

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Mutaciones de Arabidopsis que producen el fenotipo de *nrb2*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: VÍCTOR MANUEL TOLOSA ALMENDROS

TUTOR: ISMAEL RODRIGO BRAVO

COTUTOR: PABLO TORNERO FELICIANO

Curso Académico: 2013 - 2014

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2014



Datos del Trabajo Fin de Grado

Título del TFG:	Mutaciones de <i>Arabidopsis</i> que producen el fenotipo de <i>nrb2</i>
Autor:	Víctor Manuel Tolosa Almendros
Localidad y fecha:	Valencia, septiembre de 2014
Tutor:	Ismael Rodrigo Bravo
Cotutor:	Pablo Tornero Feliciano
Tipo de Licencia:	Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada".

Resumen

En la resistencia basal de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) frente a patógenos biotrofos hay una señal fundamental: el ácido salicílico (SA). Pese a la importancia de esta molécula en plantas, todavía se desconocen muchos pasos importantes en esta ruta.

El uso de mutantes que presentan alguna alteración en la ruta de señalización del SA puede ser una herramienta útil para estudiar esta ruta.

A partir de un rastreo genético en *Arabidopsis*, hemos identificado catorce grupos de complementación que no responden al SA.

El presente trabajo consiste en continuar la caracterización de uno de estos mutantes, *nrb2*. *nrb2* está definido por seis alelos, y sus fenotipos relacionados con el SA no muestran gran diferencia respecto a otros mutantes encontrados previamente, excepto en que *nrb2* es ligeramente intermedio. Respecto a la genética, su mapeo y segregación indica que está causado por un mínimo de dos mutaciones y un máximo de tres. Este trabajo consiste en encontrar los genes responsables del fenotipo *nrb2*, y cuál es la relación entre estos. Para ello, hemos secuenciado los genes candidatos en los alelos.

Además estudiamos la segregación de un cruce entre *nrb2* x Col-0 con el objetivo de establecer un modelo genético que muestre la relación existente entre los genes responsables.

Es importante destacar que la selección de los mutantes se ha efectuado en base al menor crecimiento que produce la respuesta al SA en plantas silvestres, por lo que cabe la posibilidad de que alguno de los mutantes crezca de forma normal en presencia de SA pero produzca defensas en respuesta al SA. Si bien es poco probable (hasta ahora ninguna de las plantas analizadas separa estos dos fenotipos), un genotipo que se comportase así tendría un alto valor biotecnológico.

Palabras clave

Ácido salicílico, BTH, defensa, *Arabidopsis*, biotrofo, señalización

Abstract

In the basal resistance of *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) against biotrophic pathogens, salicylic acid (SA) signaling is essential. Despite the importance of this molecule in plants, several important steps in the SA pathway are still unknown.

Mutants impaired in the SA pathway are a useful tool to study this pathway.

From a genetic screening in Arabidopsis, we have identified fourteen complementation groups that do not respond to SA.

The present work consists in continue the characterization of one of these mutants, *nrb2*. *nrb2* is defined by six alleles and their phenotypes associated with the SA show no major differences from others previously found, except that *nrb2* is slightly intermediate. Genetics, mapping and segregation, all together, indicate that the *nrb2* phenotype is caused by a minimum of two and a maximum of three mutations. The aim of this work is to find the genes responsible of the *nrb2* phenotype, and the relationship between them. With this purpose, we have sequenced the alleles of the candidate genes.

Moreover, the segregation from a cross between *nrb2* and Col-0 has been assessed, in order to propose a genetic model that describes the relationship between the responsible genes.

It is important to note that the selection of the mutants has been based on the slower growth caused by the SA in wild plants. For this reason, the possibility of finding a mutant with normal growth in presence of SA, but that produces defences in response to it shouldn't be discarded, although this fact would be very strange (none of the plants assessed present these two phenotypes separated). This genotype would have an enormous biotechnological value.

Key words

Salicylic acid, BTH, defense, Arabidopsis, biotroph, signaling

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecerle al Dr. Pablo Tornero por toda la ayuda y apoyo que me ha prestado durante la realización de este trabajo y también por la amabilidad con la que me ha tratado.

También quisiera agradecerle al Dr. Ismael Rodrigo por ser mi tutor en la UPV y por ser una de sus clases la que me llevó a elegir este TFG.

No puedo olvidarme de mi familia. Tengo que agradecer de manera muy especial a mis padres y a mi hermana todos los ánimos que me han dado y la confianza que han tenido en mí.

También tengo que acordarme de mis abuelos, que aunque a veces confunden la carrera que estudio, nunca dejan de estar pendientes de mí.

Asimismo quiero darle las gracias a mi tía Cristi y a mi tío Diego, que me han tratado como a un hijo más durante mis años en Valencia.

A mis amigos del pueblo, David, Isaac, Nico y Sergio tengo que darles las gracias por los buenos momentos compartidos y por acordarse siempre de mí, incluso cuando me paso meses sin ir por allí.

Por último quisiera agradecerles a mis compañeros de carrera lo bien que me han tratado durante estos cuatro años, en especial a Carlos, Dani, Miquel y Pablo, de los que parece que no me voy a librar ni después de terminar la carrera.

LISTA DE ABREVIATURAS.

1. **Avr.** Factores de avirulencia.
2. **BTH.** Benzotiadiazol.
3. **Col-0.** Columbia.
4. **ETI.** Inmunidad activada por efectores.
5. **ETS.** Susceptibilidad activada por efectores.
6. **HR.** Respuesta hipersensible.
7. **IC.** Isocorismato.
8. **ICS.** Proteína ISOCHORISMATE SYNTHASE.
9. **IPL.** Proteína ISOCHORISMATE PYRUVATE LYASE.
10. **JA.** Ácido jasmónico.
11. **NRB2.** NON-RECOGNITION OF BTH 2.
12. **NRB4 / MED15.** NON-RECOGNITION OF BTH 4/MEDIATOR 15.
13. **NPR1.** Gen NON-EXPRESSER OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1.
14. **PAL.** Proteína PHENYLALANINE AMMONIA LYASE.
15. **PAMPs.** Patrones moleculares asociados a patógenos.
16. **PR.** Genes PATHOGENESIS RELATED.
17. **PRRs.** Receptores de reconocimiento de patrones.
18. **PTI.** Inmunidad activada por PAMPs.
19. **R.** Genes RESISTANCE.
20. **RST1.** *RESURRECTION1*.
21. **SA.** Ácido salicílico.
22. **SAR.** Resistencia sistémica adquirida.
23. **t-CA.** Trans-ácido cinámico.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Interacción planta patógeno.....	1
1.2. Ácido salicílico.	4
1.2.1. Biosíntesis.....	4
1.2.2. Metabolismo y función del SA.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1 Material Vegetal.....	9
3.2 Métodos.....	9
3.2.1. Extracción de DNA.....	9
3.2.2. Reacción en cadena de la DNA polimerasa.....	10
3.2.3. Secuenciación.....	10
3.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	10
3.2.5. Siembra.....	11
3.2.6. Tratamiento con BTH.....	11
3.2.7. Cuantificación de DNA.....	11
3.2.8. Digestión del DNA.....	12
3.2.9. Análisis de segregación.....	12
3.2.10. Diseño de marcadores.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1. Genes candidatos.....	13
4.1.1. Genes candidatos en el cromosoma III.....	13
4.1.2. Genes candidatos en el cromosoma I.....	17
4.2. Modelo genético de la mutación <i>nrb2</i>.....	18
4.2.1. Análisis de una población <i>nrb2-1</i> x <i>Col-0</i> F2. Fijación de <i>rst1</i>	18
4.2.2. Análisis de una población <i>nrb2-1</i> x <i>Col-0</i> F3.....	19
4.2.2.1. Análisis de plantas individuales.....	19
4.2.2.2. Análisis de familias heterocigotas.....	21
4.2.2.3. Validación de <i>NPR1H</i> como gen implicado en la mutación <i>nrb2</i>	25
4.2.2.4. Búsqueda de nuevos genes candidatos en el cromosoma I....	26
4.2.2.5. Modelo genético propuesto para el fenotipo <i>nrb2</i>	26

5. CONCLUSIONES.....	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

Índice de Tablas

Tabla 4.1. Fenotipos obtenidos en el análisis con el marcador <i>RST1</i> sobre la población <i>nrb2-1</i> x Col-0 F3.....	20
Tabla 4.2. Análisis χ^2 para el modelo de un gen en la población <i>nrb2-1</i> x Col-0	21
Tabla 4.3. Analisis χ^2 para el modelo de dos genes en la población <i>nrb2-1</i> x Col-0	21
Tabla 4.4. Genotipo para los marcadores <i>NPR1H</i> e <i>INS</i> de las familias analizadas.....	22
Tabla 4.5. Fenotipos obtenidos en el análisis de las distintas familias de <i>nrb2-1</i> x Col-0 F3.....	22
Tabla 4.6. χ^2 para el modelo de un gen recesivo.....	23
Tabla 4.7. χ^2 para el modelo de un gen dominante.....	23
Tabla 4.8. χ^2 para el modelo de dos genes, uno dominante y otro recesivo.....	24
Tabla 4.9. χ^2 para el modelo de dos genes recesivos.....	24

Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema que representa las diferentes etapas que tienen lugar en la interacción planta-patógeno.....	3
Figura 1.2. Esquema simplificado de las dos rutas de biosíntesis del SA.....	5
Figura 4.1. Experimento acumulación de SA en plantas <i>rst1</i> comparado con la acumulación en Col-0.....	14
Figura 4.2. Esquema de la estrategia de secuenciación del gen <i>RST1</i>	15
Figura 4.3. Comprobación de los cebadores de <i>RST1</i> en el alelo <i>nrb2-1</i>	15
Figura 4.4. Cromatograma de la secuencia del gen <i>RST1</i> del alelo <i>nrb2-3</i> , comparado con el cromatograma de la secuencia de referencia del gen <i>RST1</i>	16
Figura 4.5. Cromatograma de la secuencia del gen <i>RST1</i> del alelo <i>nrb2-5</i> comparado con el cromatograma de la secuencia de referencia del gen <i>RST1</i>	17
Figura 4.6. Análisis de una población <i>nrb2-1</i> x Col-0 con el marcador <i>RST1</i>	19
Figura 4.7. Análisis con el marcador <i>NPR1H</i> (A) y con el marcador <i>INS</i> (B) de individuos <i>nrb2-1</i> x Col-0 F3 (familia 15) de fenotipo mutante.....	25
Figura 4.8. Esquema modelo genético propuesto para explicar el fenotipo <i>nrb2</i>	26

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Interacción planta patógeno.

Las plantas, como el resto de seres vivos, están expuestas a cambios continuos en el ambiente que las rodea, que alteran su estado de salud y ponen en riesgo su supervivencia. Debido a esto necesitan una serie de mecanismos de defensa adecuados. Los cambios a los que están sometidas se pueden clasificar en dos grupos según su naturaleza: Bióticos (ocasionados por las interacciones con otros seres vivos) y abióticos (provocados por las características físico-químicas del ecosistema).

Las plantas son organismos sésiles, inmóviles, por lo que no pueden escapar de los distintos estreses a los que están sometidas, además carecen de células inmunológicas especializadas por lo que no pueden generar anticuerpos. Pese a esto, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa enormemente eficaces y complejos que les permiten responder en cada situación de la forma más adecuada (Jones y Takemoto., 2004). A la vez, entre la planta y el patógeno existe una coevolución.

Los patógenos pueden clasificarse según el tipo de interacción que tienen con las plantas en biotrofos, necrotrofos y hemibiotrofos (Dangl y Jones., 2001). Los patógenos biotrofos son aquellos que invaden la planta y se alimentan de células metabólicamente activas. Los patógenos necrotrofos, por otro lado, se alimentan de tejido muerto, para ello provocan la muerte de la célula hospedadora, normalmente mediante la producción de toxinas. Los patógenos hemibiotrofos presentan dos fases en su interacción con la planta. Una primera fase conocida como fase silenciosa en la que viven de forma latente en la planta. Cuando se alcanza una masa crítica de patógenos se desencadena la segunda fase en la que el patógeno se comporta como un necrotofo, es decir, provoca la muerte de la célula hospedadora y se nutre de tejido muerto (Glazebrook., 2005).

Se conoce como patogénesis el proceso de infección, colonización y reproducción del patógeno en la planta, causándole algún detrimento en alguna o en todas de estas fases. Para que se produzca esto, el patógeno debe penetrar en la planta y esto puede hacerlo a través de heridas o por aberturas naturales (estomas). Una vez dentro debe superar una serie de mecanismos de defensa de las plantas. Lo primero que deben solventar los patógenos son las llamadas defensas constitutivas de la planta, que son un conjunto de barreras físicas y químicas que dificultan la entrada del patógeno y proporcionan una resistencia inespecífica (Heath., 2000). Ejemplos de estas defensas son la cutícula, la pared celular (Hückelhoven., 2007) y también compuestos bioquímicos, por ejemplo metabolitos secundarios.

Si el patógeno consigue atravesar las defensas constitutivas, las siguientes barreras con las que se va a encontrar son las defensas inducidas. Las plantas son capaces de distinguir entre las señales propias y las generadas por algún patógeno. Incluso pueden distinguir las señales generadas por algún patógeno de las generadas por otro organismo no patogénico. Esta capacidad les permite activar las defensas inducidas rápidamente. Dentro de la respuesta inmune inducida se pueden diferenciar dos niveles de reconocimiento del patógeno. La primera respuesta activa de la planta se produce gracias al reconocimiento de unos patrones moleculares asociados a patógenos, denominados PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). Estos patrones son moléculas muy conservadas propias de un conjunto amplio de microorganismos y esenciales para su ciclo vital (Segonzac y Zipfel., 2011). Los PAMPs son reconocidos por medio de unos receptores de reconocimiento de patrones conocidos como PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). El reconocimiento de estos patrones induce la denominada inmunidad activada por PAMPs o PTI (*PAMP triggered immunity*) (Jones y Dangl., 2006).

No se han identificado muchos PRRs en plantas pero los que se han identificado son proteínas transmembrana que presentan una gran afinidad y especificidad por un determinado PAMP pudiendo llegar a detectarlo a concentraciones muy bajas (Boller y He., 2009; Segonzac y Zipfel., 2011). La importancia de la PTI ha sido comprobada porque por un lado las plantas que carecen de algunos de los PRRs identificados presentan susceptibilidad a determinados patógenos y por otra parte se ha visto que para los patógenos es totalmente indispensable superar la PTI para continuar con la infección (Zipfel., 2004; Segonzac y Zipfel., 2011).

Los patógenos han desarrollado estrategias que les permiten alterar las funciones celulares y así superar la PTI. Principalmente lo hacen mediante la secreción de unas moléculas conocidas como efectores. Los efectores poseen actividades enzimáticas que les permiten modificar ciertas proteínas del hospedador, para aumentar así la virulencia del patógeno y evitar su reconocimiento por parte del receptor. Esta respuesta de los patógenos se conoce como susceptibilidad activada por efectores o ETS (*Effector triggered susceptibility*) (Jones y Dangl., 2006).

El otro sistema de reconocimiento de la inmunidad inducida es la denominada inmunidad activada por efectores o ETI (*Effector Triggered Immunity*). Este sistema se basa en el reconocimiento directo o indirecto de efectores, gracias a las proteínas codificadas por los genes de resistencia (R) (Jones y Dangl., 2006). El reconocimiento mediado por los genes R también se conoce como modelo de interacción gen a gen y postula que la planta conseguirá bloquear el ataque del patógeno siempre y cuando la planta posea un gen R y el patógeno un gen de avirulencia (Avr) (Flor., 1971). Cualquier otra

combinación dará lugar a una reacción de susceptibilidad. Este tipo de resistencia suele ser inestable, ya que está condicionada a la presencia de ambos genes. Debido a esto, en determinadas situaciones los patógenos consiguen superar la ETI, ya sea dando lugar a nuevos efectores o modificando los ya existentes para que no sean reconocidos por los genes R (de Wit., 2007). Teniendo en cuenta esto se puede afirmar que tanto planta como patógeno mantienen una constante coevolución. En la figura 1.1 se muestra el denominado modelo de "zig-zag", donde se presentan las distintas etapas existentes en el proceso de infección y defensa.

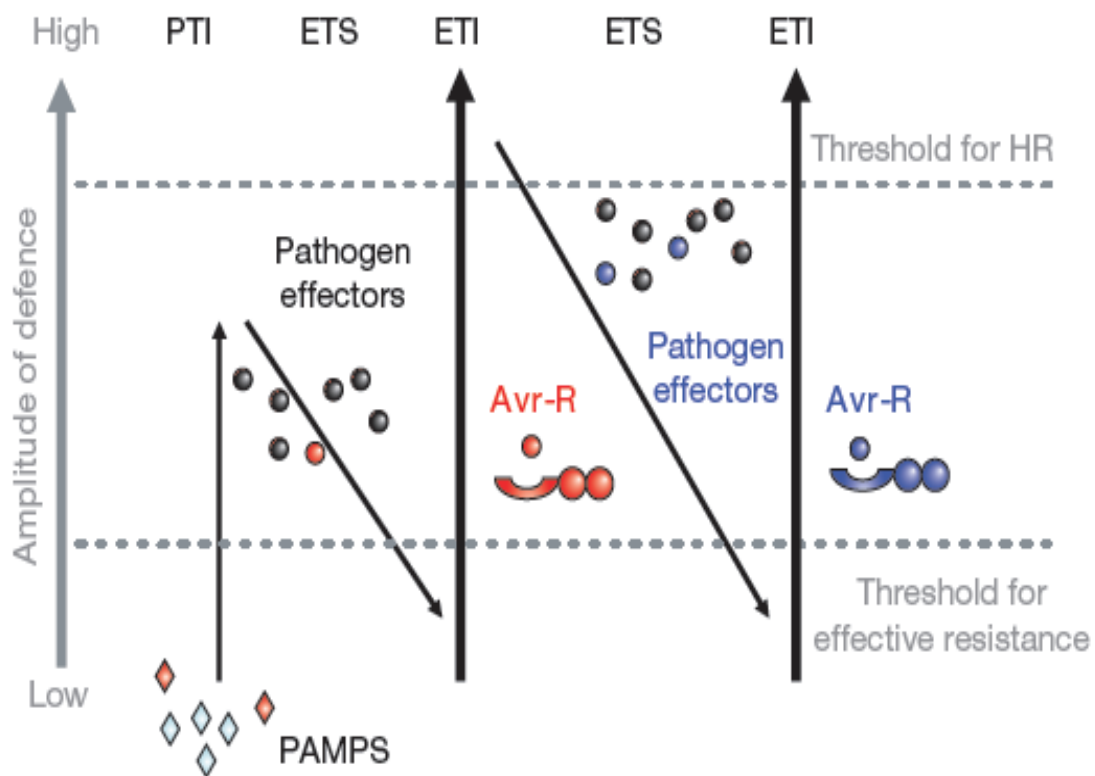


Figura 1.1. Esquema que representa las diferentes etapas que tienen lugar en la interacción planta-patógeno. Fuente: Jones y Dangl., 2006.

El reconocimiento del patógeno, ya sea vía PRRs o vía genes R, conduce a una serie de respuestas defensivas. Las respuestas defensivas de las plantas frente al ataque de patógenos resultan en cambios importantes en los niveles de varias fitohormonas implicadas en la traducción de señales, dentro de las cuales el ácido salicílico juega un papel preponderante.

1.2. Ácido salicílico.

Desde el punto de vista químico, el ácido salicílico (SA) forma parte de un amplio grupo de compuestos denominados fenólicos. Estos compuestos se engloban dentro del llamado metabolismo secundario (Vlot et al., 2009). Los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer en su estructura química un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. Tradicionalmente el SA ha sido más conocido por su papel medicinal en humanos, pero en las últimas dos décadas su rol como molécula de señalización en plantas ha comenzado a ser relevante. Se trata de una molécula muy versátil, que presenta un papel destacado en la regulación de procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo vegetal (germinación de las semillas, fotosíntesis, floración, termogénesis). En muchos de los procesos en los que interviene, lo hace de forma indirecta, mediante la alteración de vías de señalización de otras hormonas vegetales (Vlot et al., 2009).

1.2.1. Biosíntesis.

Se han descrito dos rutas por las que puede ser generado el SA y ambas requieren el metabolito primario corismato (Vlot et al., 2009; Chen et al., 2009). La primera ruta parte de un derivado del corismato, la L-fenilalanina (Phe, de *L-Phenylalanine*). La Phe es convertida en trans-acido cinámico (t-CA, de *trans-cinnamic acid*) mediante la acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL, de *Phenylalanine ammonia lyase*). La biosíntesis del SA a partir del t-CA se realiza mediante la participación de dos posibles intermediarios finales: El ácido ortocumárico o el ácido benzoico. Esta ruta se conoce como ruta PAL y tiene lugar en el citoplasma (Vlot et al., 2009; Dempsey et al., 2011). La segunda ruta es la ruta del isocorismato (IC, de *Isochorismate*). El IC es un derivado del corismato. Esta segunda ruta es más corta y ocurre en el cloroplasto. Se trata de un proceso que se produce en dos pasos y que implica la participación de las enzimas isocorismato sintasa (ICS) e isocorismato piruvato liasa (IPL) (Vlot et al., 2009; Dempsey et al., 2011). En *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) la mayor parte del SA producido procede de la segunda ruta, la ruta del IC (Wildermuth et al., 2001). En la figura 1.2 se presenta un esquema de las dos rutas de biosíntesis del SA en plantas, así como también se indican algunas de las posibles modificaciones químicas que puede sufrir esta molécula tras su biosíntesis.

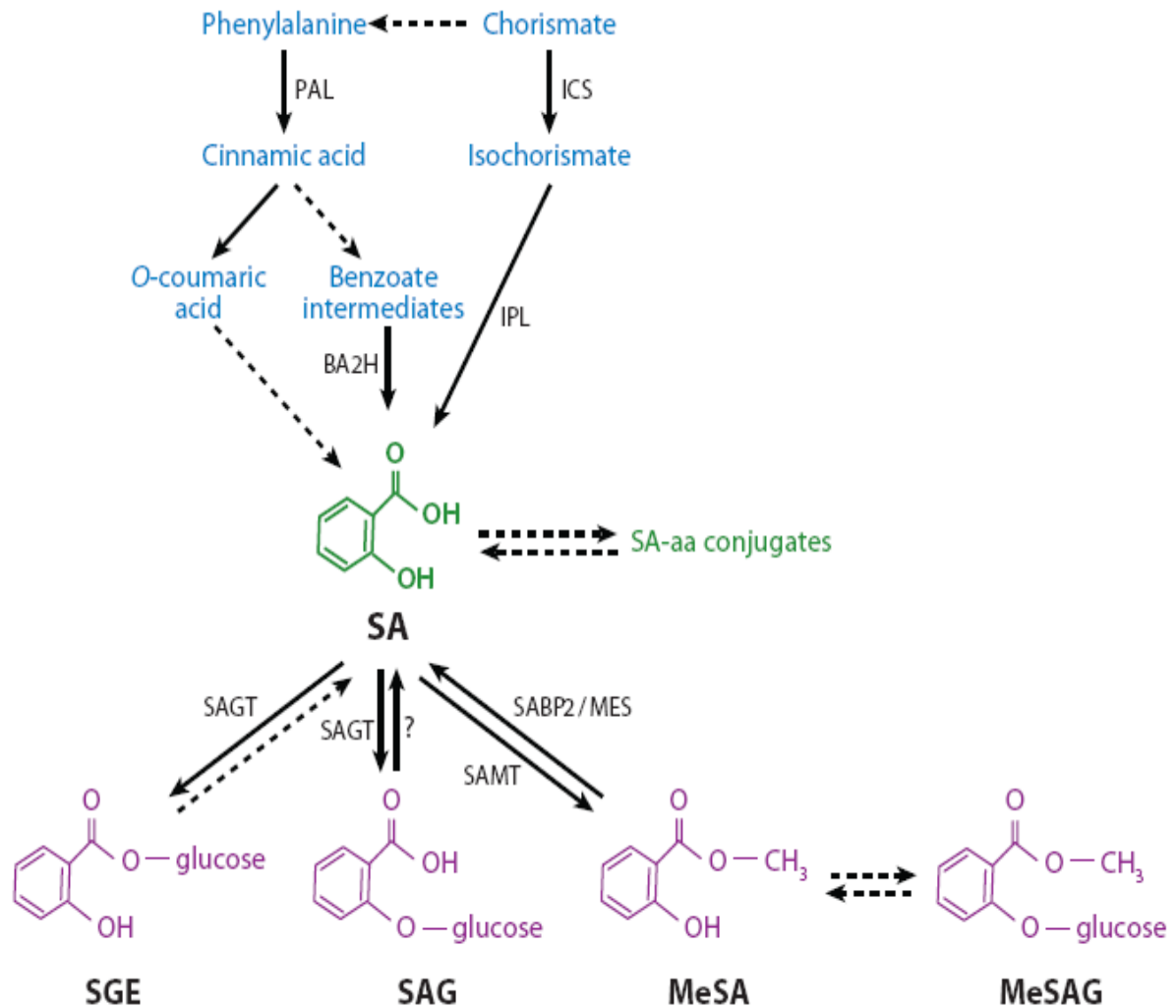


Figura 1.2. Esquema simplificado de las dos rutas de biosíntesis del SA: la ruta de la fenilalanina amonio liasa y la ruta del isocorismato. También se muestran algunas de las modificaciones químicas del SA tras su biosíntesis. Fuente: Vlot et al., 2009.

1.2.2. Metabolismo y función del SA.

El SA se encuentra en los tejidos de las plantas en forma libre o conjugada. A excepción de unas pocas plantas, no se encuentra gran cantidad de SA endógeno en forma libre. Las modificaciones del SA alteran su actividad, acumulación y movilidad (Dempsey et al., 2011). Algunas de estas modificaciones son la glucosilación, la metilación o la conjugación con aminoácidos (Loake y Grant., 2007; Dempsey et al., 2011).

Además de las funciones ya mencionadas, el SA desempeña un papel fundamental como molécula señalizadora para inducir las respuestas frente a patógenos biotrofos. White (1979), fue el primero en comprobar que el SA tiene un papel en la resistencia a enfermedades. Su experimento consistía en tratar con SA hojas de tabaco de una línea resistente al virus del mosaico del

tabaco y en ellas se observó la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Las proteínas PR son un grupo de proteínas que tienen un papel importante en la resistencia de las plantas contra los patógenos (Edreva., 2005). Como su nombre indica se trata de proteínas codificadas por la planta huésped en situaciones patológicas o relacionadas a la patogénesis (Antoniw et al., 1980; Van Loon et al., 2006).

Además de su papel en la activación de los genes PR, el SA también presenta un rol importante en la traducción de señales que conduce al establecimiento de la respuesta hipersensible (HR) y la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Vlot et al., 2009).

La prueba más sólida de la participación del SA como señal defensiva procede de experimentos con plantas donde los niveles endógenos de SA estaban alterados. Se ha podido ver como en plantas en las que los niveles de SA eran más bajos, no conseguían desarrollar la SAR o la expresión de genes PR. Estas plantas también mostraban mayor susceptibilidad a ciertos patógenos. Se ha comprobado que la adición de SA o algunos de sus análogos consiguió restaurar la resistencia y la expresión de genes PR (Vernooij et al., 1995). Un nuevo enfoque en el control y prevención de enfermedades se basa en el uso de compuestos activadores de la SAR, como el SA. También ha habido interés por encontrar mutantes incapaces de desencadenar la SAR, aunque las concentraciones de SA sean lo suficientemente altas como para activarla. Uno de estos mutantes es el denominado como *npr1* (*Non expresser of PR genes 1*) (Cao et al., 1997). *NPR1* está implicado en la ruta de señalización del SA, actuando después de la síntesis de este y antes de la expresión de genes de defensa. Está considerado como el gen clave en la percepción del SA, aunque todavía no está claro si actúa como un receptor por sí mismo.

El problema de utilizar SA es que las cantidades de este compuesto necesarias para dar lugar a un efecto reproducible en la inducción de defensas en *Arabidopsis* resultan tóxicas (van Leeuwen et al., 2007), lo que limita su posible uso. Para superar esta barrera se han desarrollado distintos análogos químicos que no presentan estos inconvenientes. Uno de ellos es el BTH (Benzotiadiazol) (Lawton et al., 1996), el cual ha sido utilizado en este proyecto. Es posible realizar tratamientos con BTH a concentraciones parecidas a las utilizadas con el SA, sin que resulten tóxicas y que al mismo tiempo desencadenen las respuestas defensivas. A nivel comercial la desventaja que presenta el BTH es que produce una pérdida de biomasa. Un estudio reciente aprovechó esta característica del BTH, relacionando la pérdida de masa con la activación de las defensas, obteniendo así un nuevo modelo de percepción de SA (Canet et al., 2010).

En otro estudio ha sido descrito un nuevo mutante, que es insensible a BTH, denominado *nrb4* (*Non-response to BTH 4*). El gen *NRB4* también se

considera que es necesario para la percepción del SA. Se ha determinado que *NRB4* forma parte del complejo *Mediator* y es el ortólogo de *MED15* en *Arabidopsis* (Canet et al., 2012).

Pese al esfuerzo realizado, todavía no se tiene un gran conocimiento sobre la ruta de señalización del SA.

2. OBJETIVOS.

El ácido salicílico es una molécula de gran importancia en la señalización frente a patógenos biotrofos. Sin embargo, la ruta de señalización es muy compleja y el conocimiento que se tiene de ella no es muy amplio.

El estudio de mutantes que presenta alguna alteración con respecto a la señalización mediada por SA puede ser una herramienta eficaz para esclarecer los integrantes de esa ruta.

Se dispone de una colección de mutantes insensibles al BTH. De esta colección se ha escogido un grupo de complementación denominado *nrb2*.

En el presente trabajo se va a continuar la caracterización de este mutante con los objetivos de:

- Establecer cuál es la causa del fenotipo *nrb2*, indicando en la medida de lo posible los genes implicados. Para ello se analizarán mediante secuenciación los genes candidatos.
- Proponer un modelo genético a partir del análisis de segregación que explique cuál es la relación entre los genes responsables del fenotipo *nrb2*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Material Vegetal.

El material vegetal utilizado para esta investigación proviene de una colección de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) sin respuesta a BTH obtenida previamente (Canet et al, 2010). El mutante está definido por seis alelos: n204 (*nrb2-1*), n208 (*nrb2-2*), n212 (*nrb2-3*), n218 (*nrb2-4*), n221 (*nrb2-5*), y n225 (*nrb2-6*). Los alelos están en fondo *NPR1H*, que originalmente está en el ecotipo Columbia (Col-0) con un transgén que sobreexpresa *NPR1* (*35S::NPR1*) (Cao., et al, 1998).

3.2 Métodos.

3.2.1. Extracción de DNA.

- Para secuenciar.
En primer lugar se toman hojas jóvenes de las plantas a analizar. Esas hojas se introducen en un vial con 600 μ l de EDM (100ml Tris-HCl pH7.5, 1 M; 25ml NaCl, 5 M; 25ml EDTA, 0.5 M; 12.5ml SDS, 20%) y se guardan a -20°C durante 30 minutos. Después se hierven a 96°C durante 10 minutos. A continuación se centrifuga la muestra durante un minuto a máxima velocidad. Se toman 500 μ l del sobrenadante y se llevan a otro tubo evitando tomar el tejido. A este nuevo tubo se le añaden 500 μ l de isopropanol, se agita en vortex y se centrifuga durante 10 minutos a máxima velocidad. Una vez centrifugado se descarta el sobrenadante y se añaden 500 μ l de etanol. A continuación se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a máxima velocidad. Se vuelve a descartar el sobrenadante y secamos el vial en el speed vac durante 5 minutos. Se añaden 500 μ l de TE (Tris-HCl pH 7.5 10 mM EDTA Na 1 mM) y se calienta a 65°C durante 10 minutos. Por último se agita en el vortex y se centrifuga durante 10 minutos. Las muestras se guardan a -20°C hasta su utilización.

- Para analizar
Se toman hojas jóvenes de las plantas a analizar y se introducen en 100 μ l de EDM. Los tubos se congelan durante 30 minutos y seguidamente se hierven a 96°C durante 10 minutos. Por último se les añaden 900 μ l de TE. Para facilitar la extracción, cuando se van a analizar muchas muestras en lugar de utilizar tubos se utilizan placas de PCR y placas microtiter.

3.2.2. Reacción en cadena de la DNA polimerasa.

La reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) es un procedimiento utilizado para sintetizar *in vitro* grandes cantidades de una región concreta de DNA. Las reacciones de PCR preparadas para cada muestra son de un volumen de 21 μ l y constan de:

- Tampón de reacción 10x (comercial). Volumen: 2.1 μ l
- Deoxinucleótidos trifosfato 2 mM. Volumen: 2.1 μ l
- Cebadores. 2 μ M, Volumen: 2.1 μ l
- Agua. Volumen: 13.2 μ l
- Polimerasa (Taq). 5 U/ μ L. Volumen: 0.5 μ l
- DNA. Volumen: 1 μ l.

Los volúmenes presentados están referidos a una reacción 1x (en cuanto a la concentración de cebadores). En determinadas reacciones de PCR se han utilizado concentraciones de 3x y 7x (Se utiliza el mismo volumen que las 1x en todos los componentes a excepción de los cebadores que aumentan tres veces o siete veces su volumen respectivamente, siendo el agua el componente de la reacción que disminuye su volumen para ajustar el volumen a 21 μ l). A no ser que se indique lo contrario la concentración utilizada es 1x.

Todos los reactivos y cebadores fueron comprados a Sigma (Barcelona, España) y Fermentas (Madrid, España).

3.2.3. Secuenciación.

Se realiza una PCR por triplicado de aquellas muestras que van a ser enviadas a secuenciar. Se hacen tres reacciones por cada muestra. La razón es porque la Taq polimerasa introduce mutaciones con relativa frecuencia por lo que para evitar que un error se propague se reparte la reacción en tres pocillos que después se combinarán. Antes de mandar a secuenciar se comprobó que el resultado de la PCR había sido el correcto mediante una electroforesis. Las muestras se enviaron al servicio de secuenciación del IBMCP que dispone de un secuenciador automático (ABI 3100, Applied Biosystems). Las muestras a secuenciar se proporcionaron como alícuotas de 5 μ l. Por último, las secuencias se compararon mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con la base de datos de secuencia del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.

Para analizar los fragmentos de DNA resultantes de la PCR se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% y al 2%, según el tamaño de los fragmentos a analizar.

Para preparar la agarosa al 1% se añadieron 5 gramos de agarosa (D1low) a 500 ml de BSB 1x (para preparar esto se diluían 40 ml de BSB 50x (95g Na₂B₈O₇·10H₂O + 60g H₃BO₃) en 2 litros de agua). Posteriormente se calentaba la mezcla durante 4 minutos y se agitaba utilizando un agitador magnético, la mezcla volvía a ser calentada y agitada hasta conseguir la disolución de la misma. Por último se añadían 25 µl de bromuro de etidio a la disolución y se agitaba. La disolución se guardaba a 65°C.

Para preparar agarosa al 2% se seguía el mismo procedimiento teniendo en cuenta que la cantidad de agarosa inicial era de 10 gramos en lugar de 5 gramos.

Dependiendo del número de muestras a analizar se usaron geles de trece pocillos o de cincuenta pocillos. Para ello se vertió sobre el soporte adecuado la cantidad precisa de agarosa fundida y se dejó enfriar en presencia del peine con el número de pocillos adecuados durante 35 minutos aproximadamente. Después se retiró el peine y el gel se colocó en la cubeta de electroforesis para cargar las muestras. Antes de cargar las muestras a estas se les añadió la cantidad correspondiente de tampón de carga (LB). Las electroforesis se corrieron durante 30 minutos a 130 V. Las bandas se observaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta gracias al bromuro de etidio presente en el gel. Los tamaños de los fragmentos de DNA se estimaron mediante comparación del marcador de referencia (λ DNA-HindIII para fragmentos mayores de 1kb y generuler 1000 bp para fragmentos menores de 1kb).

3.2.5. Siembra.

Las semillas de Arabidopsis fueron sembradas en pequeñas macetas o en semilleros según el tratamiento que iban a recibir y se mantuvieron a 4°C y oscuridad durante 3 días. Después fueron transferidas a condiciones de crecimiento bajo un régimen de día corto (8 horas de luz a 21°C y 16 horas a 19°C).

3.2.6. Tratamiento con BTH.

El tratamiento con BTH se realizó mezclando BTH con agua (6.25 mg de BTH/50 ml de agua). El BTH es rociado utilizando un aerosol. El tratamiento se realiza los días 3, 6, 10, 13, 17 (Considerando como día 0 el día que las plantas son transferidas a condiciones de crecimiento).

3.2.7. Cuantificación de DNA.

La concentración de DNA se determinó mediante medida espectrofotométrica con un NanoDrop ND-1000. Esta medida se utilizó para calcular la cantidad de DNA que era necesario para enviar a secuenciar.

3.2.8. Digestión del DNA.

La digestión con endonucleasas de restricción permitió la caracterización física de fragmentos de DNA. A cada muestra de DNA a digerir, se le añadieron 4 μl de una solución compuesta por 0.5 μl de enzima, 2 μl del tampón de reacción correspondiente para esa enzima y 1.5 μl de agua. La utilización de estas enzimas se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones de las casas comerciales suministradoras (Fermentas (Madrid, España)).

3.2.9. Análisis de segregación.

Se analizó la segregación de varias poblaciones del cruce *nrb2-1* x Col-0. Para ello se sembraron semillas de los individuos a analizar y se realizaron aplicaciones de BTH 350 μM , según el procedimiento de Canet et al., 2010. Tras cinco aplicaciones se contaron las semillas germinadas y las plantas desarrolladas; y entre las desarrolladas, se valoró su respuesta al BTH. Como controles se utilizaron Col-0 y *nrb2-1*.

3.2.10. Diseño de marcadores.

Partiendo de un fichero donde se recogen mutaciones para distintos genes, se diseñaron marcadores que permitían diferenciar entre el genotipo mutante y el silvestre. En un primer momento se seleccionó un gen que presentaba alguna mutación. A continuación se buscaba la secuencia genómica de este gen en la base de datos TAIR (www.arabidopsis.org). Esta secuencia era guardada en un fichero de texto, anotando donde empieza el gen y su orientación. Después se comparaban la secuencia del gen mutado con la secuencia de referencia del gen obtenida en TAIR, para encontrar la mutación. Es recomendable escoger un gen que presente más de una mutación, ya que así será más sencillo confirmar que la posición de la mutación es la correcta. Haciendo uso de la herramienta bioinformática dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>), se buscaba una enzima que cortase la secuencia mutante frente a la silvestre o viceversa. Una vez conocida la enzima y el sitio de corte, se diseñaban cebadores para una zona de 500 nucleótidos aproximadamente, que englobara el corte, haciendo uso de la herramienta bioinformática Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se modificaron los valores de temperatura, tamaño del amplicón y se seleccionó la base de datos "Genome" del organismo *Arabidopsis thaliana*. Por último se escogieron un par de cebadores que solo amplificaban el gen en cuestión y se comprobó que el patrón de corte era lo suficientemente claro como para permitirnos discernir entre silvestre y mutante.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Como ya se ha dicho el principal objetivo de este trabajo es la caracterización del mutante *nrb2*. Este mutante procede de una colección de mutantes insensibles al BTH. Sus fenotipos relacionados con el SA no muestran gran diferencia con otros mutantes encontrados previamente, excepto que *nrb2* es ligeramente intermedio.

El punto de partida de este proyecto es el trabajo fin de Máster realizado por Don Fernando Rivas en este laboratorio. En este trabajo se comenzó la caracterización genética de *nrb2*. El primer paso fue mapear el gen mutado por marcadores, encontrando dos regiones en las que puede localizarse la mutación. La primera región en el cromosoma I de aproximadamente 25 Mb y la segunda en el cromosoma III de unas 6 Mb. Sin embargo, al secuenciar los genes candidatos más obvios aislados del mutante *nrb2* correspondientes a esa zona no se encontró que estuvieran mutados. En este trabajo también se indica que el fenotipo *nrb2* está causado por un mínimo de dos mutaciones y un máximo de tres.

4.1. Genes candidatos.

En el momento de empezar este trabajo, habían sido enviados a secuenciar tres alelos (antes ya se había mandado un alelo) con el objetivo de encontrar mutaciones, que proporcionaran algún gen candidato a ser el responsable del fenotipo. Se esperaba encontrar mutaciones que fueran canónicas (las que causadas el 95% por el mutágeno utilizado, EMS), únicas y que pudieran estar tanto en regiones codificantes como en sitios de transición entre intrones y exones (*splicing*).

4.1.1. Genes candidatos en el cromosoma III.

En todos los alelos secuenciados apareció un gen que presentaba el tipo de mutaciones buscadas, *RST1* (*RESURRECTION1*). El gen *RST1* se encuentra en el cromosoma III y su posición en este cromosoma coincide con la región que apareció en el trabajo anterior, por lo que el gen *RST1* pasó a ser el gen candidato del cromosoma III.

Se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer más detalles sobre este gen, averiguando que guarda relación con la señalización mediada por SA. El mutante *rst1* se obtuvo mediante mutagénesis insercional y la importancia del gen fue confirmada con tres alelos independientes (Chen et al., 2005). En otro trabajo posterior se estableció el papel de *RST1* en la defensa de plantas frente a patógenos. El gen *RST1* codifica una proteína que se localiza en la membrana plasmática y posee once dominios transmembrana. *RST1* interviene en la regulación de las rutas de señalización dependientes de SA y

ácido jasmónico (JA), estableciendo una interacción antagonista entre ambas rutas, regula de forma directa la ruta de señalización dependiente del JA y de forma indirecta la del SA (Mang et al., 2009). En este trabajo también se hace referencia a que las plantas *rst1* muestran mayor susceptibilidad a un determinado patógeno biotrofo (*Erysiphe cichoracearum*). Para comprobar si en las plantas *rst1* existe alguna alteración de las respuestas defensivas, compararon la expresión de las proteínas PR1 y PR2 en plantas silvestres y mutantes. Observaron que tras la inoculación del patógeno la expresión de las proteínas PR en las plantas mutantes era mucho menor que en las plantas silvestres. Además observaron como la cantidad de SA acumulado tras la inoculación del patógeno era mayor en las plantas silvestres que en las mutantes (previamente habían comprobado que la cantidad de SA en ambas plantas antes de la inoculación era muy similar). De esta manera se evidencia que el gen *RST1* es necesario para que se produzca la adecuada acumulación de SA y se puedan activar correctamente las respuestas inducidas frente al ataque de patógenos. En la figura 4.1 se reproduce una figura de este trabajo donde se midieron los niveles de SA en diferente genotipos, y se comprobó que los alelos nulos de *rst1* acumulan menos SA tras la inoculación del patógeno.

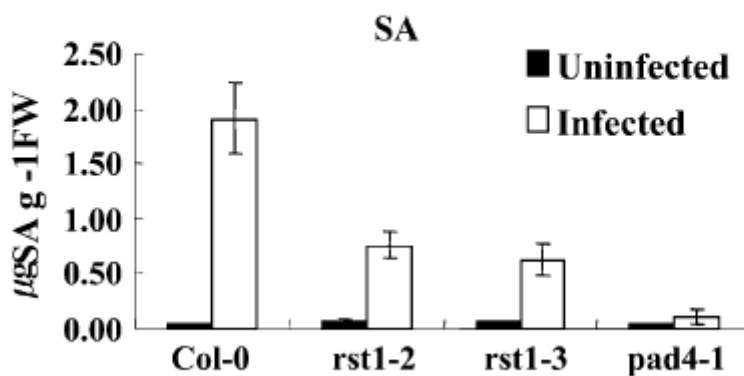


Figura 4.1. Las plantas mutantes *rst1* acumulan menos SA que la forma silvestre (Col-0) tras la inoculación del patógeno. Fuente: Mang et al., 2009.

Toda la información obtenida mediante búsqueda bibliográfica no hacía más que reforzar la hipótesis de que *RST1* estaba involucrado en el fenotipo *nrb2*.

Por ello, al comenzar el trabajo de laboratorio, lo primero que se hizo fue secuenciar los dos alelos que faltaban (*nrb2-3* y *nrb2-5*), con el objetivo de confirmar que *RST1* es el gen del cromosoma III que está involucrado en el fenotipo *nrb2*. La estrategia seguida para secuenciar este gen fue

secuenciarlo en cuatro fragmentos, para lo que se utilizaron cuatro pares de cebadores. Los fragmentos adyacentes poseen una región solapante. Esto se debe a que la secuenciación tiende a introducir errores al principio y al final de la secuenciación. Secuenciando por duplicado estas regiones, se minimiza el posible error. En la figura 4.2 se muestra un esquema de la estrategia utilizada para secuenciar el gen *RST1*.



Figura 4.2. Esquema de la estrategia de secuenciación del gen *RST1*. En gris claro las partes individuales de cada cebador y en gris oscuro las partes solapantes entre ellos.

Antes de enviar a secuenciar el gen, se realizó la amplificación de los cuatro fragmentos mediante PCR, tras comprobar que los cebadores funcionaban correctamente. La figura 4.3 muestra el resultado de la comprobación del correcto funcionamiento de los cebadores utilizados para amplificar el gen *RST1*.

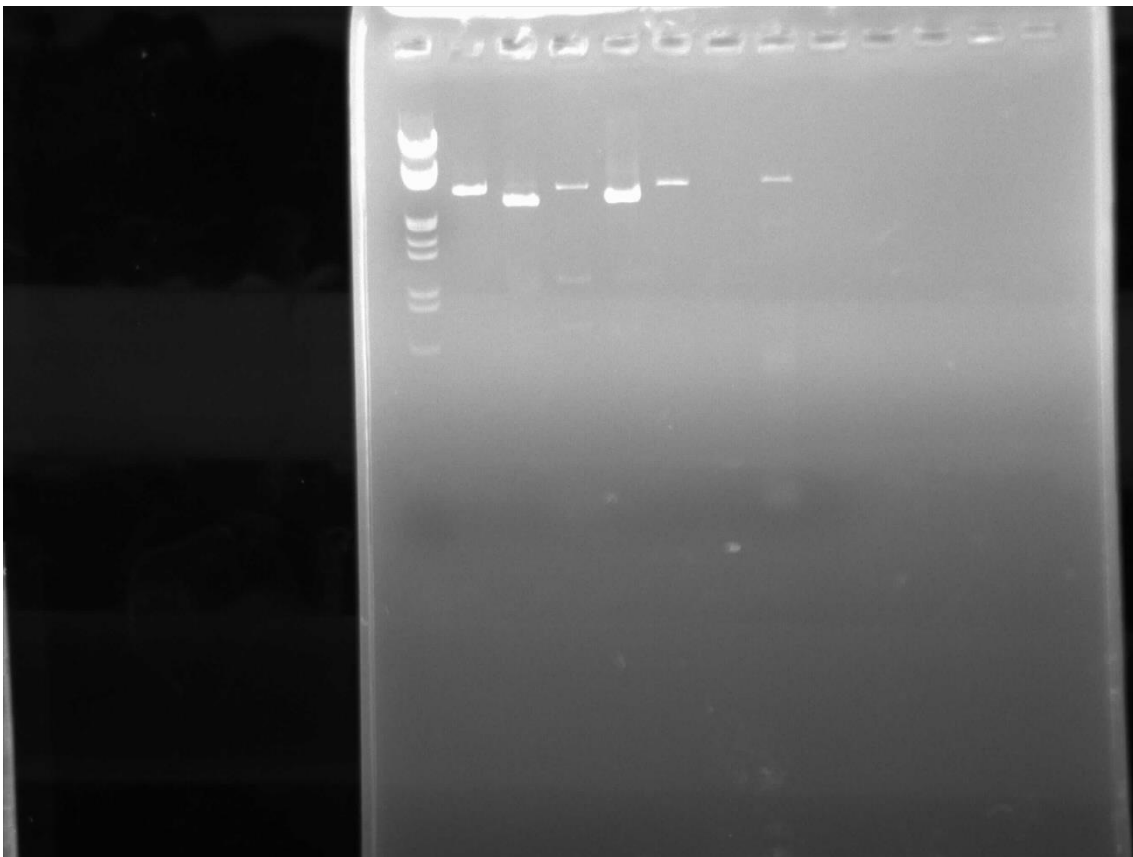


Figura 4.3. Comprobación de los cebadores de *RST1* en el alelo *nrb2-1*. En la primera línea se muestra el marcador de peso molecular utilizado para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados por PCR. En las líneas 2, 3, 4 y 5 se muestra el resultado de la amplificación del alelo *nrb2-1* con los cebadores correspondientes utilizando una concentración de cebadores 1x en la reacción de PCR. En las líneas 6, 7, 8 y 9 se muestra el resultado de la amplificación del alelo *nrb2-1* con los cebadores correspondientes utilizando una concentración de cebadores 3x en la reacción de PCR.

En las figuras 4.4 y 4.5, se muestran los resultados de la secuenciación de los alelos *nrb2-3* y *nrb2-5* respectivamente.

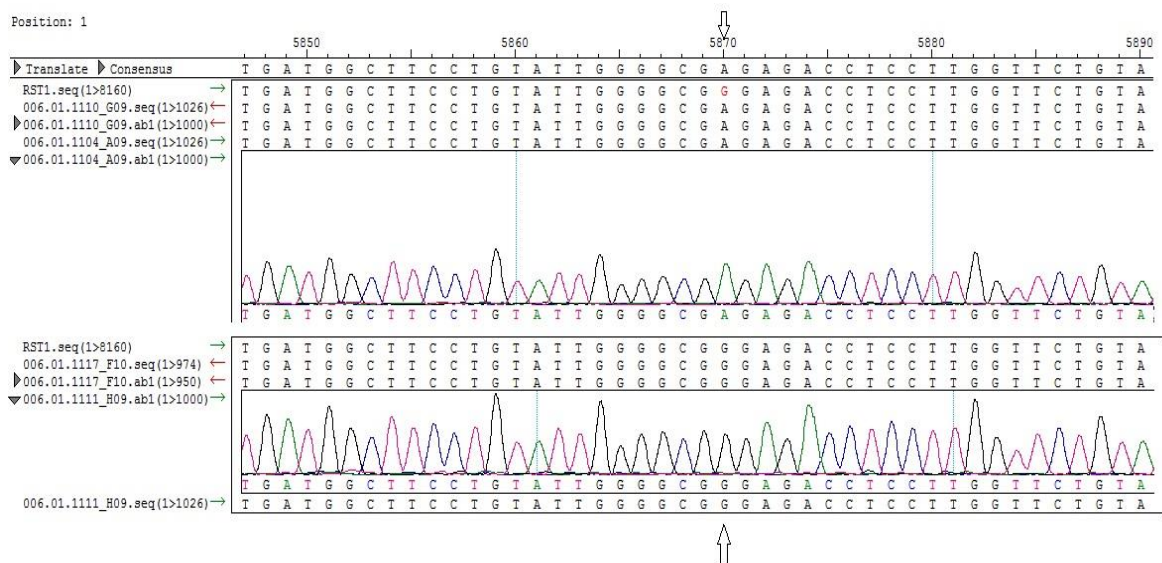


Figura 4.4. Cromatograma de la secuencia del gen *RST1* del alelo *nrb2-3* (arriba), comparado con el cromatograma de la secuencia de referencia del gen *RST1* (abajo). Las flechas señalan la posición de la mutación.

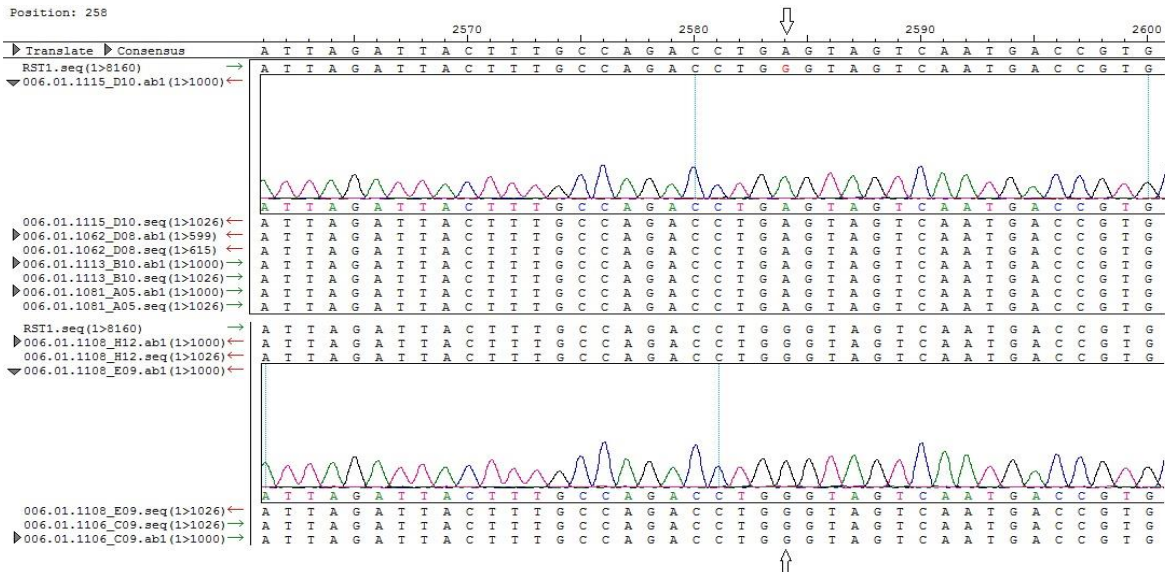


Figura 4.5. Cromatograma de la secuencia del gen *RST1* del alelo *nrb2-5* (arriba), comparado con el cromatograma de la secuencia de referencia del gen *RST1* (abajo). Las flechas señalan la posición de la mutación.

Como se puede observar en las figuras 4.4 y 4.5 los resultados de la secuenciación muestran que en los dos alelos el gen *RST1* está mutado. Este resultado sumado al hecho de que el gen se encuentra en la zona de mapeo del gen mutado y la información obtenida mediante búsqueda bibliográfica, nos lleva a poder afirmar que el gen *RST1* es necesario para el fenotipo *nrb2*.

4.1.2. Genes candidatos en el cromosoma I.

La región del cromosoma I donde puede localizarse la mutación es muy amplia y se tienen varios genes candidatos:

- *AT1G20400*. La secuenciación de los cuatro alelos (previa al inicio de este proyecto) mostró que en los cuatro alelos este gen estaba mutado. En tres de estos alelos se encontraron mutaciones producidas por EMS, mientras que la mutación encontrada en el otro alelo no era de este tipo. Este hecho hizo que este gen fuera considerado como el principal gen candidato. Para confirmar su papel en el fenotipo *nrb2*, se secuenciaron los dos alelos restantes, siguiendo la misma estrategia que la llevada a cabo en la secuenciación de *RST1*. Sorprendentemente, los resultados de la secuenciación mostraron que en ninguno de los dos alelos el gen estaba mutado. Estos resultados nos llevaron a desplazar al gen a un segundo plano, si bien todavía no se descarta que pueda estar involucrado en el fenotipo *nrb2*, debido a que la mutación se encuentre en alguna región del gen no secuenciada, como por ejemplo el promotor.

- *LNO1*. Este gen codifica una nucleoporina necesaria para la embriogénesis y la viabilidad de las semillas de Arabidopsis. En tres de los cuatro alelos, aparecen mutaciones canónicas. Para verificar si este gen está involucrado en el fenotipo *nrb2*, se enviaron a secuenciar los alelos restantes, siguiendo la misma estrategia que la llevada a cabo con los genes anteriores. Sin embargo, problemas en la optimización de la reacción de PCR han impedido que se haya logrado obtener la secuencia de este, en el momento de escribir este trabajo.
- *NPR1H*. Se trata de un gen *NPR1* bajo el control de un promotor 35S, y es la planta transgénica que se mutagenizó. El hecho de que, una vez retrocruzados dos veces, *NPR1H* esté presente en todos los alelos del mutante *nrb2* hace pensar que este gen puede estar implicado en el fenotipo. Su posible efecto sobre la mutación se ha valorado posteriormente mediante un análisis por marcadores de la segregación.

4.2. Modelo genético de la mutación *nrb2*.

4.2.1. Análisis de una población *nrb2-1* x Col-0 F2. Fijación de *rst1*.

Paralelamente, a la secuenciación de estos alelos se realizó un análisis de una población *nrb2-1* x Col-0 F2 utilizando un marcador para *RST1*. Col-0 es un ecotipo o variedad de Arabidopsis, utilizado en este caso por ser el parental de *nrb2*. En las inserciones de T-DNA estudiadas en *RST1*, este gen presentaba una herencia recesiva (Chen et al., 2005). En la figura 4.6 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos del análisis de la población *nrb2-1* x Col-0 con el marcador de *RST1*.

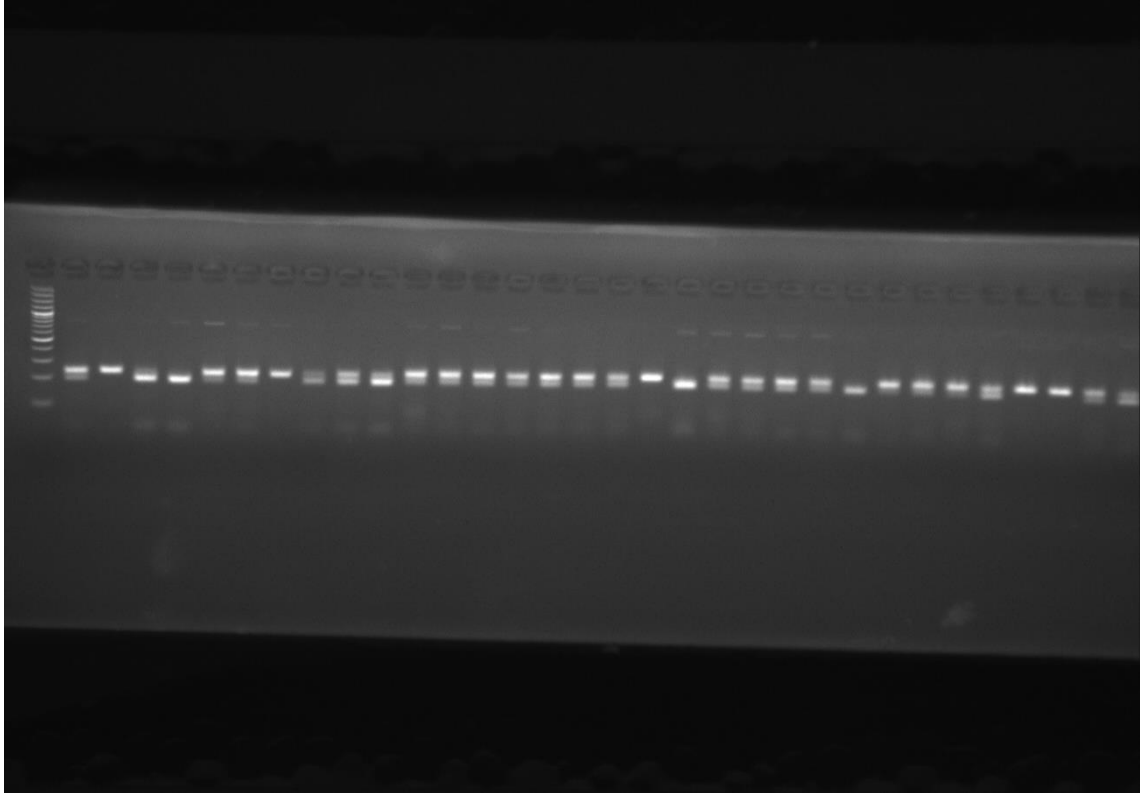


Figura 4.6. Análisis de una población *nrb2-1* x Col-0 con el marcador *RST1*. En la primera línea se muestran los marcadores de peso, y a continuación, cada línea corresponde a una planta. En este marcador, la presencia de dos bandas denota un heterocigoto, una banda sin cortar (más arriba) significa una planta mutante *rst1*, mientras que una banda cortada (más abajo) implica que la planta es homocigota silvestre *RST1*.

Los datos obtenidos del análisis con marcadores (Figura 4.6) confirman este comportamiento, ajustándose a la proporción 3/4 de plantas silvestres y 1/4 de plantas mutantes, descartando así algún tipo de efecto de letalidad.

Las plantas *nrb2-1* x Col-0 F2 que son *rst1* fueron seleccionadas para obtener a partir de ellas una población F3 con la que estudiar la relación existente entre *rst1* (ya fijado) con el gen o los genes del cromosoma I implicados en el fenotipo y así proponer un modelo genético que pueda explicar la causa del fenotipo *nrb2*.

4.2.2. Análisis de una población *nrb2-1* x Col-0 F3.

4.2.2.1. Análisis de plantas individuales.

Al obtener la F3 de las plantas seleccionadas, se sembraron las semillas obtenidas de cada individuo F2 en macetas individuales, tratando cada una de ellas con BTH y se observaron los fenotipos de cada planta. El objetivo de este proceso era fenotipar la F2 a partir de sus descendientes. El fenotipo de las macetas podía ser silvestre, mutante o heterocigoto, y ese fenotipo nos

da información de cómo es genéticamente la F2 en relación a los genes que controlan el fenotipo *nrb2*. Los resultados obtenidos de este análisis se recogen en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Fenotipos obtenidos en el análisis con el marcador *RST1* sobre la población *nrb2-1* x Col-0 F3.

Planta	Fenotipo
1	Heterocigota
2	Heterocigota
3	Mutante
4	Mutante
5	Heterocigota
6	Mutante
7	Mutante
8	Heterocigota
9	Silvestre
10	Mutante
11	Heterocigota
12	Silvestre
13	Heterocigota
14	Mutante
15	Heterocigota
16	Silvestre
17	Heterocigota
18	Heterocigota
19	Heterocigota
20	Silvestre
21	Heterocigota

A partir de estos datos se confirma algo que ya se sospechaba, y es que el gen *RST1* no es capaz por sí mismo de producir la mutación *nrb2*, hecho que podemos confirmar con la aparición, en este análisis, de individuos de fenotipo silvestre que son *rst1*.

Con estas 21 plantas se realizó un análisis de segregación para comprobar si los resultados obtenidos se ajustan a los modelos genéticos propuestos, es decir que el fenotipo mutante esté controlado por dos o tres genes.

Hay que tener en cuenta que el gen *RST1* está fijado en estas plantas y sabemos que participa en el fenotipo *nrb2*, por lo que en el análisis de segregación se realizó para un modelo de un gen o dos genes. Se realizaron χ^2 para ambos modelos que se presentan en las tablas 4.2 y 4.3.

Tabla 4.2. χ^2 para el modelo de un gen realizado con los datos de la población *nrb2-1* x Col-0 F3 (mut = Mutante; silv = Silvestre; Het = Heterocigota). Los números en negrita indican que la segregación real se ajusta a la teórica propuesta.

	Observado			Esperado			Total	χ^2 (2g.l=5.99)	Valor p
	mut	silv	Het	mut	silv	Het			
<i>nrb2-1</i> x Col-0 F3	6	4	11	5,25	5,25	10,5	21	0,42857143	0,80711755

Tabla 4.3. χ^2 para el modelo de dos genes realizado con los datos de la población *nrb2-1* x Col-0 F3 (mut = Mutante; silv = Silvestre; Het = Heterocigota). Los números tachados indican que la segregación real no se ajusta a la teórica propuesta.

	Observado			Esperado			Total	χ^2 (2g.l=5.99)	Valor p
	mut	silv	Het	mut	Silv	Het			
<i>nrb2-1</i> x Col-0 F3	6	4	11	1,3125	6,5625	13,125	21	18,0857143	0,00011823

La tabla 4.2 recoge los datos de la χ^2 para el modelo de un gen. Para este modelo se espera una proporción de mutantes de 1/4, los datos de la χ^2 se ajustan con una probabilidad elevada a este modelo. A partir de estos resultados podemos proponer un modelo en el que el fenotipo mutante esté causado por un gen recesivo en el cromosoma I más el gen *RST1*. Es decir la mutación estaría producida por dos genes recesivos, uno en el cromosoma I y otro en el cromosoma III. Ese gen del cromosoma I podría ser *NPR1H*, ya que a priori es el modelo más simple, ambos genes están presentes en todos los alelos y la posición de ambos genes coincide con la posición en la que deben encontrarse los genes. Posteriormente se comprobará la validez de este modelo.

En la tabla 4.3 se presentan los datos de la χ^2 para el modelo de dos genes. Como puede observarse los datos de la χ^2 no son adecuados como para poder aceptar esta hipótesis como probable. Sin embargo el número de individuos analizados no es lo suficientemente elevado como para proporcionar una prueba suficientemente sólida para descartar esta hipótesis.

4.2.2.2. Análisis de familias heterocigotas.

Ante esta situación se decidió analizar varias familias heterocigotas de la F3, para tener una población mayor sobre la que estudiar la segregación. Además

se realizó un análisis de plantas individuales de ambos fenotipos de estas familias con el marcador de *NPR1H* (por si fuera este gen o su inserción el que está involucrado en la mutación). En la tabla 4.4 se muestran la caracterización genotípica de las familias heterocigotas analizadas con los marcadores de *NPR1H* e *INS*. El marcador *INS* se desarrolló a partir de la secuencia de los alelos *nrb2*, y se corresponde con el gen *At1G12800*, en el cual está inserto el transgen *NPR1H*.

Tabla 4.4. Genotipo para los marcadores NPR1H e INS de las familias analizadas.

Familia	Fenotipos	NPR1H	INS
8	Mutante	Sí	No
	Silvestre	No	Sí
11	Mutante	Sí	No
	Silvestre	Sí	No
13	Mutante	Sí	No
	Silvestre	Sí	Sí
15	Mutante	No	Sí
	Silvestre	Sí	Sí
17	Mutante	Sí	Sí
	Silvestre	No	Sí
18	Mutante	Sí	No
	Silvestre	Sí	No
19	Mutante	Sí	No
	Silvestre	Sí	No
21	Mutante	Sí	Sí
	Silvestre	Sí	Sí

Se sembraron una cantidad elevada de semillas de cada una de las familias y fueron tratadas con BTH. Tras el tratamiento se evaluó el fenotipo de los individuos de cada una de las familias, lo que se presenta en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Fenotipos obtenidos en el análisis de las distintas familias de *nrb2-1* x Col-0 F3. (Mut = mutantes; Silv = silvestre)

Familia	Sem. Germinadas	Mut	Silv	Total
8	185	36	146	185
11	173	41	131	172
13	120	16	104	120
15	94	44	48	92
17	166	27	133	160
18	193	48	145	193
19	66	17	49	66
21	127	60	67	127

A partir de estos datos se obtuvieron distintas χ^2 acordes con los modelos propuestos, que se muestran a continuación en las tablas 4.6, 4.7, 4.8 y 4.9.

Tabla 4.6. χ^2 para el modelo de un gen recesivo.

		Modelo		1 gen mut rec		$\chi^2(1g.l = 3.84)$	Valor p
		observado		Esperado			
Familia	Total	mut	silv	mut	silv		
8	182	36	146	45,5	136,5	2,64468864	0,10389651
11	172	41	131	43	129	0,12403101	0,724703
13	120	16	104	30	90	8,711111111	0,00316276
15	92	44	48	23	69	25,5652174	4,2768E-07
17	160	27	133	40	120	5,633333333	0,01762209
18	193	48	145	48,25	144,75	0,00172712	0,96685059
19	66	17	49	16,5	49,5	0,02020202	0,88697431
21	127	60	67	31,75	95,25	33,5144357	7,0737E-09

Tabla 4.7. χ^2 para el modelo de un gen dominante.

		Modelo		1 gen mut dominante		$\chi^2(1g.l = 3.84)$	Valor p
		observado		Esperado			
Familia	Total	mut	silv	mut	silv		
8	182	36	146	136,5	45,5	295,978022	2,47768E-66
11	172	41	131	129	43	240,124031	3,6954E-54
13	120	16	104	90	30	243,377778	7,21473E-55
15	92	44	48	69	23	36,2318841	1,75181E-09
17	160	27	133	120	40	288,3	1,16674E-64
18	193	48	145	144,75	48,25	258,668394	3,34794E-58
19	66	17	49	49,5	16,5	85,3535354	2,49515E-20
21	127	60	67	95,25	31,75	52,1811024	5,06109E-13

Tabla 4.8. χ^2 para el modelo de dos genes, uno dominante y otro recesivo.

		Modelo		2 genes 1 dom A*; 1 rec b		Genotipos mutantes A*_bb	
		observado		Esperado		$\chi^2(1g.l = 3.84)$	Valor p
Familia	Total	mut	silv	mut	Silv		
8	182	36	146	34,125	147,875	0,12679628	0,72177717
11	172	41	131	32,25	139,75	2,92188432	0,087385763
13	120	16	104	22,5	97,5	2,31111111	0,1284522
15	92	44	48	17,25	74,75	51,0546265	8,98309E-13
17	160	27	133	30	130	0,36923077	0,543423864
18	193	48	145	36,1875	156,8125	4,74571542	0,029371338
19	66	17	49	12,375	53,625	2,12742813	0,144683337
21	127	60	67	23,8125	103,1875	67,6844337	1,91872E-16

Tabla 4.9. χ^2 para el modelo de dos genes recesivos.

		Modelo		2 genes recesivos		Genotipos mutantes aabb	
		observado		Esperado		$\chi^2(1g.l = 3.84)$	Valor p
Familia	Total	mut	silv	mut	Silv		
8	182	36	146	11,375	170,625	56,8630037	4,67254E-14
11	172	41	131	10,75	161,25	90,7968992	1,59203E-21
13	120	16	104	7,5	112,5	10,2755556	0,001348043
15	92	44	48	5,75	86,25	271,408696	5,5962E-61
17	160	27	133	10	150	30,8266667	2,82134E-08
18	193	48	145	12,0625	180,9375	114,205527	1,17479E-26
19	66	17	49	4,125	61,875	42,8646465	5,86612E-11
21	127	60	67	7,9375	119,0625	364,246194	3,34967E-81

La tabla 4.6 recoge el análisis χ^2 para el modelo de un gen recesivo. Los resultados muestran que las familias 8, 11, 18 y 19 pueden explicarse con este modelo mientras que la segregación del resto de familias no se adapta al modelo.

La tabla 4.7 muestra el análisis χ^2 realizado para el modelo en el cual un gen dominante es el responsable de la mutación. Los datos obtenidos no se ajustan a ninguna de las poblaciones por lo que se descarta esta hipótesis.

La tabla 4.8 muestra el análisis χ^2 realizado para el modelo de dos genes uno dominante y otro recesivo. Con este modelo podrían explicarse las familias 8, 11, 13, 17 y 19, las otras tres familias presentan valores de χ^2 elevados que impiden poder englobarlas dentro de este modelo.

La tabla 4.9 muestra el análisis χ^2 realizado para el modelo de dos genes recesivos. Los datos obtenidos no se ajustan a ninguna de las poblaciones por lo que se descarta esta hipótesis.

Fijándonos en el estudio con el marcador de *NPR1H* y el marcador *INS* que se realizó sobre las distintas familias (tabla 4.4) cuyas segregaciones han sido analizadas, podemos observar que en las familias 11, 18 y 19 el gen *NPR1H* no está segregando y es en estas familias en las que se obtienen unos valores de χ^2 que se ajustan mejor a un modelo de un único gen recesivo. Así mismo, estas familias también pueden explicarse según el modelo de dos genes, uno dominante y otro recesivo. Estos datos nos llevan a proponer un modelo genético que explique la mutación y que consistiría en tres genes, dos en el cromosoma I y uno en el III. Centrándonos en el cromosoma I, uno de los genes sería dominante mientras que el otro gen sería recesivo. El gen dominante podría ser *NPR1H*, su inserción, o algún gen cercano a él. Por ello cuando este gen no está segregando (familias 11, 18 y 19) la χ^2 presenta valores adecuados al modelo de un gen recesivo, ya que este sí que estaría segregando. Mientras que por otro lado en aquellas familias donde *NPR1H* (su inserción o algún gen cercano a él) continúa segregando la χ^2 concuerda mejor con el modelo de dos genes, uno dominante y otro recesivo.

4.2.2.3. Validación de *NPR1H* como gen implicado en la mutación *nrb2*.

Para averiguar si *NPR1H* es uno de los genes del cromosoma I involucrado en el fenotipo *nrb2*, se tomaron individuos de fenotipo mutante y silvestre procedentes de cada una de las familias F3 cuya segregación había sido analizada. Los resultados muestran que existen individuos mutantes sin *NPR1H*, de manera que *NPR1H* queda descartado como uno de los genes candidatos y cobra fuerza la hipótesis de que un gen cercano genéticamente al gen *NPR1H* sea el gen que está involucrado en la mutación *nrb2*. En la figura 4.7 se muestra el resultado del análisis con estos marcadores realizado sobre individuos de fenotipo mutante.

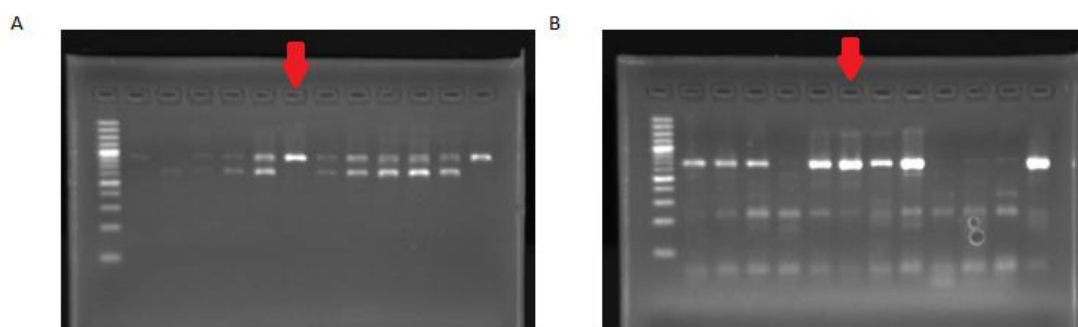


Figura 4.7. Resultados del análisis con el marcador *NPR1H* (A) y con el marcador *INS* (B) de individuos *nrb2-1* x Col-0 F3 (familia 15) de fenotipo mutante. Las flechas señalan a un individuo

de fenotipo mutante que no posee el gen *NPR1H*. El marcador *NPR1H* detecta la presencia del gen silvestre *NPR1* en forma de una banda, o bien la presencia del transgen *NPR1H*, en forma de una banda más pequeña, adicionalmente a la banda de *NPR1* silvestre. Por otra parte, el marcador *INS* solo detecta la presencia de una copia (o dos) del gen silvestre.

4.2.2.4 Búsqueda de nuevos genes candidatos en el cromosoma I.

Además de los genes candidatos ya valorados, existen otros genes en el cromosoma I que pueden estar implicados en la mutación. Para tratar de averiguar de forma más concreta la posición de los posibles genes involucrados en el fenotipo *nrb2* se diseñaron marcadores para ocho genes localizados en la región del cromosoma I en la que se supone que deben encontrarse. Sin embargo, el análisis con estos marcadores no proporcionó resultados satisfactorios.

4.2.2.5. Modelo genético propuesto para el fenotipo *nrb2*.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el posible modelo genético que se propone para poder explicar la mayoría de los datos obtenidos sería: Siendo A y B las formas silvestres de los genes en el cromosoma I y C la forma silvestre en el cromosoma III, para que la mutación *nrb2* se exprese el genotipo debe ser: heterocigoto u homocigoto mutante en A, mutante en B y mutante en C. Siendo A un gen cercano genéticamente a *NPR1H* y C el gen *RST1*. En la figura 4.8 se muestra un esquema del modelo genético propuesto para el fenotipo *nrb2*.

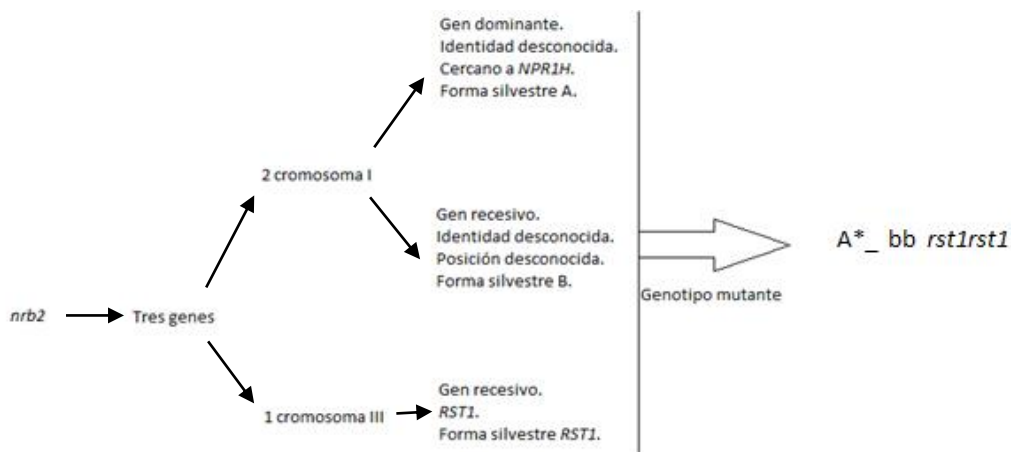


Figura 4.8. Esquema modelo genético propuesto para explicar el fenotipo *nrb2*.

5. CONCLUSIONES.

- El gen *RST1*, situado en el cromosoma III de Arabidopsis, está involucrado en el fenotipo mutante *nrb2*, hecho que es confirmado a partir de los resultados obtenidos en la secuenciación de este gen en los distintos alelos del mutante.
- El gen *RST1* no es el único gen responsable del fenotipo *nrb2*, como confirma la aparición de individuos silvestres *rst1*.
- El gen *NPR1H* no está involucrado en el fenotipo *nrb2*, ya que se ha comprobado que existen individuos *nrb2* que no poseen este gen.
- El modelo genético propuesto con el que se pretende explicar la mayoría de los datos obtenidos al analizar la segregación de una población *nrb2-1* x Col-0 F3, postula que el fenotipo *nrb2* está causado por tres genes. Dos en el cromosoma I, uno de ellos dominante (cuya forma silvestre es A) y otro recesivo (cuya forma silvestre es B) y el gen *RST1* situado en el cromosoma III.
- Los resultados del análisis de segregación se adaptan a la hipótesis de que uno de los genes del cromosoma I, implicado en el fenotipo *nrb2*, ocupa una posición cercana a *NPR1H*.
- A partir del modelo propuesto se concluye que para que la mutación *nrb2* se exprese el genotipo debe ser: heterocigoto u homocigoto mutante en A, mutante en B y mutante en *RST1*.

BIBLIOGRAFÍA.

Antoniw, J., Ritter, C., Pierpoint, W., Van Loon, L (1980). "Comparison of Three Pathogenesis-related Proteins from Plants of Two Cultivars of Tobacco Infected with TMV." *J. Gen. Virol* 47, 79-87.

Boller, T. and S. Y. He (2009). "Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens." *Science* 324, 742-744.

Canet, J. V., A. Dobón, F. Ibáñez, L. Perales and P. Tornero (2010). "Resistance and biomass in Arabidopsis: a new model for Salicylic Acid perception." *Plant Biotechnology Journal* 8, 126-141.

Canet, J, Dobón, A, Tornero, P. (2012). "Non-Recognition-of-BTH-4, an Arabidopsis Mediator subunit homolog, is necessary for development and response to salicylic acid." *The Plant Cell* 24, 4220-4335.

Cao, H., J. Glazebrook, J. D. Clarke, S. Volko and X. Dong (1997). "The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats." *Cell* 88, 57-63.

Cao, H., X. Li and X. Dong (1998). "Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6531-6536.

Chen, X., Goodwin, M., Liu, X., Chen, X., Bressan, R and Jenks MA (2009). "Mutation of the RESURRECTION1 Locus of Arabidopsis Reveals an Association of Cuticular Wax with Embryo Development." *Plant Physiology* 139, 909-919.

Chen, H., L. Xue, S. Chintamanani, H. Germain, H. Lin, H. Cui, R. Cai, J. Zuo, X. Tang, X. Li, H. Guo and J.-M. Zhou (2009). "ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 Expression to Negatively Regulate Plant Innate Immunity in Arabidopsis." *The Plant Cell* 21, 2527-2540.

Dangl, J. L. and J. D. Jones (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." *Nature* 411, 826-833.

de Wit, P. (2007). "How plants recognize pathogens and defend themselves." *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 2726-2732.

Dempsey, D. A., A. C. Vlot, M. C. Wildermuth and D. F. Klessig (2011). "Salicylic Acid biosynthesis and metabolism." *The Arabidopsis book* American Society of Plant Biologists 9:e0156.

Edreva, A. (2005). "Pathogenesis-Related Proteins: Research progress in the last 15 years." *Gen. Appl. Plant Physiology* 31, 105-124.

Flor, H. H. (1971). "Current status of the gene-for-gene concept." *Annual Review of Phytopathology* 9, 275-296.

Glazebrook, J. (2005). "Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens." *Annual Review of Phytopathology* 43, 205-227.

Heath, M. C. (2000). "Nonhost resistance and nonspecific plant defenses." *Current Opinion in Plant Biology* 3, 315-319.

Hückelhoven, R. (2007). "Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility." *Annual Review of Phytopathology* 45, 101-127.

Jones, D. A. and D. Takemoto (2004). "Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules." *Current Opinion in Immunology* 16, 48-62.

Jones, J. D. and J. L. Dangl (2006). "The plant immune system." *Nature* 444, 323-329.

Lawton, K. A., L. Friedrich, M. Hunt, K. Weymann, T. Delaney, H. Kessmann, T. Staub and J. Ryals (1996). "Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway." *The Plant Journal* 10, 71-82.

Loake G., Grant M (2007). "Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists." *Current Opinion in Plant Biology* 10, 466-472.

Mang, HG., Laluk, K., Parsons, E., Kosma, D., Cooper, B., Park, H., AbuQamar, S., Bocconcelli, C., Miyazaki, S., Consiglio, F., Chilosi, G., Bohnert, H., Bressan, R., Mengiste, T. and Jenks, MA (2009). "The Arabidopsis RESURRECTION1 Gene Regulates a Novel Antagonistic Interaction in Plant Defense to Biotrophs and Necrotrophs". *Plant Physiology* 151, 290-305.

Segonzac, C. and C. Zipfel (2011). "Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria." *Current Opinion in Microbiology* 14, 54-61.

van Leeuwen, H., D. J. Kliebenstein, M. A. West, K. Kim, R. van Poecke, F. Katagiri, R. W. Michelmore, R. W. Doerge and D. A. St Clair (2007). "Natural variation among *Arabidopsis thaliana* accessions for transcriptome response to exogenous salicylic acid." *The Plant Cell*. 19, 2099-2110.

van Loon, L. C., M. Rep and C. M. J. Pieterse (2006). "Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants." *Annual Review of Phytopathology* 44, 135-162.

Vernooij, B., Friedrich, L., Ahl-Goy, P., Staub, T., Kessmann, H., and Ryals, J. (1995) "2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens does not require the accumulation of salicylic acid." *MOI. Plant-Microbe Interact.* 8, 228-234.

Vlot, A. C., D. M. A. Dempsey and D. F. Klessig (2009). "Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease." *Annual Review of Phytopathology* 47, 177-206.

White RF (1979). "Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus." *Virology* 99, 410-412.

Wildermuth, M. C., J. Dewdney, G. Wu and F. M. Ausubel (2001). "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence." *Nature* 414, 562-565.

Zipfel, C. (2004). "Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception." *Nature* 428, 764-767.