

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Análisis de la expresión mediante ensayos GUS y caracterización de mutantes del gen *SBT4.13* de *Arabidopsis thaliana*

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Belén Mercé Gallo

DIRECTOR: Dr. Jesús Muñoz Bertomeu

CO-DIRECTOR: Dr. Ramón Serrano Salom

Curso 2014-2015

Valencia, Julio de 2015



Datos personales

Nombre y apellidos: Belén Mercé Gallo

Datos del trabajo fin de grado

Título: Análisis de la expresión mediante ensayos GUS y caracterización de mutantes del gen *SBT4.13* de *Arabidopsis thaliana*.

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor/a: Jesús Muñoz Bertomeu

Cotutor/a: Ramón Serrano Salom

Fecha de lectura: Julio 2015

Resumen

Las plantas son organismos que habitan en ambientes cambiantes, por tanto al no poder desplazarse a sitios mejores han desarrollado mecanismos de respuesta a todo tipo de estreses entre ellos el estrés ácido intracelular. La homeostasis de pH permite a las células vegetales tener un valor de pH dentro de un estrecho rango en los diferentes compartimentos y orgánulos, por tanto el pH será diferente según la localización en la célula.

En trabajos previos se identificó un mutante de *Arabidopsis* que era tolerante a estrés ácido intracelular durante la germinación y se pudo identificar al gen *SBT4.13* como responsable de dicha tolerancia cuando está sobreexpresado.

Durante este Trabajo Final de Grado se ha clonado el promotor *SBT4.13* en el plásmido pCAMBIA1303 para poder realizar estudios de expresión GUS en plantas de *Arabidopsis*, y poder conocer donde y cuando se expresa el gen. Tras obtener plantas transgénicas homocigotas de una inserción para el T-DNA de este plásmido se realizaron los ensayos y se pudo comprobar que el promotor inducía la expresión del gen reportero GUS sobre todo en plántulas de 1, 3 y 7 días, anteras y polen. También se han obtenido mutantes simples homocigotos para el gen *SBT4.13* donde se ha comprobado que no tienen diferencias significativas durante germinación en medios suplementados con ácido acético o paraquat. Como último apartado del trabajo se han obtenido plantas transgénicas homocigotas de una inserción que incorporan un antisentido del gen *SBT4.13* o un amiRNA contra *SBT4.13* y *SBT4.12*.

Palabras clave

SBT4.13, subtilasa, pH intracelular, ácido acético

Abstract

Plants are organisms that live in continual changing environments; therefore as they don't ability to move to less harmful environments, they have developed mechanisms to respond to all this kinds of stresses including intracellular acid stress. PH homeostasis allows plant cells to maintain a pH within a narrow range in all their different compartments and organs; therefore we will appreciate different pH depending on the location on the cell.

In previous experiments it was identified an arabidopsis mutant tolerant to intracellular acidic stress during germination. Here the gene *SBT4.13* was identified as the responsible of this tolerance when the gene was overexpressed.

During this Final Degree Thesis the promoter *SBT4.13* was cloned into the plasmid pCAMBIA1303 with the purpose of obtaining expression GUS studies in arabidopsis plants and by this, observing where and when the expression of this gene happens. After obtaining transgenic plants homocigotic for one insertion of the T-DNA of the plasmid, assays were done and it could be found that the promoter induced the expression of the reporter gen GUS in plants after 1, 3 and 7 days, anthers and pollen. Simple homocigotic mutants for the gene *SBT4.13* were also obtained where it was found to have no significant differences during germination in supplemented medium with acetic acid or paraquat. As the last section of the work homocigotic transgenic plants with one insertion that incorporate a *SBT4.13* antisense gene or an amiRNA against *SBT4.13* and *SBT4.12* were obtained.

Key words

SBT4.13, subtilase, intracellular pH, acetic acid

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Necesidad de la Biotecnología en la producción de alimentos...	1
1.2. El estrés abiótico.....	1
1.3. Importancia del pH intracelular.....	2
1.4. Proteasas.....	3
1.5. Subtilasas.....	3
1.5.1. Clasificación de las subtilasas.....	4
1.5.2. Estructura de las subtilasas.....	4
1.5.3. Redundancia de las subtilasas de <i>Arabidopsis</i>	5
1.5.4. Funciones.....	6
1.6. <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo.....	9
1.7. Antecedentes.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. Material vegetal.....	12
3.1.2. Medios y soluciones de crecimiento.....	12
3.1.3. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
3.1.3.1. Esterilización de semillas.....	12
3.1.3.2. Cultivo <i>in Vitro</i>	13
3.1.3.3. Cultivo en tierra.....	13
3.2. Material bacteriano.....	13
3.2.1. Manejo de las bacterias.....	13
3.2.2. Medios de cultivo.....	14
3.2.3. Preparación de células competentes.....	14
3.2.4. Transformación por choque térmico.....	14
3.2.5. Mantenimiento de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> ...	15
3.3. Vectores de clonación y transformación.....	15
3.4. Aislamiento de ácidos nucleicos.....	15
3.4.1. Aislamiento de DNA genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	15
3.4.2. Extracción de plásmidos de <i>E. coli</i>	15
3.4.3. Aislamiento de ARN de <i>A. thaliana</i>	16
3.5. Análisis de ácidos nucleicos.....	17
3.5.1. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	17
3.5.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	17
3.5.3. Extracción y purificación de bandas de ADN.....	17
3.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
3.5.4.1. Oligonucleótidos cebadores.....	17
3.5.4.2. Condiciones de PCR.....	18
3.5.4.3. PCR diagnóstica.....	19
3.5.5. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.....	19
3.5.6. Ligación de moléculas de ADN.....	19
3.5.7. Análisis de la expresión génica.....	19
3.5.7.1. Síntesis de cDNA para PCR semicuantitativa y a tiempo real.....	19

3.5.7.2. qRT-PCR.....	20
3.6. Diseño y obtención de la construcción plasmídica para experimentos de transformación de plantas.....	20
3.7. Transformación de <i>Arabidopsis</i> por inmersión floral.....	20
3.8. Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos...	21
3.9. Caracterización fenotípica de las líneas mutantes y transgénicas	21
3.10. Ensayo histoquímico para la detección de la actividad β -glucuronidasa.....	21
3.11. Análisis estadísticos.....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1. Análisis del patrón de expresión del gen <i>SBT4.13</i>	23
4.1.1. Análisis <i>in silico</i>	23
4.1.2. Análisis de expresión mediante la reacción histoquímica GUS.....	24
4.2. Obtención de mutantes de pérdida de función.....	29
4.2.1. Mutantes de pérdida de función por inserción de T-DNA....	29
4.2.2. Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan un gen antisentido de la <i>SBT4.13</i>	33
4.2.3. Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan un amiRNA para los genes <i>SBT4.13</i> y <i>SBT4.12</i>	34
5. CONCLUSIONES.....	35
6. BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.1. Representación esquemática de los principales sistemas de transporte en la membrana plasmática de la célula vegetal (Larsson, 2007).

Figura 1.2. Árbol filogenético de las 56 subtilasas presentes en *Arabidopsis thaliana* mostrando la agrupación en 6 subfamilias diferentes (Schaller y col., 2012).

Figura 1.3. A, representación esquemática de la estructura secundaria de las subtilasas, con hélices alfa como cilindros y hojas beta plagada como flechas. B, representación tridimensional de las subtilasas mostrando la triada catalítica (Siezen y Leunissen, 1997).

Figura 1.4. Representación de la zona de unión a un sustrato o inhibidor de las subtilasas. P, residuos aminoacídicos, S, zonas de unión de la subtilasa (Siezen y Leunissen, 1997).

Figura 1.5. Mapa de la distribución de los genes de las subtilasas de *Arabidopsis thaliana* (Rautengarten y col., 2005).

Figura 3.1. Esquema de la posición de los cebadores y representación de las bandas esperadas tras la PCR en líneas silvestres (WT), heterocigotas (He) y homocigotas mutantes (Ho). LP, RP y BP representan los cebadores para el estudio genético por PCR. Extraído y modificado de la web <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>

Figura 4.1. Estudio *in silico* del patrón de expresión tisular del gen *SBT4.13* (At5g59120) de *Arabidopsis thaliana* a través de la aplicación informática *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007). Los datos se muestran a través del mapa de expresión génica diseñado por Schmid y col., (2005).

Figura 4.2. Estudio *in silico* del patrón de expresión tisular en la semilla y embrión del gen *SBT4.13* (At5g59120) de *Arabidopsis thaliana* a través de la aplicación informática *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007). Los datos se muestran a través del mapa de expresión génica diseñado por Schmid y col., (2005).

Figura 4.3. **A,** Amplificación del promotor *SBT4.13* mediante enzimas de alta fidelidad; se muestra en el carril M el marcador GeneRuler 1 kb Plus de Thermo Scientific, en el carril 1 se muestra el producto de PCR del promotor *SBT4.13* (2190 pb), y en el carril 2 el producto de PCR donde no se puso molde (utilizado como control negativo de la PCR). **B,** se muestra la digestión del vector pCAMBIA1303 con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* mostrando el promotor *35S* liberado de unos 810 pb y el resto del plásmido (unos 11,55 Kb).

Figura 4.4. Digestión de los plásmidos extraídos de colonias aparecidas en la transformación de *E. coli* con la mezcla de ligación de los fragmentos del promotor *SBT4.13* y vector abierto pCAMBIA1303 sin el promotor *35S*. M, marcador GeneRuler 1 kb Plus de Thermo Scientific. Carriles 1 a 11 corresponden a colonias analizadas.

Figura 4.5. Comprobación mediante PCR de la presencia del plásmido Pro*SBT4.13*::GUSGFP en las colonias de *Agrobacterium tumefaciens*. M, marcador GeneRuler 1 kb Plus de Thermo Scientific. Carril 1, Control negativo de la PCR. Carriles del 2 al 8 corresponden a colonias analizadas.

Figura 4.6. Ensayo de la expresión GUS (condiciones de reacción especificadas en el Apartado 3.10) en diferentes estadios de crecimiento. A y B, Semillas embebidas y estratificadas durante 3 días a 4°C; para B lo que se hizo fue sacar el embrión de la semilla. C, plántulas de 36 horas tras pasar de la estratificación a 4°C a la cámara de crecimiento. D, plántulas de 3 días tras pasar de la estratificación a 4°C a la cámara de crecimiento. E, plántulas de 7 días tras pasar de la estratificación a 4°C a la cámara de crecimiento. F, Raíz de una plántula de 7 días. G y H, Hoja de roseta de planta adulta. I, Hoja del tallo. J, Raíz de planta adulta. K, flor. L, polen. M a Ñ.

Figura 4.7. Esquema del gen SBT4.13 y localización de las inserciones de T-DNA que presenta. Imagen obtenida de <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>.

Figura 4.8. Resultados obtenidos del análisis de los mutantes SALK_009191 y SAIL_228_A04 del gen SBT4.13 mediante PCR. Se muestran también los juegos de cebadores y tamaños de los fragmentos esperados. M, marcador GeneRuler 1 kb Plus de Thermo Scientific. CS, control silvestre.

Figura 4.9. A la izquierda se muestran plántulas de la línea SALK_009191 germinadas en medio MS1/2 suplementado con 50 mg/L de kanamicina. A la derecha se muestran plántulas de la línea SAIL_228_A04 germinadas en medio MS1/2 suplementado con 25 mg/L de BASTA. Las semillas que se emplearon fueron las que nos proporcionó el NASC.

Figura 4.10. Porcentaje de plántulas con cotiledones verdes y expandidos a los 3 ó 4 días desde el paso a la cámara de crecimiento de líneas mutantes, Col 2 o el mutante de ganancia de función para la SBT4.13 (S109). Para cada línea mutante se presenta el homocigoto y una línea acigótica (control silvestre, CS). Las barras muestran la media \pm error estándar. Para cada línea $n = 6$. * Significativo respecto a Col 2 ($P \leq 0,05$) según la Prueba T.

Figura 4.11. Análisis por RT-PCR cuantitativa de plántulas de 7 días de las líneas Col 2 o mutantes de inserción de T-DNA del gen *SBT4.13*. Para cada línea mutante se presenta el homocigoto y una línea acigótica (control silvestre, CS). Las barras muestran la media \pm error estándar. Para cada línea $n = 3$. * Significativo respecto a Col 2 ($P \leq 0,05$) según la Prueba T.

Tabla 3.1. Cebadores empleados en este trabajo

Tabla 3.2. Compuestos adicionados al medio MS para la caracterización fenotípica de los mutantes

Índice

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ALE: Abnormal Leafshape

amiRNAs: micro RNA artificial

Asp: Asparigina (D)

bp: pares de bases

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

DNasa: DNA endonucleasa

dNTPs: trifosfato de N (N= A adenosina, T timina, C citosina, G guanina)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GFP: proteína verde fluorescente

GUS: β -glucuronidasa

H₂O mQ: Agua Milli-Q

His: histidina (H)

Kb: kilo base

LB (medio): Luria Bertani

M: molar

MEROPS: Base de Datos de proteasas, proteinasas y enzimas proteolíticas

mL: mililitros

MS: Murashige y Skoog

p/v: partes/volumen

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

OD₆₀₀: Densidad Óptica a 60nm

ONU: Organización de las Naciones Unidas

RACE: rapid amplification of cDNA ends

RALF: Factor de Alcalinización Rápida

RNA: ácido ribonucleico

RNasa: nucleasa de RNA

Rpm: revoluciones por minuto

RT: retrotranscripción

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SBT: subtilasa

Ser: serina (S)

SDS: dodecil sulfato sódico

Índice

$T_{1/2/3}$: Generacion primera, segunda, tercera

TAQ: *Termophilus aquaticus*

TBE: Tris, borato EDTA

TDT: terminal deoxynucleotidyl transferase

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

U: unidades

v/v: volumen/volumen

WT: silvestre

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Necesidad de la Biotecnología en la producción de alimentos

La productividad vegetal es el pilar que sostiene la vida en la Tierra. Actualmente, el calentamiento global ha dejado de ser una predicción y es una palpable realidad, así como los efectos que produce sobre la planta. A este problema se le añade que la población mundial se encuentra en continuo crecimiento y se estima que para 2050 seamos unos 9000 millones de personas (ONU, 2007). Esto crea una alarma por la producción de alimentos, por lo que cabe pensar que para poder abastecer a toda esta población será necesaria una producción de alimentos cada vez más eficaz; aumentando la producción y a la vez disminuyendo las limitaciones durante el desarrollo vegetativo.

Asimismo, los logros obtenidos por la “Revolución Verde” de los años 60 donde se consiguió duplicar los rendimientos de cosechas básicas para la alimentación de la población (arroz trigo y maíz) optimizando las prácticas agronómicas y aplicando técnicas de mejora genética clásica han venido acompañados por aspectos adversos. Las técnicas utilizadas produjeron una mayor utilización de abonos nitrogenados, plaguicidas y energía procedente de combustibles fósiles causando grandes daños medioambientales. Además las técnicas de mejora clásica son muy lentas y limitadas. Con todos estos cambios introducidos en estos tres cultivos se dejó de lado muchos otros importantes para la alimentación de las personas de países en vías de desarrollo. Sintetizando, esta revolución verde duplicó el volumen de producción de cereales en tan solo 20 años pero conllevó a disminuir la biodiversidad y a incrementar el consumo de fertilizantes nitrogenados y fosforados en 7 y 4 veces respectivamente (Tilman, 1999).

Por ello se ve la clara necesidad de ir más allá y encontrar una tecnología que consiga además de lograr una productividad deseable, que respete en la mayor medida posible el medio ambiente. Así, podría ser la clave de todo este problema la aplicación de la Biotecnología para la producción de plantas transgénicas, de forma rápida, racional y controlada, que permita el salto a estas metas de producción agrícola mediante la Biología Molecular.

1.2. El estrés abiótico

Entre los factores que limitan en mayor medida la productividad vegetal y que reducen significativamente la disponibilidad de suelos destinados a cultivo destaca el estrés abiótico. Se estima que el estrés abiótico reduce la productividad de los cultivos alimentarios en más de un 50% (Bray y col., 2000).

En relación con las plantas, se entiende por estrés abiótico al conjunto de efectos negativos sobre las células vegetales que pueden consistir en una inhibición del crecimiento, disminución de la productividad, pudiendo llegar incluso a ocasionar la muerte de la planta como consecuencia de las condiciones adversas del medio. Los principales factores ambientales que generan dicho estrés son la sequía, salinidad y temperaturas subóptimas. La salinidad muchas veces es también producida o acentuada por el excesivo uso de fertilizantes y/o agua de riego con alta conductividad eléctrica, los cuales finalmente terminan por salinizar los suelos

Algunos de los efectos más generalizados que ocurren en las células como consecuencia de distintas condiciones ambientales adversas son la generación de estrés osmótico (Chinnusamy y col., 2004), la producción de estrés oxidativo (Price y Hendry, 1991; Zhu, 2001) o la acidificación intracelular (Katsuhara y col., 1989; Coote y col., 1991; Piper y col., 1997; Fernandes y col., 1998). Este último efecto es lo que se conoce como “estrés ácido intracelular”, y a diferencia de los otros efectos, no existe mucha información disponible relacionada con el estudio del estrés ácido en células vegetales.

1.3. Importancia del pH intracelular

Un pH adecuado en los diversos compartimentos celulares garantiza que una multitud de procesos celulares se desarrollen correctamente, y las variaciones en él afectarán este buen funcionamiento; asimismo permite el mantenimiento de la estructura tridimensional de las enzimas, dado que las variaciones que se sucedan en la concentración de H^+ pueden alterar el estado de ionización de los aminoácidos polares afectando su estructura y su función.

La actividad de las enzimas también se ve influenciada por el pH, ya que la actividad de estas varían alrededor de un pH óptimo, por tanto las alteraciones en el pH puede afectar el metabolismo o la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas por tratarse de procesos en los que intervienen diversas enzimas.

Por otro lado el pH intracelular afecta de forma directa al transporte de solutos, los cuales se movilizan a través de las membranas celulares. El transporte activo primario es mediado por las bombas de H^+ creando un gradiente de H^+ a ambos lados de la membrana, lo que representa una fuente de energía almacenada para transportar otros solutos en contra de su gradiente de concentración, conocido como transporte secundario (Serrano, 1985), ya sea mediante cotransporte con H^+ o sencillamente a favor de su potencial eléctrico.

Este transporte activo secundario posibilita que el nitrato, el fosfato y el sulfato puedan ingresar en la célula en contra de su gradiente de concentración; asimismo la acumulación de K^+ o la expulsión de Na^+ del citoplasma son igualmente procesos de transporte activos que dependen del gradiente electroquímico de H^+ . En la Figura 1.1 se muestran algunos de los principales transportadores de iones o de otros solutos de la membrana plasmática vegetal, obsérvese la implicación que tienen los H^+ en la mayoría de éstos.

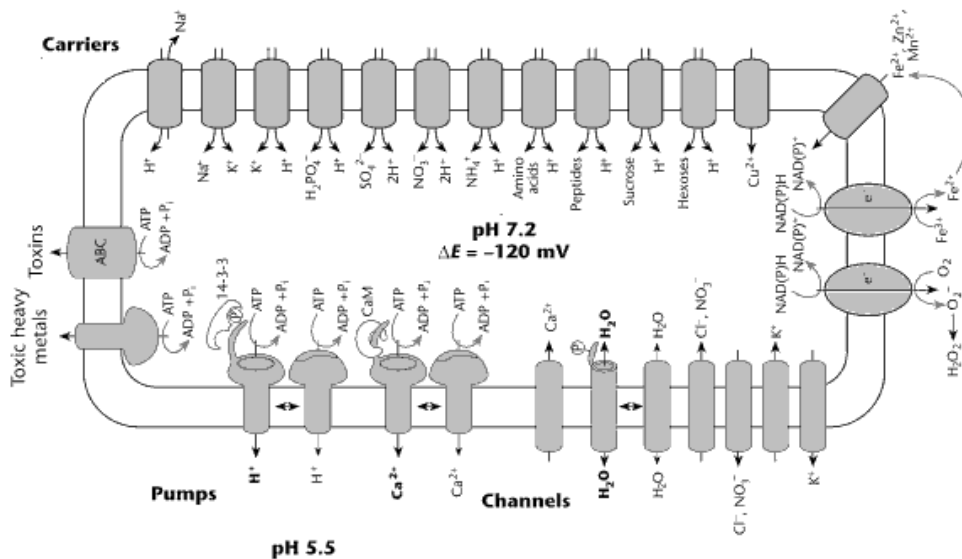


Figura 1.1. Representación esquemática de los principales sistemas de transporte en la membrana plasmática de la célula vegetal (Larsson, 2007).

El tráfico celular de vesículas es otro proceso afectado por el pH, siendo necesario que éste sea el apropiado en cada compartimento del sistema de endomembranas para proporcionar un adecuado funcionamiento. Asimismo existe la propuesta que el pH cumple una función como mensajero celular (Felle, 2001), dado que se han detectado variaciones en la concentración de H^+ en el citosol ante procesos tales como cambios de luz a oscuridad (Felle y Bertl, 1986) o también a elicitores de patógenos (Mathieu y col., 1996).

Hay pocos estudios sobre la homeostasis de pH en plantas y la mayoría son muy recientes y generados en el grupo de investigación del profesor Ramón Serrano (Niñoles, 2011; Muñoz,

Introducción

2011; Lledó, 2010; Vilanova, 2011; Bissoli, 2012; Vilcara, 2012; Niñosles, 2013; Oms, 2013; Selgas, 2014). Por lo que el conocimiento de los mecanismos moleculares de respuesta o adaptación a este tipo de estrés requieren más investigación.

El presente trabajo se enmarca en el estudio de uno de los genes identificados previamente por nuestro grupo. Este gen codifica una proteasa del tipo de las serin-proteasas, y en concreto a las subtilasas (SBT4.13), que parece estar implicada en la tolerancia al estrés ácido intracelular (Vilcara, 2012; Oms, 2013)

1.4. Proteasas

Las proteasas son un tipo de proteínas que hidrolizan los enlaces peptídicos entre los aminoácidos y dar lugar a la fragmentación de sus proteínas diana. Estas enzimas pueden actuar en el extremo o en la parte interior de las proteínas y están descritas, por tanto, como exo o endopeptidasas, respectivamente. La proteólisis es una importante modificación coetánea o posterior a la traducción con diversas implicaciones funcionales. Se emplea para destruir proteínas (catabolismo proteico), maduración de proteínas precursoras, o en la eliminación de la metionina en la fase de traducción temprana por las metionin-aminopeptidasas (Jackson y Hunter, 1970). Las proteasas gobiernan varios procesos importantes a nivel celular y de tejidos durante el crecimiento y desarrollo de los organismos, y también durante su final (van der Hoorn, 2008; Kato y Sakamoto, 2010; Nixon y col., 2010; Coll y col., 2011). Particularmente en las plantas, se ha demostrado que las proteasas están involucradas en la formación de xilema, maduración de la semilla, la movilización de suministro de nutrientes, eliminación de los péptidos señal de proteínas codificadas por el núcleo y cuyo destino son orgánulos celulares, eliminación de proteínas dañadas, respuestas a estímulos del medio ambiente y a factores de virulencia, y en la senescencia.

En la base de datos MEROPS (versión 9.12) (Rawlings y col., 2010) se incluyen unas 856 accesiones que incluyen proteasas conocidas y putativas de *Arabidopsis thaliana*, correspondientes a aproximadamente 3,1% de todos los genes que codifican proteínas en *Arabidopsis* (27416 según "TAIR10 gene lists" en la web <https://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Estas proteasas están distribuidas en más de 62 familias que pertenecen a 30 diferentes grupos, de los cuales el más grande es el de las serín-proteasas, seguido por el de las aspartato, cisteína, metalo- y treonina proteasas (van der Hoorn, 2008). A pesar de ser tan abundantes y de las importantes implicaciones que tienen, sólo unos pocos sustratos naturales han sido identificados hasta la fecha.

1.5. Subtilasas

Las subtilasas son proteínas del grupo de las serín proteasas, ya que realizan la digestión de proteínas mediante una tríada catalítica esencial en su centro activo, y se distinguen de otros tipos de proteasas por presentar en esta tríada residuos de Asp, His y Ser. Las subtilasas debe su nombre a dos subtilisininas que fueron identificadas en las cepas de Carlsberg y BPN de *Bacillus subtilis* (Smith y col., 1966).

Muchas de las subtilasas son extracelulares y endopeptidasas de amplio espectro que son utilizadas por bacterias, arqueas y eucariotas inferiores para poder crecer en sustratos proteicos o para defenderse (Siezen y Leunissen, 1997). En un principio, se pensaba que estaban restringidas a los microbios, y que la amplia especificidad de sustrato era considerada como una característica general de las proteasas relacionadas con las subtilisininas (Siezen y col., 1991).

Nuevos miembros de las subtilasas se van descubriendo continuamente en diferentes organismos de los reinos Archea, Bacteria y Eucaria; predominando en las bacterias gram-positivas y *Bacillus*, sugiriendo que han existido desde hace mucho tiempo.

Introducción

Utilizando las secuencias aminoacídicas de varios tipos de subtilasas se llegó a determinar una estructura típica de las regiones conservadas en las subtilasas y de los elementos de estructura secundaria conservados. Esta estructura estaría compuesta por unos 190 residuos que contenía virtualmente todas las hélices alfa y láminas beta comunes, incluyendo los residuos del sitio catalítico D32, H64, S221. Es sorprendente el alto grado de variabilidad que se encuentra entre las secuencias de la región catalítica. A la excepción de los tres residuos mencionados previamente, cualquier residuo podría ser sustituido por uno o más residuos distintos, aunque se han descubierto 19 residuos altamente conservados, de los cuales 10 son glicinas. (Siezen y Leunissen, 1997; ver Figura 1.3).

La Figura 1.4 muestra una ilustración esquemática de la región de unión de las subtilisinas, basado en una base de datos 3D. Observamos una región capaz de acomodar hasta 6 residuos de aminoácidos de un sustrato polipeptídico o de un inhibidor. La región catalítica (S1 a S4) es grande e hidrofóbica por lo que muestra una preferencia por moléculas aromáticas y apolares. Las reacciones electrostáticas entre la enzima y el sustrato son más dominantes que las reacciones hidrofóbicas y ayudan a dar especificidad a la unión con los sustratos.

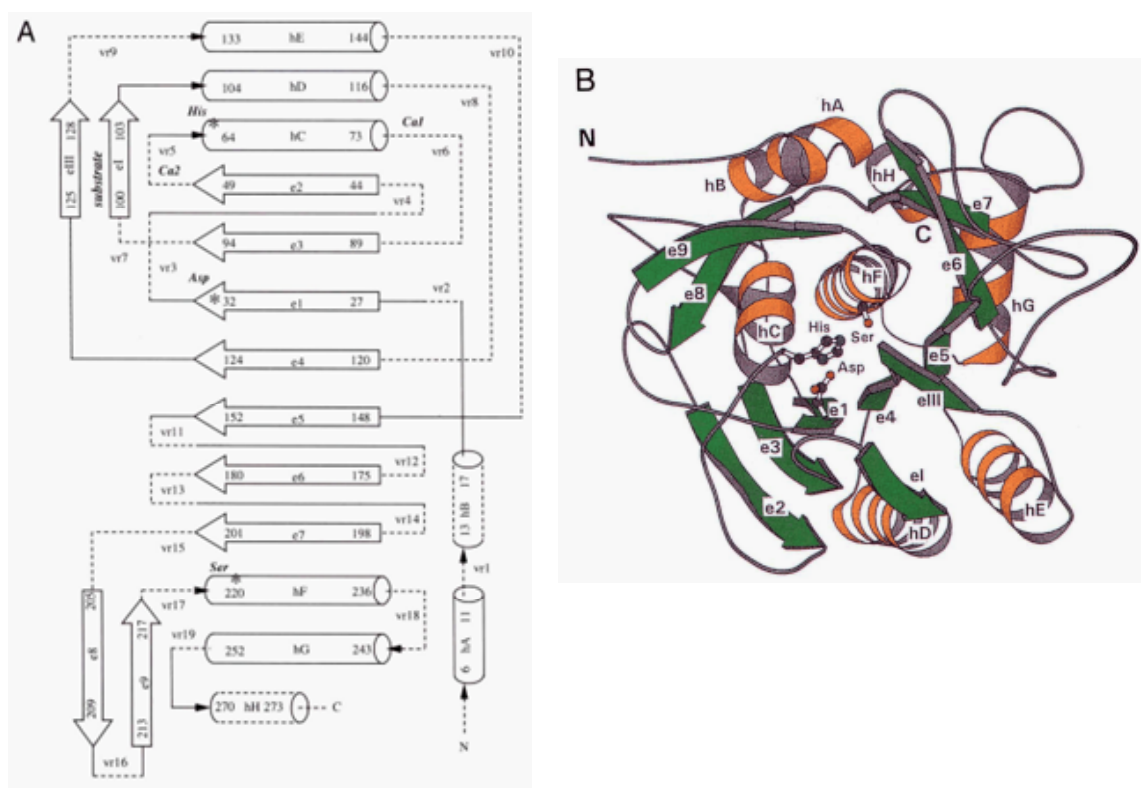


Figura 1.3. A, representación esquemática de la estructura secundaria de las subtilasas, con hélices alfa como cilindros y hojas beta plagada como flechas. B, representación tridimensional de las subtilasas mostrando la triada catalítica (Siezen y Leunissen, 1997).

1.5.3. Redundancia de las subtilasas de Arabidopsis

A la hora de estudiar las subtilasas de arabisopsis uno de los grandes problemas es que no se encuentran diferencias fenotípicas entre los mutantes simples respecto a las plantas silvestres. En un experimento en el que se utilizaron 55 líneas homocigotas con inserciones de T-DNA de los genes *AtSBTs* se observó que estos mutantes no presentaban diferencias en los estadios del desarrollo, a excepción de los mutantes en el gen *AtSBT1.2* que mostraron alteraciones fenotípicas visibles. Tras obtener varios dobles mutantes los autores seguían sin apreciar alteraciones en el fenotipo. Todo esto parece indicar que en la familia de las subtilasas de arabisopsis existe una gran

Introducción

(Liu y col., 2007), mientras que la sobreexpresión de la parte N-terminal de bZIP17 causó un modesto aumento en la tolerancia a la sal (Liu y col., 2008).

Por otro lado, AtS1P está relacionado con la maduración del factor de alcalinización rápida AtRALF23 (Tsiatsiani y col., 2012; Liu y col., 2007). Se ha visto que AtS1P es capaz de cortar a este factor de 138 aminoácidos, aunque no se ha podido por el momento aislar el péptido maduro. La sobreexpresión de AtRALF23 produce plantas adultas enanas y tupidas, y en plántulas el fenotipo que se observa es una reducción en su crecimiento y una reducción de la capacidad de las raíces para acidificar la rizosfera (Srivastava y col., 2009)

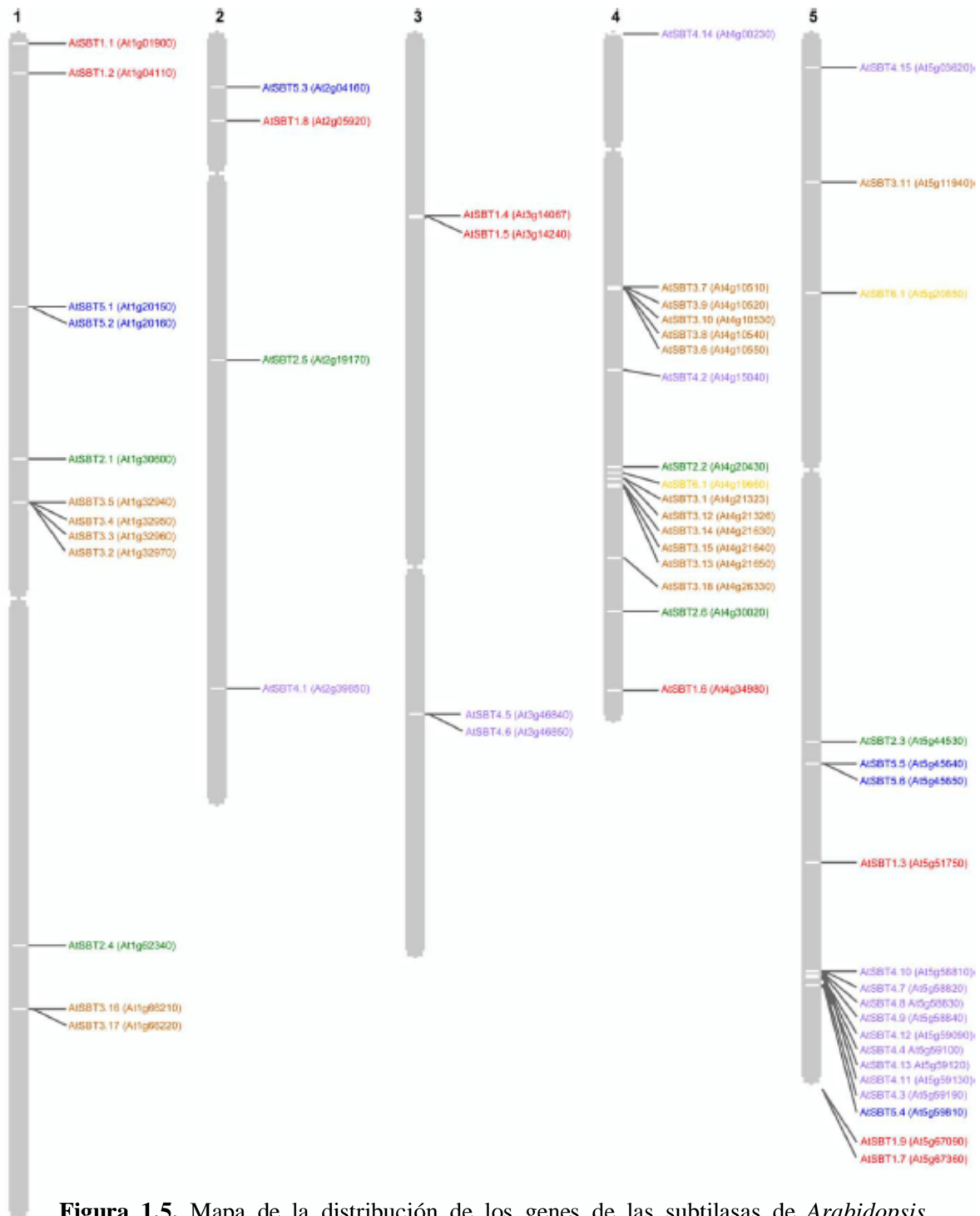


Figura 1.5. Mapa de la distribución de los genes de las subfamilias de *Arabidopsis thaliana* (Rautengarten y col., 2005).

Introducción

La subtilasa SBT3.3 está relacionada con la respuesta inmune de las plantas. Induce un mecanismo que promueve la reorganización de la cromatina y activa el mecanismo de producción de ácido salicílico relacionado con la activación de genes de defensa. Además, esta subtilisina induce la transcripción de los genes *OXII* y *MAP* quinasas relacionados con la defensa frente patógenos (Ramírez y col., 2013).

La subtilasa AtSBT1.1 está involucrada en el procesamiento del péptido hormonal AtPSK4, un factor de crecimiento del tipo de las fitosulfoquina, promoviendo así la proliferación celular durante el cultivo de tejidos. Que sea diana de esta subtilasa ha sido observado después del corte de un péptido sintético que alberga el sitio de corte predicho de AtPSK4. Además, la proteína AtPSK4 myc-etiquetada no era procesada en el mutante SBT1.1 (Tsiatsiani y col., 2012; Srivastava y col., 2008).

En otros estudios se han investigado subtilasas como SDD1 (SBT 1.2) y ALE1 (SBT 2.4) altamente implicadas en la regulación del desarrollo de la planta. El gen *SDD1* está involucrado en la formación de los estomas, tanto en la cantidad de estomas producidos como en el patrón de formación. (Rautengarten y col., 2005; Berger y col., 2000). La pérdida de función del gen *SDD1* resulta en un incremento de la densidad de estomas en la planta (Beers y col., 2004). La subtilasa ALE1 (ABNORMAL LEAFSHAPE1) está involucrada en la formación de la cutícula y la diferenciación de la epidermis durante la maduración del embrión en *Arabidopsis* (Rautengarten y col., 2005). El gen *ALE1* se expresa exclusivamente en la región que recubre la superficie del embrión (epidermis) afectando por lo tanto a la permeabilidad de las semillas y con ello a futuras anomalías en el crecimiento de la plántula. La ausencia de *ALE1* conlleva una incorrecta separación del endospermo de los diferentes tejidos embrionarios y con ello a la malformación de la semilla. Plántulas mutantes al gen producen un fenotipo con cotiledones y hojas pequeñas, arrugadas y con un número menor de tricomas (Tanaka y col., 2001).

La subtilasa XSP1 (SBT 4.14) ha sido detectada principalmente en tejidos y órganos (tallos y flores) donde las células se encuentran en expansión y diferenciación pero no en tejidos maduros. Esto sugiere que estas subtilasas están en funciones específicas asociadas al crecimiento y/o diferenciación (Zhao y col., 2000).

La subtilasa AtSBT1.7 se localiza en la cubierta de las semillas en desarrollo. Está relacionada con el desarrollo y maduración de la testa afectando principalmente a la ruptura de la cubierta de la semilla y al desprendimiento del mucílago. Induce un mecanismo que inicia la acumulación y activación de las enzimas necesarias para el desprendimiento de las primeras capas de la pared celular de la semilla, y facilita la salida del mucílago. Esto se vio corroborado ya que una mayor expresión del gen producía un aumento en la actividad de las pectinas metilesterasas en las semillas (Rautengarten y col., 2008).

El gen de la subtilasa AIR3 está directamente relacionado con el desarrollo de raíces laterales. Induce un mecanismo que promueve la digestión de proteínas estructurales de la matriz extracelular, debilitando las conexiones célula a célula y por lo tanto facilitando el desarrollo de raíces laterales (Neuteboom y col., 1999).

La subtilasa AtSBT5.4 está relacionada con la ruta de señalización de clavata. Aunque los mutantes no poseen fenotipo aparente, una sobreexpresión del gen produce una pérdida de función del fenotipo “clavata”, dando a pensar que AtSBT5.4 puede inactivar algún componente de la ruta. Esta sobreexpresión produce un fenotipo con un alto número de inflorescencias, una ausencia de silicuas y semillas, e incluso la no producción de órganos reproductivos en algunos casos. (Liu y col., 2009)

La subtilasa AtSBT3.5 está relacionada con el procesamiento de la pectina metilesterasa (II) llevando a la escisión de la región Pro N-terminal en el Golgi, y transformándola en una enzima activa pudiendo ser secretada al apoplasto de forma funcional (Sénéchal y col., 2014).

Introducción

Las subtilasas At-SLP1, At-SLP2, At-SLP3 y ARA12 están relacionadas con el desarrollo de la planta. Su expresión puede encontrarse en hojas de plantas juveniles pero no en raíces, mientras que en plantas adultas sí que se observa una expresión en diferentes tejidos tanto en raíces como en hojas y flores. Estos genes están relacionados con un control de la regulación de la expresión y función de enzimas específicas necesarias para el desarrollo de la planta pero trabajan de forma no coordinada. La expresión de estas tres subtilasas SLP está regulado de forma diferente durante el envejecimiento de la planta. Así, At-SLP2 es inducido durante el envejecimiento mientras que en el caso de At-SLP1 y At-SLP3 su inducción se ve disminuida (Golldack y col., 2003).

1.6. *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo

La investigación en biología requiere del empleo de sistemas modelo para comprobar o refutar en ellos las hipótesis propuestas. En un principio, los investigadores utilizaban los organismos más accesibles y manejables, pero con el tiempo, la investigación relacionada con un área determinada tiende a concentrarse en una especie en concreto (especie modelo). Un organismo modelo es aquel en el que las estrategias de genética directa y reversa pueden llevarse a cabo con facilidad y sus resultados se pueden extrapolar a otras especies. La principal característica que debe cumplir un organismo para ser considerado modelo es que se puedan correlacionar los diferentes genes con fenotipos gracias a la existencia de colecciones de mutantes. Debe tener un tamaño reducido para facilitar su manejo, un ciclo de vida corto, descendencia abundante y un mantenimiento simple y económico en el laboratorio. Por otro lado, es importante que posea una variabilidad fenotípica y genotípica, y que los fenotipos de interés se puedan observar y medir de manera sencilla.

En el caso del estudio de las plantas, el sistema modelo elegido fue *Arabidopsis thaliana*, que es una planta autógena, perteneciente a la familia de las brasicáceas o crucíferas. Pese a que carece de importancia agronómica, muestra unas características que hacen que sea el modelo vegetal más empleado en biología celular y molecular (Meyerowitz, 1989). Es un organismo eucariota y pluricelular, por lo que permite abordar estudios de respuesta frente a estreses. Posee un tamaño reducido (30-40 cm de altura), un ciclo de vida corto (2-3 meses), una elevada producción de semillas (>10.000 semillas/planta), y un genoma pequeño (125 Mb) y completamente secuenciado. Otro aspecto de interés es la disponibilidad de amplias colecciones de mutantes, así como de líneas sobreexpresoras. Esta especie debido a su fácil manipulación permite establecer relaciones entre fenotipos y genes, lo que permite una generalización a otras especies y por tanto acortar su mejora.

1.7. Antecedentes

Las investigaciones sobre la homeostasis de pH intracelular, como ya he comentado anteriormente son recientes y la mayoría de los trabajos se han realizado en el grupo del profesor Ramón Serrano. En un rastreo de mutantes realizado en años anteriores se obtuvo un mutante de activación transcripcional que permitía tolerar la acidificación intracelular inducida por ácido acético en el medio. La inserción del T-DNA presente en este mutante se determinó mediante la técnica del rescate plasmídico y se pudo comprobar que estaba en una región del cromosoma 5 donde se localizaban varios genes de subtilasas (Vilcara, 2012; Oms, 2013). El análisis de expresión de estos genes mediante RT-PCR permitió identificar que el gen *SBT4.13* (At5g59120) estaba inducido unas 200 veces respecto al control. Por otro lado se generaron plantas transgénicas que sobreexpresaban el cDNA de *SBT4.13* y se comprobó que las plantas presentaban mejor tolerancia al estrés ácido intracelular que las plantas silvestres. Tanto el mutante rescatado como las plantas transgénicas de la recapitulación tienen resistencia a otros ácidos débiles (sorbico y propiónico), a agentes oxidantes (paraquat y peróxido de hidrógeno), y a cationes tóxicos como la norespermidina. Tras estudiar en las bases de datos de *Arabidopsis* se comprobó que existía una

Introducción

subtilasa con una gran homología de secuencia nucleotídica y aminoacídica con SBT4.13, que estaba anotada como SBT4.12 (At5g59090) y que está muy cerca en el cromosoma. El hecho de ser tan parecidas a nivel de secuencia puede complicar el estudio en mutantes de pérdida de función debido a la redundancia génica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Final de Grado es profundizar en el conocimiento de la subtilasa 4.13 de *Arabidopsis thaliana*, proteasa que está relacionada con la tolerancia a estrés ácido intracelular y a estrés oxidativo.

Para la consecución de este objetivo se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1- Obtención y estudio de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que nos permitan conocer el momento del desarrollo y lugar de la expresión del gen *SBT4.13*.
- 2- Estudio de nuevos mutantes de pérdida de función por inserción de T-DNA en el gen *SBT4.13*.
- 3- Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que incorporen un antisentido del gen *SBT4.13* o amiRNAs contra los genes *SBT4.13* y *SBT4.12*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

La especie vegetal objeto de este estudio fue *Arabidopsis thaliana*. En concreto, para este estudio se empleó el ecotipo Columbia 2 (Col 2) para la obtención de las distintas líneas transgénicas y también como control en los experimentos de germinación. Se empleó la línea de sobreexpresión del gen *SBT4.13* denominada S109 obtenida en Vilcara 2012 y Oms (2013).

Se utilizaron también varios mutantes simples de T-DNA para el gen *SBT4.13*, en concreto el mutante SAIL_228_A04 (4 exon) y el SALK_009191 (4 intron).

Todas las semillas fueron proporcionadas por el Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

3.1.2. Medios y soluciones de crecimiento

Todos los medios de cultivo utilizados en este proyecto se esterilizaron en autoclave (Mediclave P Selecta) durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión. El ácido acético, paraquat y las sustancias termolábiles como los antibióticos (higromicina y cefotaxima), se adicionaron al medio de cultivo ya estéril y enfriado por debajo de los 50°C. Los medios se conservaron a 4 °C.

Medio MS

De forma rutinaria para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana* se utilizó el medio Murashige-Skoog (MS; Murashige y Skoog, 1962). Está compuesto de 0,4% (p/v) de sales MS (Sigma-Aldrich, M5524), 1% (p/v) de sacarosa, 10 mM de MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico) y 0,8% (p/v) fitoagar (Duchefa Biochemie). En cuanto al pH, este se ajustó a pH 5,7 con Tris [Tris(hidroximetil)aminometano], aunque en los experimentos en los que el medio se suplementó con ácido acético y en sus controles, el pH se ajustó a 5,5.

El ácido acético se preparó pesando 5,48 g de Tris base polvo, se añadió 2,418 mL de ácido acético glacial (17,5 M) y se enrasó a 50 mL con H₂O mQ. De esta manera, se obtuvo un stock de ácido acético 1 M pH 5,5. La mezcla se esterilizó en campana mediante filtración, a través de unos filtros estériles de 45 µm.

Solución nutritiva

La solución nutritiva es la solución de minerales usada para regar las plantas de *A. thaliana* cultivadas en invernadero. Está compuesta por los siguientes macro y micronutrientes: 4 mM KNO₃, 4 mM Ca(NO₃)₂, 1,5 mM MgSO₄, 0,75 mM KH₂PO₄, 0,035% (p/v) EDTA-FeSO₄, 70 µM H₃BO₃, 14 µM MnCl₂, 0,5 µM CuSO₄, 1 µM ZnSO₄, 0,2 µM Na₂MoO₄, 10 µM NaCl y 0,01 µM CoCl₂, adquiriendo un pH de 6,5. Esta solución fue preparada por el personal del invernadero de la Universidad Politécnica de Valencia.

3.1.3. Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

3.1.3.1. Esterilización de semillas

Se empleó un método de esterilización en húmedo que consistía en que las semillas se alicuotaron en tubos de 1,5 mL y se esterilizaron superficialmente tratándolas en primer lugar con 1 mL de una solución de etanol al 70% (v/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v) durante 15 minutos. Posteriormente se eliminó el etanol y se añadió 1 mL de una segunda solución de lejía al 2,5% (v/v) y Tritón X-100 0,05% (v/v). Por último, las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada

Materiales y Métodos

estéril (lavados de 1 mL). Para una correcta estratificación se guardaron en agua estéril a 4°C durante 3 días.

También se empleó un método de esterilización en seco que consistía en que las semillas se esterilizan en su superficie tratándolas en primer lugar con 1 mL de una solución de etanol al 70% (v/v) y SDS 0,05%, durante 25 minutos en agitación. A continuación, una vez retirada la solución anterior, se añade 1 mL de una segunda solución de etanol al 70%, durante 5 minutos, con la que eliminamos los restos de SDS. Por último, las semillas junto con la solución, se depositan sobre un papel de filtro estéril en el interior de la cabina de flujo laminar, y se dejan secar al aire. Una vez secas, pueden ser sembradas o guardadas en microtubos y almacenadas durante un largo periodo de tiempo a 4°C.

3.1.3.2. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* se llevó a cabo empleando placas de cultivo de 9 cm de diámetro o en placas cuadradas de 12 cm de lado colocadas en horizontal. En el caso de las placas cuadradas se vertieron 80 mL de medio por placa, mientras que para las placas redondas se utilizaron 30 mL de medio por placa. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con la cantidad correspondiente de ácido acético, paraquat, higromicina o cefotaxima.

Las placas, una vez sembradas con las semillas, se sellaron con cinta porosa (Micropore). El cultivo se realizó a 23°C de temperatura, un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz de intensidad $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ y 8 de oscuridad) y humedad relativa del $70 \pm 5\%$.

3.1.3.3. Cultivo en tierra

El cultivo de *A. thaliana* en invernadero se realizó en macetas de plástico cuadradas de 7 x 7 x 6,5 cm. Las macetas se rellenaron con una mezcla de Sustrato Profesional (Pelemix España S.L.), Vermiculita exfoliada (Perlindustria 2002) y Perlita Premiun (Gramoflor), en proporción 2:1:1.

Una vez crecidas las plántulas de cultivo *in vitro* se pasaron a tierra, para ello se transplantaron a la mezcla de turba, vermiculita y perlita y se colocaron en el interior de una cámara especializada para el cultivo de *A. thaliana* con condiciones similares a las de cultivo *in vitro*. Las macetas se regaron con solución nutritiva, de composición citadas en apartado 3.1.2.2, dos veces por semana.

3.2. Material bacteriano

La especie que se utilizó durante los experimentos destinados a la obtención de nuevos plásmidos fue *E. coli*, en concreto la cepa DH5 α : F' Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1.

Para la transformación de plantas se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 pSOUP. Esta cepa posee resistencia a los antibióticos gentamicina, rifampicina y tetraciclina. Estas resistencias son debidas a que la cepa GV3101 contiene el plásmido pMP90, que posee genes de resistencia a gentamicina y rifampicina (Koncz y Schell, 1986; Furni y col., 1997; Mullins y col., 2001), junto al vector binario pSOUP, que contiene un gen de resistencia al antibiótico tetraciclina.

3.2.1. Manejo de las bacterias

Durante el desarrollo de este proyecto final de grado se utilizaron técnicas estándar en el manejo de esta bacteria. Para el crecimiento en medio líquido de las bacterias, se utilizaron tubos de 15 mL o matraces estériles (de diferentes volúmenes), que se colocaron en un incubador orbital

Materiales y Métodos

a 37°C (*E. coli*) o 28°C (*Agrobacterium*) con una velocidad de agitación de entre 200 y 250 rpm, para mantener una aireación y agitación adecuada. En el caso de crecimiento en medio sólido, las placas se depositaron invertidas en una estufa a 37°C ó 28°C.

3.2.2. Medios de cultivo

Medio LB

Para el crecimiento de las bacterias se utilizó el medio LB, compuesto por 1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl. Cuando fue necesario solidificarlo para repartirlo en placa de cultivo redonda de 9 cm de diámetro, se añadieron 15 g/L de agar. El antibiótico kanamicina, cuando fue necesario su uso, se adicionó una vez enfriado el medio a 50°C a una concentración de 50 mg/L de medio. De igual forma se adicionaron los antibióticos tetraciclina (5 mg/L) y gentamicina (25 mg/L).

Medio SOC

Durante el proceso de transformación de *E. coli* (ver apartados 3.2.3.4 y 3.2.3.5) se empleó el medio SOC que está compuesto por 2% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl y 2,5 mM KCl. El pH se ajustó a 7 con NaOH y, después de autoclavar se añadieron soluciones estériles de MgCl₂ y glucosa a una concentración final de 10 y 20 mM, respectivamente.

3.2.3. Preparación de células competentes

Se utilizaron células quimiocompetentes de la cepa DH5α preparadas por la doctora Lola Planes (Técnico del laboratorio del profesor Serrano) siguiendo el protocolo Inoue y colaboradores (1990).

Para el caso de *Agrobacterium* a partir de 1mL de cultivo saturado de la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, se inoculan 100mL de medio LB con los antibióticos correspondientes, hasta obtener el cultivo con una OD₆₀₀ de aproximadamente 1. La suspensión se centrifuga a 4000rpm durante 15 minutos y 4°C, y el precipitado celular se resuspende en 1mL de CaCl₂ 20mM. La suspensión se divide en alícuotas de 50µL, que se congelan rápidamente en nitrógeno líquido y se guardan a -80°C hasta su uso.

3.2.4. Transformación por choque térmico

En el caso de *E. coli* se añadió la solución con los plásmidos a transformar a una alícuota (100 µL) de células quimiocompetentes y se mantuvieron 30 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se realizó un choque térmico de 90 segundos a 42°C en un bloque térmico, e inmediatamente se colocó en hielo durante otros 5 minutos. A continuación, se agregó 1 ml de medio SOC y se incubó en agitación durante 1 hora a 37°C. Finalmente las células se extendieron en placas LB kanamicina.

En el caso de *Agrobacterium tumefaciens* se siguió un protocolo modificado del método de congelación/descongelación de Holsters y col., (1978), que consiste en añadir unos microlitros de la solución del plásmido a una alícuota de 50µL de células competentes. La mezcla se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se preincuba durante 5 minutos a 37°C. A continuación, se añaden 0,5mL de medio SOC y se incubaba a 28°C durante 4 horas con agitación a 200rpm. Finalmente, se extiende todo el volumen en medio LB sólido selectivo con la ayuda de perlas de vidrio.

3.2.5. Mantenimiento de las cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens*

Las diferentes cepas o líneas bacterianas utilizadas en este proyecto, fueron mantenidas a -80°C. Para ello, se colocó 1 mL de un cultivo bacteriano saturado en un criovial, 230 µL de glicerol 80%, se mezcló y se guardó a -80°C

3.3. Vectores de clonación y transformación

-pCAMBIA1303: Plásmido de 12361 pb (Figura III.8) que se utilizó para obtener plantas transgénicas que nos permitieran conocer el patrón de expresión del gen *SBT4.13*. Este plásmido es portador de un gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un gen de resistencia a higromicina (*hptII*) para la selección en plantas. Los dos genes de resistencia están bajo el control del promotor 35S.

-pMDC32:SBT4.13inv. Este plásmido contiene el cDNA del gen *SBT4.13* en posición invertido y dirigido por el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. Este vector fue construido por mi director del proyecto el Dr. Jesús Muñoz Bertomeu.

-pMDC32:amiRNA. Este vector contiene las secuencias necesarias para poder generar un amiRNA contra los genes *SBT4.13* y *SBT4.12*, para poder inactivar a los dos a la vez, ya que seguramente los mutantes simples de la *SBT4.13* no tengan fenotipo por la redundancia génica de la familia de las subtilasas de *Arabidopsis*. Este vector fue construido por mi director del proyecto el Dr. Jesús Muñoz Bertomeu.

3.4. Aislamiento de ácidos nucleicos

3.4.1. Aislamiento de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana*

El estudio de la presencia del T-DNA introducido en *Arabidopsis* se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basada en la capacidad de las DNA polimerasas de replicar un fragmento concreto de DNA mediante unos cebadores específicos y unos ciclos adecuados de temperatura (Saiki y col., 1985).

El DNA utilizado para el análisis por PCR se extrajo utilizando un tampón de extracción compuesto por 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 7,5 - 8) y 0,5% SDS. Así, una pequeña cantidad de material vegetal joven (50-100 mg) fue triturada con ayuda de pistilos de plástico en un microtubo, agregando acto seguido 400 µL del tampón de extracción. En este paso, las muestras se pueden mantener a temperatura ambiente o en hielo, hasta completar la homogeneización de las muestras a analizar (como máximo 24 por ser la capacidad máxima de la microcentrífuga). Se centrifugó 4 minutos a máxima velocidad (13000 rpm), y se recuperaron 300 µL del sobrenadante, que se transfirieron a un nuevo tubo. A continuación, se añadió un volumen de isopropanol (300 µL), se vorteoó y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, induciéndose así la precipitación del DNA. Se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad, recuperando de esta forma el DNA precipitado en el fondo del microtubo. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 100 µL de H₂O MilliQ y se guardó a 4°C hasta su uso.

3.4.2. Extracción de plásmidos de *E. coli*

El protocolo seguido fue una modificación del descrito por Sambrook (2001), basado en que una disolución de un detergente aniónico fuerte y pH elevado, rompe las células y desnaturaliza tanto las proteínas como el DNA cromosómico, y la subsiguiente centrifugación de la suspensión permite recuperar el DNA plasmídico en el sobrenadante (Birnboim y Doly, 1979).

Materiales y Métodos

Las colonias aisladas en las transformaciones de *E. coli* se cultivaron durante 12-16 horas en 5 mL de LB con sus respectivos antibióticos. Seguidamente, se procedió a la centrifugación (2500 rpm durante 15 min. a 4°C) de 4 mL de ese cultivo y a la resuspensión del precipitado celular en 200 µL de la solución I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 10 mM EDTA, pH 8,0); inmediatamente después, se añadieron 300 µL de la solución alcalina recién preparada (0,2N NaOH, 1% SDS; Solución II), se agitó manualmente y la mezcla se colocó en hielo.

A continuación se añadieron 300 µL de la solución III (60 mL acetato potásico, 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5 mL de agua). La mezcla se agitó manualmente y se mantuvo en hielo otros 5 minutos. El sobrenadante resultante de la centrifugación (13000 rpm durante 10 min. a 4°C) se transfirió a un nuevo tubo (unos 700-750 µL) y se añadió 2 µL de RNAsa al 1%. La mezcla se agitó y se incubó a 37°C durante 20 minutos.

Trascurrida la incubación a 37°C se realizó un lavado con cloroformo para eliminar proteínas del extracto. A 400 µL del extracto se añadió 400 µL de cloroformo, se agitó manualmente y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Este paso se repitió una segunda vez. Se recogió la fase superior acuosa que contiene el DNA y se le añadió 1 volumen de isopropanol. La mezcla se agitó y se mantuvo en hielo 10 minutos. A continuación, se centrifugó (13000 rpm, 15 minutos) y se lavó el precipitado, para la eliminación de sales, con 500 µL de etanol al 70%, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones.

Por último se dejó secar el precipitado y cuando estuvo totalmente seco, se resuspendió en 50 µL de agua MiliQ, y para comprobar que la extracción se había realizado correctamente, se realizó una electroforesis (como la explicada en el apartado III.10.3.) pero con 2 µL del plásmido.

3.4.3. Aislamiento de ARN de *A. thaliana*

La extracción del ARN de diferentes tejidos y líneas de arabidopsis se realizó a partir de 100 mg de muestra siguiendo un protocolo modificado del descrito por MACHEREY-NAGEL *Total RNA Isolation* (Ref. 740955.50). Este ARN se utilizó para los análisis de qRT-PCRs (PCR cuantitativa a tiempo real).

Las soluciones utilizadas fueron suministradas por el kit. Dado que durante el proceso de extracción, el ARN puede ser degradado por RNAsas, el material era libre de RNAsas.

Para realizar la extracción, el material de partida se congeló con nitrógeno líquido y se trituró en mortero. Se pesaron 100 mg del material pulverizado, se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se añadieron 350 µL de tampón RA1 junto con 3,5 µL de β-mercaptoetanol. La muestra se agitó con un vórtex y se cargó en una columna con filtro (suministrada por el kit) depositada dentro de un tubo de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. El filtrado se transfirió a un nuevo Eppendorf, sin coger restos del precipitado que se queda en el fondo del tubo, y se le añadieron 350 µL de etanol 70%. La mezcla homogeneizada se cargó en una nueva columna con filtro y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm para que el ARN en la solución se quedara unido en la membrana de la columna al atravesarla. A partir de aquí, la membrana se lavó en primer lugar con 350 µL de MDB y se centrifugó adicionalmente 1 minuto a 13000 rpm, para posteriormente adicionar 95 µL de reacción de la desoxirribonucleasa (DNasa; 90 µL de tampón DNasa + 10 µL de DNasa). Finalmente, antes de la elución del ARN, la membrana se lavó con 200 µL de RA2, 600 µL de RA3 y 250 µL de RA3, entre cada paso se realizó una centrifugación de 1 minuto a 13000 rpm. La elución final se realizó añadiendo 40 µL de H₂O libre de RNAsas, tras una centrifugación de 1 minuto a 13000 rpm se añadieron otros 20 µL a la columna y se volvió a centrifugar, ya que eluyendo en dos tiempos se obtiene una mayor concentración de ARN final.

3.5. Análisis de ácidos nucleicos

3.5.1. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de los ácidos nucleicos (ADN o ARN), se realiza mediante espectrofotometría en el rango ultravioleta (260 nanómetros), utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, a partir de 1 μ L de muestra.

3.5.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para comprobar la integridad y concentración del ADN plasmídico, ADN genómico de *A. thaliana* y de los productos de la PCR, se emplean geles de diferente porcentaje de agarosa (p/v), principalmente entre 0,7 y 1,5%, en tampón de electroforesis TBE 0,5X (45mM Tris-Base, 45mM ácido bórico y 1mM EDTA). Tanto el tampón de electroforesis como el gel contienen 0,05% (p/v) de bromuro de etidio. La visualización de ácidos nucleicos (ADN o ARN), se realiza iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda. Como tampón de carga se utilizó Tampón 6X azul (40% p/v sacarosa, 0,1M EDTA y 0,25% p/v azul de bromofenol). Mediante la utilización del marcador de tamaño 1Kb (Fermentas) se verificó el tamaño de las bandas.

Tanto el tampón de electroforesis (TBE 0,5X) como el gel contenían 0,05% (p/v) de bromuro de etidio. La visualización del DNA se realizó iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda.

3.5.3. Extracción y purificación de bandas de ADN

Tras separar las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE, las bandas de interés se cortaron del gel con un bisturí y el ADN contenido en las mismas se purificó siguiendo el protocolo especificado por el kit de MACHEREY-NAGEL *PCR clean-up Gel extraction, NucleoSpin® Extract II* (Ref. 740609.50), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Una vez separados los fragmentos de ADN mediante electroforesis, se visualizó la banda bajo luz ultravioleta y se cortaron. El fragmento de gel se incluyó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se añadió el tampón NT. El volumen utilizado en este paso se calculó a razón de 200 μ L de tampón por cada 100 mg de gel de agarosa. La muestra se incubó a 50°C hasta que se disolvió el gel y posteriormente se cargó en una columna con su correspondiente tubo de colección servida por el kit. Acto seguido se centrifugó un minuto a 13000 rpm y se desechó el filtrado. A partir de este punto, los pasos siguientes tuvieron como objetivo lavar la membrana de sílice de la columna. Para tal fin, se pipetearon 700 μ L del tampón NT3 y la muestra se centrifugó otro minuto a 13000 rpm desechando nuevamente el filtrado. Este último paso se repitió nuevamente, pero en esta ocasión la centrifugación se prolongó durante un minuto más para eliminar cualquier resto de la solución. Finalmente, el ADN se eluyó añadiendo 50 μ L del tampón NE a la columna, incubando la muestra durante un minuto a temperatura ambiente. Como último paso se centrifugó durante un minuto a 13000 rpm y el ADN se guardó hasta ser utilizado a -20°C.

3.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.5.4.1. Oligonucleótidos cebadores

Todos los cebadores empleados en este trabajo han sido sintetizados por la empresa IDT y se muestran en la siguiente Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Cebadores empleados en este trabajo

Gen o secuencia	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
Cebadores para genotipar mutantes		
At5g59120	At5g59120+1312 Rev	CATAGCGTGAAAAGCCCCG
At5g59120	At5g59120+485 For	AAGAGTTGCCAGTGAGTGTTCC
T-DNA Salk	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
T-DNA Sail	Lb1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
Cebadores para el clonaje		
At5g59120	At5g59120ProEcoRIFo	CCGGAATTCACCATTATTGTTGATGTTATAAATTATTC
At5g59120	At5g59120ProNcoI Rev	CATGCCATGGTTGCTTGAAAGAAAATTACTGTAATG
Cebadores para secuenciar el promotor		
At5g59120	At5g59120ProNcoI Rev	CATGCCATGGTTGCTTGAAAGAAAATTACTGTAATG
At5g59120	At5g59120 Rev-562	GGACGTTACACATCGTTACAT
At5g59120	At5g59120 For-1709	CGAAACTAACAAACAATCAAAATGC
pCambia1303	pCambia1303 MCS-180	TGCAGCTGGCACGACAGGTT
pCambia1303	pCambia1303 gus+170	GCATCGGCGAACTGATCGT
Cebadores para comprobación de que <i>Agrobacterium</i> tenga el plásmido ProSBT4.13::GUS-GFP		
At5g59120	At5g59120 For-810	CTGGCAAAGTTATTGTGGTGG
pCambia1303	pCambia1303 gus+170	GCATCGGCGAACTGATCGT
Cebadores para RT-PCRs		
At5g59120	At5g59120+1930For	ACCTGCCGCTGGTTTACTAACAGA
At5g59120	At5g59120+2163Rev	ATCAACCGCAATGGTGTGGACC
At5g59120	At5g59120+674For	CGAAGAGGAACCCTACCGTC
At5g59120	At5g59120+1044Rev	GTGTACCGTGTCCGTCCATGT
At5g55840	At5g55840For	GATGATATTGCAGTTTGTCCACCGT
At5g55840	At5g55840Rev	CACTGCTTGCTTGTCTTGTCTG

3.5.4.2. Condiciones de PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de forma rutinaria en microtubos autoclavados de 200 μ L donde se añadió la mezcla de reacción. Cada reacción lleva 1 μ L de la solución de DNA obtenido en el paso anterior más:

Tampón PCR 10X	3 μ L
dNTPs 10 mM total	0,6 μ L
Cebador 5' 10 μ M	1,5 μ L
Cebador 3' 10 μ M	1,5 μ L
Taq polimerasa 1U/ μ L	1 μ L
H ₂ O MilliQ	volumen hasta 30 μ L

En las reacciones se utilizó la enzima “Taq polimerasa” (Biotools). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) con el siguiente programa de PCR: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 10 min, 45 ciclos de: 30 segundos a 95°C de desnaturalización, 45 segundos a una temperatura de anillamiento 2°C inferior a la T_m de los oligonucleótidos (para la hibridación de los cebadores), y una extensión de 1 minuto por Kb a amplificar, a una temperatura de 72°C. Al acabar los ciclos se mantiene durante 10 min a 72°C como extensión final y por último se añadió un paso a 4°C durante un periodo indefinido.

3.5.4.3. PCR diagnóstica

La PCR diagnóstica se utilizó para amplificar fragmentos de ADN genómico de los mutantes de *Arabidopsis thaliana*, en los que potencialmente debía encontrarse el inserto de T-DNA en los alelos mutantes y aislar así líneas mutantes homocigotas junto con sus correspondientes grupos control. Así pues, para la obtención de los mutantes homocigotos, se realizaron PCR diagnósticas utilizando un par de oligonucleotidos (LR y RP), que hibridan en el ADN del genoma de *Arabidopsis*, localizados a cada lado del T-DNA y un tercer oligonucleotido que hibrida en el T-DNA (BP; Figura 3.1). Tras las distintas PCRs, los correspondientes productos se visualizaron en un gel de agarosa para la identificación y aislamiento de los mutantes homocigotos a través del análisis del patrón de bandas resultante. Este patrón estaba basado en la amplificación de 2 bandas de diferentes tamaños: una banda de tamaño menor del alelo mutante homocigoto y la otra del alelo silvestre (WT) y también la identificación de plantas heterocigotas por la presencia de ambas bandas (Figura 3.1).

3.5.5. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Esta técnica se empleó en los experimentos de clonaje. Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizan en las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos proveedores. En todos los casos se utilizan de 1 a 5U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

3.5.6. Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se lleva a cabo utilizando 1U de la enzima ligasa de INVITROGEN *T4 DNA Ligase* (Ref. 15224-041) por cada 10µL de volumen de reacción. Esta es una herramienta, junto con la digestión de fragmentos de ADN con endonucleasas de restricción, que constituirían la principal herramienta de clonaje para la creación de plásmidos recombinantes. Para la ligación de fragmentos, se utilizan 100 ng de inserto manteniendo siempre una relación molar 1:3 (vector:inserto). La incubación se realiza durante 1h a 22°C, y un mínimo de 16 horas a 16°C. Acto seguido, se transforma el producto de la ligación en células competentes de *E. coli*.

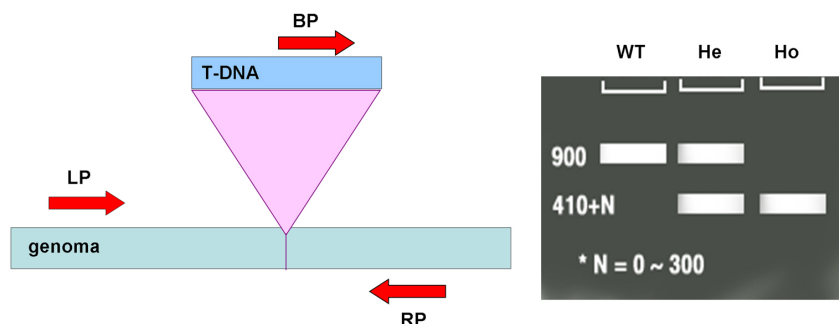


Figura 3.1. Esquema de la posición de los cebadores y representación de las bandas esperadas tras la PCR en líneas silvestres (WT), heterocigotas (He) y homocigotas mutantes (Ho). LP, RP y BP representan los cebadores para el estudio genético por PCR. Extraído y modificado de la web <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>

3.5.7. Análisis de la expresión génica

3.5.7.1. Síntesis de cDNA para PCR semicuantitativa y a tiempo real

Para llevar a cabo la síntesis de ADN complementario a los ARNs extraídos en el aislamiento de ARN de *Arabidopsis* (Apartado 3.4.3), se utiliza el kit de FERMENTAS LIFE SCIENCES *Maxima® Universal First Strand cDNA Synthesis Kit* (Ref. K1641). En cada reacción

Materiales y Métodos

se añadió el volumen necesario para contener 3-5 μ g ARN, 2 μ L de tampón, 1 μ L de la enzima retrotranscriptasa, y el volumen de agua necesario hasta completar un volumen final de 20 μ L. Esta reacción, se incubó en un termociclador con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C seguido de un paso final de 5 minutos a 85°C. Terminado el proceso se añadieron 20 μ L de agua MilliQ a cada tubo de reacción y se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.5.7.2. qRT-PCR

La qRT-PCR o PCR cuantitativa a tiempo real, es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa, y se emplea para amplificar y cuantificar los niveles de ARN mensajeros de los genes de interés de forma absoluta. La diferencia con la variante semicuantitativa, es que en esta variante se adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos.

Para ello, se utiliza el kit de *Cultek Molecular Bioline* “PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX)”. Se prepara una mezcla de reacción con 4 μ L de la solución proporcionada por el kit, 0,5 μ L de cada oligonucleótido necesario para la reacción (10 μ M), y 14 μ L de agua MilliQ estéril, libre de nucleasas. A esta mezcla de 19 μ L, se le añade 1 μ L de cDNA molde para la amplificación. Cada reacción fue realizada por triplicado.

3.6. Diseño y obtención de la construcción plasmídica para experimentos de transformación de plantas

Para comprobar la funcionalidad del promotor del gen *SBT4.13* en plantas, nos dispusimos a fusionar esta región reguladora al gen reportero *GUS*. Para ello, se amplifica un fragmento de 2171 pares de bases del promotor, antes del codón de inicio, mediante PCR y polimerasas de alta fidelidad, como la Phusion (Thermo Scientific; bajo las especificaciones del proveedor, evitando así la incorporación de mutaciones). A este amplicón, mediante los oligos utilizados en su amplificación, se le incorporan unos sitios de restricción *EcoRI* (en el extremo 5') y *NcoI* (en el extremo 3'), para facilitar su clonaje en el plásmido pCAMBIA1303 mediante restricción, y ligación de extremos cohesivos. Tras la ligación se transformó *E. coli* y se sembró en placas con kanamicina. Se extrajo sus plásmidos y se mandaron a secuenciar para comprobar que no existían mutaciones. Una vez comprobado esto se transformó *Agrobacterium tumefaciens* y se sembró en placas con tetraciclina, gentamicina y kanamicina. Para comprobar que presentaban el plásmido se realizó una PCR similar a la comentada anteriormente salvo por el hecho de que se ponen como molde unas pocas células de la colonia (PCR colony).

3.7. Transformación de *Arabidopsis* por inmersión floral

Se emplearon 10-15 plantas de *A. thaliana* cultivadas en tierra (en maceta de 10 cm de diámetro) con una inflorescencia primaria de alrededor de 10 centímetros de longitud. A estas plantas se les cortó la inflorescencia primaria por su base para promover la aparición de inflorescencias secundarias y tener mayor cantidad de capullos florales. Unos 7 días después de que rebrotaran los escapes florales, se realizó la transformación.

Inicialmente se agregó 1 mL de cultivo saturado de *A. tumefaciens* con el vector de interés a 200 mL de medio con los agentes de selección apropiados, y se incubó en agitación a 28°C durante unas 12-16 horas, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6-1. Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron por centrifugación en frío a 4000 rpm durante 20 minutos, y se resuspendieron en 400 mL de solución de transformación compuesta por 5% (p/v) sacarosa, 0,02% (v/v) detergente Silwet L-77 (Lehle Seeds), 10 mM de MgCl₂ y 1 g/L de MES.

La solución de transformación se colocó en un recipiente donde se introdujo la parte aérea

Materiales y Métodos

de las plantas durante 1 minuto. Luego, se cubrieron las plantas con bolsas de plástico para mantener la humedad y aumentar la eficiencia de la transformación. Después de 2 días se retiraron las bolsas y se mantuvieron las macetas en el invernadero hasta recoger la población de semillas transgénicas T₁.

3.8. Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos

Las semillas transgénicas T₁ se sembraron en placas de cultivo de 14 cm de diámetro con medio MS ½ 0,5% de sacarosa y 25 mg/L de higromicina pH 5,7 (los T-DNA de los plásmidos pMDCs y pCAMBIA1303 dan tolerancia a higromicina). Después de 7-10 días, las plántulas resistentes (T₁) se rescataron y se transplantaron a macetas para obtener la generación T₂. Las semillas T₂ se cultivaron en el mismo medio que anteriormente descrito. De aquellas líneas transgénicas cuyas semillas mostraron una segregación 3:1 (resistentes:sensibles, que tendrán una inserción), se pasaron 8 plántulas resistentes a tierra para obtener la generación T₃, donde se podrán seleccionar las plantas homocigotas con el transgen (100% resistentes a higromicina).

3.9. Caracterización fenotípica de las líneas mutantes y transgénicas

Con el fin de evaluar la respuesta de cada línea mutante o silvestre a distintas condiciones de estrés abiótico, se realizaron ensayos de aparición de cotiledones en medio MS sólido suplementado con ácido acético o paraquat (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Compuestos adicionados al medio MS para la caracterización fenotípica de los mutantes

Compuesto	Concentración
Ácido acético	4,5 mM
Paraquat	0.1 µM

La caracterización se realizó en placas cuadradas divididas en 8 partes, colocando en cada porción 40 semillas de cada línea (esterilizadas por el “método húmedo”). Se sembraron 3 placas por tratamiento y se realizaron tres repeticiones. Se sembraron las semillas en medio MS como control de germinación. Se realizó el recuento de plántulas con cotiledones verdes y expandidos hasta los 13-14 días.

3.10. Ensayo histoquímico para la detección de la actividad β-glucuronidasa

Para los ensayos de actividad de la enzima β-glucuronidasa, los órganos de las plantas a revelar se sumergieron en el tampón de reacción GUS [fosfato de sodio (100 mM), EDTA (10 mM), Tritón X-100 (0,1%), ferricianuro de potasio (0,5 mM), ferrocianuro de potasio (0,5 mM) y 2 mM X-GlcA (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido) a pH 7.0] durante 8 horas a 37°C. El X-GlcA es utilizado por la β-glucuronidasa para crear un precipitado azulado (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo) que permite localizar la expresión de la proteína. Posteriormente, los fragmentos de las plantas se destiñeron mediante lavados sucesivos con etanol al 70% (Jefferson y col., 1987). Una vez destiñidos las muestras se montaron en portaobjetos y tras poner el cubreobjetos se observaron con un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) con cámara digital DS-Ri 1 o con una lupa binocular (Nikon SMZ800) con cámara digital rColor View 12.

3.11. Análisis estadísticos

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los diferentes controles ensayados y los mutantes en los diferentes ensayos de crecimiento llevados a cabo en este trabajo, se realizaron pruebas estadísticas t. Esta prueba permite determinar si existen o no diferencias significativas entre las medias de los dos grupos a comparar con un determinado nivel de significación.

En el análisis genético de segregación realizado para conocer el número de inserciones en las plantas transgénicas generadas se utilizó un test χ^2 para comprobar si la proporción de semillas resistentes:sensibles de la progenie se ajustaba a la esperada para una inserción (3:1).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis del patrón de expresión del gen *SBT4.13*

4.1.1. Analisis *in silico*

En primer lugar se realizó un análisis *in silico* del gen *SBT4.13* utilizando la herramienta informática eFP Browser (Winter y col., 2007). Esta herramienta permite estudiar la expresión de los genes en diferentes órganos y tejidos de *Arabidopsis* y también su expresión a lo largo del desarrollo. Como se puede ver en la Figura 4.1 los niveles de expresión son bajos en todos los tejidos a excepción de las anteras en fase de desarrollo y en algún estadio de flor cerrada. Durante la fase globular/corazón del desarrollo del embrión también se puede apreciar una tonalidad algo anaranjada que también indica que existe expresión. La coloración amarilla en el resto de órganos nos indica que o bien existe un nivel basal bajo o que no existe expresión. La aplicación también nos permite identificar un nivel alto de expresión de nuestro gen en la calaza durante el desarrollo de la semilla (Figura 4.2).

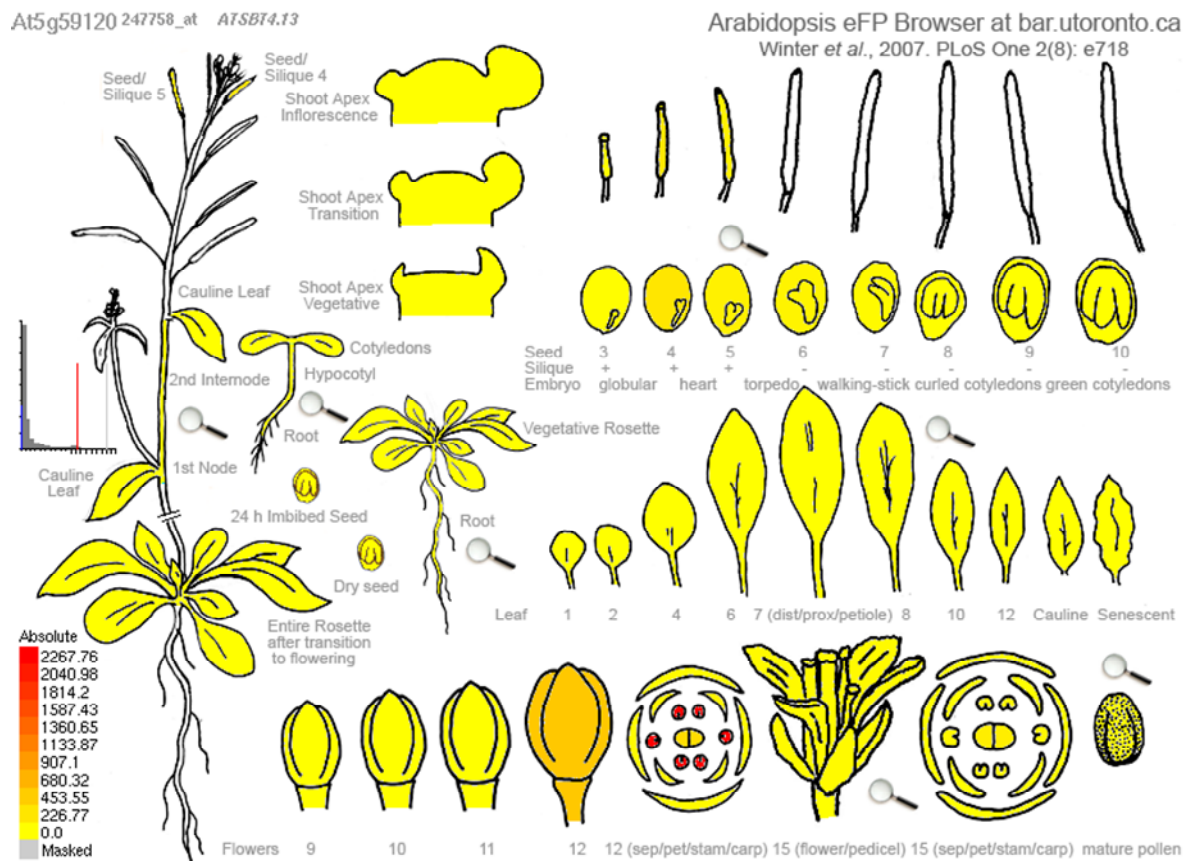


Figura 4.1. Estudio *in silico* del patrón de expresión tisular del gen *SBT4.13* (*At5g59120*) de *Arabidopsis thaliana* a través de la aplicación informática *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007). Los datos se muestran a través del mapa de expresión génica diseñado por Schmid v col. (2005).

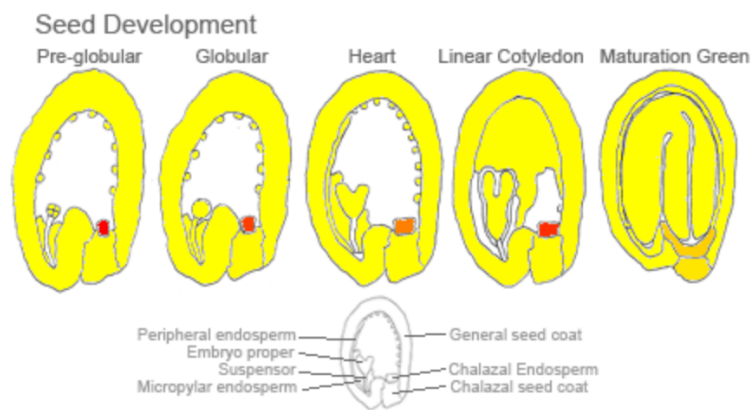


Figura 4.2. Estudio *in silico* del patrón de expresión tisular en la semilla y embrión del gen *SBT4.13* (At5g59120) de *Arabidopsis thaliana* a través de la aplicación informática *Arabidopsis eFP Browser* (Winter y col., 2007). Los datos se muestran a través del mapa de expresión génica diseñado por Schmid y col., (2005).

Teniendo en cuenta que la expresión obtenida *in silico* parece indicar que el fenotipo observado de tolerancia a estrés ácido intracelular durante la germinación/establecimiento de plántula (Muñoz, 2011; Vilcara, 2012; Oms, 2013) podría ser un artefacto por la sobreexpresión ectópica del gen, procedimos a generar líneas transgénicas que expresaran el gen reportero *GUS-GFP* bajo el control del promotor *SBT4.13* para confirmar si estos datos de expresión son fiables.

4.1.2. Análisis de expresión mediante la reacción histoquímica GUS

Utilizando la base de datos de secuencias del TAIR obtuvimos la secuencia correspondiente a la zona donde está el gen *SBT4.13* y la introdujimos en el programa Jellyfish. Identificamos la zona que podría ser el promotor y diseñamos cebadores para amplificar la región comprendida entre el par de bases -2171 hasta -1 respecto al ATG del gen (siendo la adenina el nucleótido +1). Para poder insertar el promotor en el vector pCAMBIA1303 entre los sitios *EcoRI* y *NcoI* añadimos a ambos cebadores los sitios correspondientes (*EcoRI* en el cebador directo y *NcoI* en el reverso). Dado que las enzimas de restricción que vamos a utilizar son endonucleasas les añadimos algunos nucleótidos mas para que los sitios de corte estuvieran en el interior del cebador (los nucleótidos añadidos fueron seleccionados utilizando la tabla proporcionada en https://www.neb.com/~media/NebsUs/Files/Chart%20image/cleavage_olignucleotides_old.pdf).

Una vez amplificado el promotor a partir de DNA genómico de plantas silvestres (Col 0) de *Arabidopsis* mediante polimerasas de alta fidelidad para no introducir mutaciones (ver Figura 4.3A), se purificó, se digirió con las dos enzimas de restricción indicadas y volvió a purificar el inserto a partir del gel de agarosa. Por otro lado se extrajo el plásmido pCAMBIA1303 y se digirió utilizando las mismas enzimas utilizadas con el inserto, para posteriormente poder separar por electroforesis el plásmido respecto al promotor 35S (ver Figura 4.3B). Tras purificar la banda correspondiente al plásmido, éste y el promotor *SBT4.13* se ligaron mediante la enzima T4 DNA

Resultados y Discusión

ligasa, se transformó *E. coli* y se obtuvieron colonias 16 horas después de la siembra en placas con LB suplementadas con kanamicina.

Para comprobar que colonias habían incorporado el plásmido designado como ProSBT4.13::GUS-GFP se realizaron minipreparaciones de plásmido de 11 colonias y se digirieron con las enzimas de restricción utilizadas en el clonaje. Como se puede apreciar en la Figura 4.4 la mayoría presentaron el patrón del nuevo plásmido, con una banda correspondiente al tamaño del promotor *SBT4.13* y otra del resto del plásmido. Las colonias 3 y 8 presentaron una banda de unos 810 pb correspondientes al promotor *35S*, lo cual indica que son plásmidos originales pCAMBIA1303. Al existir colonias con plásmidos no recombinantes se puede indicar que la digestión del vector no fue completa (liberando el promotor *35S*) y que en la purificación del teórico plásmido abierto se arrastraron plásmidos sin digerir o plásmidos digeridos con una sola de las enzimas.

El análisis de restricción realizado para comprobar la obtención del plásmido ProSBT4.13::GUS-GFP no te asegura en ningún momento que la secuencia del promotor *SBT4.13* esté libre de mutaciones, por lo que se mando a secuenciar con un total de 5 cebadores distribuidos a lo largo del promotor y de las zonas cercanas a la inserción (Tabla 3.1). Con las secuencias proporcionadas se realizaron alineamientos y comparaciones con la secuencia original obtenida previamente del TAIR y se comprobó que no existían mutaciones y que la zona de inserción fue la esperada (entre los sitios *EcoRI* y *NcoI*).

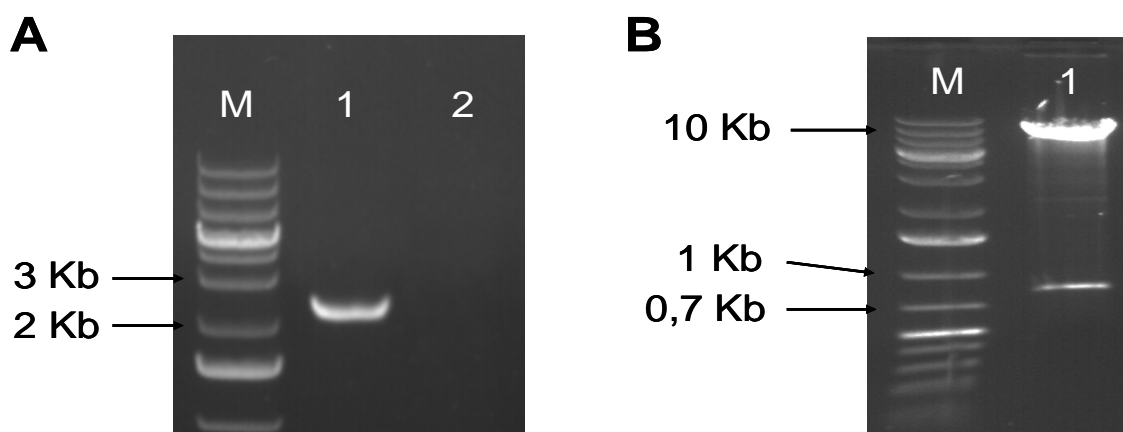


Figura 4.3. **A**, Amplificación del promotor *SBT4.13* mediante enzimas de alta fidelidad; se muestra en el carril M el marcador GeneRuler 1 kb Plus de Thermo Scientific, en el carril 1 se muestra el producto de PCR del promotor *SBT4.13* (2190 pb), y en el carril 2 el producto de PCR donde no se puso molde (utilizado como control negativo de la PCR). **B**, se muestra la digestión del vector pCAMBIA1303 con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* mostrando el promotor *35S* liberado de unos 810 pb y el resto del plásmido (unos 11,55 Kb).

Resultados y Discusión

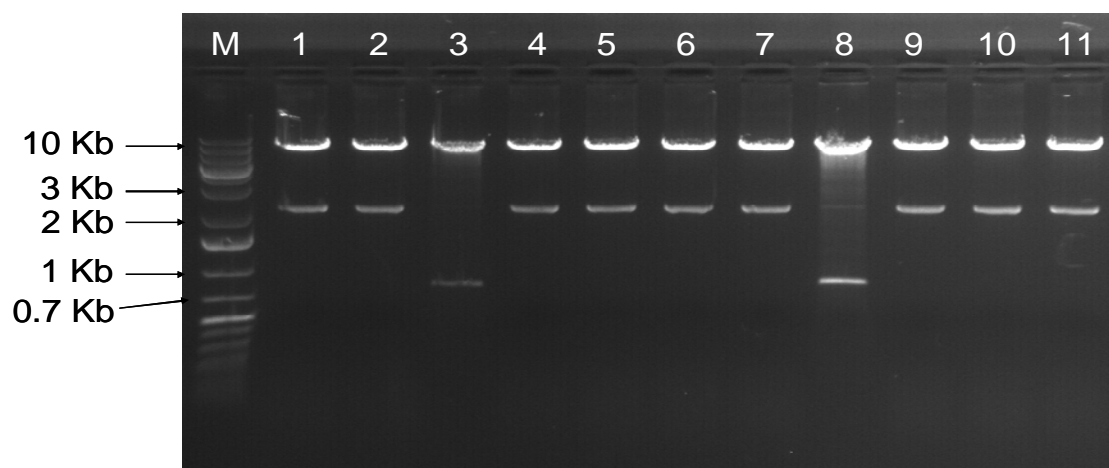


Figura 4.4. Digestión de los plásmidos extraídos de colonias aparecidas en la transformación de *E. coli* con la mezcla de ligación de los fragmentos del promotor SBT4.13 y vector abierto pCAMBIA1303 sin el promotor 35S. M, marcador GeneRuler 1 kb Plus de Thermo Scientific. Carriles 1 a 11 corresponden a colonias analizadas.

Con el plásmido secuenciado se transformó *Agrobacterium tumefaciens* y mediante PCR colony (Apartado 3.6) se confirmó que las colonias aparecidas en las placas contenían el plásmido ProSBT4.13::GUS-GFP. Para ello en esta PCR se utilizó un cebador directo del interior del promotor y otro situado en posición reversa dentro del gen *GUS*. Como se puede ver en la Figura 4.5 todas las colonias ensayadas mostraron la banda esperada de unos 1000 pb.

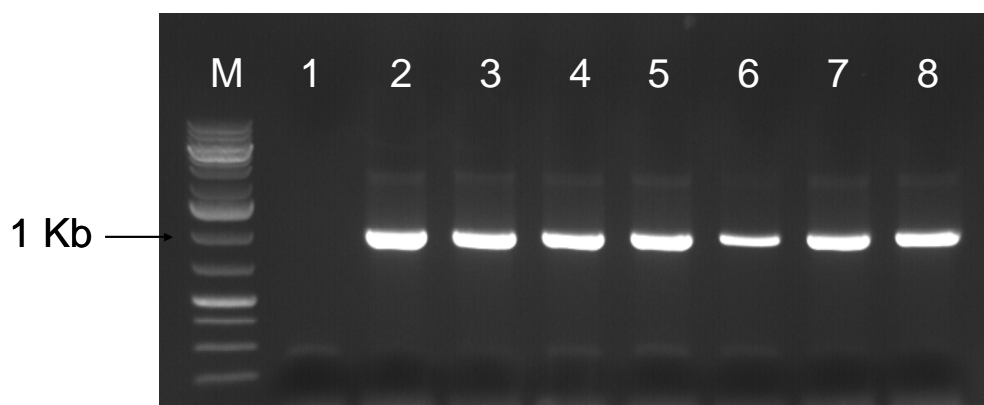


Figura 4.5. Comprobación mediante PCR de la presencia del plásmido ProSBT4.13::GUS-GFP en las colonias de *Agrobacterium tumefaciens*. M, marcador GeneRuler 1 kb Plus de Thermo Scientific. Carril 1, Control negativo de la PCR. Carriles del 2 al 8 corresponden a colonias analizadas.

Con una de las colonias positivas se realizaron los experimentos de transformación genética de arábidopsis mediante la inmersión floral, en la solución bacteriana de transformación, de las inflorescencias de plantas de un mes crecidas en el invernadero. Después de un mes las plantas estaban secas y sus semillas fueron sembradas en medios de cultivo MS1/2 suplementados

Resultados y Discusión

con higromicina (para la selección de los transformantes) y con cefotaxima para que el *Agrobacterium* remanente en las semillas no creciera. Se obtuvieron 64 transformantes (plántulas T₁ que eran capaces de crecer en el medio de selección) que se llevaron a maceta para obtener su descendencia tras dos meses de crecimiento en el invernadero. Las nuevas semillas (generación T₂) se sembraron en MS1/2 suplementados con higromicina y se contaron para cada línea las plántulas sensibles y tolerantes, para poder realizar un análisis Chi-cuadrado y poder determinar cuales de las 64 líneas transformantes tenían una sola inserción. Los análisis estadísticos mostraron que únicamente 14 líneas presentaban la relación 3 (tolerantes):1 (sensible) correspondiente a la segregación mendeliana para una inserción. Para cada una de las líneas seleccionadas se llevaron al invernadero 12 plántulas para obtener la nueva descendencia (generación T₃). Finalmente se obtuvieron 10 líneas en las que al menos la descendencia de una de estas doce plantas era 100% resistente en medio MS1/2 suplementado con higromicina, lo cual indica que es homocigota para el transgen.

En la Figura 4.6 se muestran fotografías representativas de los ensayos GUS realizados a las 10 líneas homocigotas, y como se puede ver en ellas, la expresión se puede apreciar sobre todo en semillas en germinación, en las raíces y cotiledones de plántulas, en las anteras, polen y raíces de plantas adultas. En menor medida se aprecia coloración azul en el resto de los órganos de las flores y en algunos tejidos de las silicuas, así como en los bordes de las hojas adultas. En ningún caso se obtuvo coloración en semillas (y en los embriones de su interior) hidratadas y estratificadas durante 3 días.

Los resultados obtenidos mediante los ensayos GUS (Figura 4.6) nos hacen pensar que los fenotipos que observamos durante la germinación en medios suplementados con ácido acético u otros estresantes (paraquat, H₂O₂, norespermidina; Muñoz, 2011; Vilcara, 2012; Oms, 2013) podrían estar relacionados con su función fisiológica, ya que durante los estadios de germinación y establecimiento de plántula se observa una abundante actividad GUS. Los resultados obtenidos mediante este ensayo son bastante diferentes a los análisis *in silico* obtenidos mediante la aplicación eFP Browser (Figura 4.1), y por tanto se tendría que realizar algún otro ensayo para tener una segunda confirmación de la expresión del gen *SBT4.13* durante la germinación, como podría ser realizar PCRs cuantitativas de diferentes órganos y estadios de desarrollo. Además para conocer mas en detalle los tejidos donde se expresa nuestro gen se podrían realizar cortes histológicos después de realizar el ensayo GUS.

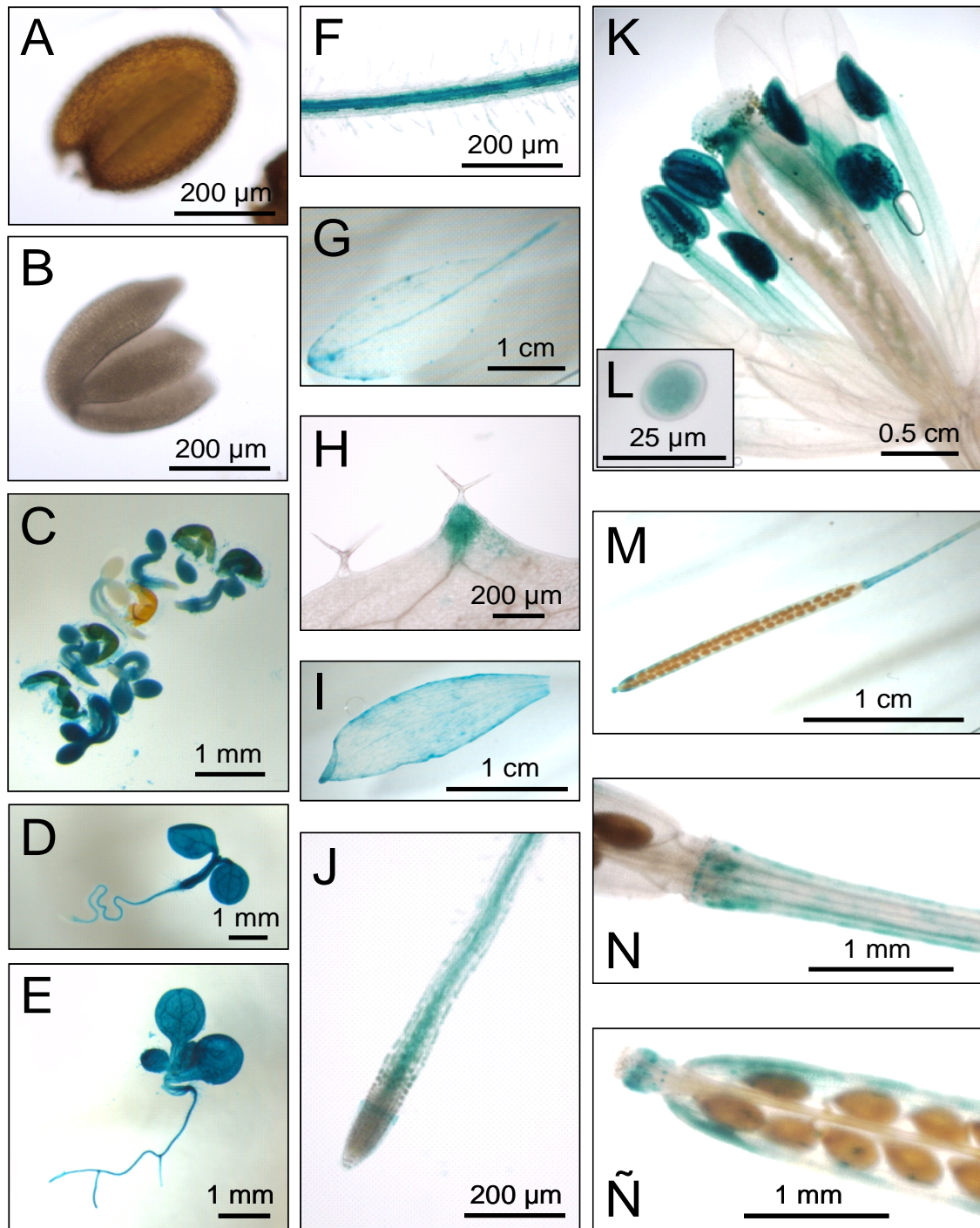


Figura 4.6. Ensayo de la expresión GUS (condiciones de reacción especificadas en el Apartado 3.10) en diferentes estadios de crecimiento. A y B, Semillas embebidas y estratificadas durante 3 días a 4°C; para B lo que se hizo fue sacar el embrión de la semilla. C, plántulas de 36 horas tras pasar de la estratificación a 4°C a la cámara de crecimiento. D, plántulas de 3 días tras pasar de la estratificación a 4°C a la cámara de crecimiento. E, plántulas de 7 días tras pasar de la estratificación a 4°C a la cámara de crecimiento. F, Raíz de una plántula de 7 días. G y H, Hoja de roseta de planta adulta. I, Hoja del tallo. J, Raíz de planta adulta. K, flor. L, polen. M a Ñ,

4.2. Obtención de mutantes de pérdida de función

4.2.1. Mutantes de pérdida de función por inserción de T-DNA

La segunda parte del trabajo consistió en obtener nuevos mutantes de pérdida de función del gen *SBT4.13*, ya que en los trabajos previos realizados en el grupo se vio que el mutante SAIL_358_G07 no tenía una expresión diferente al de plantas control. Para ello se pidieron nuevos mutantes al NASC y se generaron plantas transgénicas con un antisentido del gen *SBT4.13* y plantas transgénicas que sobreexpresaban un amiRNA contra los genes *SBT4.13* y *SBT4.12*.

Tras revisar en la página *T-DNA Express* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) observamos que existían mutantes que en principio podrían producir pérdida de función del gen *SBT4.13*, por lo que tras comprobar su disponibilidad se procedió a pedirlos. Estos mutantes estaban designados como SAIL_228_A04 y SALK_009191 (Figura 4.7).



Figura 4.7. Esquema del gen *SBT4.13* y localización de las inserciones de T-DNA que presenta. Imagen obtenida de <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>.

Una vez recibidas las semillas se sembraron en medio MS1/2 con o sin los agentes de selección, ya que no conocíamos si en alguna de estas líneas se había perdido la tolerancia al antibiótico o herbicida por silenciamiento génico. Una vez germinadas se plantaron en macetas y se llevaron al invernadero para la obtención de semillas. Tras analizar mediante PCR estas plantas se observó que había plantas homocigotas, heterocigotas y plantas silvestres. Los resultados esperados para líneas silvestres u homocigotas para los distintos mutantes mediante la técnica de la PCR se muestran en la Figura 4.8. En dicha figura se especifican los cebadores utilizados para cada línea mutante y el tamaño esperado de los fragmentos.

En las placas que contenían los agentes de selección se observó que existían algunas plantas tolerantes por lo que en principio la expresión del gen de tolerancia no se había silenciado. En el caso de la línea SALK_009191 las plantas eran tolerantes a Kanamicina y en el caso de la línea SAIL_228_A04 las plantas eran tolerantes al herbicida BASTA. Esta tolerancia es muy importante porque nos puede facilitar el mantenimiento de las diferentes líneas y poderlas discriminar por su diferente agente selectivo. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 4.9.

Resultados y Discusión

Con la descendencia de las plantas homocigotas o silvestres se realizó en un primer momento un ensayo de germinación en medio MS y los resultados mostraron que los porcentajes de germinación eran superiores al 95%, lo cual indica que las semillas eran de buena calidad y que por tanto se podían utilizar para experimentos sucesivos.

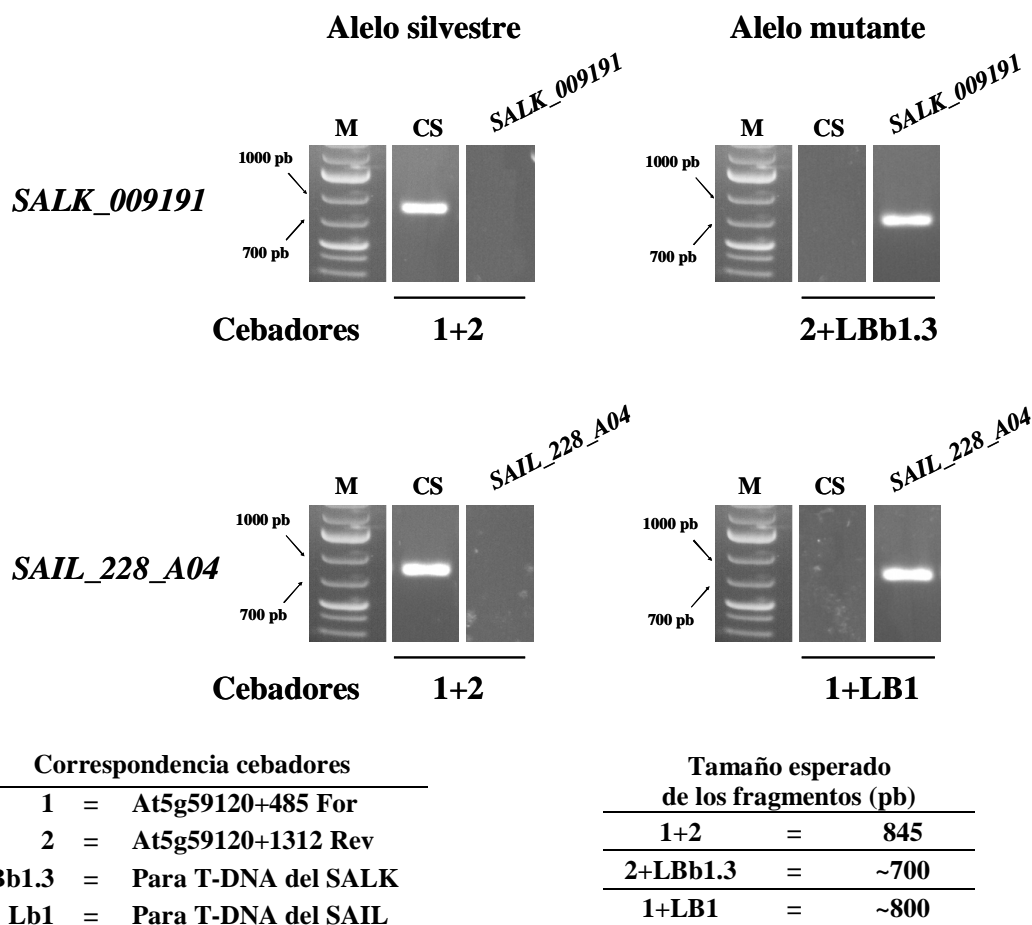


Figura 4.8. Resultados obtenidos del análisis de los mutantes SALK_009191 y SAIL_228_A04 del gen SBT4.13 mediante PCR. Se muestran también los juegos de cebadores y tamaños de los fragmentos esperados. M, marcador GeneRuler 1 kb Plus de Thermo Scientific. CS, control silvestre.

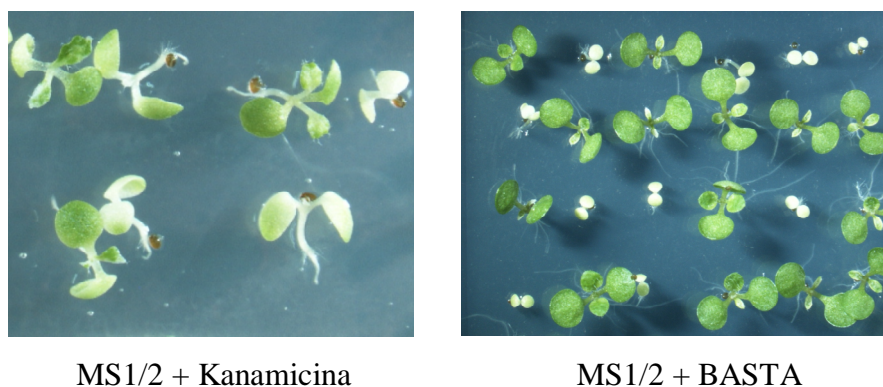


Figura 4.9. A la izquierda se muestran plántulas de la línea SALK_009191 germinadas en medio MS1/2 suplementado con 50 mg/L de kanamicina. A la derecha se muestran plántulas de la línea SAIL_228_A04 germinadas en medio MS1/2 suplementado con 25 mg/L de BASTA. Las semillas que se emplearon fueron las que nos proporcionó el NASC.

Resultados y Discusión

Tras estos experimentos iniciales se realizaron ensayos de germinación en presencia de ácido acético y de paraquat (nuevamente se pusieron también en medios sin suplementar y la germinación fue total a los 2 días). Los resultados mostraron que no había diferencias significativas entre las líneas mutantes y sus controles en cuanto a la germinación y establecimiento de las plántulas, medida como aparición de cotiledones verdes. Tampoco existieron diferencias con el Col 2 ni con el mutante de ganancia de función S109, salvo en el medio de cultivo con ácido acético a los 4 días (Figura 4.10). Dado que el mutante S109 y las líneas de recapitulación presentaban mejores porcentajes de germinación que los controles (comunicación personal del Dr. Jesús Muñoz) lo lógico sería que los mutantes de pérdida de función tuvieran menor germinación, cosa que no ha ocurrido. Es posible que los mutantes no tengan una expresión reducida respecto al control, o que el gen *SBT4.12* sea redundante con el nuestro y por tanto no vemos el fenotipo.

Con las plantas que crecieron en los medios sin suplementar se realizaron los ensayos de expresión por qRT-PCR. Como gen de referencia utilizado como control de carga se utilizó *PPR* (At5g55840) recomendado en Czechowski y colaboradores (2005) para estudios de desarrollo o de estrés abiótico. Los resultados mostraron sorprendentemente que los teóricos mutantes de pérdida de función presentaban una inducción significativa respecto a sus controles (Figura 4.11).

Teniendo en cuenta que los cebadores (At5g59120+1930For y At5g59120+2163Rev) utilizados estaban por detrás de las zonas de inserción (Vilcara, 2012) pensamos que quizás se estuvieran produciendo transcritos truncados del gen, o que estuvieran inducidos por algún promotor presente en el T-DNA. Para resolver esto se diseñamos cebadores que estuvieran entre la zona de inserción (uno por delante y otro por detrás, At5g59120+674For y At5g59120+1044Rev) para ver si existe o no expresión del gen reducida. A pesar de que los resultados mostraron en un principio que los mutantes homocigotos presentaban reducción del nivel de expresión respecto al Col 2 o sus controles acigóticos, los resultados no fueron fiables debido a que con esos nuevos cebadores se amplificaban más de un tipo de fragmento (como se vio en las curvas de desnaturalización de los amplificadores). Este problema era de esperar debido a que las secuencias de los genes *SBT4.13* y *SBT4.12* tienen una alta homología y a pesar de intentar diseñar los cebadores en zonas que fueran un poco diferentes esto no fue suficiente para evitar la unión inespecífica de los cebadores al gen *SBT4.12* (supuestamente, ya que no se secuenció la banda obtenida en la RT-PCR cuantitativa).

Para intentar resolver este problema se podrían realizar experimentos Northern para ver si hay niveles bajos de expresión en los homocigotos mutantes respecto a los silvestres (como cabría esperar), o si vemos mensajeros truncados que podría ser coherente con los niveles altos de expresión observados en los mutantes (Figura 4.11).

Resultados y Discusión

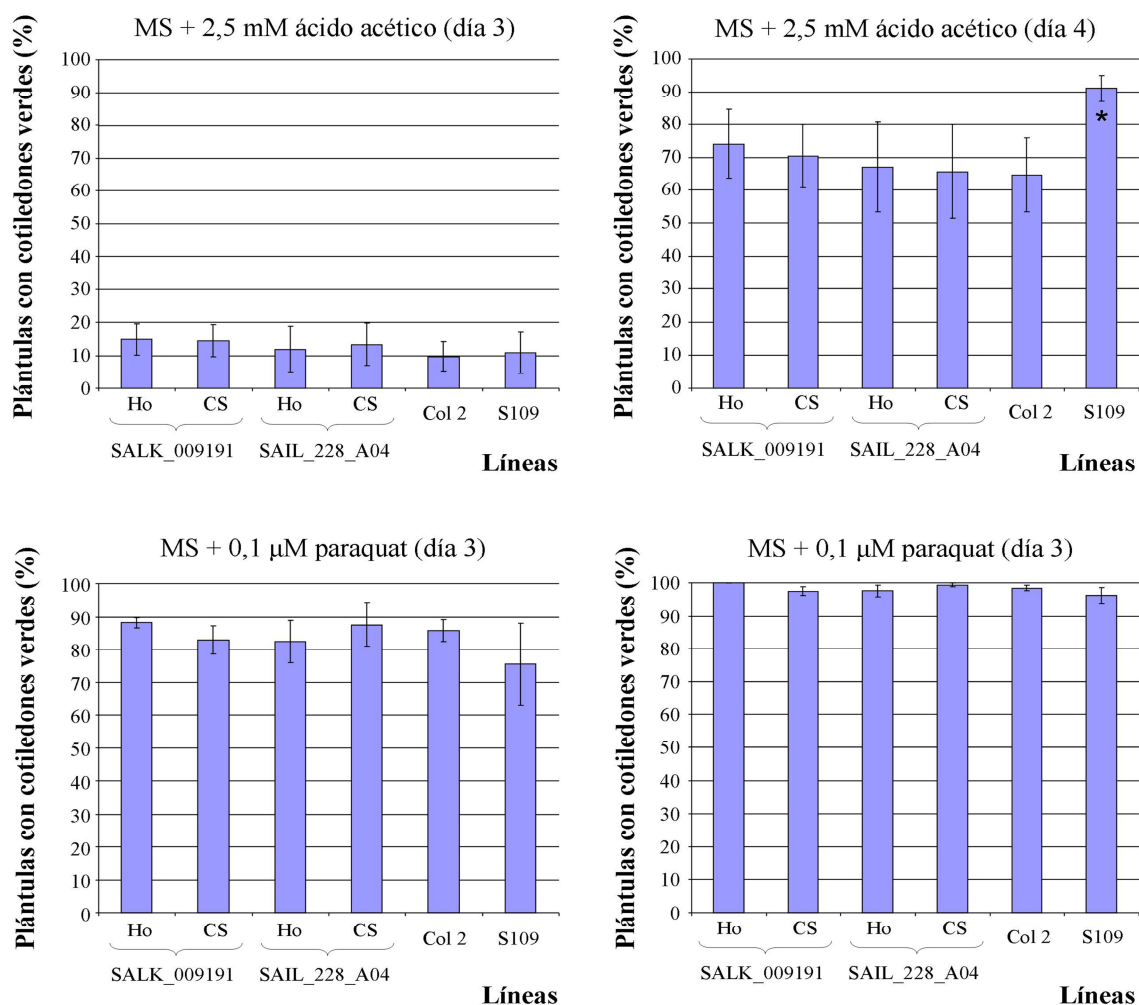


Figura 4.10. Porcentaje de plántulas con cotiledones verdes y expandidos a los 3 ó 4 días desde el paso a la cámara de crecimiento de líneas mutantes, Col 2 o el mutante de ganancia de función para la SBT4.13 (S109). Para cada línea mutante se presenta el homocigoto y una línea acigótica (control silvestre, CS). Las barras muestran la media \pm error estándar. Para cada línea $n = 6$. * Significativo respecto a Col 2 ($P \leq 0,05$) según la Prueba T.

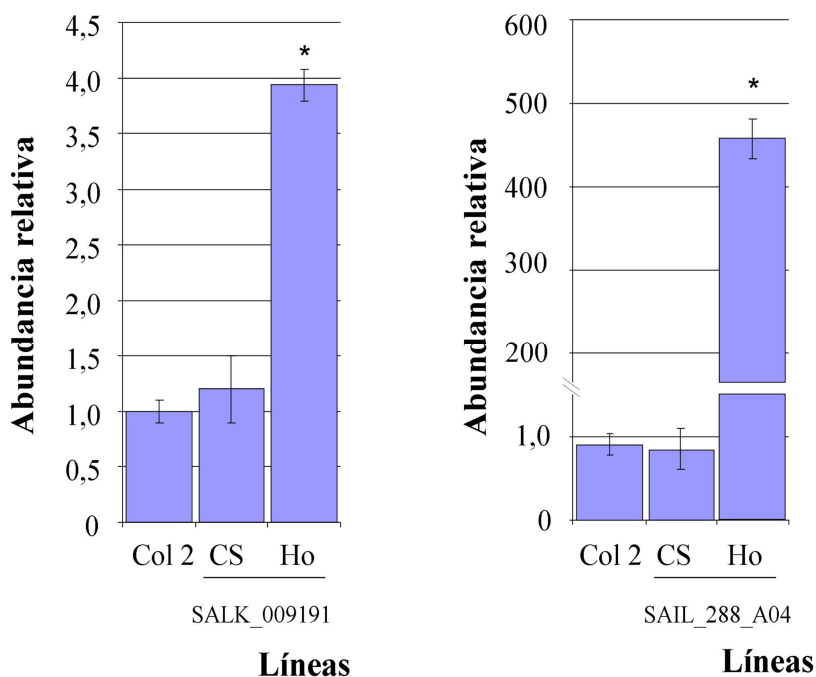


Figura 4.11. Análisis por RT-PCR cuantitativa de plántulas de 7 días de las líneas Col 2 o mutantes de inserción de T-DNA del gen *SBT4.13*. Para cada línea mutante se presenta el homocigoto y una línea acigótica (control silvestre, CS). Las barras muestran la media \pm error estándar. Para cada línea $n = 3$. * Significativo respecto a Col 2 ($P \leq 0,05$) según la Prueba T.

4.2.2. Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan un gen antisentido de la *SBT4.13*.

Dado que no tuvimos los resultados esperados con los mutantes de pérdida de función por inserción de T-DNA se decidió generar plantas que incorporaran el gen *SBT4.13* en antisentido. Para ello se había obtenido previamente en el laboratorio un plásmido designado como pMDC32:SBT4.13inv. Este plásmido llevaba toda la secuencia codificante del gen *SBT4.13* en dirección invertida bajo el promotor constitutivo 35S.

Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* con ese plásmido y tras confirmar que las colonias obtenidas en las placas suplementadas con tetraciclina, gentamicina y kanamicina tenían el plásmido se procedió a transformar *Arabidopsis thaliana* (ver Apartado 3.7 de Materiales y Métodos). Se realizó un experimento de transformación en el que obtuvimos muchas semillas T_1 que dieron más de 40 plantas transgénicas al sembrarlas en MS1/2 con higromicina y cefotaxima. Estas plantas se transfirieron al invernadero para obtener la siguiente generación de semillas (T_2). Las semillas T_2 se sembraron en medio suplementado con higromicina para hacer recuentos de plántulas resistentes y no resistentes que nos permitieran hacer un análisis estadístico Chi-cuadrado (que nos permitiera seleccionar aquellas líneas que tuvieran una inserción). De las 15 líneas que presentaron una inserción de T-DNA se transfirieron 9 plántulas resistentes a

Resultados y Discusión

higromicina al invernadero para obtener una descendencia T₃ que nos permitiera identificar las líneas homocigotas (serán aquellas en las que todas las plántulas resistan a higromicina). A pesar de que en estos momentos tenemos 12 líneas homocigotas para el transgén y de una única inserción, por falta de tiempo no se han podido realizar los experimentos de germinación ni los de expresión del gen para comprobar que realmente tienen menor nivel de transcrito.

Teniendo en cuenta que las secuencias nucleotídicas de los genes *SBT4.13* y *SBT4.12* son muy similares es muy posible que el antisentido se una tanto a los mensajeros de uno como del otro, y por tanto poder eliminar el efecto de la redundancia génica que es posible que esté ocurriendo. Como con el caso de los mutantes del apartado anterior lo que se pretende es que las líneas presenten reducción de la expresión y baja germinación en presencia de los agentes que aumentan la expresión en el mutante S109 o en las transgénicas de recapitulación.

4.2.3. Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan un amiRNA para los genes *SBT4.13* y *SBT4.12*.

Al mismo tiempo que realizamos los experimentos de los apartados anteriores comenzamos a generar desde el principio un plásmido que permitiera posteriormente generar plantas transgénicas que bloquearan a los transcritos de los genes *SBT4.13* y *SBT4.12*.

Siguiendo el mismo protocolo que con las antisentidos, y con un plásmido designado como pMDC32:amiRNA SBT obtenido previamente en el laboratorio, se transformaron inflorescencias de arábido. Esta construcción es portadora de un amiRNA que tienen como diana los transcritos de los dos genes que queremos bloquear y está dirigido por el promotor 35S. Tras transformar nuevamente *Agrobacterium* y comprobar que las colonias obtenidas eran buenas se procedió a transformar plantas silvestres de arábido. El protocolo utilizado para la obtención de líneas homocigotas de una inserción fue similar al del apartado anterior. En este caso se obtuvieron 32 líneas T₁, 15 líneas T₂ de una inserción y finalmente 9 líneas homocigotas para el transgén (T₃). Estas líneas permitirán determinar la expresión de los genes *SBT4.13* y *SBT4.12* para comprobar si cualifican como pérdida de función.

5. CONCLUSIONES

Análisis del patrón de expresión del gen *SBT4.13*

- 1) El análisis de expresión *in silico* del gen *SBT4.13* mostró que se expresaba muy poco en los tejidos de la planta a excepción de las anteras y la calaza. También había cierta expresión reducida en la fase globular/corazón del desarrollo del embrión y en flores a punto de abrirse.
- 2) Se ha obtenido un vector que tiene el gen *GUS-GFP* bajo el control del promotor del gen *SBT4.13* para observar en la planta la expresión de dicho promotor. Tras transformar plantas de *arabidopsis* se han obtenido 10 líneas de una inserción con el transgen en homocigosis.
- 3) Mediante el estudio de las plantas transgénicas mediante ensayo histoquímico de la β -glucuronidasa se ha comprobado que el gen tiene más nivel de expresión que lo que indicaba el análisis *in silico*. Se ha visto que durante los primeros días de la germinación y establecimiento de la plántula la expresión es bastante importante, y eso permite pensar que el fenotipo de tolerancia a estrés ácido no es un artefacto y que puede ser debido a un efecto fisiológico.

Obtención de mutantes de pérdida de función

- 4) Se han analizado dos mutantes de pérdida de función por inserción de T-DNA (*SAIL_228_A04* y *SALK_009191*). Tras obtener plantas homocigotas y singénicas de las semillas enviadas por el NASC, el fenotipo esperado de sensibilidad al estrés ácido intracelular (por ácido acético) o al estrés oxidativo (por paraquat) no se ha podido observar en los experimentos de establecimiento de plántula. Dado que los experimentos para poder conocer los niveles de expresión de los mutantes no han salido como esperábamos no se puede concluir nada sobre los experimentos de germinación, y habrá que realizar nuevos ensayos como Northern o con nuevos cebadores para confirmar la expresión.
- 5) En los experimentos de transformación para obtener plantas transgénicas de *arabidopsis* que expresen bajo el promotor *35S* un antisentido del gen *SBT4.13* se han conseguido 12 líneas homocigotas de una inserción. En el caso de la transformación para obtener líneas con un amiRNA contra los genes *SBT4.13* y *SBT4.12* se han obtenido 9 líneas independientes homocigotas de una inserción.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Beers EP, Jones AM, Dickerman AW (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. *Phytochemistry* 65: 43-58.
- Berger D, Altmann T (2000). A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in Arabidopsis thaliana. *Genes and Development* 14: 1119-1131.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1525.
- Bissoli G, Niñoles R, Fresquet S, Palombieri S, Bueso E, Rubio L, García-Sánchez MJ, Fernández JA, Mulet JM, Serrano R (2012) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ROF2 modulates intracellular pH homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 70: 704-716.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000). Responses to abiotic stresses. In: B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004). “Molecular and genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants”. *Journal of Experimental Botany* 55: 225-236.
- Coll NS, Epple P, Dangl JL (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation* 18: 1247-1256.
- Coote PJ, Cole MB, Jones MV (1991). Induction of increased thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *Journal of General Microbiology* 137: 1701-1708.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 5-17.
- Felle HH (2001). pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biology* 3: 577-591.
- Felle H, Bertl A (1986). Light-induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in Riccia fluitans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 848: 176-182.
- Fernandes AR, Peixoto FP, Sá-Correia I (1998). Activation of the H⁺-ATPase in the plasma membrane of cells of Saccharomyces cerevisiae grown under mild copper stress. *Archives of Microbiology* 171: 6-12.
- Furni A, Koncz C, Salamini F, Bartels D (1997) High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *Embo Journal* 16: 3599-3608.
- Golldack D, Vera P, Dietz KJ (2003). Expression of subtilisin-like serine proteases in Arabidopsis thaliana is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiologia Plantarum* 118: 64-73.
- Holsters M, Dewaele D, Depicker A, Messens E, Vanmontagu M, Schell J (1978) Transfection and Transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics* 163: 181-187.

Bibliografía

- Huesgen PF, Overall CM (2012). N- and C-terminal degradomics: New approaches to reveal biological roles for plant proteases from substrate identification. *Physiologia Plantarum* 145, 5-17.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Jackson R, Hunter T (1970) Role of methionine in the initiation of haemoglobin synthesis. *Nature* 227: 672-676
- Kato Y, Sakamoto W (2010) New insights into the types and function of proteases in plastids. *International Review of Cell and Molecular Biology* 280: 185-218.
- Katsuhara M, Kuchitsu K, Takeshige K, Tazawa M (1989). Salt Stress-Induced Cytoplasmic Acidification and Vacuolar Alkalization in *Nitellopsis obtusa* Cells: In Vivo P-Nuclear Magnetic Resonance Study. *Plant Physiology* 90: 1102-1107.
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383-396.
- Larsson C (2007). Plasma membrane. In: "Handbook of plant sciences" Vol. 1. Edited by: Wiley. West Sussex, England.
- Li M, Wan WN, Petrova O, Huang F, Zhou Z, Boyd P, Wilson KA, Tan-Wilson A (2009). Applicability of multigene family-specific antibodies toward studies of the subtilases in *Arabidopsis thaliana*. *Analytical Biochemistry* 384: 114-122.
- Liu JX, Srivastava R, Howell S (2009). Overexpression of an arabidopsis gene encoding a subtilase (AtSBT5.4) produces a clavata-like phenotype. *Planta* 230: 687-697.
- Liu JX, Srivastava R, Howell SH (2008). Stress-induced expression of an activated form of AtbZIP17 provides protection from salt stress in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 31: 1735-1743.
- Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH (2007). Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 51: 897-909.
- Lledo A (2010) Caracterización de un mutante en la adaptina $\beta 3$ de *A. thaliana* resistente a ácidos débiles y del mutante en el mismo gen homólogo de *S. cerevisiae*. *Trabajo Final de Carrera UPV-ETSIAMN*.
- Mathieu Y, Lapous D, Thomine S, Laurière C, Guern J (1996). Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta* 199: 416-424.
- Meyerowitz EM (1989). *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 56: 263-269.
- Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91: 173-180.
- Muñoz L (2011). Obtención de mutantes tolerantes a ácido acético y estudio de las kinasas CRK29 y ARSK1 sobreexpresadas en condiciones de estrés ácido intracelular. *Trabajo Final de Carrera UPV-ETSIAMN*.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Bibliografía

- Neuteboom LW, Veth-Tello LM, Clijdesdale OR, Hooykaas P J, van der Zaal BJ (1999). A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 6: 13-19.
- Niños R, Rubio L, García-Sánchez MJ, Fernández JA, Bueso E, Alejandro S, Serrano R (2013). A dominant-negative form of *Arabidopsis* AP-3 β -adaptin improves intracellular pH homeostasis. *The Plant Journal* 74: 557-568.
- Niños R (2011). Biología molecular de la regulación de la homeostasis de pH en *Arabidopsis thaliana*. *Tesis Doctoral UPV*.
- Nixon PJ, Michoux F, Yu J, Boehm M, Komenda J (2010) Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Annals of Botany* 106: 1-16.
- Oms P (2013). Obtención de mutantes tolerantes a ácido acético e identificación de los genes responsables de su tolerancia en condiciones de estrés ácido. *Trabajo Final de Carrera UPV-ETSIAMN*.
- ONU (2007). Previsiones demográficas Mundiales, Revisión 2006. Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población. Naciones Unidas.
- Piper PW, Ortiz-Calderon C, Holyoak C, Coote P, Cole M (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones* 2: 12-24.
- Price AH, Hendry GAF (1991). Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant, Cell & Environment* 14: 477-484.
- Ramírez V, López A, Mauch-Mani B, Gil MJ, Vera P (2013). An Extracellular Subtilase Switch for Immune Priming in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens* 9.
- Rautengarten C, Steinhauser D, Büssis D, Stintzi A, Schaller A, Kopka J, Altmann T (2005). Inferring hypotheses on functional relationships of genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *PLoS Computational Biology* 1: 0297-0312.
- Rautengarten C, Usadel B, Neumetzler L, Hartmann J, Büssis D, Altmann T (2008). A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from *Arabidopsis* seed coats. *The Plant Journal* 54: 466-480.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 38: D227–D233.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- San-Bento R, Farcot E, Galletti R, Creff A, Ingram G (2014). Epidermal identity is maintained by cell-cell communication via a universally active feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 77: 46-58.
- Schaller A, Stintzi A, Graff L (2012). Subtilases - versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment. *Physiologia Plantarum* 145: 52-66.

Bibliografía

- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann J (2005) A gene expression map of Arabidopsis development. *Nature Genetics* 37: 501-506
- Selgas I (2014) Identificación de mutantes y genes que proporcionen tolerancia a estrés ácido intracelular. *Trabajo Final de Grado UPV-ETSIAMN*.
- Sénéchal F, Graff L, Surcouf O, Marcelo P, Rayon C, Bouton S, Mareck A, Mouille G, Stintzi A, Höfte H, Lerouge P, Schaller A, Pelloux, J. (2014). Arabidopsis PECTIN METHYLESTERASE17 is co-expressed with and processed by SBT3.5, a subtilisin-like serine protease. *Annals of Botany* 114: 1161-1175.
- Serrano R (1985). Membrane potentials and active transport in Plants and Fungi. Plasma membrane ATPase of Plants and Fungi. Edited by CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Siezen RJ, Leunissen J (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 6: 501-523.
- Siezen RJ, de Vos WM, Leunissen J, Dijkstra BW (1991). Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Engineering* 4: 719-737.
- Smith EL, Markland FS, Kasper CB, DeLange RJ, Landon M, Evans WH (1966). The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN9 and Carlsberg. *Journal of Biological Chemistry* 241: 5974-5976.
- Srivastava R, Liu JX, Howell SH (2008). Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in Arabidopsis. *The Plant Journal* 56: 219-227.
- Srivastava R, Liu JX, Guo H, Yin Y, Howell SH (2009). Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. *The Plant Journal* 59: 930-939.
- Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C, Machida Y (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in Arabidopsis embryos and juvenile plants. *Development* 128: 4681-4689.
- Tilman D (1999) "Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 5995-6000.
- Tripathi L, Sowdhamini R (2006) Cross genome comparisons of serine proteases in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics* 7: 200.
- Tsiatsiani L, Gevaert K, Van Breusegem F (2012). Natural substrates of plant proteases: How can protease degradomics extend our knowledge?. *Physiologia Plantarum* 145: 28-40.
- van der Hoorn RAL (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 59: 191-223.
- Vilanova C (2011). Caracterización de mutantes de Arabidopsis thaliana resistentes a estrés ácido. *Trabajo Final de Carrera UPV-ETSIAMN*.
- Vilcara E (2012). Análisis molecular de un mutante marcado de Arabidopsis thaliana tolerante a estrés ácido intracelular. *Trabajo Final de Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas-UPV*.

Bibliografía

- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson, GV, Provart NJ (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2.
- Xing Q, Creff A, Waters A, Tanaka H, Goodrich J, Ingram GC (2013). ZHOUP1 controls embryonic cuticle formation via a signalling pathway involving the subtilisin protease ABNORMAL LEAF-SHAPE1 and the receptor kinases GASSHO1 and GASSHO2. *Development* 140: 770-779.
- Zhao C, Johnson BJ, Kositsup B, Beers EP (2000). Exploiting secondary growth in Arabidopsis. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiology* 123: 1185-1196.
- Zhu JK (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.