rif35b* en homocigosis. De esta manera sería posible asignar aquellos fenotipos del mutante *rif35* específicamente asociados a la inserción del T-DNA *rif35b*.

Los resultados obtenidos en el estudio de la segregación de los T-DNAs *rif35a* y *rif35b* mostraron también otros aspectos inesperados. Por una parte se observó la segregación de un fenotipo no descrito anteriormente consistente en un crecimiento de las hojas de la roseta direccionado hacia arriba, además del fenotipo clorótico. Este nuevo fenotipo se denominó CHDE “fenotipo clorótico con hojas en disposición elevada” para diferenciarlo del fenotipo característico del mutante *rif35* observado anteriormente y que se denominó CHDN (“fenotipo clorótico con hojas en disposición normal”). Por otra parte se observó que, independientemente de la segregación de los fenotipos CHDN o CHDE, toda la población segregante mostraba el mismo genotipo: era hemizigota para el T-DNA *rif35a* y homocigotas para el T-DNA *rif35b*. Estos resultados son de difícil explicación debido a una serie de aspectos. Mientras que la segregación de los dos fenotipos a partir de las plantas con fenotipo CHDN se producía en proporción 1:3, esto no era así en las plantas que presentaban el fenotipo CHDE. Por otra parte, el T-DNA *rif35a* no mostraba una segregación mendeliana ya que siempre se encontraba en hemizigosis. En relación con este segundo aspecto, se podría proponer que en un fondo genético homocigoto para el T-DNA *rif35b* las plantas wt u homocigotas para la inserción de T-DNA *rif35a* no serían viables.

La similitud entre los mutantes *rif35*, *rif1* y *ClpP6-1* en cuanto a la morfología y el color de las hojas sugirió una posible reducción de la actividad del complejo proteolítico Clp en éste mutante. Este hecho reforzaría la hipótesis según la cual el aumento de los niveles de proteína DXR en el mutante *rif35*

descrito por Cairó (2009) podría ser debido, directamente o indirectamente, a una reducción de la degradación de esta enzima por parte del complejo Clp. Estos resultados no han podido ser confirmados en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo. No obstante, sí que se ha podido observar que, de forma similar a los mutantes *ClpP6-1* y *rif1*, el mutante *rif35* también presenta alteraciones en el desarrollo de los cloroplastos (Sjögren, et al. 2006; Flores-Perez, et al. 2008). El análisis mediante TEM de hojas de la roseta de mutante *rif35* ha mostrado la existencia de dos tipos de cloroplastos (apartado 1.3 de Resultados). En las hojas jóvenes los cloroplastos son más pequeños que los de las hojas maduras, mostrando un número reducido de tilacoides y granas. En las hojas maduras, que muestran pigmentación normal, se observaron cloroplastos con tamaño similar a los cloroplastos de las plantas wt pero con una morfología completamente irregular y mostrando una red de tilacoides abundantes totalmente desorganizada y unos granas más alargadas formando estructuras circulares o semicirculares. El hecho que las hojas maduras del mutante *rif35* presenten alteraciones en los cloroplastos más intensas en condiciones de día largo que en día corto sugiere una sensibilidad diferencial de sus cloroplastos a la luz.

3 Caracterización de las variantes de splicing descritas para el locus At1g73470

Al inicio del presente trabajo apareció también en la base de datos TAIR nueva información relacionada con el locus At1g73470 en la que se hacía referencia a su organización en exones e intrones (apartado 2 de Resultados). De acuerdo con dicha información, el gen At1g73470 generaría tres transcritos que derivarían de un proceso de splicing diferencial. En el presente trabajo dichos transcritos han sido denominados *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*. Los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.3* contienen 12 exones y únicamente difieren en la secuencia del exón 12, que muestra 18 nucleótidos adicionales en el caso de *RIF35.3*. El transcrito *RIF35.2* está compuesto por 11 exones debido a que el primer exón

está formado por las secuencias de los exones 1 y 2 de los transcritos *RIF35.1* y *RIF35.3* fusionadas a la secuencia correspondiente al primer intrón (Figura 16). La existencia de estas variantes de splicing ha sido validada en el presente trabajo mediante la clonación de los cDNAs correspondientes y su posterior secuenciación.

La puesta a punto de un método de cuantificación de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* mediante qPCR utilizando sondas TaqMan ha permitido estudiar los niveles de expresión de dichas variantes de splicing tanto en las plantas wt como en el mutante *rif35* (apartado 3 de Resultados). Los transcritos *RIF35.1* y *RIF35.2* se expresan de forma generalizada en la planta y con niveles de expresión relativamente elevados. Por el contrario, el transcrito *RIF35.3* tiene una expresión muy baja en comparación con *RIF35.1* y *RIF35.2* y su expresión está restringida a la parte aérea de la planta.

El patrón de expresión de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* obtenido en el presente trabajo se ha contrastado con el descrito en la base de datos eFP Browser (Figura 47). Los perfiles de expresión génica mostrados en dicha base de datos se han elaborado en base a análisis de microarrays utilizando muestras de diferentes tejidos y estadios desarrollo de plantas de *Arabidopsis* (ecotipo Col0).

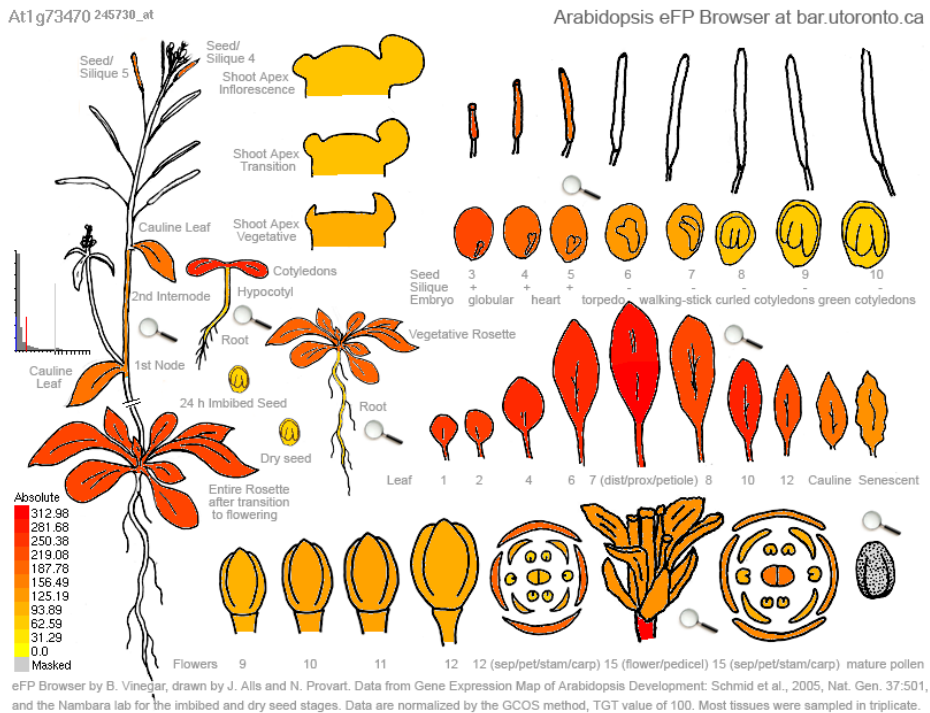


Figura 47 Patrón de expresión del locus At1g73470 descrito en la base de datos Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)

Se puede observar que el patrón de expresión mostrado en la Figura 47 no se corresponde con los obtenidos de forma individual para los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* mostrados en la Figura 24 (apartado 3.3 de Resultados). No obstante, con la información disponible en la actualidad resulta evidente que el patrón de expresión de la base de datos eFP Browser corresponde en realidad al patrón de expresión solapado de las tres variantes de splicing, ya que es comparable con el obtenido en el presente trabajo si se realiza la sumatoria de los patrones de expresión individuales de los tres transcritos (Figura 48).

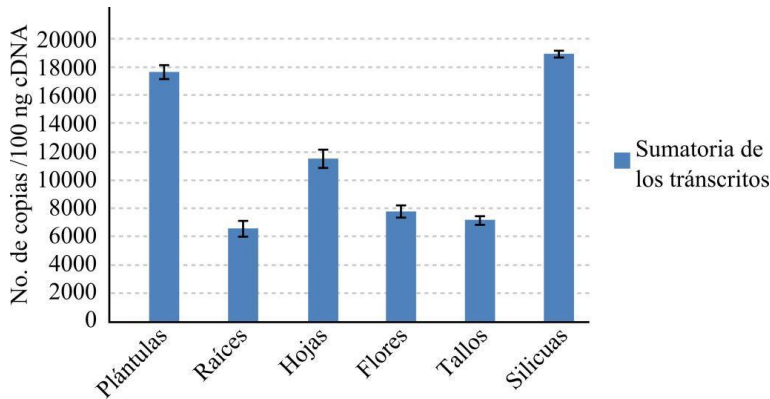


Figura 48 Cuantificación del sumatorio del número de copias de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en diversos tejidos y estadios de desarrollo de plantas de *Arabidopsis* (Ecotipo Col0), crecidos en condiciones de día largo

La cuantificación de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en plántulas del mutante *rif35* ha indicado que todos ellos están incrementados entre 7 y 16 veces en relación con los niveles de expresión de cada uno de ellos en las plantas wt. Este hecho confirma que el T-DNA *rif35a* activa la expresión del gen At1g73470 en el mutante *rif35*. No obstante, y en base a estos resultados, no es posible concluir si la resistencia a la FSM del mutante *rif35* es debida a la activación de la expresión de uno de los transcritos en particular o bien a la del conjunto o ciertas combinaciones de los mismos.

4 Caracterización de las proteínas RIF35.1, RIF35.2 Y RIF35.3

Por el hecho de derivar del mismo gen, los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* Y *RIF35.3* codifican proteínas que presentan secuencias aminoacídicas comunes entre ellas y otras que son específicas de cada una de ellas. Así, mientras que las proteínas RIF35.1 y RIF35.3 difieren únicamente en una secuencia de 6 aminoácidos presente en la región C-terminal de RIF35.3, la proteína RIF35.2 es idéntica RIF35.1 excepto que es considerablemente más corta en su extremo N-terminal debido al uso de un codón ATG más interno (apartado 4.1 de Resultados). La proteína RIF35.1 está altamente conservada en plantas

dicotiledóneas y monocotiledóneas. El alineamiento múltiple de las proteínas ortólogas de RIF35.1 indica la existencia de tres dominios altamente conservados en todas ellas. En relación con la proteína RIF35.2, más corta en su extremo N-terminal, solamente se han encontrado ortólogos en dos especies silvestres del género *Nicotiana* (*N. tomentosiformis* y *N. sylvestris*). Hasta el momento no ha sido posible detectar ninguna proteína ortóloga de RIF35.3 en el sentido de contener la secuencia adicional de 6 aminoácidos en la región C-terminal. Es posible que, al igual que sucedió con *Arabidopsis* anteriormente, la predicción de dichas variantes proteicas a partir de los datos de secuenciación de genomas requiera la utilización de algoritmos de predicción más avanzados.

Los elevados niveles de identidad y similitud entre las proteínas ortólogas de RIF35.1 presentes en las plantas (Entre un 55 al 89 % identidad y un 72 y 96 % de similitud) sugiere que dichas proteínas podrían desempeñar un papel relevante en algún proceso común a todas las plantas.

La información presente en la base de datos TAIR predice que las proteínas RIF35.1 y RIF35.3 estarían localizadas en los plastos. El uso de distintos programas de predicción de localización subcelular de proteína, tales como ChloroP, Target P, Signal, Predotar, y AtSubP, llevó a conclusiones similares. La localización plastídica de RIF35.1 y RIF35.3 fue confirmada mediante el análisis de variantes de dichas proteínas fusionadas con la proteína fluorescente eYFP. Es de destacar que mientras que el péptido de tránsito predicho para RIF35.1 y RIF35.3 dirige la proteína de fusión fluorescente al estroma del cloroplasto, la fusión de la proteína entera a eYFP se localiza en estructuras punteadas en el interior del cloroplasto de naturaleza desconocida (Figura 32). Ello implica la existencia de una señal de localización interna presente en la proteína importada a los cloroplastos. Estos resultados indican también que la función de las proteínas RIF35.1 y RIF35.3 se desarrollaría en una estructura suborganelar del cloroplasto todavía desconocida.

En caso de la proteína RIF35.2 no existía ninguna predicción clara sobre su posible localización subcelular. Para el estudio de localización subcelular de dicha proteína se generaron proteínas de fusión en las que la eYFP estaba localizada en posición N-terminal o C-terminal (apartado 4.2 de Resultados). Solamente se observó un patrón claro de localización con la variante que contenía eYFP localizada en el extremo C-terminal. Dicha localización mostraba un patrón punteado que sugería la presencia de la proteína de fusión en los peroxisomas. Estudios de colocalización utilizando un marcador de peroxisomas confirmaron este punto. Teniendo en cuenta los mecanismos y las señales implicadas en la traslocación de las proteínas a los peroxisomas, los resultados obtenidos indicaron que RIF35.2 utilizaría una señal del tipo PTS1 localizada en el extremo C-terminal para su direccionamiento a los peroxisomas. Las señales PTS1 consisten en un tripéptido presente en un determinado contexto de la secuencia C-terminal que es reconocido por receptores específicos y un complejo de traslocación que media el transporte de dichas proteínas través de la membrana del peroxisoma. A lo largo de los últimos años se han identificado numerosas variantes de las señales PTS1 implicadas en el direccionamiento de proteínas a los peroxisomas (Hu, et al. 2012). No obstante el tripéptido del extremo C-terminal de la variante RIF35.2 (ProCysLys) no se parece a ninguna de las señales PTS1 descritas hasta el momento (Kaur y Hu 2011).

El hecho de que las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3 no contengan regiones hidrofóbicas que puedan representar dominios transmembrana indicaría que, de forma independiente a su localización subcelular específica, dichas proteínas se deberían encontrar en la célula en forma de proteínas solubles. No obstante, no se puede descartar que su localización en la célula se vea influenciada por la interacción con otras proteínas.

La existencia del mutante de *Arabidopsis* SAIL_615_E08, que contiene un T-DNA insertado en un exón de la parte central del gen At1g73470, se consideró de interés para obtener alguna información acerca de la función de las proteínas codificadas por dicho gen. A priori se consideró que este mutante, al

que se denominó KO35, debería mostrar algún fenotipo relativamente severo al estar afectado en un gen que codifica para proteínas altamente conservadas en las plantas. Inesperadamente, el mutante KO35 (homocigoto para la inserción del T-DNA) no mostró ningún defecto en el crecimiento o desarrollo de la planta sino más bien todo lo contrario, ya que presentó un desarrollo más vigoroso que las correspondientes plantas wt.

A pesar de tener una inserción en la zona central del gen At1g73470, el mutante KO35 expresa dos transcritos correspondientes a la región 3' del gen. Teóricamente, dichos transcritos codifican para una versión truncada de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*. Uno de los transcritos contiene una secuencia intrónica adicional de 85 nucleótidos. Se desconoce si estos transcritos pueden ser traducidos a proteína en la planta. En el supuesto que tuviera lugar su traducción, el resultado sería una proteína carente de 129 aminoácidos de la parte N-terminal en relación con la proteína madura *RIF35.1* y *RIF35.3* que no podría ser transportada al cloroplasto, por lo que debería ser transportada a los peroxisomas, como es el caso de la variante *RIF35.2* descrita en el apartado 4.2. La proteína resultante tendría 164 aminoácidos (sin incluir los 28 aminoácidos adicionales en el caso de la variante que incluye la secuencia intrónica adicional) y no contendría dos de los dominios altamente conservados en las proteínas *RIF35*. Por todo ello se considera improbable que dichas proteínas sean biológicamente activas.

Tomando en su conjunto los resultados obtenidos en la caracterización del mutante *rif35* se podría especular sobre el hecho de que las proteínas codificadas por el At1g73470 tuvieran una actividad reguladora negativa de algún proceso importante en el crecimiento y desarrollo de la planta.

5 Caracterización de líneas transgénicas que sobreexpresan las variantes de splicing *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*

Los estudios realizados por Cairó (2009) y los presentados en el presente trabajo indican de forma clara que el fenotipo de resistencia a la FSM del mutante *rif35* es debido a una activación de la expresión del gen At1g73470. Como se ha descrito anteriormente, los “enhancers” presentes en el T-DNA *rif35a* activan de forma simultánea la expresión de las tres variantes de splicing codificadas por este gen. Es por ello que no podía concluir si la resistencia a la FSM era debida a la sobreexpresión de los tres transcritos (y posiblemente también de sus correspondientes proteínas) o a la activación de alguno de ellos en particular. Es por ello que se decidió generar y caracterizar plantas transgénicas que expresaran los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* de forma individualizada.

Todas las líneas transgénicas generadas mostraron distintos niveles de resistencia a la FMS y en ningún caso el nivel de resistencia obtenido fue comparable a la mostrada por el mutante *rif35*. Es de destacar que las plantas más resistentes fueron las que sobreexpresaban el transcrito *RIF35.2*.

Se ha descrito que la sacarosa potencia el nivel de resistencia a la FSM en otros mutantes *rif* descritos anteriormente y en plantas wt tratadas con concentraciones subletales de dicho inhibidor (Flores-Pérez et al., 2010). Es por ello que los ensayos de sensibilidad a la FSM se realizaron en ausencia y presencia de sacarosa (apartado 6.2.1 de Resultados). Como era de esperar, los niveles de resistencia a la FSM disminuyeron de forma importante en ausencia de sacarosa. No obstante, merece la pena destacar que la ausencia de sacarosa en el ensayo afectó de forma especialmente severa a las plantas que sobreexpresaban *RIF35.1* y *RIF35.3*. Cabe resaltar que la pérdida relativa de resistencia a la FSM en ausencia de sacarosa de las plantas que sobreexpresan *RIF35.2* fue similar a la mostrada por el mutante *rif35*. Todo ello permite sugerir que la proteína *RIF35.2* (de localización peroxisomal) es la que desempeñaría un

papel más relevante en relación con la resistencia a la FSM en el mutante *rif35*. Estos resultados indicarían también que las proteínas plastídicas RIF35.1 y RIF35.3 podrían tener una acción sinérgica sobre la actividad de RIF35.2.

Durante la caracterización de las plantas transgénicas que sobreexpresan los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* se pudo observar que algunas plantas diseñadas para la sobreexpresión de uno de los transcritos en particular también mostraban un aumento en la expresión de otros de los transcritos (Figura 43). Este sería el caso de las plantas que sobreexpresan los transcritos *RIF35.2* y *RIF35.3* en que se puede apreciar claramente la fuerte activación paralela del transcrito *RIF35.1*. Las bases moleculares de esta observación son desconocidas pero indican que el proceso de splicing de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* podría estar modulado por los niveles relativos entre ellos.

El análisis de los niveles de transcrito y proteína DXR (la diana de acción de la FSM) en las plantas transgénicas que sobreexpresan *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* mostraron ligeros aumentos que todos los casos. No obstante, los valores de proteína DXR en las líneas *OE35.1* y *OE35.3* son considerablemente menores que los mostrados por el mutante *rif35*. Ello podría explicar el hecho que estas líneas tengan también niveles de menores de resistencia a la FSM. En este contexto sorprende la línea que sobreexpresa *RIF35.2*, que muestra una resistencia a la FSM relativamente mucho mayor que las líneas que sobreexpresan *RIF35.1* y *RIF35.3* a pesar de mostrar niveles de proteína DXR similares a los de las plantas wt. Cabe destacar que los niveles de transcrito y proteína DXS tampoco se han podido correlacionar de forma clara con los niveles de resistencia a la FSM mostrados por las líneas transgénicas analizadas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El genotipado de la población de semillas del mutante *rif35* utilizadas en este trabajo demostró que todas las plantas analizadas eran hemizigotas para la inserción de T-DNA *rif35a* y homocigotas para la inserción del T-DNA *rif35b*. Estudios de segregación pusieron de manifiesto la imposibilidad de seleccionar líneas segregantes homocigotas para las dos inserciones o únicamente homocigotas para la inserción del T-DNA *rif35b*. Dichos resultados indicarían que las plantas homocigotas para la inserción del T-DNA *rif35b* solamente son viables en un fondo genético hemizigoto para la inserción del T-DNA *rif35a*.

2. La población de semillas del mutante *rif35* da lugar a plantas con dos fenotipos morfológicamente diferenciados. Por una parte plantas cloróticas con hojas en disposición normal (fenotipo CHDN) y, por otra, plantas cloróticas con hojas en disposición elevada (fenotipo CHDE). Estos fenotipos segregan de forma diferencial. Mientras que las plantas con fenotipo CHDE dan lugar a poblaciones homogéneas con fenotipo CHDE, las plantas con fenotipo CHDN dan lugar a plantas con fenotipos CHDN y CHDE en una proporción 3:1. Se desconoce la naturaleza de los genes implicados en este proceso.

3. Los estudios de microscopía electrónica en hojas jóvenes y maduras del mutante *rif35* revelaron la presencia de dos tipos de cloroplastos. Las hojas jóvenes contenían cloroplastos de menor tamaño y un sistema membranoso poco desarrollado, mientras que las hojas maduras mostraban la presencia de cloroplastos con una morfología totalmente irregular, una red de tilacoides desorganizada y granas más alargadas. Tanto el fenotipo de desarrollo de la planta como el de los

cloroplastos presentes en el mutantes *rif35* son similares a los del mutante *ClpP6-1*, lo que sugiere una posible reducción de la actividad del complejo Clp en el mutante, reforzando así la idea de que el aumento de los niveles de proteína DXR en el mutante *rif35* podría ser debido, directa o indirectamente, a una reducción de la degradación de esta enzima por parte del complejo proteolítico Clp.

4. Las tres variantes de splicings predichas en la base de datos TAIR para el gen At1g73470 (*RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*) han sido validadas de forma experimental mediante RT-PCR y secuenciación. La puesta a punto de un método de cuantificación de dichas variantes de splicing mediante qPCR utilizando sondas TaqMan ha permitido determinar que las tres variantes de splicings se expresan de forma diferencial.

5. La cuantificación de los niveles de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* en el mutante *rif35* ha indicado que están incrementados entre 7 y 16 veces en relación con sus correspondientes niveles de expresión en las plantas wt. El análisis de la expresión de estos transcritos durante el crecimiento y desarrollo de plantas wt han mostrado que los transcritos *RIF35.1* y *RIF35.2* se expresan de forma generalizada y con niveles de expresión relativamente elevados. El transcrito *RIF35.3* tiene una expresión muy minoritaria respecto a *RIF35.1* y *RIF35.2* y un patrón de expresión restringido a la parte aérea de la planta.

6. Las proteínas codificadas por los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* tienen 351, 248 y 357 aminoácidos. Las proteínas *RIF35.1* y *RIF35.3* difieren únicamente en una secuencia de 6 aminoácidos presente en la región C-terminal de *RIF35.3*. La proteína *RIF35.2* es considerablemente más corta en su extremo N-terminal debido

al uso de un codón ATG más interno respecto al utilizado para la traducción de las proteínas RIF35.1 y RIF 35.3. Estudios de predicción han indicado que las proteínas RIF35.1, RIF35.2 y RIF35.3 están constituidas únicamente por hélices- α y no presenta ninguna región hidrofóbica con características de anclaje a membranas.

7. El alineamiento de la proteína RIF35.1 con las secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos ha confirmado la presencia de proteínas ortólogas en plantas con genomas secuenciados que incluyen plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Solamente ha sido posible identificar ortólogos de RIF35.2 en plantas silvestres del género *Nicotiana*. Se desconoce si la existencia de la proteína RIF35.3 es una característica única de *Arabidopsis*.

8. Estudios de localización subcelular han demostrado que las proteínas RIF35.1 y RIF35.3 son dirigidas a los cloroplastos, mientras que la proteína RIF35.2 se localiza en los peroxisomas. Las proteínas RIF35.1 y RIF35.3 muestran un patrón de localización punteado que correspondería a un compartimento cloroplastídico no identificado. Su localización dependería de algún motivo localizado en una posición más interna respecto del péptido señal. La localización de la proteína RIF35.2 en los peroxisomas implicaría a una señal ubicada en el extremo C-terminal no descrita anteriormente en otras proteínas peroxisomales.

9. La caracterización del mutante KO35, que contiene una inserción de T-DNA en un exón localizado en la parte central del gen At1g73470 (*RIF35*) ha mostrado que dicho mutante presenta un desarrollo más vigoroso que las correspondientes plantas wt. El mutante KO35 expresa dos transcritos correspondientes a la región 3' del gen *RIF35* que codifican para una versión truncada de los transcritos *RIF35.1*

y *RIF35.2*. Se desconoce si estos transcritos son traducidos a proteína en la planta. Este mutante muestra una sensibilidad a la FSM equivalente a la de las plantas wt.

10. Se han generado plantas transgénicas de *Arabidopsis* diseñadas para la sobreexpresión individualizada de las variantes de splicings *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3*. En todos los casos se ha obtenido un incremento muy elevado de los transcritos correspondientes a cada transgén. No obstante en el caso de la sobreexpresión de los transcritos *RIF35.2* y *RIF35.3* se produce un aumento paralelo muy marcado de la expresión del transcrito *RIF35.1*, lo que indicaría la existencia de mecanismos que regularían una expresión coordinada de las distintas variantes de splicing.

11. Todas las plantas transgénicas generadas han mostrados ser resistentes a la FSM. Esta resistencia no parece estar asociada a aumentos significativos en los niveles de RNA y proteína de las enzimas DXS y DXR. Los estudios de sensibilidad a la FSM han puesto de manifiesto que la proteína *RIF35.2*, de localización peroxisomal, tendría un papel cuantitativamente importante en la resistencia a dicho inhibidor. Es posible que las proteínas *RIF35.1* y *RIF35.3*, de localización plastídica, actúen de forma sinérgica con *RIF35.2* para conferir los altos niveles de resistencia a la FSM que presenta el mutante *rif35*.

12. Ninguna de las plantas transgénicas generadas para la sobreexpresión individualizadas de los transcritos *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* presentaron clorosis en sus hojas jóvenes ni un retraso en el crecimiento, como si sucede con el mutante *rif35*. De forma similar al mutante *KO35*, las plantas transgénicas *OE35.1* y *OE35.3* presentan un desarrollo más vigoroso que las plantas wt.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Material Biológico

1.1 Material vegetal

1.1.1 *Arabidopsis thaliana* (variedades wild type)

Arabidopsis thaliana (Heynen) ecotipo Columbia-0 (Col0)

Arabidopsis thaliana (Heynen) ecotipo Columbia-2 (Col2)

1.1.2 Mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Mutante *rif35*. Proveniente de la colección de mutantes Scheible y Somerville de *activation tagging*. Mutante generados en la variedad de *Arabidopsis thaliana* Col2. El T-DNA insertado proviene del vector pSKI015, que contiene el gen BAR que confiere resistencia a BASTA y 4 “enhancers” del promotor CaMV 35S dispuestos en tándem en la proximidad del “right border” (RB). Distribuido por NASC.

Mutante SAIL_615_E08 (*At1g73470*), que se ha denominado mutante KO35. Mutante Knock out de la colección Syngenta Arabidopsis Insertion Library (SAIL), generado en plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0. El T-DNA proviene del vector pCSA110 i pDAP101. Distribuido por NASC.

1.1.3 Líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (generadas en el presente trabajo)

35S:rif35.1 (fondo genético Col0)

35S:rif35.2 (fondo genético Col0)

35S:rif35.3 (fondo genético Col0)

Ver sección de Resultados apartado 6.1

1.1.4 *Nicotiana benthamiana*

1.2 Cepas bacterianas

Escherichia coli **DH5 α** (*supE44*, *Δlac*, U169, (Φ80, *lacZ*Δ*m15*), *hsd* R17, *recA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*)

Agrobacterium tumefaciens **C58C1** (Rifampicina^R – vector *helper* pGV2260 Amp^R) (Valvekens, Montagu, y Van Lijsebettens 1988)

1.3 Vectores

Vectores plasmídicos

pBLUESCRIPT-SK+ (*Stratagene*)

pGFP-PAU (Rodríguez-Concepción, et al. 2000; Earley, et al. 2006)

Vectores Gateway

Vectores con AttL1 – AttL2

pENTR/D-TOPO-gen de interés

Vectores con AttR1 – AttR2 (de la familia pEarlyGate (Earley, et al. 2006))

pEarlyGate 100 35S-Gateway-OCS3' (TAIR stock number CD3-724)

pEarlyGate 101 35S-Gateway-YFP-HA tag-OCS (CD3-683)

pEarlyGate 104 35S-YFP-Gateway-OCS3' (CD3-686)

2 Medios de cultivo

2.1 Medios de cultivo de plantas

2.1.1 Medio para germinación y crecimiento *in vitro*

El medio de germinación se esteriliza al autoclave durante 20 min a 120 °C antes de adicionar a placas de Petri adecuadas para el desarrollo *in vitro* de plántulas de Arabidopsis. Este medio fue el utilizado para crecer las plantas en condiciones estériles.

Medio de germinación (MS0.5) estéril:

Murashige & Skoog * (MS).....	2.2 g
MES.....	0.25 g
Agua miliQ q.s.p.....	1 l
Agar.....	8 g
Ajustar el pH a 5.7 con KOH 1 N.	

* El medio MS utilizado no contenía ni sacarosa, ni kinetina, ni ácido indolacético (*ICN Biomedical*). En algunos casos en el que se requirió el uso de medio MS0.5 suplementado con Sacarosa, ésta estaba a una concentración de 5 gramos por litro.

2.1.2 Suplementos

Los suplementos que se detallan a continuación, en el caso de requerirse, se añadieron una vez esterilizado el medio y después de haberse atemperado a 50 °C.

-Fosmidomicina (ácido 3-(N-formil-N-hidroxiamino) propilfosfónico (*life technologies*) inhibidor de la casa comercial Invitrogen: La solución madre se preparó a 100 mM en Agua miliQ. Conservación en oscuridad a -20 °C.

-Clomazona (2-[(2-chlorophenyl)methyl]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone) (*Zeneca Agrochemical*). La solución madre se preparó a 100 mM en Agua miliQ. Conservación en oscuridad a -20 °C.

2.1.3 Medio en tierra

En el caso de *Arabidopsis* el sustrato sólido consistió en una mezcla de turba rubia de sphagnum, perlita y vermiculita en proporciones 2:1:1.

En el caso de la *N. benthamiana* el sustrato consistió en turba rubia de sphagnum con carbonato de calcio y pH entre 5.5 y 6.5.

2.2 Medios de cultivo de bacterias

Los medios de cultivo de bacterias se autoclavaron a 121°C durante 20 min. Los antibióticos o suplementos requeridos se añadieron después de atemperar el medio a una temperatura de 50 °C.

El medio LB se utilizó para el crecimiento de *E. coli* y el medio YEB para el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*.

Medio líquido LB

NaCl.....	0,5 %
Bactotripton.....	1 %
Extracto de levadura.....	0,5 %

Medio líquido YEB

Extracto de levadura.....	0,1 %
Extracto de bovino.....	0,5 %
Bactopeptona.....	0,5 %
Sacarosa.....	0,5 %

En el caso de medios sólidos se añadió agar al 1.5 % antes de autoclavar.

2.2.1 Suplementos

Los antibióticos que se detallan a continuación se añadieron al medio de cultivo una vez esterilizado y una vez atemperado a 50 °C.

Ampicilina (Amp): Concentración final 50 µg/ml a partir del stock a 100 mg/ml

Kanamicina (Kn): Concentración final 100 µg/ml a partir del stock a 25 mg/ml

Rifampicina (Rif): Concentración final 100 µg/ml a partir del stock a 50 mg/ml

Gentamicina (Gent): Concentración final 100 µg/ml a partir del stock a 100 mg/ml

Conservación a -20 °C

3 Condiciones de cultivo

3.1 Plantas

3.1.1 *Arabidopsis thaliana*

Las plantas de *Arabidopsis* se crecieron en cámaras de cultivo a una temperatura de 22-24 °C siguiendo esencialmente dos programas de desarrollo: fotoperiodo corto (8 horas de luz/16 de oscuridad) o fotoperiodo largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad). Una combinación de las fases de día largo y día corto permite el desarrollo óptimo de las plantas. El material vegetal utilizado fue cultivado en condiciones estériles y posteriormente trasplantado en macetas si se requería.

La mayoría de los experimentos se han realizado con plántulas crecidas en condiciones estériles utilizando medio MS 0,5 en placas Petri a 2 °C y en condiciones de fotoperiodo largo.

Las plantas destinadas a completar su ciclo biológico y producir semillas se transfirieron a tierra 15 días después de la germinación. Después del traspaso de las plantas desde un medio estéril a tierra (no estéril) se procedió a su aclimatación al nuevo medio, sellando las bandejas con papel film y a los 2 días se le hacen pequeñas perforaciones al papel y al quinto día se retira el film de la bandeja.

3.1.2 Esterilización de semillas

Las semillas de *Arabidopsis* se germinaron en condiciones estériles. Para esterilizar las semillas de *Arabidopsis* se siguió el siguiente método:

- Sumergir las semillas (50 a 100 mg en un tubo de microcentrífuga) en solución de esterilización durante 8 minutos en agitación a 120 rpm.
- Realizar dos lavados con etanol absoluto y en agitación a 120 rpm cada uno durante 1 o 2 min.
- Dejar secar, dentro del tubo abierto, en la cabina de flujo laminar entre 4 horas y una noche, dependiendo de la cantidad de etanol que quede en el tubo.

Para sincronizar la germinación se ha seguido el proceso de estratificación, guardando las placas durante un periodo mínimo de 48 horas a 4 °C y en oscuridad antes de ponerlas a germinar.

Solución de esterilización:

<i>BAYROL GmbH</i> (desinfectante universal de uso común).....	1.5 g
Agua miliQ q.s.p.....	40 ml
Diluir al 10% en etanol absoluto.	

3.1.3 Cuantificación de la resistencia a FSM y CLM

Este método consiste en evaluar la relación de plántulas que producen hojas fotosintéticamente activas, y por tanto capaces de continuar el total desarrollo de la planta, frente a las cloróticas cuyo crecimiento se ve afectado. Las semillas fueron germinadas en placas de MS suplementadas con FSM o CLM. Al cabo de 15, se contaron de plántulas que producían hojas verdaderas y las que no.

Se calculó el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas con respecto al total de plántulas de la placa. Dicho valor fue corregido teniendo en cuenta el número de plántulas germinadas en MS con respecto al total de plántulas sembradas.

3.1.4 *Nicotiana benthamiana*

Las plantas de *N. benthamiana* se crecieron en el invernadero a 23-26 °C y humedad relativa entre el 50 y 60 % en condiciones de fotoperiodo largo.

3.2 Cepas bacterianas

Las condiciones de cultivo, variaron de acuerdo con especie bacteriana utilizada. En el caso de *Echerichia coli* se crecieron a 37 °C durante una noche y en el caso de *Agrobacterium tumefaciens* a 28 °C durante 2 - 3 días.

Los cultivos en medio líquido se mantuvieron en agitación constante. 200 rpm para *E. coli* y entre 120-160 rpm para *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2.1 Preparación y transformación de células competentes de *E.coli* por choque térmico

1. Preparación de las células competentes de *E.coli*:

- Crecer un precultivo de la cepa de E. coli de interés en medio LB (2 ml) durante toda la noche a 37 °C.
- Inocular 100 ml de cultivo LB con 1 % del precultivo anterior.
- Incubar de 2-4 horas a 37 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.4-.5 a 600 nm.
- Poner 5 min en hielo.
- Repartir el cultivo en tubos de 30 ml y centrifugar a 3.400 xg en el rotor JA-17 durante 10 min a 4 °C.
- Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 20 ml de TfBI estéril.
- Incubar 10 min en hielo.
- Centrifugar a 3.400 xg en el rotor JA-17 durante 10 min a 4 °C.
- Retirar el sobrenadante.
- Resuspender el sedimento con 1 ml de TfBII
- Alicuotar 100 µl de las células competentes en tubo de microcentrífuga y congelar rápidamente en N₂ líquido
- Mantener las células competentes a -80 °C hasta el momento de su uso.

TfBI:

KAc.....	30 mM
MnCl ₂	50 mM
RbCl.....	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Glicerol.....	15 %
pH.....	5.8

TfBII:

MOPS.....	10 mM pH 7
RbCl.....	10 mM
CaCl ₂	75 mM

Glicerol.....5 %
pH..... 5.8

2. Transformación de células de *E. coli* por choque térmico

- Introducir 50 ng de la reacción de ligación en uno de los microtubos conteniendo las células competentes de *E. coli* (preparadas como se indica en el punto anterior) y mantener en hielo durante 30 min.
- Realizar el choque térmico manteniendo el tubo de microcentrífuga a 42 °C durante 1.5 min.
- Transferir el tubo rápidamente a hielo durante 2 min.
- Diluir con 900 µl de LB y mantener a 37 °C durante 1 hora.
- Sembrar las células en una placa con medio LB/agar complementada con el antibiótico de selección adecuado.
- Incubar las placas a 37 °C durante la noche.

3.2.2 **Protocolo de transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación**

- Introducir 1 µl de una solución de 50 ng de DNA plasmídico, en 40 µl de células competentes, y mantener en hielo.
- Introducir la mezcla de células competentes y DNA plasmídico en una cubeta de electroporar fría.
- Realizar la electroporación a 2 kV y 25 µF de capacitancia, Comprobar que el tiempo de electroporación sea de entre 3 y 5 ps.
- Resuspender rápidamente las células con 1 ml de YEB, incubar en hielo durante 2 min.
- Mantener las células competentes a 28 °C durante 4 h.

- Sembrar las células en una placa con medio YEB/agar complementado con los antibióticos de selección adecuados. En nuestro caso rifampicina, kanamicina y ampicilina.
- Incubar las placas a 28 °C durante 48 h
- Seleccionar los clones obtenidos mediante PCR con primers específicos del vector y del T-DNA.
- Guardar las muestras congeladas a -80 °C en glicerol 50 %

4 Técnicas de bioquímica y biología molecular

4.1 Genómica

4.1.1 Minipreps de DNA de cepas de *E. coli* transformadas

- Inocular 3 ml de medio LB conteniendo el antibiótico de selección con una colonia transformante crecida en las placas de selección (apartado 3.2.1 de Materiales y métodos) e incubar en un agitador orbital a 37 °C y 180 rpm durante una noche.
- Al día siguiente, los cultivos se procesaron con el kit Nucleo Spin^R Plasmid de Macherey-Nagel para obtener el plásmido purificado.

4.1.2 Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis*

El DNA genómico de plántulas de *Arabidopsis* se obtuvo utilizando una técnica sencilla y rápida a partir de pequeñas cantidades de tejido de *Arabidopsis* (del orden de 10-40 mg). El ADN obtenido mediante este método permite, por ejemplo, confirmar por PCR la presencia de un transgén o realizar un genotipado. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Congelar el tejido de Arabidopsis en un tubo de microcentrífuga y trabajado siempre en presencia de N₂ líquido triturar las muestras utilizando el equipo Tissuelyser (Qiagen). Alternativamente se puede utilizar un mortero en presencia de N₂ líquido y moler con un pilón hasta obtener un polvo fino
- Resuspender el tejido triturado en 115 µl de tampón de extracción por cada 10 mg del tejido inicial, mezclar en el vórtex durante 10 seg y mantener en agitación en un agitador de bandeja, durante 10 min a temperatura ambiente
- Centrifugar a temperatura ambiente durante 1 min a 13.500 rpm y transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga. Descartar el sedimento
- Añadir isopropanol en una cantidad correspondiente al doble del volumen de la muestra, agitar manualmente (inversión del tubo varias veces) y dejar durante 2 min en hielo.
- Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 min a 13.500 rpm.
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 200 µl de etanol al 70 % por cada 10 mg de tejido
- Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 min a 13.500 rpm. Descartar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente (o a 37 °C) hasta que se evapore todo el etanol
- Resuspender el pellet en 100 µl de Agua miliQ y conservar a -20 °C.

Tampón de extracción:

Tris-HCl pH 7.5.....	0.2 mM
NaCl.....	0.25 mM
EDTA.....	0.025 M
SDS.....	0.5 %

4.1.3 Reacción de PCR utilizando Taq DNA polimerasa

Para amplificar secuencias génicas, con el fin de genotipar mutantes o líneas transgénicas, se ha utilizado la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* o PCR) utilizando oligonucleótidos específicos y la enzima DNA polimerasa termoestable comercial *Go Taq Polymerase Green Master Mix* (Promega), que presenta una baja tasa de error (HF, High Fidelity). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando DNA preparado según se describe en el apartado 4.1.1. y siguiendo el siguiente protocolo:

Reacción:

Oligonucleótido sentido 10 μ M.....	0.5 μ l
Oligonucleótido anti-sentido 10 μ M.....	0.5 μ l
Green Taq MM (Promega).....	5 μ l

Se aporta a la reacción entre 1 y 2 μ g aproximadamente de la muestra de DNA genómico en un total de 10 μ l.

Programa de PCR:

1. Desnaturalización.....	2 min/95 °C
2. Desnaturalización.....	30 seg/95 °C
3. Apareamiento.....	30 seg/55 °C
4. Extensión.....	1 min por pb/72 °C
Repetir 35 ciclos desde el paso 2	
Extensión final.....	7-10 min/72 °C

4.1.4 Reacción de PCR utilizando Pfu DNA polimerasa

La Pfu DNA Polimerasa, enzima termoestable que exhibe actividad exonucleasa 3'-5' (*proofreading*) y carece de actividad exonucleasa 5'-3', posibilita que la polimerasa corrija los nucleótidos incorporados erróneamente. El uso de esta DNA polimerasa es recomendada en aquellas reacciones que

requieren una alta fiabilidad cuando los fragmentos no superan las 3 kb. Es por ello que fue utilizada en la preparación de las construcciones utilizadas en la generación de las plantas transgénicas.

Reacción:

H ₂ O miliQ autoclavada.....	6.75 µl
Oligonucleótido sentido 10 µM.....	0.5 µl
Oligonucleótido anti-sentido 10 µM.....	0.5 µl
Tampón de actividad 10 X.....	1 µl
Nucleótidos 10 mM.....	0.5 µl
Pfu (10 u/µL).....	0.25 µl

Se aporta a la reacción entre 1 y 2 µg aproximadamente de cDNA en un total de 10 µl

Programa de PCR:

1. Desnaturalización.....	2 min/95 °C
2. Desnaturalización.....	1 min/95 °C
3. Apareamiento.....	1 min/55 °C
4. Extensión.....	0.5 min por Kb/72 °C
Repetir 35 ciclos desde el paso 2	
Extensión final.....	7-10 min/72 °C

4.1.5 Extracción de RNA

Se utilizaron 100 mg de tejido de plántulas congelado en N₂ líquido y triturado en el equipo Tissue Lyzer, o bien en morteros de pilón.

La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando el kit *SpectrumTM Plant Total* de la marca Sigma.

4.1.6 Generación del cDNA a partir de RNA

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA total utilizando el kit *RETROscript*^R de la casa Ambion. El protocolo utilizado incluía una etapa de desnaturalización y el uso del primer Oligo dT.

En el caso que la pureza del cDNA sea crítica es recomendable realizar un tratamiento adicional con DNAsa utilizando el *Kit RNAsse Free DNAsse Set* de la firma comercial Qiagen.

En algunos casos el uso del primer Oligo dT fue reemplazado por primers específicos indicados en cada caso.

4.1.7 Purificación del DNA desde geles de agarosa

La banda de DNA es cortada con una hoja de bisturí y procesada con el Kit de *Nucleo Spin^R Gel and PCR Clean-up* de la casa Macherey - Nagel.

4.1.8 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las enzimas utilizadas fueron de la firma comercial Promega o New England Biolabs. Los DNAs de interés fueron digeridos siguiendo las instrucciones facilitadas por el suministrador y los fragmentos generados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.1.9 Ligación de DNA

Se utilizó la enzima *T4 DNA polimerase* de la firma Promega siguiendo las instrucciones facilitadas por el proveedor.

4.1.10 Secuenciación del DNA

Para la secuenciación de DNA se utilizó el Kit *Bigdye Terminator 3.1* de Applied Biosystems en Servicio de Secuenciación del CRAG.

4.1.11 Reacción de la *TOPO isomerasa*

Se utilizó el Kit *pENTRTM/D-TOPO[®] Cloning with One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E. coli* de Life Technologies, según las instrucciones del proveedor.

4.1.12 Sistema Gateway

Las reacciones LR se utilizaron con el Kit *Gateway[®] LR Clonase[®] II Enzyme mix* de Life Technologies, según las instrucciones del proveedor.

4.1.13 Cuantificación de niveles de expresión génica mediante qRT-PCR

Los niveles de expresión génica fueron cuantificados mediante qRT-PCR. La técnica requiere la extracción de RNA de las muestras de interés, síntesis de cDNA a partir de RNA y posterior cuantificación con el método de detección por fluoróforo no específico (*Sybr Green*) mediante el equipo *Light Cycler 480 Real-Time PCR System* (Servicio de Genómica del CRAG).

4.2 Técnicas de transferencia génica

4.2.1 Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas transgénicas se generaron utilizando el vector Gateway pEarlyGate 100 35S-Gateway-OCS 3' (CD3-724) introducido de *Agrobacterium tumefaciens* mediante transformación (apartado 3.2.2.).

1. Preparación del medio de Agroinfiltración

- Sembrar una estría de la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 transformada (a partir del cultivo congelado a -80 °C en glicerol 50 %) en una placa de medio YEB/agar con los antibióticos selectivos (rifampicina y ampicilina) y el antibiótico del vector binario introducido kanamicina. Incubar a 28 °C durante 2-3 días hasta obtener colonias aisladas.

-Inocular una colonia en 3 ml de medio YEB líquido con los antibióticos antes indicados e incubar en agitación a 180 rpm y 28 °C durante una noche.

-Inocular el cultivo anterior en 500 ml de medio YEB suplementado con los mismos antibióticos. Mantener durante una noche en agitación a 180 rpm y 28 °C.

-Transferir el cultivo a botellas de centrifuga de 500 ml, mantenerlos a 4 °C y centrifugar a 5.000xg durante 5 min y 4 °C.

-Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 300 ml de una solución que contiene 5.5 % de sacarosa (p/v), 0.2 % MgCl₂ y 0.5 % del detergente Silwet L-7 (v/v)

2. Transformación por inmersión floral (*floral deep*)

-Crecer unas 15 plantas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de día largos por cada línea transgénica que se desee generar, empleando 3 tiestos medianos y sembrando 5 plantas en cada uno de ellos

-Cortar las inflorescencias primarias cuando aparezcan.

-Después de 5 a 7 días de crecimiento de las inflorescencias secundarias, sumergir las plantas durante 1min en la suspensión que contiene la cepa de *A. tumefaciens* con el plásmido de interés. Agitar suavemente.

-Colocar las plantas horizontalmente sobre papel secante en bandejas y recubiertas con una película plástico (tipo *Saran Wrap*) para mantener la humedad. Estas bandejas se colocan en cámaras en penumbra y se mantienen durante un día o dos, hasta que las inflorescencias se curven buscando la luz.

-Seguidamente se retira el film transparente y las plantas se colocan en cámaras con condición de día largo para que completen su ciclo biológico y poder proceder a la recolección de las semillas. Estas plantas transformadas corresponden a la denominada generación T0.

4.2.2 Transferencia génica mediante microbombardeo

1. Preparación de los microproyectiles

- Pesar 30 mg de micropartículas de Tungsteno en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml
- Añadir 1 ml de etanol al 70 %. Agitar vigorosamente en un vórtex durante 3 a 5 min.
- Incubar durante 15 min a temperatura ambiente.
- Precipitar las micropartículas con un pulso de 5 seg en la microcentrífuga y eliminar el sobrenadante
- Añadir 1 ml de H₂O estéril y conservar a -20 °C para prevenir la oxidación

2. Precipitación del DNA sobre los microproyectiles

- Mantener las micropartículas en agitación en una plataforma vórtex durante 20 min con el fin de resuspender y romper los aglomerados de micropartículas que puedan existir
- Pasar 10 µl de suspensión de micropartículas a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml
- Mantener en agitación y añadir entre 1 y 2 µg de DNA plasmídico y 14 µl de Solución de precipitación (10 µl de CaCl₂ 2.5 M y 4 µl de espermidina 0.1 M)
- Mantener agitando en vórtex durante 5 min más.
- Dejar sedimentar las micropartículas durante 1 min.
- Dar un pulso de 5 seg en la microcentrífuga y eliminar el sobrenadante.
- Lavar con etanol al 70 % y retirar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado con etanol al 100 % y retirar el sobrenadante
- Resuspender las micropartículas con la ayuda de la micropipeta en 8 µl de etanol absoluto

3. Microbombardeo

Para evitar la contaminación entre muestras conviene esterilizar la zona y piezas de trabajo con etanol entre cada bombardeo.

-Colocar los 8 µl de las muestras de micropartículas recubiertas en el centro de una membrana portadora y esperar a que se evapore el etanol.

-Ajustar el regulador de la bombona de Helio a una presión de 1300 psi, unos 200 psi por encima de la soportada por el disco de ruptura

-Ajustar la membrana portadora correctamente orientada (las partículas deben quedar en la parte del tejido a bombardear) sobre el soporte metálico con la ayuda de la pieza roja diseñada para tal fin.

-Colocar una rejilla de parada en la plataforma. A continuación, colocar el soporte metálico con la membrana portadora.

-Colocar el disco de ruptura, previamente esterilizado con etanol absoluto y cerrar el montaje

-Colocar la plataforma con la membrana en el nivel 5, contando de abajo hacia arriba.

-Colocar la plataforma con la muestra vegetal dispuesta en un aplaca de agar 0.8 % en el nivel 2

-Cerrar la cámara de bombardeo y poner en marcha la bomba de vacío, conectar la cámara de bombardeo y accionar el interruptor en la posición de vacío (hacia arriba)

-La presión de vacío subirá. En el momento que llegue entre los 27 y 29 mm de Hg (0.06 atm), pasar el interruptor a la posición inferior, en la cual se mantendrá la presión de vacío

-Accionar rápidamente el interruptor de disparo y mantener presionado hasta escuchar que se ha realizado el disparo. La presión de Helio descenderá a cero. En este momento colocar el interruptor de vacío en la posición intermedia (de apagado)

-Recuperar la muestra, que presentará unas manchas negras producto del impacto de de las micropartículas tungsteno. Incubar 24 horas en

oscuridad a una temperatura de 22-24 °C para que tenga lugar la expresión de la construcción bombardeada

4.2.3 Agroinfiltración transitoria de plantas de *N. benthamiana*

- Sembrar una estría de la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 transformada (a partir del cultivo congelado a -80 °C en glicerol 50 %) en una placa de medio YEB/agar con los antibióticos selectivos (rifampicina y ampicilina) y el antibiótico del vector binario introducido kanamicina. Incubar a 28 °C durante 2-3 días hasta obtener colonias aisladas.

-Inocular la colonia en 5 ml de medio YEB líquido con los antibióticos antes mencionados e incubar en agitación a 180 rpm y 28 °C durante dos días.

-Transferir 2 ml del cultivo a tubos de microcentrífuga y centrifugar a 5.000 g durante 15 min.

-Resuspender los *Agrobacterium* con la solución de infiltración a una D.O. adecuada. En el presente trabajo fueron:

D.O. de 1 para las construcciones: 35.1:eYFP, 35.2:eYFP, eYFP:35.2 y 35.3:eYFP

D.O. de 0.25 para la construcción: eYFP

-Incubar a temperatura ambiente durante 3 a 5 horas.

-Mezclar en proporción 1:1 la suspensión de las cepas de *Agrobacterium* conteniendo las construcciones de interés con la cepa de *Agrobacterium* HcPro previamente preparada a la misma D.O.

- Infiltrar la mezcla de cepas *Agrobacterium* presionando suavemente la jeringa sobre el envés de la hoja con la ayuda de una jeringa de 1 ml (sin aguja).

-Marcar la zona infiltrada

- Mantener las plantas agroinfiltradas en condiciones de día largo.

-La fluorescencia de las proteínas de fusión fue observada en el microscopio espectral confocal Olympus FV1000 3 días después de la infiltración

Solución de infiltración:

MES.....	10 mM
MgCl ₂	10 mM
pH.....	5.7
Soln. de Acetosiringona.....	200 µM

La solución de Acetosiringona disuelta en etanol al 70 %, debe ser preparada en el momento

4.2.4 Co-infiltración con cepas de *Agrobacterium* portadoras de genes que codifican proteínas marcadoras de localización subcelular

- Preparar los cultivos de *Agrobacterium* siguiendo el protocolo anterior
- Resuspender los *Agrobacterium* a una D.O. adecuada. En el presente trabajo fueron:

D.O. de 1 para las construcciones 35.2:eYFP, eYFP:35.2 y marcador eCFP-peroxisomas

D.O. de 0.50 para la construcción del marcador eCFP-peroxisomas

D.O. de 0.25 para la construcción eYFP

- Incubar a temperatura ambiente durante 3 a 5 horas.
- Mezclar en proporción 1:1 cada una de las cepas de *Agrobacterium* conteniendo la construcción de interés con la cepa de *Agrobacterium* HcPro preparada a la misma D.O.
- Infiltrar la mezcla de cepas de *Agrobacterium* presionando suavemente la jeringa sobre el envés de la hoja con la ayuda de una jeringa de 1 ml (sin aguja).
- Marcar la zona infiltrada

- La fluorescencia de las proteínas fue observada en el microscopio espectral confocal Olympus FV1000 3 días después de la infiltración

4.3 Técnicas de manipulación de proteínas

4.3.1 Extracción de proteínas totales

- Triturar 25-100 mg de tejido de *Arabidopsis* congelado en N₂ líquido en un tubo de microcentrífuga. Alternativamente, el tejido se puede triturar utilizando el equipo TissueLyser (Qiagen).

- Añadir 20 µl de tampón de homogenización por cada 10 mg de tejido inicial y mantener en agitación durante 30 min a 4 °C.

- Centrifugar a 4 °C durante 5 min a 200 xg y recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.

- Repetir el punto 4 hasta asegurarse de que está suficientemente limpio, ya que el precipitado obtenido es muy poco compacto.

- Para la cuantificación de proteínas, se ha seguido el método espectrofotométrico de Bradford, usando el reactivo BioRad Protein Assay. Las medidas se realizaron en el Spectramax con la ayuda del programa Softmax Pro a una longitud de onda de 595 nm

- Congelar las muestras en N₂ líquido y conservar a -20 °C

Tampón de homogenización:

MgCl ₂	1 mM
KCl.....	10 mM
Sacarosa.....	10 % (p/v)
Tricina pH 7.5.....	0,1 M
EDTA.....	1 mM

A pH de 7.5 con KOH 1 N, conservar el tampón a 4 °C.

Esta solución fue completada con los siguientes componentes que se añaden al momento de uso:

Tritón X 100.....	0.2 %
DTT.....	1 mM
PMSF.....	100 µg/ml
E64.....	3 µg/ml
Mezcla de inhibidores proteasas SIGMA...	20 µl/ml

4.3.2 Análisis electroforético de proteínas (SDS-PAGE)

-Preparar los geles de poliacrilamida con el gel separador N°12 y el concentrador, en cristales de 1,5 mm de espesor y de 8 cm de alto x 10 cm de ancho

-Situarse el gel en el soporte correspondiente y este, a su vez, en la cubeta de electroforesis. Añadir tampón de electroforesis 1 X hasta sobrepasar los pozos

-Preparar las muestras previamente cuantificadas mediante el método de Bradford, agregando el volumen adecuado de tampón de muestra y Agua miliQ. Las muestras se desnaturalizaron calentando a 100 °C durante 2 min (practicar un agujero en el tapón del tubo) y seguidamente se sometieron a un pulso de centrifugación y guardaron en hielo

- Cargar las muestras con ayuda de una micropipeta o una pipeta Hamilton, dejando los carriles necesarios para cargar el volumen oportuno de marcador de pesos moleculares de proteínas

-Aplicar el voltaje apropiado para la separación de las proteínas: 10 mA por cada gel concentrador y 40 mA por cada gel separador

Tampón de electroforesis 10 X:

Trizma Base.....	0.25 M
Glicina.....	1.92 M
SDS.....	1 %
pH.....	< 8.7
H ₂ O miliQq.s.p.....	1 l

TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8:

Trizma Base.....	60.5 g
SDS.....	20 ml
H ₂ O miliQ q.s.p.....	1 l
Ajustar el pH a 6.8 con HCl	

TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8:

Trizma Base.....	181.5 g
SDS.....	20 ml
H ₂ O miliQq.s.p.....	1 l
Ajustar el pH a 8.8 con HCl	

Tampón de muestra 4 x:

Tris-HCl pH 6.8.....	250 mM
Glicerol.....	40 %
SDS.....	8 %
β-mercaptoetanol.....	4 %
Azul de bromofenol.....	0.02 %
H ₂ O miliQq.s.p.....	10 ml

Gel separador:

Tris 1.5 M; SDS 0.4 % pH 8.8.....	2.5 ml
Acilamida 30 %.....	4 ml
SDS 10 % (p/v).....	70 µl
APS 10 % (p/v).....	50 µl
TEMED.....	6.65 µl
H ₂ O miliQq.s.p.....	3.4 ml

Gel separador:

Tris 1.5 M; SDS 0.4 % pH 8.8.....	2.5 ml
Acilamida 30 %.....	4 ml
SDS 10 % (p/v).....	70 µl
APS 10 % (p/v).....	50 µl
TEMED.....	6.65 µl
H ₂ O miliQq.s.p.....	3.4 ml

Gel apilador:

Tris 0.5 M; SDS 0.4 % pH 6.8.....	750 µl
Acilamida 30 %.....	390 ml
SDS 10 % (p/v).....	15 µl
APS 10 % (p/v).....	15 µl
TEMED.....	3 µl
H ₂ O miliQq.s.p.....	3.47 ml

El persulfato de amonio (APS) se prepara en el momento en H₂O, o bien se preparan alícuotas y se congela a -20° C.

4.3.3 Análisis mediante Western-blot

-Recuperar el gel, descartar el gel apilador y lavar en solución de transferencia durante 10 min.

-En paralelo, sumergir un fragmento de membrana de PVDF de igual tamaño que el gel separador en Metanol absoluto durante 10 seg un fragmento de membrana de PVDF de igual tamaño que el gel separador. Eliminar el metanol sobrante lavando con agua durante 1 min y finalmente mantener la membrana en solución de transferencia hasta que el equipo esté ensamblado. Mantener en agitación suave constante.

-Realizar la transferencia utilizando el sistema de BioRad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell. El sistema consta de un cassette donde se mantiene la membrana íntimamente en contacto con el gel recubriendo el conjunto por ambos lados con 3 hojas de papel Whatmann 3 mm y una esponja. A la hora de poner en contacto el gel y la membrana se debe evitarla formación de burbujas de aire.

-El proceso de transferencia dura 2 horas aplicando un voltaje constante de 400 mA. Mantener la temperatura del sistema homogénea mediante agitación constante de la solución a 4 °C.

- Recuperar la membrana y lavar con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear los posibles sitios de unión inespecífica del anticuerpo primario en la membrana

-Incubar la membrana durante toda una noche a 4 °C con la dilución adecuada de anticuerpo primario en solución de bloqueo. Se utilizaron las siguientes diluciones: Anticuerpo Anti-DXR: 1/5000

Anticuerpo Anti-DXS: 1/1000

Anticuerpo Anti-Actina: 1/2500

-Realizar tres lavados de la membrana con PBS-Tween 0.5 % de 5 min cada uno e incubar con solución de bloqueo conteniendo la dilución adecuada de anticuerpo secundario. Se utilizó anticuerpo anti-IgG de conejo unido a la peroxidasa de rábano a una dilución de 1/5000 para los anticuerpos primarios Anti-DXR y Anti-DXS. Para Anti-Actina se utilizó anticuerpo Anti-IgG de ratón a dilución 1/80.000.

-Realizar tres lavados con PBS-Tween 0.5 % de 5 min cada uno y uno último en PBS1X otros 5 min

-Para el proceso de detección incubar la membrana durante 5 min protegida de la luz en un volumen suficiente de los reactivos del sistema de detección (ECL + Plus de *GE Healthcare Life Sciences*), preparados según las proporciones descritas por el proveedor.

-A continuación, visualizar la quimioluminiscencia con el programa "LAS-4000 luminiscent image analyser" (*Fujifilm*) a diferentes tiempos (normalmente entre unos pocos segundos y 30 min como máximo) hasta obtener una señal y contraste óptimos de la imagen.

Solución de transferencia:

Trizma Base.....	5.82 g
Glicina.....	2.93 g
MetOH.....	200 ml
SDS 10 %.....	3.75 ml
H ₂ O miliQq.s.p.....	1 l

PBS 1 X pH 7.6:

Na ₂ HPO ₄	80 mM
NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl.....	10 mM
H ₂ O miliQ q.s.p.....	1 l

PBS 1 X + Tween 0.5 %:

PBS 1 X pH 7.6.....	1 l
Tween-20.....	0.5 %

Solución de Bloqueo:

PBS 1 X pH 7.6.....	1 l
Tween-20.....	0.5 %
Leche en polvo.....	5 %

4.3.4 Tinción de proteínas

La tinción del gel y la membrana de transferencia es de gran ayuda para observar la eficiencia de la transferencia, la integridad de la proteína y la normalización en la carga entre los diferentes carriles.

- Colocar el gel en solución Coomassie durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. En el caso de la membrana durante 10 segundos
- Desteñir el gel en solución de destinción 1 X durante 1 hora o toda la noche y la membrana durante 30 min o toda la noche. Reemplazando el líquido de lavado correspondiente cuantas veces sea necesario hasta que la relación entre la intensidad de las bandas y el ruido de fondo resulte óptima. Prolongar el lavado con agua destilada.

Solución de coomassie:

Azul brillante de Coomassie.....	0.6 %
Metanol.....	100 ml
Ácido acético glacial.....	25 ml
H2O destilada q.s.p.....	250 ml

Solución de destinción 5 X:

Ácido acético glacial 7 %.....	700 ml
Metanol 5 %.....	500 ml
Agua destilada q.s.p.....	2 l

4.4 Métodos de microscopía e imagen

4.4.1 Microscopía láser confocal

Para la detección de las proteínas de fusión Green Fluorescent Protein (GFP), Yellow Fluorescent Protein (YFP), Cyan Fluorescent Protein (CFP) y la clorofila en los experimentos de localización subcelular se utilizó el microscopio

espectral confocal Olympus FV1000 con microscopio invertido, el objetivo 60 x U-PlanSApo 60 x/1.2 w de inmersión en agua y el filtro de Fluorescencia FITC.

Para la detección de las diferentes fluorescencias se empleó el Láser de iones de Argón a diferentes emisiones para excitar según la fluorescencia. Para la GFP la excitación fue de 488nm y la ventana de emisión se fijó entre 500 y 550 nm, para la visualización de la YFP 515 nm de excitación y entre 530 y 585 de emisión, la excitación de la CFP fue de 458 nm y la ventana de emisión de 465 a 500 nm. Por último para la autofluorescencia la clorofila la excitación fue de 515 nm y la emisión se fijó entre 640 y 680 nm.

4.4.2 Microscopía electrónica

Para el estudio de la morfología cloroplastídica del mutante *rif35* se empleó Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), haciendo uso del microscopio electrónico de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

Las muestras fueron cortadas en pequeños rectángulos de 1 mm² aproximadamente y fijadas al vacío en una solución que contenía 2 % de paraformaldehído, 2,5 % de glutaraldehído y tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) durante al menos 24 horas a 4 °C. Pasado este tiempo se lavaron en tampón fosfato 0,1 M y fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1 %. Esto fue seguido por deshidratación en acetona y la incrustación en resina de Spurr, a partir del cual se obtuvieron las secciones semifinas utilizando el ultramicrotom Ultracut E Reichert-Jung. Dichas secciones se tiñeron con azul de metileno para localizar el área de interés y, a continuación, se obtuvieron los cortes ultrafinos con una cuchilla de diamante (Diatome) que fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron observadas con el microscopio Jeol JEM 1010 TEM operado a 80 kV y las imágenes captadas usando una cámara Bioscan de Gatan.

4.5 Fotografía e imagen

Para el registro de experimentos y el estudio de los fenotipos de las plantas se utilizó la cámara *Nikon D7000* acoplada a los objetivos AF-S NIKKOR 18-70 mm 1:3.5-4.5 G y AF-S MICRO NIKKOR 105 mm 1:2.8 G.

Para la captura de imágenes de membranas de Western Blot se utilizó el equipo *LAS 4000*.

4.6 Software y base de datos

Los principales programas informáticos y bases de datos utilizados se resumen en la tabla 6.

Software	Aplicación
Multigauge	Análisis de imagen (Western blot).
Vector NTI	Alineamientos y análisis de secuencias.
Bio Edit	Análisis de secuencias.
<i>Olympus Fluoview FV10-ASW 2.0 Viewer</i>	Imágenes en microscopía láser confocal.
Light Cycler 480	Análisis de CTs QRT-PCR y QRT-PCR con Sondas Taqman.
Base de datos	
www.ncbi.nlm.nih.gov	“National Center for Biotechnology Information” utilizando las herramientas: PubMed, para la búsqueda bibliográfica.
	Nucleotide, para la de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos relacionadas con la investigación.
	BLAST, para el alineamiento entre secuencias conocidas o con las depositadas en bancos de secuencias.
www.arabidopsis.org	The Arabidopsis information Resource.
http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi	Arabidopsis eFP Browser, consultar los patrones de expresión del gen de interés.
http://www.bioinformatics.org/sms2/trans_map.html	Traducción de secuencias de DNA en diferentes pautas de lectura posibles de proteínas.
tools.neb.com/NEBcutter2/	NEBcutter V 2.0 búsqueda de sitios de enzimas de restricción presentes en la secuencia de estudio.
http://insilico.ehu.es/translate/	Traducción de secuencias de DNA en Proteína
http://sites.bio.indiana.edu/~pikaardlab/pEarleyGate%20plasmid%20vectors%20copy/Table%20of%20vectors.html	Características y mapa de los vectores pEarlyGate.
www.expasy.org/	Análisis de secuencias de proteínas y estructuras del Swiss Institute of Bioinformatic (SIB).
www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Alineamiento de secuencias de DNA y proteína
www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	Boxshade visualización de alineamientos de secuencias de DNA y proteínas.

Tabla 6 Programas y bases de datos utilizados

Nombre	Secuencia	Dirección
Generales		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Forward
T3	ATTAACCTCACTAAAGGGA	Reverse
M13FW	GTAAAACGACGGCCAG	Forward
M13RV	CAGGAAACAGCTATGAC	Reverse
ATTB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAA	Forward
ATTB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAA	Reverse
2X35S	CTTCGCAAGACCCTTCC	Forward
Genotipados		
g35aF	CATAATCGAGGATCATTTATAACC	Forward
g35aR	CTACGCTAGAATCCTAAGAGC	Reverse
ATC12	TTGGGCGGGTCCAGGG	Forward
g35bF	TTATGGCATCACGATATGCG	Forward
g35bR	GTCTCTGTAAATGAACCTTACG	Reverse
g35aF2	CTTGTCTCCTACGTCACGTCATC	Forward
g35aF3	CTCAACGAGGGCCACAAATA	Forward
g35aR2	CAGCTCTGTTAGCAGCGAAGC	Reverse
g35aR3	GATGACGTGACGTAGGAGACAAG	Reverse
KO35F	TTCAGAATCATAGATTGGACC	Forward
KO35R	AGAATAGCTTCTTGTTTTAGGC	Reverse
LB1Sail	GCCTTTTCAGAAATGGATAAAT	Reverse
Expresión del gen en el mutante KO		
KO35 IF	TGATTTCAGATGACCAGTGTCTC	Forward
KO35 IR	AGTAAAACGTTTCTGTATGAAGG	Reverse
KO35 FF	GTCGACAATTTCTCGAGTGAAG	Forward
KO35 FR	ATTTACAAGGTAGCCTGTATGTC	Reverse
Cuantificación de variantes de splicing mediante colonias		
rif35allsplicingF	CAATCTCATCGCTCAGTGACT	Forward
rif35allsplicingR	AGGGACACTGAGATTGAGAAAAC	Reverse
Localización subcelular		
RIF35TPF	ATCACCATGGCCAGTGTCTCCGTCG	Forward
RIF35TPR	GACGTGACGGAATCGGTAGCGAGCTCG	Reverse
TPRIF35.1Y3F	CACCATGACCAGTGTCTCCG	Forward
TPRIF35.1Y3R	CCATTTACAAGGTAGCCTGTATGTCC	Reverse
TPRIF35.2S/TGAF	CACCATGATCCGGAGCTCC	Forward
TPRIF35.2S/TGAR	CCATTTACAAGGTAGCCTGTATGTCC	Reverse
TPRIF35.2C/TGAF	CACCTATGATCCGGAGCTCC	Forward
TPRIF35.2C/TGAR	TCATTTACAAGGTAGCCTGTATGTCC	Reverse
Gateway topo		
rif35topoF	CACCATGACCAGTGTCTCCGT	Forward
rif35topoR	AGGGACACTGAGATTGAGAAAAC	Reverse
RT específica		
RT2	CTCAAGCTCATATAACTCGGAATC	Reverse

Tabla 7 Primers utilizados durante esta investigación

Gen	AGI	Primer QRT-PCR F	Primer QRT-PCR R	Sondas
QRT-PCR				
DXR	At5g62790	AGTAGCGGATGCGTTGAAGC	GCGGATGAATGACAATCTCTATATCG	--
DXS	At4g15560	TCGCAAAGGGTATGACAAAAG	CAGTCCCGCTTATCATTC	--
ACT2	At3g18780	GATTCAGATGCCCCAGAAAGTCTTG	TGGATTCCAGCAGCTTCCAT	--
QRT-PCR con Sondas Taqman				
35.1	At1g73470.1	GTTGCCCATTTCTAGTCATCT	TAGCTGTTTCTCCGCC	CTGAACAAGCTTTCCTCAAATTCCTAGAAC
35.2	At1g73470.2	AGTGTCTCTCCATAGGTTTCATC	TAGCTGTTTCTCCGCC	AACCGTTTCGTTTTTTTTTGCTCTTCG
35.3	At1g73470.3	GACTACGCTAGAATCCTAAGAGCAA	AAGGTAGCCTGTATGTCCTGG	ACAGGATTGTTTTGTTTTGCAGATTCC
ACT2	At3g18780	CACGATTGGTGCTGAGAGAT	GGATTCCAGCAGCTTCC	TCTTGTCCAGCCCTCGTTTGTG

Tabla 8 Primers utilizados para qRT-PCR y qRT-PCR con Sondas TaqMan

ANEXOS

ANEXO A

1 Secuencia de nucleótidos de los cDNAs *RIF35.1*, *RIF35.2* y *RIF35.3* del locus At1g73470

1.1 *RIF35.1*

```
1 AAATTTAAAC AAAAAAACT TAGAAGAGAA ACAATCTCAT CGCTCAGTGA
51 CTGATTCAGA TGACCAGTGT CTCCGTCGCC GTCGTAGCTC CTCCGCATCG
101 TTGCCATTTC TCTAGTCATC TGAATCTGAA CAAGCTTTCT CTTCAAATTC
151 CTAGAACCGG CTGGCGGAGG AAACAGCTAG GGTTCGCTTT AGCTTCTACT
201 GCGGCTTCAG AATCGCCATC GGAAGCTACA TATGATCCGG AGCTCCGTTT
251 AGTTTTCGAG CTCGCTACCG ATTCCGAGTT ATATGAGCTT GAGAAAATCC
301 TTTTTGGTCC CAGCTACTTC AGCCCTTTCG TGAAATCAAT CCCAAACAAA
351 GGAGGAGGTG ACCGGCTTAT GATAGGCCAA GACATTGAAG TGCGAGATGG
401 TTTTATCGAA GCTCTTGAAT CGAGATTCTT GTTTCTAGCT GCAGATGCTC
451 GTTCAACACT CAGGGGTTGG AGGCCTTCAT ACAGAAACGT TTTACTTGCG
501 GTGAGAAATA ATTTGAATAT TCCCTGCTCC AGCCAATTGC CAACCGAAGA
551 CCTAGAAGCA GAGATTTTTTC TTTATCTTGT CGACAATTTTC TCGAGTGAAG
601 CATCAGGGGT TTTTCCAGGC ATGTGGGAAA ATTCTGAAGT CTCAGAGGCA
651 GAGGGAAGCT TAGAACTCGG GCTCAGTAAA TGGAAAGTTG AACTACTTGC
701 CGCACTACAA GTGGGTGCTA CAGAGGTCCA ATCTATGATT CTGAAGGGTG
751 GTGGCATGAT CACATTCGCC AAAGTTTATC AGTTGTTGGC TAAGAAACTA
801 TCTGAAAAG TATTCCTTGA AGCTGCCAAC TACCAGATTA GGAAAGAGAT
851 GCTAAAAAAG GGTGGGCAGT TTGCTGCCAT TAACTTGGA TCTCGAGCAG
901 CTCTGTTAGC AGCGAAGCAT GGATTTGCAG GGGCTGCATC CAGATACATT
951 GGCTTAAAAA CAGCGATGCA ATTACTTGGC CCCATGATGT GGGGGACATT
1001 ACTGGCTGAC TTAGTGATTC AGATGCTCGA GACTGACTAC GCTAGAATCC
1051 TAAGAGCAAT TTACGCATTT GCACAGATTC GGATCACCAG GACATACAGG
1101 CTACCTTGTA AATGAGTAA CAGTTTGTTT TCTCAATCTC AGTGTCCCTA
1151 CGAACTATGT CGGTAAACAA TGTTTTTCAC ACTCGTATAA TTCGCTTGTG
1201 GTTGAAATCA AA
```

1.2 RIF35.2

```
1 AAATTTAAAAC AAAAAAAACT TAGAAGAGAA ACAATCTCAT CGCTCAGTGA
51 CTGATTCAGA TGACCAGTGT CTCCGTCGCC GTCGTAGCTC CTCCGCATCG
101 TTGCCATTTC TCTAGTCATC TGAATCTGAA CAAGCTTTCT CTTCAAGTAG
151 TAATCTTTCT CTCTCTTCTA TCTATCTCAC TCTCTCAGTG TGTCTCTCCA
201 TAGGTTTTCAT CTTCCCAACC GTTTCGTTTT TTTTGTCTCT TCGGTTGTGA
251 TTTTGAAGAT TCCTAGAACC GGCTGGCGGA GGAAACAGCT AGGGTTTGCT
301 TTAGCTTCTA CTGCGGCTTC AGAATCGCCA TCGGAAGCTA CATATGATCC
351 GGAGCTCCGT TTAGTTTTCG AGCTCGCTAC CGATTCCGAG TTATATGAGC
401 TTGAGAAAAT CCTTTTTGGT CCCAGCTACT TCAGCCCTTT GCTGAAATCA
451 ATCCCAAACA AAGGAGGAGG TGACCGGCTT ATGATAGGCC AAGACATTGA
501 AGTGCGAGAT GGTTTTATCG AAGCTCTTGA ATCGAGATTC TTGTTTCTAG
551 CTGCAGATGC TCGTTCAACA CTCAGGGGTT GGAGGCCTTC ATACAGAAAC
601 GTTTTACTTG CGGTGAGAAA TAATTTGAAT ATTCCCTGCT CCAGCCAATT
651 GCCAACCGAA GACCTAGAAG CAGAGATTTT TCTTTATCTT GTCGACAATT
701 TCTCGAGTGA AGCATCAGGG GTTTTTCCAG GCATGTGGGA AAATTCTGAA
751 GTCTCAGAGG CAGAGGGAAG CTTAGAACTC GGGCTCAGTA AATGGAAAGT
801 TGAACTACTT GCCGCACTAC AAGTGGGTGC TACAGAGGTC CAATCTATGA
851 TTCTGAAGGG TGGTGGCATG ATCACATTCG CCAAAGTTTA TCAGTTGTTG
901 GCTAAGAAAC TATCTGGAAA AGTATTCCTT GAAGCTGCCA ACTACCAGAT
951 TAGGAAAGAG ATGCTAAAAA AGGGTGGGCA GTTTGTCTGCC ATTA ACTTGG
1001 AATCTCGAGC AGCTCTGTTA GCAGCGAAGC ATGGATTTGC AGGGGCTGCA
1051 TCCAGATACA TTGGCTTAAA AACAGCGATG CAATTACTTG GCCCATGAT
1101 GTGGGGGACA TTA CTGGCTG ACTTAGTGAT TCAGATGCTC GAGACTGACT
1151 ACGCTAGAAT CCTAAGAGCA ATTTACGCAT TTGCACAGAT TCGGATCACC
1201 AGGACATACA GGCTACCTTG TAAATGAAGT AACAGTTTGT TTTCTCAATC
1251 TCAGTGTCCC TACGAACTAT GTCGGTAAAC AATGTTTTTC AACTCGTAT
1301 AATTCGCTTG TGTTGAAAT CAAA
```

1.3 RIF35.3

```

1 AAATTTAAAAC AAAAAAAACT TAGAAGAGAA ACAATCTCAT CGCTCAGTGA
51 CTGATTCAGA TGACCAGTGT CTCCGTCGCC GTCGTAGCTC CTCCGCATCG
101 TTGCCCATTC TCTAGTCATC TGAATCTGAA CAAGCTTTCT CTTCAAATTC
151 CTAGAACCGG CTGGCGGAGG AAACAGCTAG GGTTTGCTTT AGCTTCTACT
201 GCGGCTTCAG AATCGCCATC GGAAGCTACA TATGATCCGG AGCTCCGTTT
251 AGTTTTTCGAG CTCGCTACCG ATTCCGAGTT ATATGAGCTT GAGAAAATCC
301 TTTTTGGTCC CAGCTACTTC AGCCCTTTCG TGAAATCAAT CCCAAACAAA
351 GGAGGAGGTG ACCGCTTAT GATAGGCCAA GACATTGAAG TGCGAGATGG
401 TTTTATCGAA GCTCTTGAAT CGAGATTCTT GTTTCTAGCT GCAGATGCTC
451 GTTCAACACT CAGGGGTGAG AGGCCTTCAT ACAGAAACGT TTTACTTGCG
501 GTGAGAAATA ATTTGAATAT TCCCTGCTCC AGCCAATTGC CAACCGAAGA
551 CCTAGAAGCA GAGATTTTTT TTTATCTTGT CGACAATTTT TCGAGTGAAG
601 CATCAGGGGT TTTTCCAGGC ATGTGGGAAA ATTCTGAAGT CTCAGAGGCA
651 GAGGGAAGCT TAGAACTCGG GCTCAGTAAA TGGAAAGTTG AACTACTTGC
701 CGCACTACAA GTGGGTGCTA CAGAGGTCCA ATCTATGATT CTGAAGGGTG
751 GTGGCATGAT CACATTCGCC AAAGTTTATC AGTTGTTGGC TAAGAAACTA
801 TCTGAAAAG TATTCCTTGA AGCTGCCAAC TACCAGATTA GGAAAGAGAT
851 GCTAAAAAAG GGTGGGCAGT TTGCTGCCAT TAACTTGGA TCTCGAGCAG
901 CTCTGTTAGC AGCGAAGCAT GGATTTGCAG GGGCTGCATC CAGATACATT
951 GGCTTAAAAA CAGCGATGCA ATTACTTGGC CCCATGATGT GGGGGACATT
1001 ACTGGCTGAC TTAGTGATTC AGATGCTCGA GACTGACTAC GCTAGAATCC
1051 TAAGAGCAAT TTACGCATTT GCACAGGATT GTTTTGTTTT GCAGATTCGG
1101 ATCACCAGGA CATA CAGGCT ACCTTGTAAG TGAAGTAACA GTTTGTTTTT
1151 TCAATCTCAG TGTCCCTACG AACTATGTCG GTAAACAATG TTTTTCACAC
1201 TCGTATAATT CGCTTGTGGT TGAAATCAAA TTAGACGTTA CTC

```


BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Banerjee, A., y T. D. Sharkey. 2014. "Methylerythritol 4-Phosphate (Mep) Pathway Metabolic Regulation." *Nat Prod Rep* 31, no. 8 (Aug): 1043-55. <http://dx.doi.org/10.1039/c3np70124g>.
- Botella-Pavia, P., et al. 2004. "Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Plants: Evidence for a Key Role of Hydroxymethylbutenyl Diphosphate Reductase in Controlling the Supply of Plastidial Isoprenoid Precursors." *Plant J* 40, no. 2 (Oct): 188-99. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02198.x>.
- Bouvier, F., A. Rahier, y B. Camara. 2005. "Biogenesis, Molecular Regulation and Function of Plant Isoprenoids." In *Prog Lipid Res*, vol 44, 357-429. England.
- Burlat, V., et al. 2004. "Co-Expression of Three Mep Pathway Genes and Geraniol 10-Hydroxylase in Internal Phloem Parenchyma of *Catharanthus Roseus* Implicates Multicellular Translocation of Intermediates During the Biosynthesis of Monoterpene Indole Alkaloids and Isoprenoid-Derived Primary Metabolites." *Plant J* 38, no. 1 (Apr): 131-41. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02030.x>.
- Cairó, Albert. 2009. "Anàlisi Molecular De La Biosíntesi D'isoprenoides a *Arabidopsis*." Universitat de Barcelona.
- Carretero-Paulet, L., et al. 2002. "Expression and Molecular Analysis of the *Arabidopsis* Dxr Gene Encoding 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, the First Committed Enzyme of the 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway." *Plant Physiol* 129, no. 4 (Aug): 1581-91. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.003798>.
- Carretero-Paulet, L., et al. 2006. "Enhanced Flux through the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway in *Arabidopsis* Plants Overexpressing Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerase." *Plant Mol Biol* 62, no. 4-5 (Nov): 683-95. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-006-9051-9>.

- Carretero-Paulet, L., et al. 2013. "Functional and Evolutionary Analysis of Dxl1, a Non-Essential Gene Encoding a 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase Like Protein in *Arabidopsis Thaliana*." *Gene* 524, no. 1 (Jul 15): 40-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.071>.
- Cordoba, E., M. Salmi, y P. Leon. 2009. "Unravelling the Regulatory Mechanisms That Modulate the Mep Pathway in Higher Plants." *J Exp Bot* 60, no. 10: 2933-43. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erp190>.
- Croteau, Rodney, Toni M Kutchan, y Norman G Lewis. 2000. "Natural Products (Secondary Metabolites)." *Biochemistry and molecular biology of plants* 24: 1250-1319.
- Earley, K. W., et al. 2006. "Gateway-Compatible Vectors for Plant Functional Genomics and Proteomics." *Plant J* 45, no. 4 (Feb): 616-29. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x>.
- Eisenreich, W., F. Rohdich, y A. Bacher. 2001. "Deoxyxylulose Phosphate Pathway to Terpenoids." *Trends Plant Sci* 6, no. 2 (Feb): 78-84.
- Flores-Perez, U., et al. 2010. "Pleiotropic Regulatory Locus 1 (Pr1) Integrates the Regulation of Sugar Responses with Isoprenoid Metabolism in *Arabidopsis*." *Molecular Plant* 3, no. 1: 101-112. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssp100>.
- Flores-Perez, U., et al. 2008. "A Mutant Impaired in the Production of Plastome-Encoded Proteins Uncovers a Mechanism for the Homeostasis of Isoprenoid Biosynthetic Enzymes in *Arabidopsis* Plastids." *Plant Cell* 20, no. 5 (May): 1303-15. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.108.058768>.
- Fraser, Paul D, y Peter M Bramley. 2004. "The Biosynthesis and Nutritional Uses of Carotenoids." *Progress in lipid research* 43, no. 3: 228-265.
- Guevara-Garcia, A., et al. 2005. "Characterization of the *Arabidopsis* Clb6 Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway." *Plant Cell* 17, no. 2 (Feb): 628-43. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.028860>.

- Guggisberg, Ann M, Rachel E Amthor, y Audrey R Odom. 2014. "Isoprenoid Biosynthesis in Plasmodium Falciparum." *Eukaryotic cell* 13, no. 11: 1348-1359.
- Hemmerlin, A., J. L. Harwood, y T. J. Bach. 2012. "A Raison D'etre for Two Distinct Pathways in the Early Steps of Plant Isoprenoid Biosynthesis?" *Prog Lipid Res* 51, no. 2 (Apr): 95-148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.001>.
- Hemmerlin, A., et al. 2003. "Cross-Talk between the Cytosolic Mevalonate and the Plastidial Methylerythritol Phosphate Pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells." *J Biol Chem* 278, no. 29 (Jul 18): 26666-76. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M302526200>.
- Hemmerlin, Andréa. 2013. "Post-Translational Events and Modifications Regulating Plant Enzymes Involved in Isoprenoid Precursor Biosynthesis." *Plant Science* 203: 41-54.
- Hsieh, M. H., y H. M. Goodman. 2005. "The Arabidopsis Isph Homolog Is Involved in the Plastid Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis." *Plant Physiol* 138, no. 2 (Jun): 641-53. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.058735>.
- Hu, J., et al. 2012. "Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function." In *Plant Cell*, vol 24, 2279-303. United States.
- Kasahara, H., et al. 2002. "Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in Arabidopsis." *J Biol Chem* 277, no. 47 (Nov 22): 45188-94. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M208659200>.
- Kaur, N., y J. Hu. 2011. "Defining the Plant Peroxisomal Proteome: From Arabidopsis to Rice." *Front Plant Sci* 2: 103. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2011.00103>.
- Kobayashi, K., et al. 2007. "Lovastatin Insensitive 1, a Novel Pentatricopeptide Repeat Protein, Is a Potential Regulatory Factor of Isoprenoid Biosynthesis in Arabidopsis." In *Plant Cell Physiol*, vol 48, 322-31. Japan.

- Komori, R., et al. 2009. "Identification of Tyrosylprotein Sulfotransferase in *Arabidopsis*." In *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol 106, 15067-72. United States.
- Kuzuyama, Tomohisa, et al. 1998. "Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis." *Tetrahedron Letters* 39, no. 43 (10/22/): 7913-7916. [http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)01755-9](http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(98)01755-9).
- Laule, O., et al. 2003. "Crosstalk between Cytosolic and Plastidial Pathways of Isoprenoid Biosynthesis in *Arabidopsis Thaliana*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, no. 11 (May 27): 6866-71. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1031755100>.
- Lichtenthaler, H. K. 1999. "The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50 (Jun): 47-65. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.47>.
- Lichtenthaler, H. K., et al. 2000. "The Non-Mevalonate Isoprenoid Biosynthesis of Plants as a Test System for New Herbicides and Drugs against Pathogenic Bacteria and the Malaria Parasite." *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal Of Biosciences* 55, no. 5-6: 305-313.
- Lichtenthaler, Hartmut K., Michel Rohmer, y Jörg Schwender. 1997. "Two Independent Biochemical Pathways for Isopentenyl Diphosphate and Isoprenoid Biosynthesis in Higher Plants." *Physiologia Plantarum* 101, no. 3: 643-652. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01049.x>.
- Matsue, Y., et al. 2010. "The Herbicide Ketoclozazole Inhibits 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase in the 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway and Shows Antibacterial Activity against *Haemophilus Influenzae*." *J Antibiot (Tokyo)* 63, no. 10 (Oct): 583-8. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2010.100>.
- Mora, Camilo, et al. 2011. "How Many Species Are There on Earth and in the Ocean?" *PLoS Biol* 9, no. 8: e1001127. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>.

- Nagata, N., et al. 2002. "Mevalonic Acid Partially Restores Chloroplast and Etioplast Development in Arabidopsis Lacking the Non-Mevalonate Pathway." *Planta* 216, no. 2 (Dec): 345-50. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-002-0871-9>.
- Okada, Kazunori, et al. 2002. "Antisense and Chemical Suppression of the Nonmevalonate Pathway Affects Ent-Kaurene Biosynthesis in Arabidopsis." *Planta* 215, no. 2 (2002/06/01): 339-344. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-002-0762-0>.
- Perez-Gil, Jordi, et al. 2012. "Mutations in Escherichia Coli Acee and Ribb Genes Allow Survival of Strains Defective in the First Step of the Isoprenoid Biosynthesis Pathway." *PloS one* 7, no. 8: e43775.
- Phillips, Michael A, et al. 2008. "The Plastidial Mep Pathway: Unified Nomenclature and Resources." *Trends in plant science* 13, no. 12: 619-623.
- Pruitt, R. E., y E. M. Meyerowitz. 1986. "Characterization of the Genome of Arabidopsis Thaliana." *J Mol Biol* 187, no. 2 (Jan 20): 169-83.
- Pulido, Pablo, et al. 2013. "Arabidopsis J-Protein J20 Delivers the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway to Protein Quality Control." *The Plant Cell Online* 25, no. 10: 4183-4194.
- Pérez-Massot, Eduard. 2010. "Identificació I Caracterizació De Nous Mecanismes Reguladors De La Ruta Del Mep En *Arabidopsis Thaliana*: Anàlisi Fenotípic I Molecular Dels Mutants Rif33 Y Rif35 " Universitat Autònoma de Barcelona.
- Rodríguez-Concepción, M., y A. Boronat. 2002. "Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics." *Plant Physiol* 130, no. 3 (Nov): 1079-89. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.007138>.

- Rodríguez-Concepción, M., et al. 2004. "Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors During Arabidopsis Seedling Development." *Plant Cell* 16, no. 1 (Jan): 144-56. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.016204>.
- Rodríguez-Concepción, M., et al. 2000. "Carboxyl-Methylation of Prenylated Calmodulin Cam53 Is Required for Efficient Plasma Membrane Targeting of the Protein." *Plant J* 24, no. 6 (Dec): 775-84.
- Rodríguez-Concepción, M. 2004. "The Mep Pathway: A New Target for the Development of Herbicides, Antibiotics and Antimalarial Drugs." *Curr Pharm Des* 10, no. 19: 2391-400.
- Rodríguez-Concepción, Manuel, y Albert Boronat. 2015. "Breaking New Ground in the Regulation of the Early Steps of Plant Isoprenoid Biosynthesis." *Current opinion in plant biology* 25: 17-22.
- Rodríguez-Concepción, Manuel, et al. 2013. "Biosynthesis of Isoprenoid Precursors in Arabidopsis." In *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms*, 439-456: Springer.
- Rohmer, M. 1999. "The Discovery of a Mevalonate-Independent Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria, Algae and Higher Plants." *Nat Prod Rep* 16, no. 5 (Oct): 565-74.
- Sauret-Güeto, Susanna, et al. 2006a. "Plastid Cues Posttranscriptionally Regulate the Accumulation of Key Enzymes of the Methylerythritol Phosphate Pathway in Arabidopsis." *Plant physiology* 141, no. 1: 75-84.
- Sauret-Güeto, Susanna, et al. 2006b. "A Mutant Pyruvate Dehydrogenase E1 Subunit Allows Survival of Escherichia Coli Strains Defective in 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase." *FEBS letters* 580, no. 3: 736-740.
- Schwarz, Matthias. 1994. "Terpen-Biosynthese in Ginkgo Biloba: Eine Überraschende Geschichte Von Matthias Kaspar Schwarz." Zurich University.

- Sjögren, Lars L. E., et al. 2006. "Structural and Functional Insights into the Chloroplast Atp-Dependent Clp Protease in Arabidopsis." *The Plant Cell* 18, no. 10 (06/05/received 07/18/revised 08/22/accepted): 2635-2649. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.106.044594>.
- Tang, Jianwei, et al. 2010. "The Mitochondrial Ppr Protein Lovastatin Insensitive 1 Plays Regulatory Roles in Cytosolic and Plastidial Isoprenoid Biosynthesis through Rna Editing." *The Plant Journal* 61, no. 3: 456-466.
- Tani, Helen, et al. 2004. "Activation Tagging in Plants: A Tool for Gene Discovery." *Functional & integrative genomics* 4, no. 4: 258-266.
- Thomas, S., y D. A. Fell. 1998. "The Role of Multiple Enzyme Activation in Metabolic Flux Control." *Adv Enzyme Regul* 38: 65-85.
- Thulasiram, Hirekodathakallu V., Hans K. Erickson, y C. Dale Poulter. 2007. "Chimeras of Two Isoprenoid Synthases Catalyze All Four Coupling Reactions in Isoprenoid Biosynthesis." *Science* 316, no. 5821: 73-76. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1137786>.
- Valvekens, D., M. V. Montagu, y M. Van Lijsebettens. 1988. "Agrobacterium Tumefaciens-Mediated Transformation of Arabidopsis Thaliana Root Explants by Using Kanamycin Selection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, no. 15 (Aug): 5536-40.
- Vranova, E., D. Coman, y W. Gruissem. 2013. "Network Analysis of the Mva and Mep Pathways for Isoprenoid Synthesis." *Annu Rev Plant Biol* 64: 665-700. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116>.
- Vranová, Eva, Diana Coman, y Wilhelm Gruissem. 2012. "Structure and Dynamics of the Isoprenoid Pathway Network." *Molecular Plant* 5, no. 2: 318-333. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/sss015>.
- Walter, M. H., J. Hans, y D. Strack. 2002. "Two Distantly Related Genes Encoding 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthases: Differential Regulation in Shoots and Apocarotenoid-Accumulating Mycorrhizal Roots." *Plant J* 31, no. 3 (Aug): 243-54.

- Weigel, D., et al. 2000. "Activation Tagging in Arabidopsis." *Plant Physiol* 122, no. 4 (Apr): 1003-13.
- Withers, S. T., y J. D. Keasling. 2007. "Biosynthesis and Engineering of Isoprenoid Small Molecules." *Appl Microbiol Biotechnol* 73, no. 5 (Jan): 980-90. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0593-1>.
- Wright, L. P., y M. A. Phillips. 2014. "Measuring the Activity of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase, the First Enzyme in the Mep Pathway, in Plant Extracts." *Methods Mol Biol* 1153: 9-20. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0606-2_2.
- Zeidler, J., et al. 2000. "The Non-Mevalonate Isoprenoid Biosynthesis of Plants as a Test System for Drugs against Malaria and Pathogenic Bacteria." *Biochem Soc Trans* 28, no. 6 (Dec): 796-8.