



Grado en Ciencias Biológicas
Mención Biotecnología

¿Cuál es la función de las
nucleoporinas AtSAR1 y AtSAR3 en
la meiosis de *Arabidopsis thaliana*?

Nadia Fernández Jiménez

Curso académico 2015-2016

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Genética

Fdo. Nadia Fernández Jiménez

Vº Bº del Tutor

Fdo. Javier Varas García

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	2
Resumen, palabras clave	3
Abstract, keywords.....	3
1. Introducción	4
1.1 Las proteínas supresoras de resistencia a auxinas son nucleoporinas	4
1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> y el estudio de la meiosis	6
1.3 La meiosis en los mutantes <i>Atsar1</i> y <i>Atsar3</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.4 Objetivos e hipótesis del trabajo.....	7
2. Materiales y Métodos	8
2.1 Materiales	8
2.2 Métodos	9
2.2.1 Siembra y condiciones de crecimiento	9
2.2.2 Estudio de la germinación y la floración	9
2.2.3 Estudio de la fertilidad	9
2.2.4 Caracterización de la línea germinal femenina.....	9
2.2.5 Caracterización del proceso meiótico en CMP mediante <i>spreading</i> , FISH e inmunolocalización	9
2.2.6 Obtención de dobles mutantes	12
2.2.7 Caracterización molecular	12
2.2.8 Análisis estadístico.....	13
2.2.9 Captura y análisis de imágenes	14
3. Resultados	14
3.1 Caracterización de la línea somática	14
3.1.1 Estudio comparativo del desarrollo vegetativo.....	14
3.1.2 Estudio de la germinación y la floración	14
3.2 Caracterización de la línea germinal	16
3.2.1 Evaluación de la fertilidad	17
3.2.2 Caracterización de la línea germinal femenina.....	17
3.2.3 Caracterización del proceso meiótico en células madre del polen	18
3.2.4 Caracterización citológica de la metafase I en el mutante <i>Atsar1-4</i>	20
3.2.5 Inmunolocalización de proteínas	21
3.3 Obtención de dobles mutantes <i>Atsar1-4 Atsar3-3</i>	23
4. Discusión.....	24
4.1 Las nucleoporinas AtSAR1 y AtSAR3 son necesarias para el desarrollo de la planta ..	24
4.2 AtSAR1 y AtSAR3 en la meiosis de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
5. Conclusiones	27
6. Bibliografía.....	27

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AGI	<i>Arabidopsis Genome Initiative</i>
ARF	Factor de respuesta a auxinas, <i>Auxin Response Factor</i>
AtAXR1	Proteína de resistencia a auxinas 1 (<i>Auxin-Resistant1</i>)
AtCUL1	CULINA 1
AtCUL4A	CULINA 4 A
AtERC1	Proteína E1 C-terminal relacionada con la resistencia a auxinas (<i>E1 C-TERMINAL RELATED 1</i>)
AtNUP160	Nucleoporina 160 (AtSAR1)
AtNUP96	Nucleoporina 96 (AtSAR3)
AtRCE1	Enzima conjugadora de RUB (<i>RUB-CONJUGATING ENZYME1</i>)
AtSAR1	<i>Suppressor of Auxin Resistance 1</i> (AtNUP160)
AtSAR3	<i>Suppressor of Auxin Resistance 3</i> (AtNUP96)
Aux/IAA	(<i>AXR3/INDOLE ACETIC ACID17</i>)
BSA	Albúmina de Suero Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CMP	Célula Madre del Polen
CO	Sobrecruzamientos (<i>Crossovers</i>)
Col - 0	Ecotipo Columbia de <i>Arabidopsis thaliana</i>
CRL	Ligasa asociada al anillo de culinas (<i>Cullin RING –really interesting new gene- Ligase</i>)
CS	Complejo Sinaptonémico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DSB	Rotura de doble cadena del DNA (<i>Double-Strand Breaks</i>)
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con Fluorescencia (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
HM	Homocigoto
HZ	Heterocigoto
LB	Cebador del borde izquierdo del T-DNA. (<i>Left Border T-DNA Primer</i>)
LP	Cebador izquierdo del DNA flanqueante al T-DNA (<i>Left T-DNA Primer</i>)
mRNA	RNA mensajero
NOR	Región organizadora del Nucleolo
NPC	Complejo de Poro Nuclear (<i>Nuclear Pore Complex</i>)
pb	Pares de bases de DNA
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
rDNA	DNA ribosómico
RP	Cebador derecho del DNA flanqueante al T-DNA (<i>Right T-DNA Primer</i>)
RUB	Proteína relacionada con la ubiquitina (<i>RELATED TO UBIQUITIN</i>)
T-DNA	DNA transferente
UPS	Sistema Ubiquitina-Proteasoma (<i>Ubiquitin proteasome system</i>)
WT	Organismo silvestre (<i>Wild Type</i>)

Resumen

El complejo del poro nuclear regula el transporte núcleo-citoplasmático. Existe una relación con la supresión de la resistencia auxinas cuando se alteran algunas nucleoporinas. Concretamente, mutaciones en *AtSAR1/AtNUP160* (*Suppressor of Auxin Resistance1*) y *AtSAR3/AtNUP96* suprimen el fenotipo característico de los mutantes *Ataxr1* (*Auxin Resistant1*) como: pérdida de la dominancia apical y del gravitropismo de la raíz, reducción de la formación de raíces laterales, aumento de la longitud de la raíz primaria, reducción de la altura de la planta y de la fertilidad. *AtAXR1* es una proteína implicada en la ruta de rubilación. Esta proteína es determinante en la degradación de la proteína Aux/IAA, represora de la expresión de genes de respuesta a auxinas. Además se ha demostrado fundamental durante el proceso de localización de los sobrecruzamientos en la meiosis de *Arabidopsis*.

Los mutantes para las proteínas *AtSAR* presentaron un fenotipo pleiotrópico, manifestando diversos defectos en el desarrollo vegetativo y la fertilidad. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los mutantes *Atsar1-4* y *Atsar3-3* para determinar si las alteraciones en fertilidad son debidas a anomalías durante la división meiótica y conocer más sobre las funciones del complejo del poro nuclear.

Palabras Clave: Meiosis, *Arabidopsis thaliana*, NPC, nucleoporinas, *AtSAR*.

Abstract

The nuclear pore complex (NPC) regulates the nucleocytoplasmic transport of macromolecules. Deficiencies in nucleoporins have been found to be involved in the suppression of auxin hormone resistance. Specifically, mutations in *SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE 1* (*AtSAR1/AtNUP160*) and *AtSAR3* (*AtNUP96*) suppress many of the phenotypes showed by the *Auxin resistant1* (*Ataxr1*) mutant, namely: defects in root gravitropism, lateral root formation, root hair growth, apical dominance, plant height and fertility. *AtAXR1* functions in the RELATED TO UBIQUITIN (RUB) pathway, which is needed for the auxin-dependent degradation of the Aux/IAA proteins that act as transcriptional repressors in auxin signalling. Moreover this pathway is crucial in the crossover location process in *Arabidopsis* meiosis.

Atsar1-4 and *Atsar3-3* mutants showed pleiotropic phenotype with multiple growth defects and reduce fertility. The aim of this study was to find whether the reduction in fertility displayed by the *Atsar* mutants is a consequence of meiotic defects and to have a better understanding of NPC functions in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: Meiosis, *Arabidopsis thaliana*, NPC, nucleoporins, *AtSAR*.

1. Introducción

1.1 Las proteínas supresoras de resistencia a auxinas son nucleoporinas

Las proteínas AtSAR1 (*Suppressor of Auxin Resistance 1*) y AtSAR3 (*Suppressor of Auxin Resistance 3*) fueron denominadas originalmente así al caracterizarse como proteínas represoras de la resistencia a auxinas, una de las principales hormonas vegetales (Cernac *et al.*, 1997). Sin embargo, la posterior caracterización molecular de estos genes, reveló que ambos codifican proteínas similares a las nucleoporinas de vertebrados, las subunidades que forman los complejos de poro nuclear (NPC, *Nuclear Pore Complex*) (Parry *et al.*, 2006).

AtAXR1 (*Auxin-Resistant1*) es una proteína implicada en respuesta a auxinas a través de la degradación de proteínas mediante el sistema ubiquitina-proteasoma (Lincoln *et al.*, 1990; Leyser *et al.*, 1993; Timpte *et al.*, 1995; Cernac *et al.*, 1997; Gazzarrini & McCourt, 2003). En la transferencia de la ubiquitina a las proteínas diana, para su degradación por esta vía, son fundamentales las enzimas E3 ligasas, que a su vez, forman parte de complejos multiproteicos en los que se incluyen las culinas. El correcto funcionamiento de estas ligasas requiere de la unión de la proteína RUB (del inglés RELATED TO UBIQUITIN), proceso regulado a través de la ruta conocida como rubilación (plantas y nematodos) o nedilación (levaduras y ratones). Concretamente, la ruta de rubilación en *Arabidopsis* se produce mediante una cascada enzimática en la que intervienen tres proteínas de forma secuencial, E1, E2 y E3. La actividad E1 (activación de RUB) es llevada a cabo por una enzima heterodimérica, AtAXR1-AtECR1 (C-TERMINAL RELATED 1). AtRCE1 (RUB-CONJUGATING ENZYME) actúa como la E2, conjugándose con RUB, y a partir de la actividad de estas proteínas, se inicia una cascada que finaliza en la activación de diferentes proteínas del tipo E3 ligasas (Leyser *et al.*, 1993; Hotton & Callis, 2008). Una de estas proteínas tipo E3 es la culina AtCUL1, perteneciente al complejo SCF^{TIR1}. La activación de este complejo permite la ubiquitinación de diversos sustratos, entre ellos el factor represor Aux/IAA (AXR3/INDOLE ACETIC ACID17), desencadenando su degradación por el proteosoma 26S. La degradación del represor permite la activación de factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARF, *Auxin Response Factor*) (Gazzarrini & McCourt, 2003; Hotton & Callis, 2008; Mergner & Schwechheimer, 2014). Por lo tanto, en los mutantes *Ataxr1*, toda esta ruta permanece inactiva, el represor Aux/IAA se mantiene unido a ARF y en consecuencia se produce resistencia constitutiva para la expresión de genes de respuesta auxinas. Esto supone la aparición de diversas alteraciones pleiotrópicas tales como: defectos en la morfología foliar y floral, pérdida del gravitropismo radicular que implica una menor formación de raíces laterales y un aumento de la longitud de

la raíz primaria o anomalías en el desarrollo de los tejidos vasculares (Timpte *et al.*, 1995; Parry *et al.*, 2006).

En las plantas dobles mutantes *Ataxr1 Atsar1*, se recupera parcialmente la expresión de genes de respuesta a auxinas (Cernac *et al.*, 1997). Se ha especulado con cómo los defectos en la configuración de los NPC como consecuencia a la mutación *Atsar1*, suponen una reducción de la translocación al núcleo del factor inhibidor Aux/IAA, alterándose su distribución subcelular (Parry *et al.*, 2006; Chinnusamy *et al.*, 2008).

Los NPC se localizan en la envoltura nuclear y su principal función es la de mediar en el transporte núcleo-citoplasmático. Estas estructuras multiproteicas están compuestas por diferentes subcomplejos que se organizan en torno a un canal central que tiene simetría octogonal (Tamura *et al.*, 2010). Distintos experimentos moleculares y de localización subcelular han permitido identificar a AtSAR1 (AtNUP160) y AtSAR3 (AtNUP96) como auténticas nucleoporinas integrantes del subcomplejo NUP107-160 (Figura 1), que forma parte de los NPC de *Arabidopsis* (Parry *et al.*, 2006; Parry, 2014). Desde un punto de vista estructural, se han caracterizado un alto contenido de motivos proteicos tipo alfa-solenoides (estructura terciaria constituida por alfa hélices) en AtNUP160 y AtNUP96. Además AtNUP160 presenta motivos proteicos de hélice enrollada (estructura terciaria compuesta por beta-láminas) (Tamura & Hara-Nishimura, 2013). Esta estructura proteínica se ha descrito como la base estructural del NPC, proporcionando a su vez, superficies accesibles para la interacción con otras proteínas (Tamura & Hara-Nishimura, 2013).

Diversos estudios, mediante el uso de mutantes para distintas nucleoporinas en *Arabidopsis*, han demostrado la importancia de los NPC para un correcto funcionamiento de los procesos de crecimiento, floración y desarrollo de la planta (Cernac *et al.*, 1997; Parry *et al.*, 2006; Ferrández-Ayela *et al.*, 2013; Parry, 2014), respuesta a estrés abiótico (Dong *et al.*, 2006; MacGregor *et al.*, 2013; Chinnusamy *et al.*, 2008), defensa ante patógenos y enfermedades (Zhang & Li, 2005; Roth & Wiermer, 2012; Wiermer *et al.*, 2012) mantenimiento del ritmo circadiano (MacGregor *et al.*, 2013) o el transporte de mRNA al citoplasma (Parry *et al.*, 2006; Parry, 2014). Incluso, se ha descrito como plantas mutantes *Atnup136* presentan fertilidad reducida (Tamura *et al.*, 2010; Tamura & Hara-Nishimura, 2013).

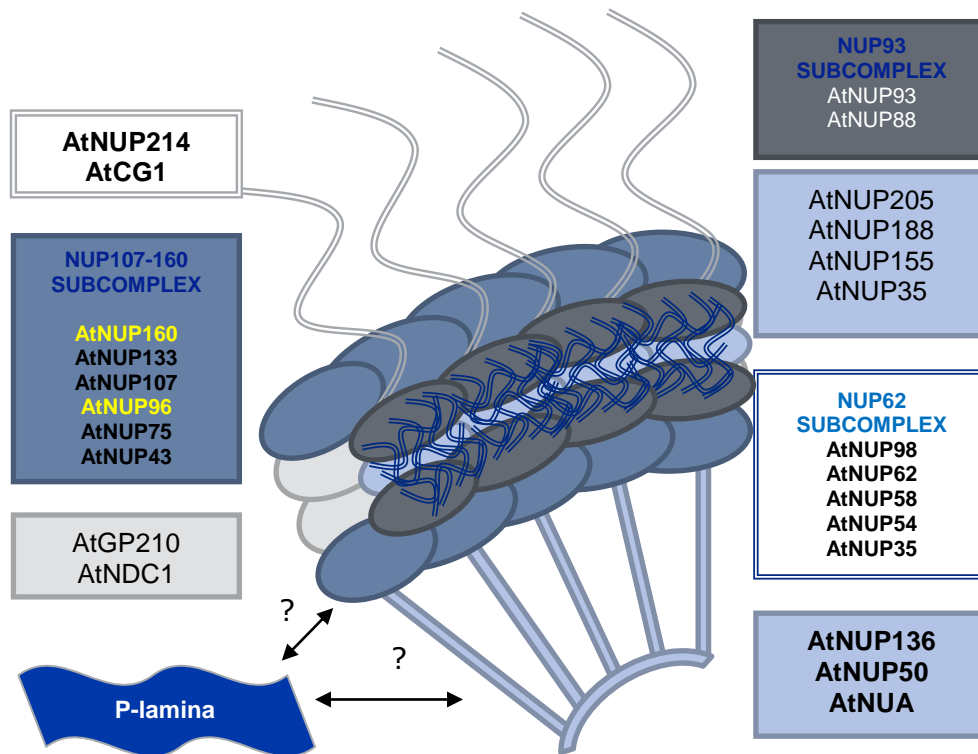


Figura 1. Estructura del NPC. En amarillo se marcan las dos nucleoporinas del estudio, AtSAR1 o AtNUP160 y AtSAR3 o AtNUP96. Ambas localizadas en el subcomplejo NUP107-160.

1.2 Arabidopsis thaliana y el estudio de la meiosis

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh (2n=10), es una planta herbácea de la familia de las Crucíferas. Este organismo se ha establecido como especie modelo en biología y genética por las características de su corto ciclo biológico, por su pequeño genoma, completamente secuenciado, que la hace adecuada para análisis moleculares, y por su morfología, que es comparable a la de otras Angiospermas haciendo posible la extrapolación de los resultados (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Además resulta fácil de mantener en laboratorio, ocupa poco espacio, tiene un tiempo de generación de seis semanas y una sola planta puede producir más de 5.000 semillas.

La meiosis es un tipo de división especializada caracterizada por una única ronda de replicación del DNA seguida de dos rondas sucesivas de segregación cromosómica. El proceso es esencial para el mantenimiento de la ploidía de la especie al culminar con la formación de gametos haploides que tras la fecundación restauraran el número cromosómico de la especie. Además gracias a la meiosis se obtienen nuevas combinaciones genéticas a partir del proceso de recombinación homóloga. En la primera división meiótica los cromosomas homólogos forman asociaciones estables denominadas bivalentes, lo que, en la mayoría de los organismos, implica el apareamiento (reconocimiento y alineamiento de los

homólogos), la sinapsis (formación del complejo sinaptonémico, CS) y el intercambio recíproco de información mediante la recombinación homóloga (mediante los sobrecruzamientos y eventos de conversión génica), segregando al final de esta los cromosomas homólogos (división reduccional). En la segunda división meiótica segregan las cromátidas hermanas (división ecuacional), permitiendo la formación de cuatro productos meióticos formados por cinco cromátidas cada uno en el caso de *Arabidopsis thaliana* (Ma, 2006). Anomalías en cualquiera de los procesos de recombinación, sinapsis o segregación genera gametos con anomalías como aneuploidías y poliploidías (Zamariola *et al.*, 2014; Pradillo *et al.*, 2014).

1.3 La meiosis en los mutantes *Atsar1* y *Atsar3* de *Arabidopsis thaliana*

Hasta la fecha, un único trabajo ha demostrado que el proceso de rubilación es determinante en la localización de los sobrecruzamientos durante la meiosis de *Arabidopsis* (Jahns *et al.*, 2014). De forma breve, los mutantes *Ataxr1* muestran sinapsis incompleta y anomalías en recombinación lo que supone la aparición de univalentes en metafase I. Consecuentemente, no se produce una correcta segregación de los cromosomas, formándose al final de la meiosis tétradas desequilibradas. Sin embargo, los defectos en recombinación no se deben a una reducción en el número de sobrecruzamientos (CO, *Crossover*) sino a una deslocalización de éstos, agrupándose en las regiones subtelo méricas. Además, AtAXR1 participa en la activación de la culina CUL4 para la detección de daño en el DNA en células somáticas (Mézard *et al.*, 2015), con lo que estos resultados sugieren la importancia de AtAXR1 y AtCUL4 durante la meiosis en *Arabidopsis thaliana*.

1.4 Objetivos e hipótesis del trabajo

Debemos considerar que una parte importante de nuestra dieta está compuesta por productos procedentes de la meiosis vegetal, por ejemplo, frutas y granos. Por tanto, el conocimiento de este proceso puede ser esencial en cualquier política encaminada al aumento de la producción global de alimentos. En la meiosis se generan nuevas combinaciones de alelos que confieren nuevos fenotipos que pueden obtener un rendimiento mejorado en variedades cultivables. Sin embargo, la recombinación en muchas especies vegetales, tiene lugar mayoritariamente en las regiones subterminales de los cromosomas, estimándose que el 40% de los genes rara vez, recombinan. Este hecho, constituye un factor limitante para la realización de programas de mejora tradicionales (Ford-Lloyd *et al.*, 2011). La comprensión del funcionamiento de los genes que controlan la formación de los fenómenos de CO durante la meiosis puede ayudar, a afrontar este reto biotecnológico (Crismani *et al.*, 2013; Wijnker *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta estas premisas y dado el rol que cumplen los NPC en distintos procesos fundamentales en *Arabidopsis*, así como que la regulación mediante la nedilación es necesaria durante el proceso meiótico, la hipótesis del presente trabajo fue la existencia de un posible papel de las nucleoporinas AtSAR1 y AtSAR3 durante la meiosis de *Arabidopsis thaliana*. Por tanto, como objetivo principal se realizó la caracterización citológica de este tipo especializado de división celular en las células madre del polen (CMP) de mutantes insercionales *Atsar1-4* y *Atsar3-3*. En dicha caracterización se han aplicado técnicas como la inmunolocalización de proteínas meióticas o la hibridación in situ con fluorescencia (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*). Como objetivo secundario se estudió el patrón de desarrollo general en estos mutantes. Ambos mutantes presentaron un descenso en fertilidad y defectos en el desarrollo. Además la identificación de CMP con alteraciones en el nivel de condensación de la cromatina durante la primera división meiótica y meiocitos con fragmentación cromosómica en segunda división, pone de manifiesto que AtSAR1 desempeña una función fundamental en la meiosis de *Arabidopsis thaliana*, mientras que AtSAR3 podría ser dispensable en este proceso. De este modo, los resultados aquí obtenidos sugieren un papel primordial de los NPC durante el desarrollo y la meiosis en *Arabidopsis thaliana*.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

Se caracterizaron mutantes de inserción mediante T-DNA en los genes *AtSAR1* (At1g33410) y *AtSAR3* (At1g80680) para el estudio de su fenotipo meiótico, utilizándose el ecotipo Columbia (Col) como plantas silvestres (WT, *Wild Type*). Las semillas fueron cedidas por la Prof. María Rosa Ponce (Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, Alicante). La estructura génica y la localización de las inserciones de T-DNA de los alelos *Atsar1-4* y *Atsar3-3* se detallan en la Figura 2.

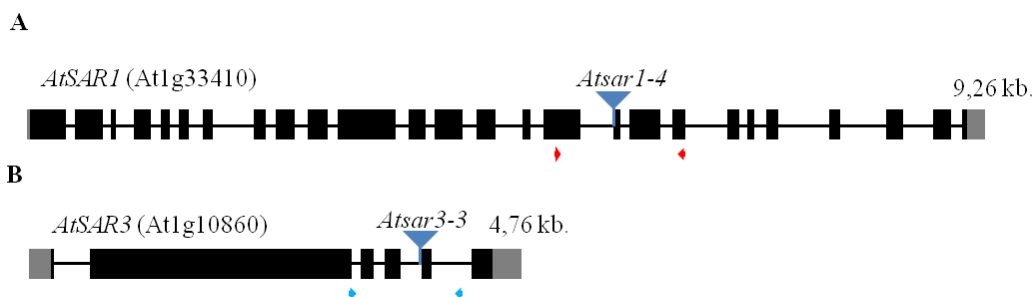


Figura 2. Estructura génica y localización de las inserciones de T-DNA A). Estructura del gen *AtSAR1*. B). Estructura del gen *AtSAR3*. El triángulo azul (▼) indica la posición de la inserción por T-DNA que ocupa en los distintos genes. Las flechas indican la posición de los cebadores utilizados para la detección de la inserción mediante amplificación por PCR.

2.2 Métodos

2.2.1 Siembra y condiciones de crecimiento

Las semillas se sembraron en una mezcla de tierra abonada y vermiculita en proporción 3:1. Las condiciones de crecimiento fueron fijas: fotoperiodo de 16 horas de luz, 60% de humedad relativa y 18°C de temperatura. Aquellas semillas que presentaron problemas de germinación se sembraron en placas Petri con medio MS, sacarosa (10 g/l), agar (10g/l) y pH 5,7, esterilizándose las semillas en hipoclorito sódico al 2,5%.

2.2.2 Estudio de la germinación y la floración

Los tiempos de germinación, aparición de los cotiledones y del primer botón floral, fueron utilizados como indicadores del tiempo de desarrollo de la línea somática y germinal.

2.2.3 Estudio de la fertilidad

Se midió la longitud de tres silicuas por planta seleccionadas al azar, repitiendo la medida en tres plantas distintas, contabilizándose el número de semillas por silicua.

2.2.4 Caracterización de la línea germinal femenina

Se diseccionaron los botones florales separándose los gineceos del resto de elementos, se dispusieron en un portaobjetos, se tiñeron con carmín acético fijando a la llama del mechero y se colocó el cubreobjetos. Se realizó el “aplastado” (*squash*) ejerciendo presión con el pulgar. Se cuantificó el número de óvulos por gineceo, estudiando un total de 11 gineceos por genotipo, mediante microscopía de contraste de fases.

2.2.5 Caracterización del proceso meiótico en CMP mediante *spreading*, FISH e inmunolocalización

➤ Técnica de “esparcido”, *spreading*

Los botones florales se fijaron en solución Carnoy (etanol, cloroformo y ácido acético glacial, 6:3:1), durante una semana a 4°C. Una vez fijados, se dispusieron en un pocillo y se realizaron tres lavados con una solución etanol - ácido acético glacial (3:1) para eliminar el cloroformo, y tres lavados en tampón citrato (10 mM; pH 4,5). Después se llevó a cabo una incubación enzimática (0,3% p/v celulasa; 0,3% p/v pectinasa y 0,3% p/v citohelicasa) en tampón citrato, durante dos horas, en cámara húmeda a 37°C. Posteriormente, se detuvo la reacción enzimática añadiendo tampón citrato frío. Para las preparaciones se dispuso un botón floral por portaobjetos y se maceró con una lanceta hasta disgregar las anteras. Se añadieron 10 µl de ácido acético frío al 60% y se incubaron durante un minuto a 42°C. Finalmente se añadieron otros 10 µl de ácido acético al 60% y 100µl de solución etanol-acético rodeando la

gota de acético para fijar el material y 100 µl de solución etanol-acético para limpiar la preparación, dejando secar la preparación. Para su observación mediante microscopía de fluorescencia, las preparaciones se tiñeron con 8 µl de una solución del agente intercalante 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 10µg/ml, en medio de montaje Vectashield).

➤ **Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)**

Pretratamiento. Las preparaciones de *spreading* se lavaron en tampón 2x SSC (solución salina con citrato: 17,52 g/l NaCl, 8,82 g/l citrato de sodio, pH 7,5), durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Después se realizó un tratamiento con pepsina al 0,01% en 0,01 M HCl durante 90 segundos a 37°C para la degradación de la pared celular y las proteínas del citoplasma. Tras dos lavados en 2x SSC a temperatura ambiente se fijó el material en paraformaldehído (al 4%, pH 8) 10 minutos, a temperatura ambiente. Se lavaron las preparaciones con agua destilada para eliminar el exceso de paraformaldehído y se deshidrataron manteniéndolas durante 2 minutos en una serie de alcoholes a distintas concentraciones (70%, 90% y 100%). Por último se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos para proceder a la hibridación.

Preparación sondas. Se prepararon 20 µl de sonda por preparación de la siguiente mezcla: 14 µl de mezcla de hibridación (5 ml formamida desionizada, 1 ml de 20x SSC, 1 gr de sulfato de dextrano, pH 7) y 3 µl de cada sonda marcada. Las sondas utilizadas fueron las sondas de DNA ribosómico (rDNA) 45S, pTa71 de *Triticum aestivum* (Gerlach & Bedbrook, 1979), que permite detectar las NOR y la sonda 5S, que se corresponde con la secuencia pCT4.2 (Campell *et al.*, 1992). Ambas fueron marcadas mediante la técnica *nick translation*, utilizando digoxigenina-dUTP para la sonda rDNA 45S y biotina-dUTP para la sonda rDNA 5S. La mezcla se desnaturalizó a 80°C durante 10 min. Finalmente se mantuvo en frío hasta su uso. En el ecotipo Col, las secuencias de rDNA 45S se localizan en los cromosomas 2 y 4, mientras que las de rDNA 5S se localizan en los cromosomas 3, 4 y 5. Por tanto, este marcaje permite distinguir cada uno de los cromosomas del complemento (Figura 3).

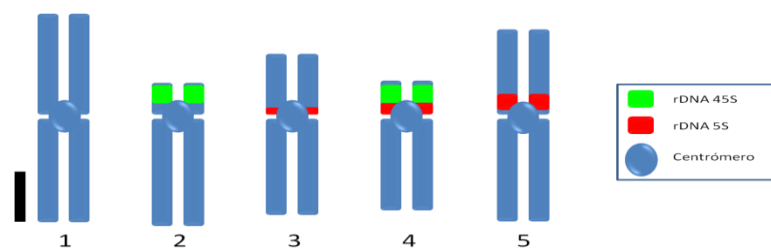


Figura 3. Idiograma del ecotipo Columbia en *Arabidopsis thaliana*. Las diferentes señales en cada cromosoma nos permiten diferenciarlos. Barra 0,5 µm.

Hibridación sondas. Se añadieron 19 μ l de sonda en cada preparación. Después se desnaturalizaron a 72°C durante 4 minutos y se hibridaron en cámara húmeda a 37°C toda la noche. Tras la hibridación se realizaron tres lavados en 50% formamida desionizada-2x SSC a 45°C durante 5 minutos, un lavado en 2x SSC a 45°C durante 5 minutos, un lavado en 4T (4xSSC-0,05% Tween 20©) a 45°C durante 5 minutos y por último un lavado en 4T a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Detección sondas. Se realizó una mezcla de anticuerpos para la detección de las sondas marcadas a una concentración de 5ng/ μ l, FITC-Antidigoxigenina y Cy3-Avidina, en TNB (100 mM TrisHCl pH 7,5; 150mM NaCl, 0,5% (p/v) Boehringer blocking reagent). Se dispusieron 50 μ l de la mezcla por preparación, utilizando parafilm como cubreobjetos. Se incubaron en cámara húmeda a 37°C una hora. Finalmente se lavaron las preparaciones tres veces en 4T a temperatura ambiente 5 minutos y se tiñeron con 7 μ l de DAPI.

Cuantificación de quiasmas por célula. Se cuantificó el número de quiasmas en metafases I de CMP según el criterio establecido por Sánchez Morán y colaboradores (2001). Los bivalentes se clasificaron en dos categorías: abiertos y cerrados. En los bivalentes abiertos los cromosomas homólogos están unidos al menos por un quiasma en uno de los brazos, mientras que en los bivalentes cerrados hay un quiasma, como mínimo, en cada uno de los dos brazos cromosómicos. La morfología de los bivalentes no depende únicamente de que los quiasmas aparezcan en uno de los brazos o en ambos, sino también de la posición del centrómero (siendo diferente entre metacéntricos y acrocéntricos) y de la localización de los quiasmas en los brazos cromosómicos (proximal, intersticial y distal), (ver Figura 2 en López *et al.*, 2012).

➤ **Inmunolocalización de proteínas por la técnica squash**

Se seleccionaron botones florales frescos y se fijó el material en una solución de paraformaldehído al 4% y Tritón X-100 al 0,15% en PBS (tampón fosfato salino: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄, pH 7,4) 20 minutos. Después de tres lavados en PBS se realizó una incubación enzimática (citohelicasa 1%), una hora en cámara húmeda a 37° C. Tras la digestión se realizaron tres lavados en PBS. Para las preparaciones se dispusieron 5 botones florales en un portaobjetos y se maceraron con una varilla metálica hasta su disgregación. Se realizó el *squash* realizando presión con los pulgares sobre el cubreobjetos y se sumergieron las preparaciones en nitrógeno líquido para conseguir la fijación del material. Se retiró el cubreobjetos, con ayuda de un bisturí, y se introdujeron en un coplin con PBS. Tras tres lavados en PBSt (Tritón 0,1% en PBS), se incubaron las preparaciones, durante 20 minutos, en cámara húmeda a temperatura ambiente en un tampón

bloqueante (BSA 1%, Tritón X-100 0,1% en PBS). Tras el bloqueo, se lavaron las preparaciones con PBSt y se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos primarios (en tampón bloqueante) en cámara húmeda una noche a 4° C. Posteriormente se realizaron tres lavados en PBSt y se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos secundarios durante 90 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras cuatro lavados en PBSt se tiñeron las preparaciones con DAPI (10µg/ml), en medio de montaje Vectashield.

Se utilizaron como anticuerpos primarios anticuerpos policlonales específicos de proteínas del eje sinaptonémico de *Arabidopsis thaliana*: anti-AtASY1 (Armstrong *et al.*, 2002) obtenido de rata (diluido 1:1000) y anti-AtZYP1 (Higgins *et al.*, 2005) obtenido de conejo (diluido 1:500). Ambos fueron cedidos por el Prof. Chris Franklin (Universidad de Birmingham, Reino Unido). Y como anticuerpos secundarios: anti-rata conjugado con FITC (diluido 1:50) y anti-conejo conjugado con Cy3 (diluido 1:500).

2.2.6 Obtención de dobles mutantes

Para la obtención de dobles mutantes en *Arabidopsis thaliana* es necesario la realización de un cruzamiento dirigido evitando la autogamia de la especie. Se utilizaron como parentales femeninos plantas *Atsar1-4* eliminando con una pinza pétalos, sépalos y anteras de los botones florales maduros, dejando únicamente los gineceos. Posteriormente se utilizaron plantas *Atsar3-3* como parentales masculinos, polinizando mediante contacto directo con anteras maduras durante tres días consecutivos con los gineceos de plantas *Atsar1-4*. Las plantas se mantuvieron aisladas del resto para evitar la polinización no controlada en invernaderos individuales. Después se recolectaron las semillas de las silicuas obtenidas tras la fecundación para su posterior sembrado en placa. Por último, plantas resultantes de la autofecundación de la F1 obtenida en los cruzamientos se analizaron mediante PCR para identificar a los dobles mutantes.

2.2.7 Caracterización molecular

Extracción de DNA genómico. Las extracciones de DNA se realizaron de forma individualizada. Se maceró en frío una hoja joven, con una punta amarilla sellada con calor, en 40 µl de buffer de extracción (100 mM Tris-ClH pH 9,5; 250 mM KCl, 10 mM EDTA) hasta homogeneizar el material. Posteriormente se aplicó un choque térmico a 95°C durante 10 minutos en el termociclador. Tras esto se mantuvieron las muestras 5 minutos en hielo, añadiendo 40 µl de buffer de dilución (3% BSA). Por último las muestras se centrifugaron y se conservaron a 4° C.

PCR. La reacción en cadena de la polimerasa nos permite analizar la presencia/ausencia de las inserciones de T-DNA a partir del tamaño de amplificación y de las distintas bandas resueltas mediante electroforesis. Se utilizaron tres cebadores en cada reacción de PCR (RP y LP presentes en la secuencia del gen y LB presente en la secuencia del T-DNA) de tal forma que se obtuvo una banda de 1000-1300 pb (RP+LP) para el fenotipo WT, una banda de 400-700 pb (RP+LB) para el mutante con inserción de T-DNA y presencia de ambas bandas en los heterocigotos.

La mezcla de reacción de PCR se preparó para un volumen final de 10 μ l (Taq 5 μ l; H₂O Milli-Q® 4,2 μ l; cebadores 0,2 μ l; extracto de DNA 0,4 μ l;). La mezcla comercial de Taq-polimerasa (Biotools) utilizada incluye el MgCl₂ y los nucleótidos necesarios para la reacción. El programa de amplificación utilizado fue: [1x (94°C-5min.)] - [35x (94°C-30 seg., 55°C-1 min., 72°C-2min.)] - [1x (72°C-10min.)].

Los cebadores utilizados en la PCR fueron: en el caso de *Atsar1-4* (SALK_126801: RP-CAGCCCTTGAGCAAGTAGATG, LP-TTACCTGAATATGTCCACCCG); y para el mutante *Atsar3-3* (SALK_109959: RP-AACTTGGGCTGTGTTGTCATC, LP-GATGCACGAAGCTCTGGTAAG). Y como LB se utilizó el cebador LBb1.3 (ATTTTGCCGATTTTCGGAAC), para los dos mutantes.

Electroforesis en gel de agarosa. Al producto resultante de la PCR se le añadieron 2 μ l de buffer de carga (azul de bromofenol al 0,25%, sacarosa al 40%) para marcar el frente en el gel y conferir peso a la muestra evitando su dispersión. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) en 0,5x TBE (44,5 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8) con SYBR-green para su visualización por luz UV en un transiluminador. Se utilizó una escalera de 100pb como marcador de tamaño.

2.2.8 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático Statgraphics Centurion XVII[®]. Para la comparación de medias se utilizó una t de Student, previo análisis de la igualdad de las varianzas por un test F de Fisher. Para el análisis de muestras con un número inferior a 30 se realizó una comparación de medianas mediante la prueba U de Mann-Whitney. Por último, para la comparación de porcentajes se realizó una prueba X². En todos los casos se tomó como nivel de significación $\alpha = 0,05$.

2.2.9 Captura y análisis de imágenes

Para el visualizado de las preparaciones y captura de imágenes de éstas se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX60) con filtros para DAPI, FITC y Cy3 y con una cámara fotográfica digital CCD (Olympus DP70) acoplada. El análisis de imagen se realizó mediante el programa Adobe Photoshop CC v14.0 ©.

3. Resultados

3.1 Caracterización de la línea somática

3.1.1 Estudio comparativo del desarrollo vegetativo

Los mutantes *Atsar1-4* y *Atsar3-3* presentaron un fenotipo pleiotrópico como se puede observar en la Figura 4. Las plantas mostraron un menor grosor del tallo y una reducción en la circunferencia de la roseta, manifestando un porte menos erguido. Además las inflorescencias presentaban un tamaño reducido así como las silicuas eran más cortas, mostrando huecos.



Figura 4. Fotografías de las plantas 54 días tras la siembra. A) Fenotipo WT (Col). B) Fenotipo mutante *Atsar1-4*. C) Fenotipo mutante *Atsar3-3*. Las flechas señalan diferentes partes de la planta: el tallo (rojas), las inflorescencias (blancas) y las silicuas (amarillas)

3.1.2 Estudio de la germinación y la floración

Se evaluó el tiempo de germinación y de floración en los mutantes *Atsar1-4* y *Atsar3-3* y se compararon los resultados con los obtenidos en las plantas control.

➤ Germinación

Se utilizaron dos parámetros para analizar la germinación: i) el porcentaje de semillas germinadas determinado por la aparición de la raíz y ii) el porcentaje de plántulas con cotiledones representado por la presencia de plántulas con dos cotiledones bien definidos (Figura 5).

El mutante *Atsar3-3* mostró diferencias significativas con respecto al WT en los primeros días desde la siembra, recuperando un comportamiento normal a partir del quinto día (Figura 5, Tabla 1). Sin embargo, el mutante *Atsar1-4* presentó un retraso significativo en la germinación frente al WT en el total de días analizados, siendo significativa también la diferencia entre ambos mutantes (Figura 5, Tabla 1).

Por último, el porcentaje final de plantas germinadas se corresponde con el dato del día 10 tras la siembra; siendo un 98,5 % en el caso del WT, un 83,1 % para *Atsar1-4* y un 98,3% para *Atsar3-3*. De esta forma, sólo el mutante *Atsar1-4* presenta una reducción significativa en la germinación de las semillas (Tabla 1).

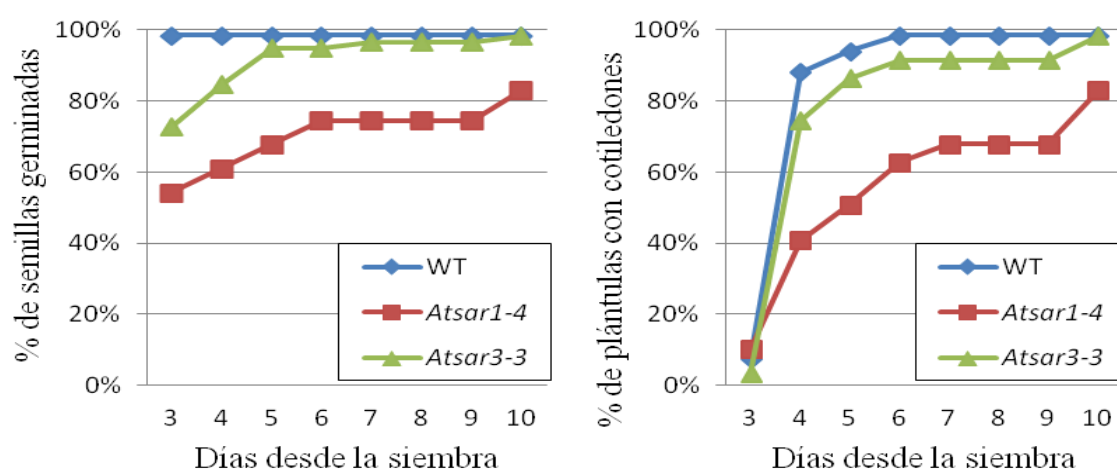


Figura 5. Porcentaje total de semillas germinadas o de plántulas con cotiledones por día desde la siembra para el WT, *Atsar1-4* y *Atsar3-3*. Los primeros días no se muestran al no haberse observado germinación en ningún caso.

Tabla 1. Análisis estadístico sobre la germinación												
D	Análisis estadístico del porcentaje de semillas germinadas						Análisis estadístico del porcentaje de plántulas con cotiledones					
	WT		WT		<i>Atsar1-4</i>		WT		WT		<i>Atsar1-4</i>	
	<i>Atsar1-4</i>	<i>Atsar3-3</i>	<i>Atsar3-3</i>	<i>Atsar3-3</i>	<i>Atsar3-3</i>	<i>Atsar3-3</i>	<i>Atsar1-4</i>	<i>Atsar3-3</i>	<i>Atsar3-3</i>	<i>Atsar3-3</i>	<i>Atsar1-4</i>	<i>Atsar3-3</i>
	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>
3	34,44	***	17,29	***	4,07	*	0,36	-	1,02	-	2,36	-
4	27,33	***	7,80	**	7,76	**	31,74	***	4,04	-	13,80	***
5	21,69	***	1,34	-	13,58	***	30,86	***	2,26	-	17,42	***
6	15,61	***	1,34	-	8,71	**	26,36	***	3,05	-	13,68	***
7	15,61	***	0,44	-	11,10	***	21,69	***	3,05	-	10,16	**
8	15,61	***	0,44	-	11,10	***	21,69	***	3,05	-	10,16	**
9	15,61	***	0,44	-	11,10	***	21,69	***	8,53	-	10,16	**
10	8,53	**	0,00	-	7,65	**	8,53	**	0,00	-	7,65	**

*** *P* < 0,001; ** *P* < 0,01; * *P* < 0,05; - No significativo; D, días tras la siembra.

➤ Floración

Se estudiaron dos parámetros para analizar la floración: i) el tiempo de aparición del primer botón floral y ii) el número medio de hojas que presentaban las plantas en dicho momento (Figura 6)

Los mutantes *Atsar1-4* y *Atsar3-3* tuvieron un comportamiento similar en cuanto al tiempo de floración, sin que existieran diferencias significativas entre ambos. En comparación con el WT, ambos mutantes florecieron significativamente antes (Figura 6, Tabla 2)

En cuanto al número de hojas, ambos mutantes mostraron una media significativamente inferior a la del control (WT = $7,875 \pm 0,032$; *Atsar1-4* = $6,024 \pm 0,019$, $P < 0,001$; *Atsar3-3* = $6,392 \pm 0,018$, $P < 0,001$)

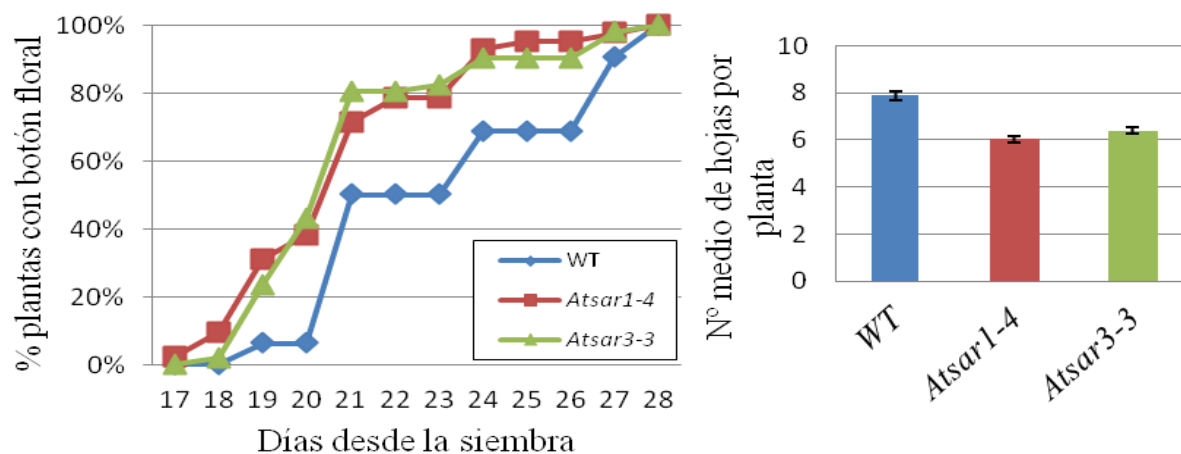


Figura 6. Porcentaje de plantas con botón floral por día desde la siembra y número medio de hojas el día de su aparición para el WT, *Atsar1-4* y *Atsar3-3*. Las barras representan el error estándar.

Tabla 2. Análisis estadístico sobre la floración

D	WT <i>Atsar1-4</i>		WT <i>Atsar3-3</i>		<i>Atsar1-4</i> <i>Atsar3-3</i>		D	WT <i>Atsar1-4</i>		WT <i>Atsar3-3</i>		<i>Atsar1-4</i> <i>Atsar3-3</i>	
	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P		χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
17	0,64	-	-	-	1,02	-	23	6,25	*	9,41	**	0,23	-
18	2,99	-	0,64	-	2,28	-	24	6,88	**	6,24	*	0,11	-
19	6,95	**	4,09	*	0,75	-	25	9,40	**	6,24	*	0,80	-
20	10,01	**	12,99	***	0,24	-	26	9,40	**	6,24	*	0,80	-
21	3,35	-	8,09	**	1,01	-	27	1,55	-	2,58	-	0	-
22	6,25	*	8,09	**	0,05	-	28	-	-	-	-	-	-

*** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05; - No significativo. D, días tras la siembra.

3.2 Caracterización de la línea germinal

Para el análisis de la línea germinal, se analizó la fertilidad evaluando la longitud de las silicuas y contabilizando el número de semillas por silicua. Además se realizó un estudio para medir la fertilidad del lado femenino, evaluando el número de óvulos presentes en el

gametófito femenino. Por otro lado, se realizó un estudio citológico del proceso meiótico para determinar si estos mutantes mostraban algún tipo de alteración que fuera el causante de los defectos en fertilidad observados.

3.2.1 Evaluación de la fertilidad

Los mutantes *Atsar1-4* y *Atsar3-3* desarrollaron silicuas de un tamaño significativamente menor al control (Figura 7A y B, Tabla 3). Y sólo en el caso de *Atsar1-4* se observó una reducción significativa del número de semillas por silicua (Figura 7C, Tabla 3).

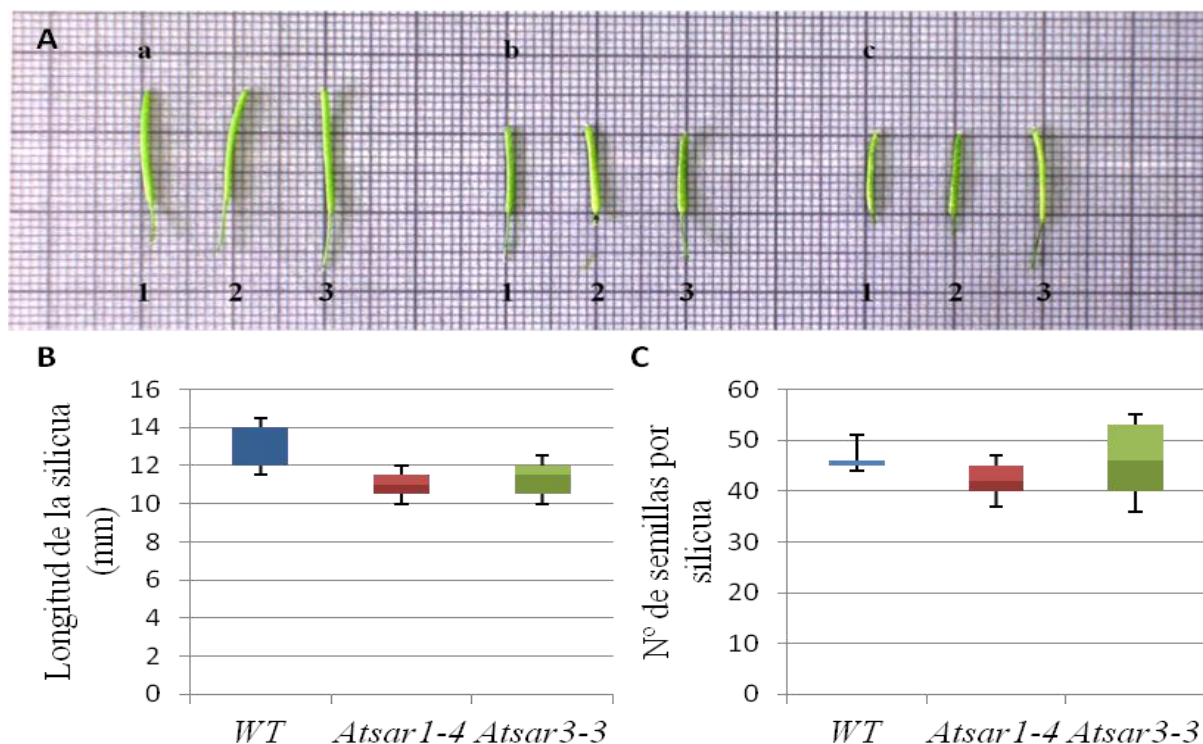


Figura 7. Análisis de fertilidad. A) Silicuas (a. WT, b. *Atsar1-4*, c. *Atsar3-3*). B) Gráfica de Caja y Bigotes comparando la longitud de la silicua (mm). C) Gráfica de Caja y Bigotes comparando el n° de semillas por silicua.

Tabla 3. Análisis estadístico de la fertilidad						
	WT- <i>Atsar1-4</i>		WT- <i>Atsar3-3</i>		<i>Atsar1-4-Atsar3-3</i>	
	<i>U</i>	<i>P</i>	<i>U</i>	<i>P</i>	<i>U</i>	<i>P</i>
Longitud de la silicua	8,00	0,004	15,00	0,024	48,5	0,498
Semillas por silicua	18,00	0,047	46,5	0,624	54,5	0,231

3.2.2 Caracterización de la línea germinal femenina

La estructura de los gineceos y los óvulos resultó ser aparentemente normal en los mutantes *Atsar1-4* y *Atsar3-3* en comparación con el WT (Figura 8). La comparación de medianas no reveló diferencias significativas entre *Atsar1-4* y las plantas WT en cuanto al número de óvulos por gineceo (50 (45-51); 54 (49-57); $U=30,5$; $P=0,052$), aunque el p-valor quedó cerca

del límite de significación. El mutante *Atsar3-3* (46 (43-49)) sí mostró una reducción significativa en comparación con el WT ($U=17$; $P=0,004$). Los dos mutantes analizados no mostraron diferencias desde un punto de vista estadístico entre ellos ($U= 35$; $P=0,098$).

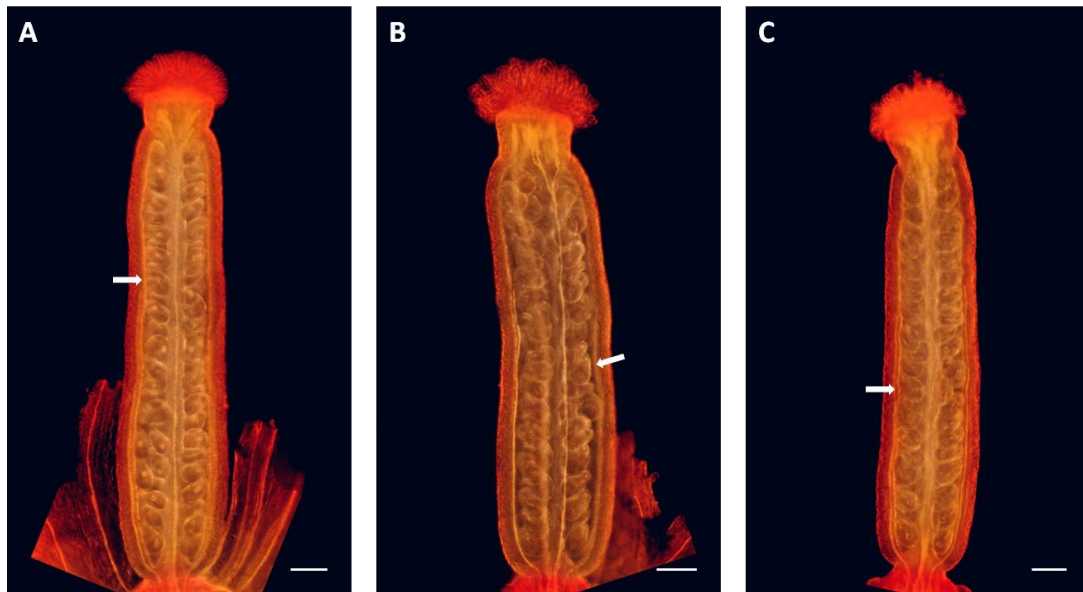


Figura 8. Gineceos maduros con tinción carmín acético. Se aprecian los óvulos dentro de los gineceos (flechas). A) WT. B) *Atsar1-4*. C) *Atsar3.3*. Barra 100 μ m.

3.2.3 Caracterización del proceso meiótico en células madre del polen

En la Figura 9 se muestra el proceso meiótico tanto del control (WT) como de los dos mutantes (*Atsar1-4* y *Atsar3-3*). En los tres genotipos se observó sinapsis completa durante paquitena, formación de cinco bivalentes en metafase I y una correcta segregación de los cromosomas homólogos en anafase I y de cromátidas hermanas en anafase II, resultando correcta la formación de las tétradas.

En el mutante *Atsar3-3* todos los meiocitos presentaron un fenotipo normal, sin aparentes alteraciones durante la meiosis. Sin embargo, en un determinado número de CMP en el mutante *Atsar1-4* se observaron anomalías durante la primera y segunda división. En la Figura 10 se muestran los fenotipos aberrantes que se observaron en este fondo genético. En primera división se visualizaron meiocitos con alteraciones en el nivel de condensación, los cuales se denominaron meiocitos anómalamente condensados o MAC (Figura 10A). Durante la segunda división, algunas CMP presentaron fragmentación (Figura 10C), produciéndose al final tétradas descompensadas y políadas (Figura 10D). Se realizó una cuantificación del porcentaje de meiocitos afectados, siendo un 17,27% en primera división y un 27,59% en segunda división.

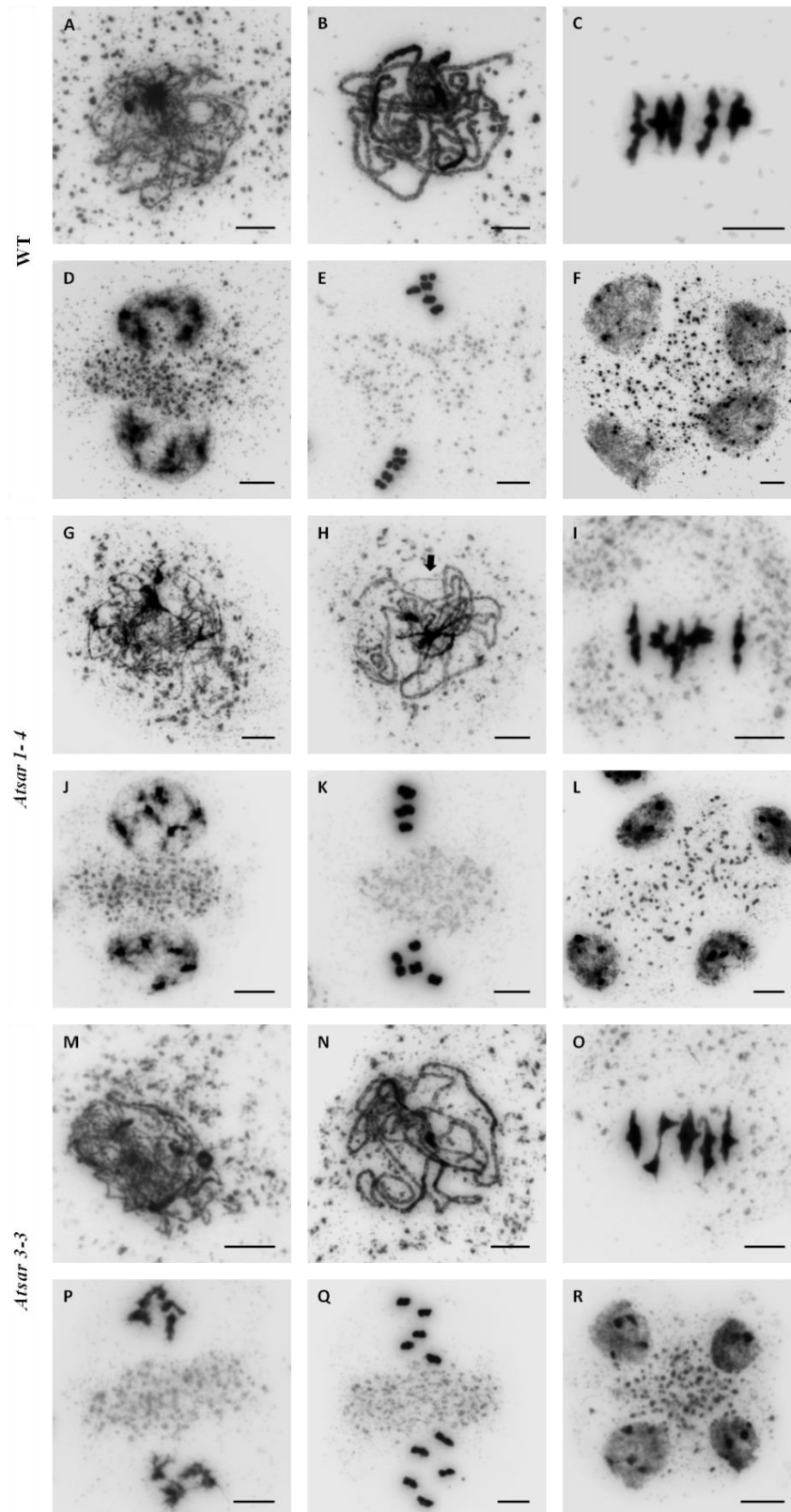


Figura 9. Meiosis en CMP. Control o WT (A-F), del mutante *Atsar1-4* (G-L) y del mutante *Atsar3-3* (M-R). (A, G, M) Zigotenas. Se aprecian puntos de inicio de la sinapsis. (B, H, N) Paquitenas. Se observa un tramo sin sinaptar (H, flecha), las otras dos células presentan sinapsis completa. (C, I, O) Metafases I. Presencia de 5 bivalentes en la placa ecuatorial. (D, J, P) Profases II. Hay una correcta segregación en la primera división. (E, K, Q) Metafases II. Aparecen 5 cromosomas compactados en cada núcleo. (F, L, R) Tétradas. Formación de cuatro productos meióticos compensados. Barras 5 μm .

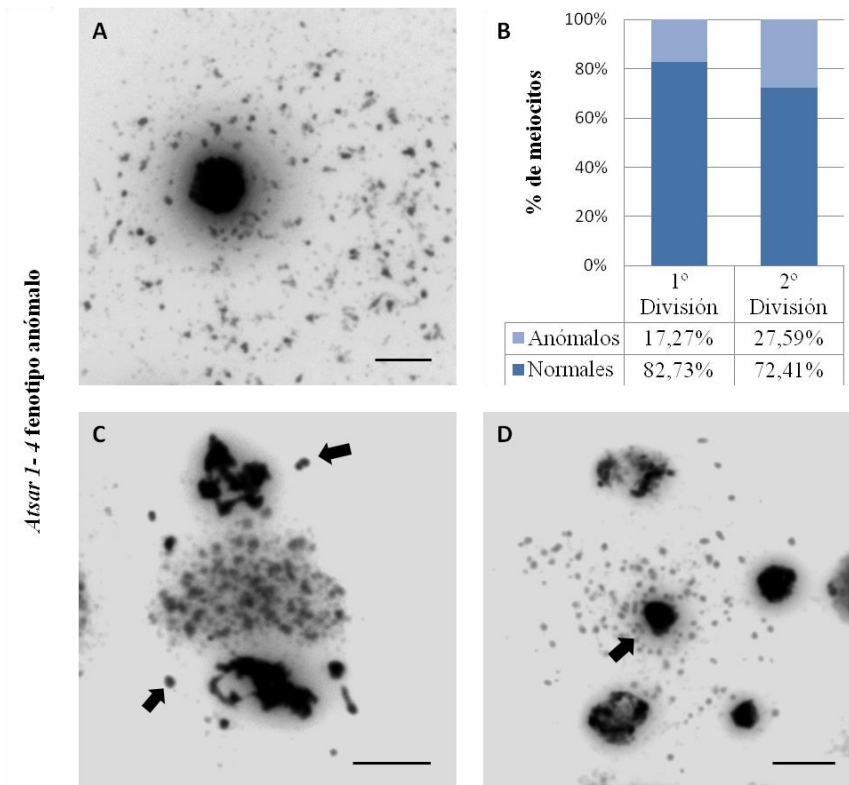


Figura 10. Meiocitos anómalos del mutante *Atsar1-4*. A) Meiocito anómalamente condensado (MAC). C) Metafase II. Fragmentación en los dos núcleos (flechas) y alteraciones en la condensación. D) Tétrada. Políada de 5 núcleos con aparentes defectos en la condensación (flecha). B) Porcentaje de meiocitos anómalos en primera y segunda división meiótica. Barras 5 μ l.

3.2.4 Caracterización citológica de la metafase I en el mutante *Atsar1-4*

Debido a las alteraciones observadas en meiosis en *Atsar1-4*, se decidió hacer un estudio más detallado mediante FISH para intentar determinar la existencia de CMP aberrantes durante metafase I y si las causas de las anomalías detectadas se relacionaban con la formación de quiasmas. La FISH permite identificar los cromosomas de *Arabidopsis thaliana*, como se observa en la Figura 11.

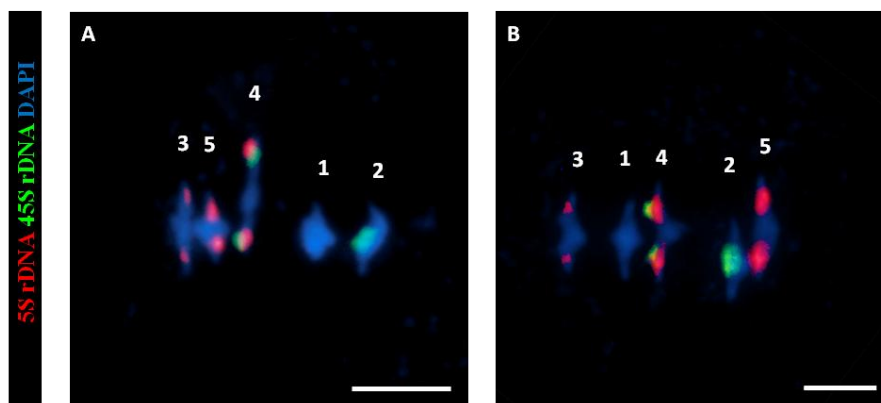


Figura 11. FISH en metafases I del WT y *Atsar1-4*. Loci rDNA 5S (rojo) y rDNA 45S (verde) localizados por FISH y contrateñido con DAPI (azul). A) WT. B) *Atsar1-4*. Se observan cuatro bivalentes cerrados y uno abierto en los dos casos. Barra 5 μ l.

Así en preparaciones de meiocitos en metafase I es posible cuantificar la frecuencia de quiasmas a nivel de célula, cromosoma y brazo cromosómico. Se analizaron preparaciones de CMP procedentes de tres plantas distintas (Tabla 4), para comprobar que no había diferencias significativas en la frecuencia de quiasmas dentro del mismo genotipo.

Tabla 4. Media de quiasmas por célula de las plantas analizadas. Q, media de quiasmas por célula; n, tamaño muestral.; <i>t</i> , valor de la <i>t</i> de Student; <i>P</i> , p-valor del test.						
	Planta					
	1		2		3	
	Q	n	Q	n	Q	n
WT	10,08 ± 0,29	12	10,39 ± 0,18	41	9,81 ± 0,32	16
<i>Atsar1-4</i>	9,8 ± 0,48	15	9,94 ± 0,23	18	10,7 ± 0,26	10
	1 vs 2		1 vs 3		2 vs 3	
	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
WT	-0,84	0,403	0,61	0,548	1,66	0,102
<i>Atsar1-4</i>	-0,27	0,790	-1,65	0,114	-2,03	0,0522

El tamaño muestral total fue n= 69 para el WT y n= 43 para *Atsar1-4*.

Tras evaluar la inexistencia de diferencias significativas, se realizó el estudio a nivel de célula, bivalente y brazo cromosómico en base al conjunto total de datos (Tabla 5). No se observaron diferencias significativas ($t = 0,55$; $P = 0,580$) en la frecuencia de quiasmas por célula entre las plantas *Atsar1-4* ($10,07 \pm 0,21$) y las plantas control ($10,20 \pm 0,14$). Es de destacar que no se observó ninguna metafase I anómala en CMP de *Atsar1-4*.

Tabla 5. Media de quiasmas por célula, bivalente y brazo cromosómico. C, brazo corto; L, brazo largo. Se muestra la media de quiasmas por brazo, por cromosoma y entre paréntesis la contribución de cada cromosoma a la media de quiasmas por célula.										
	Cromosoma									
	1		2		3		4		5	
	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L
WT	0,99	1,54	0,61	1,14	0,90	1,26	0,48	1,01	0,97	1,30
	2,52	(0,25)	1,75	(0,17)	2,16	(0,21)	1,49	(0,15)	2,28	(0,22)
<i>Atsar1-4</i>	0,95	1,30	0,65	1,16	0,95	1,14	0,74	1,09	0,98	1,09
	2,26	(0,22)	1,81	(0,18)	2,09	(0,21)	1,84	(0,18)	2,07	(0,21)

3.2.5 Inmunolocalización de proteínas

Se realizaron experimentos de inmunolocalización de proteínas para tratar de confirmar que las MAC eran realmente CMP. Se realizó una inmunolocalización de las proteínas AtASY1 y AtZYP1 en el mutante *Atsar1-4* (Figura 12). AtASY1 es una proteína asociada al elemento axial del CS e integrante de los ejes cromosómicos y AtZYP1 es una proteína del elemento

central del CS. Los meiocitos con un nivel de compactación similar al WT presentaron una señal normal de las proteínas AtASY1 y AtZYP1, sin observarse alteraciones aparentes en la sinapsis (n= 80). De esta manera, la señal de AtASY1 aparecía de forma continua sobre los ejes cromosómicos (Figura 12A) y el elemento central abarcaba por completo toda la longitud del CS (Figura 12H). En los MAC también se detectó señal de estas dos proteínas aunque en las células analizadas no se encontró ningún meiocito con sinapsis completa (n= 20) (Figura 12; D-F, J-L).

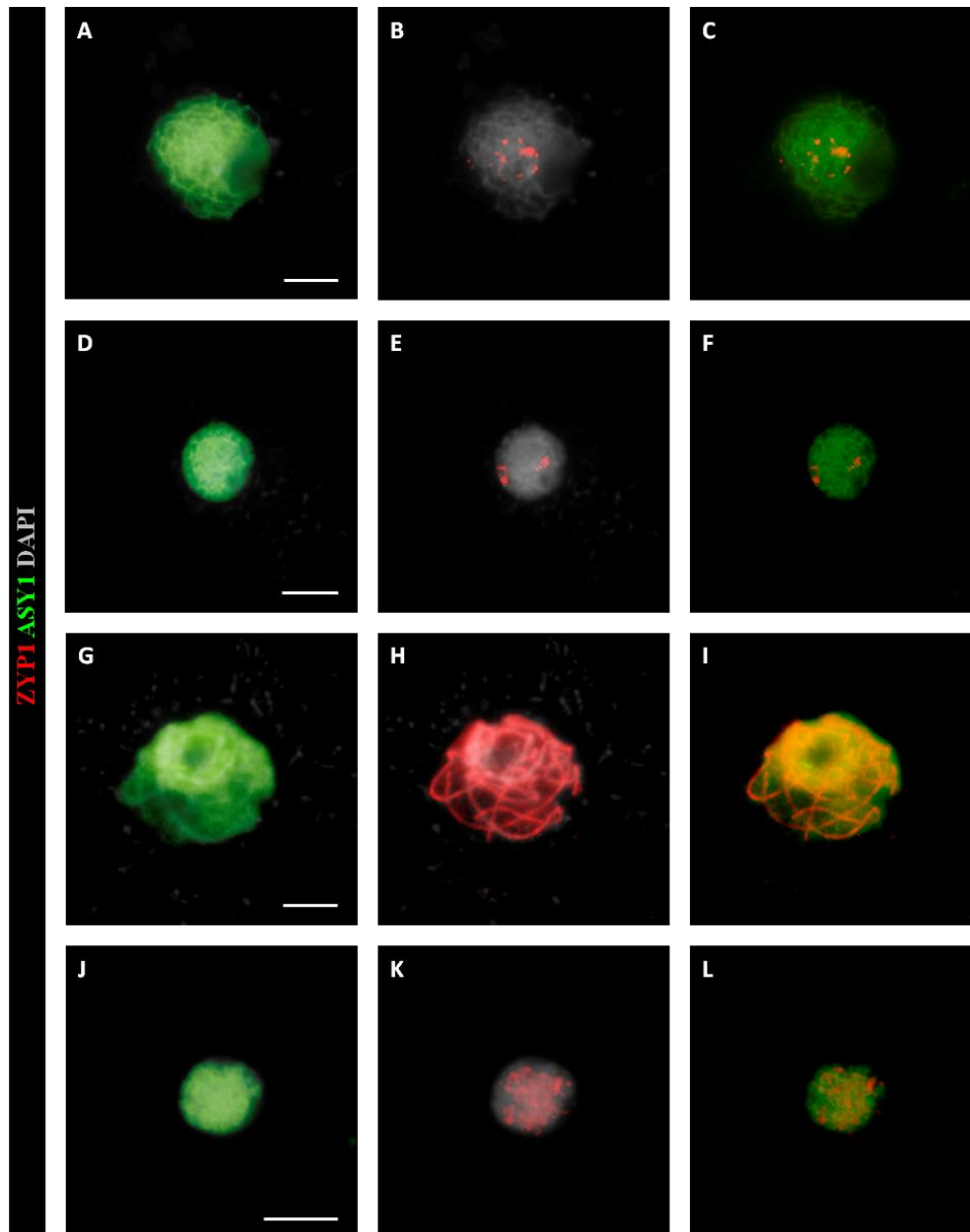


Figura 12. Immunolocalización de las proteínas AtASY1 y AtZYP1 en el mutante *Atsar1-4*. AtASY1 (verde), AtZYP1 (rojo), contrateñido con DAPI (gris). Meiocito con fenotipo normal (A-C; G-I). MAC (D-F; J-L). Barra 5 μ m.

3.3 Obtención de dobles mutantes *Atsar1-4 Atsar3-3*

Con el fin de analizar las posibles interacciones entre los dos genes estudiados, se obtuvo el correspondiente doble mutante *Atsar1-4 Atsar3-3*. Se realizó un genotipado mediante PCR para ambos genes (Figura 13A y B) tanto de la F1 para comprobar su naturaleza de dobles heterocigotos, como en la F2 para identificar las plantas dobles homocigotos para las inserciones de T-DNA.

Las plantas dobles mutantes *Atsar1-4 Atsar3-1* resultantes mostraron un fenotipo más drástico en comparación a los correspondientes mutantes simples *Atsar1-4* y *Atsar3-3* o el WT (Figura 4; Figura 13C y D). Esto consistió en que carecían de roseta basal y tallo principal y en su lugar se desarrollaron numerosos tallos de grosor reducido. Además tanto las inflorescencias como las silicuas mostraron un tamaño inferior (Figura 13C y D).

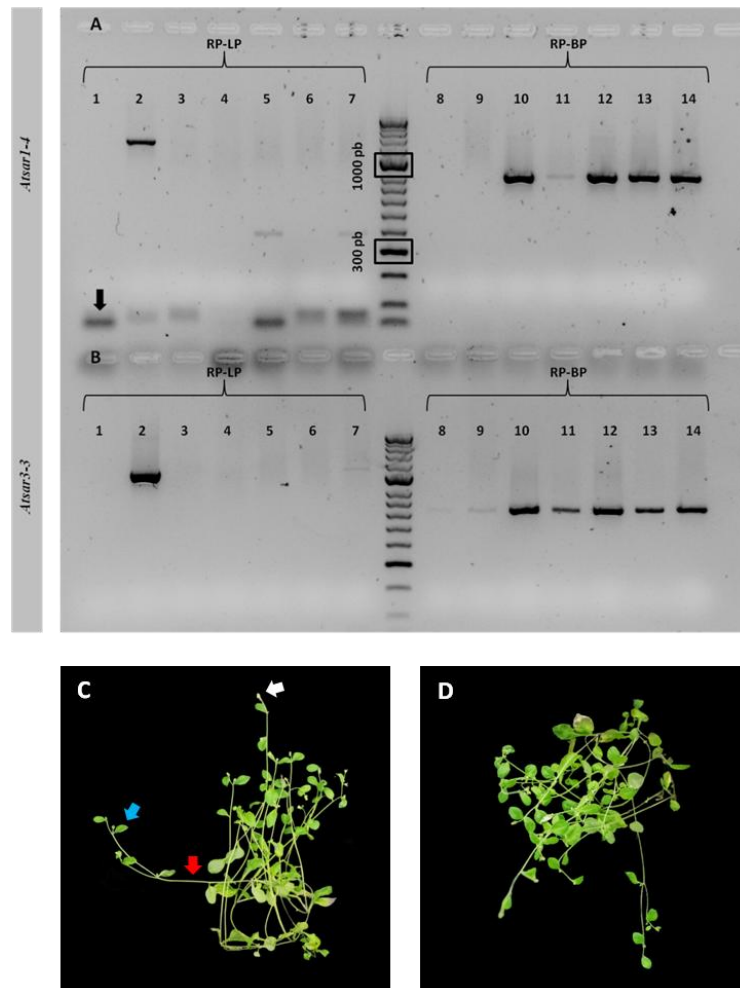


Figura 13. Caracterización doble mutante *Atsar1-4 Atsar3-3*. A-B) PCR de los dobles mutantes. A) Cebadores gen *Atsar1-4*. B) Cebadores gen *Atsar3-3*. 1,8- Blanco. 2,9- Control positivo (Producto de PCR de una planta WT sin inserciones de T-DNA para los genes analizados). 3-7,10-14- Producto de PCR de las plantas pertenecientes a la F2 del cruzamiento. Se aprecian restos de los cebadores en el gel (flecha). C) Vista frontal de la planta 54 días tras la siembra. Las flechas señalan diferentes partes de la planta: tallo (roja), hoja (azul), botón floral (blanca). D) Vista superior de la planta 54 días tras la siembra

4. Discusión

4.1 Las nucleoporinas AtSAR1 y AtSAR3 son necesarias para el desarrollo de la planta

Los resultados del presente trabajo recogen las múltiples anomalías que ocurren durante el desarrollo de la planta como consecuencia de las mutaciones *Atsar1* y *Atsar3*. Ambos mutantes simples presentaron floración temprana, un menor número de hojas en el momento de la aparición del primer botón floral (Figura 6) y una reducción de la longitud de las silicuas (Figura 7). Además las plantas *Atsar1-4* mostraron un retraso y una tasa de germinación disminuida (Figura 5), así como un descenso en el número de semillas por silicua (Figura 7). Adicionalmente, por otra parte, las plantas *Atsar3-3* manifestaron una reducción de la fertilidad por el lado femenino (Figura 8).

La mayoría de estudios apoyan la idea de que el impacto celular que supone la formación de NPC aberrantes, como consecuencia de mutaciones en genes de nucleoporinas, altera el transporte núcleo-citoplasmático. Esto produce una acumulación de mRNA poliadenilado en el interior nuclear que afecta al balance y distribución de distintas proteínas y factores transcripcionales, desregulando la expresión génica de forma global (Dong *et al.*, 2006). Por lo tanto, las nucleoporinas tienen un papel clave para distintos procesos fundamentales de la planta como la respuesta a auxinas, la respuesta a estrés abiótico, la defensa ante patógenos o el mantenimiento del ritmo circadiano (Cernac *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2006; Parry *et al.*, 2006; Chinnusamy *et al.*, 2008; Roth & Wiermer, 2012; Wiermer *et al.*, 2012; MacGregor *et al.*, 2013; Parry, 2014), que ocurren durante el desarrollo de la planta generando potencialmente los defectos descritos en el presente trabajo.

El subcomplejo NUP107-160 que integra a AtSAR1 y AtSAR3 se ha caracterizado con función estructural, siendo el de mayor tamaño (Tamura & Hara-Nishimura, 2013). En otros mutantes para subunidades de gran tamaño como *Atnua* o del mismo subcomplejo NUP107-160, *Atnup107*, el transporte núcleo-citoplasmático se ve gravemente alterado (Gallemí *et al.*, 2016). Este hecho podría acentuar los fenotipos aberrantes, relacionados con el desarrollo de la planta, caracterizados en *Atsar1* y *Atsar3*.

4.2 AtSAR1 y AtSAR3 en la meiosis de *Arabidopsis thaliana*

La meiosis en los mutantes *Atsar3-3* no reveló ningún tipo de anomalía (Figura 9). Sin embargo, *Atsar1-4* presentó defectos en un 22,82% del total de las CMP analizadas. Es destacable el hecho de que tanto *Atsar1-4* como *Atsar3-3* son mutantes hipomorfos que generan proteínas truncadas, lo que supone una pérdida parcial de sus funciones (Parry *et al.*, 2006). Además, se ha descrito la posible existencia de redundancia funcional entre el resto de

nucleoporinas que conforman el subcomplejo NUP107-160, (Figura 1; Dong et al., 2006). Por otro lado, Gallemí y colaboradores han caracterizado recientemente cómo el mutante *Atsar3-3* muestra un fenotipo más leve comparado al fenotipo de los mutantes *Atsar1-4* o *Atsar3-1* (Gallemí et al., 2016). Estas evidencias podrían explicar por qué no observamos anomalías en la meiosis de *Atsar3-3* o por qué las anomalías observadas en *Atsar1-4* sólo ocurren en un porcentaje minoritario de los meiocitos.

La proteína AtASY1, asociada al elemento axial del CS e integrante de los ejes cromosómicos, está implicada en el apareamiento de los cromosomas homólogos (Armstrong et al., 2002) y AtZYP1 es la proteína que constituye el elemento central del CS (Higgins et al., 2005), la combinación de ambas mediante técnicas de inmunolocalización de proteínas es útil como herramienta cronológica del proceso meiótico (Figura 12; Varas et al., 2015b). La presencia de ambas proteínas en los MAC (Figura 12) nos confirma que el porcentaje de CMP afectadas son auténticos meiocitos y que las anomalías en la condensación cromosómica probablemente ocurran durante las primeras etapas de la primera división meiótica, durante el ensamblaje del CS. Además, estos datos indican que las CMP pese a estos defectos graves en condensación cromosómica podrían avanzar en la meiosis, puesto que *Arabidopsis* no posee un control estricto del ciclo celular durante esta división (Wijnker & Schnittger, 2013), pese no haber encontrado CMP en metafase I aberrantes. Además, el fenotipo de condensación anómala podría conducir a defectos importantes durante fases posteriores, lo que podría explicar, al menos parcialmente, la fragmentación observada en segunda división (Figura 10). Sin embargo, no podemos descartar la presencia de otras alteraciones independientes a los problemas de condensación, como podrían ser errores en el proceso de recombinación meiótica o de reparación de las dobles roturas que se producen en meiosis entre cromátidas hermanas (Pradillo et al., 2014; Pradillo & Santos, 2011), que podrían causar la fragmentación cromosómica, aumentando el porcentaje de meiocitos anómalos en la segunda división tal y como hemos observado (Figura 10).

Los defectos en meiosis de *Atsar1-4* no muestran similitud con los observados en el mutante *Ataxr1*, el cual presenta un descenso en la media de quiasmas por célula y univalentes en metafase I (Jahns et al., 2014). Por el contrario, en los meiocitos en metafase I de *Atsar1-4* se observaron cinco bivalentes en todos los casos (n=49) y no se encontraron diferencias significativas en la media de quiasmas por célula respecto al WT (Tabla 5). Estas diferencias ponen de manifiesto que las anomalías detectadas en meiosis en *Atsar1-4* no deben tener el mismo origen que las que aparecen cuando la ruta de rubilación se encuentra inoperativa (Jahns et al., 2014; Mézard et al., 2015).

Se ha propuesto que las nucleoporinas del subcomplejo NUP107-NUP160 podrían interactuar con proteínas del núcleo o del citoplasma relacionadas con la comunicación entre los filamentos del citoesqueleto en el citoplasma y la cromatina en el núcleo mediando en los movimientos de la cromatina (Parry, 2014). En *Arabidopsis* dichos movimientos cromosómicos están mediados por proteínas de tipo SUN-KASH que son esenciales para que los procesos de recombinación meiótica y sinapsis se realicen de forma correcta (Duroc *et al.*, 2014; Varas *et al.*, 2015a). No obstante, el análisis del mutante *Atsar1-4* no ha encontrado ninguna similitud a los fenotipos meióticos descritos en ausencia de las proteínas de tipo SUN-KASH, por lo que no parece razonable que la ausencia de los movimientos sean los causantes de dichos fenotipos en meiosis.

Las alteraciones en condensación y fragmentación en meiosis (Figura 10), podrían ser debidas a las anomalías graves que tienen que ver con transporte núcleo-citoplasmático discutidas anteriormente. De este modo, proteínas necesarias para el progreso de la meiosis no podrían realizar su función al verse alterada su síntesis y distribución como ocurre con otro tipo de proteínas (Parry *et al.*, 2006). Además en *Atsar1-4* se ha caracterizado una sobreexpresión de genes implicados en el transporte nucleo-citoplasmático como las nucleoporinas AtNUP98b, RAE1 y las proteínas nucleares transportadoras RAN1, RAN2 y XPO1, que podría servir de mecanismo para atenuar las anomalías en el transporte (Parry, 2014) lo que concuerda con el hecho de que solo se observó fenotipo meiótico en una parte de las CMP.

En cualquier caso, con los resultados actuales, parece complicado tratar de explicar de forma más precisa las causas que producen las anomalías caracterizadas en la meiosis en *Atsar1-4*. La construcción y el análisis en profundidad de dobles mutantes *Atsar1-4 Atsar3-3* puede ser crucial para definir el papel de este complejo en meiosis. El hecho de que el doble mutante *Atsar1-4 Atsar3-3* muestre un fenotipo más severo que los mutantes simples (Figura 12) puede implicar bien que existe redundancia funcional entre los productos génicos de estos dos genes como se ha propuesto para otras nucleoporinas (Dong *et al.*, 2006) o bien que AtSAR1 y AtSAR3 participan en procesos diferentes.

Por tanto, los resultados del presente trabajo parecen mostrar la existencia de una relación entre las nucleoporinas y la meiosis en *Arabidopsis thaliana*, siendo esencial la nucleoporina AtSAR1 para su correcto funcionamiento. Además tanto AtSAR1 como AtSAR3 son necesarias en el desarrollo general de la planta.

5. Conclusiones

- Las nucleoporinas AtSAR1 y AtSAR3 son necesarias para el correcto desarrollo de procesos esenciales en *Arabidopsis* como la germinación y la floración
- El mutante *Atsar3-3* no muestra alteraciones en la meiosis que probablemente sean debidas a las características del alelo estudiado
- La nucleoporina AtSAR1 es indispensable para que el proceso meiótico se desarrolle con normalidad
- Podría existir un mecanismo de redundancia funcional en las nucleoporinas para atenuar las anomalías en el NPC

6. Bibliografía

Armstrong, S.J., Caryl, A.P., Jones, G.H., & Franklin, F.C.H. 2002. Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*. *Journal of cell science*, 115: 3645–3655.

Campell, B.R., Song, Y., Posch, T.E., Cullis, C.A., & Town, C.D. 1992. Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 112: 225–228.

Cernac, A., Lincoln, C., Lammer, D., & Estelle, M. 1997. The *SAR1* gene of *Arabidopsis* acts downstream of the *AXR1* gene in auxin response. *Development*, 124: 1583–1591.

Chinnusamy, V., Gong, Z., & Zhu, J.K. 2008. Nuclear RNA export and its importance in abiotic stress responses of plants. *Curr Top Microbiol Immunol*, 326: 235–255.

Crismani, W., Girard, C., & Mercier, R. 2013. Tinkering with meiosis. *Journal of Experimental Botany*, 64: 55–65.

Dong, C.-H., Hu, X., Tang, W., Zheng, X., Kim, Y.S., Lee, B., & Zhu, J.-K. 2006. A putative *Arabidopsis* nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress. *Molecular and cellular biology*, 26: 9533–9543.

Duroc, Y., Lemhemdi, A., Larchevêque, C., Hurel, A., Cuacos, M., Cromer, L., Horlow, C., Armstrong, S.J., Chelysheva, L., & Mercier, R. 2014. The Kinesin AtPSS1 Promotes Synapsis and is Required for Proper Crossover Distribution in Meiosis. *PLoS Genetics*, 10: 1–11.

- Ferrández-Ayela, A., Alonso-Peral, M.M., Sánchez-García, A.B., Micol-Ponce, R., Pérez-Pérez, J.M., Micol, J.L., & Ponce, M.R. 2013. *Arabidopsis TRANSCURVATA1* Encodes NUP58, a Component of the Nucleopore Central Channel. *PLoS ONE*, 8: 1-12.
- Ford-Lloyd, B. V., Schmidt, M., Armstrong, S. J., Barazani, O., Engels, J., Hadas, R., Hammer, K., Kell, S. P., Kang, D., Khoshbakht, K., Li, Y., Long, C., Lu, B., Ma, K., Nguyen, V. T., Qiu, L., Ge, S., Wei, W., Zhang, Z. & Maxted, N.. 2011. Crop Wild Relatives—Undervalued, Underutilized and under Threat? *BioScience*, 61: 559–565.
- Gallemí, M., Galstyan, A., Paulišić, S., Then, C., Ferrández-Ayela, A., Lorenzo-Orts, L., Roig-Villanova, I., Wang, X., Micol, J.L., Ponce, M.R., Devlin, P.F., & Martínez-García, J.F. 2016. DRACULA2 is a dynamic nucleoporin with a role in regulating the shade avoidance syndrome in *Arabidopsis*. *Development*, 143: 1623–1631.
- Gazzarrini, S. & McCourt, P. 2003. Cross-talk in plant hormone signalling: What *Arabidopsis* mutants are telling us. *Annals of Botany*, 91: 605–612.
- Gerlach, W.L. & Bedbrook, J.R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic acids research*, 7: 1869–1885.
- Higgins, J.D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J., Jones, G.H., & Franklin, F.C.H. 2005. The *Arabidopsis* synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes and Development*, 19: 2488–2500.
- Hotton, S.K. & Callis, J. 2008. Regulation of cullin RING ligases. *Annual review of plant biology*, 59: 467–89.
- Jahns, M.T., Vezon, D., Chambon, A., Pereira, L., Falque, M., Martin, O.C., Chelysheva, L., & Grelon, M. 2014. Crossover localisation is regulated by the neddylation posttranslational regulatory pathway. *PLoS biology*, 12: 1-17.
- Leyser, H.M., Lincoln, C.A., Timppte, C., Lammer, D., Turner, J., & Estelle, M. 1993. *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, 364: 161–4.
- Lincoln, C., Britton, J.H., & Estelle, M. 1990. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 2: 1071–80.
- López, E., Pradillo, M., Oliver, C., Romero, C., Cuñado, N., & Santos, J.L. 2012. Looking for natural variation in chiasma frequency in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 63: 887–94.

- Ma, H. 2006. A Molecular Portrait of *Arabidopsis* Meiosis. *The Arabidopsis Book*, 53: 1-39.
- MacGregor, D.R., Gould, P., Foreman, J., Griffiths, J., Bird, S., Page, R., Stewart, K., Steel, G., Young, J., Paszkiewicz, K., Millar, A. J., Halliday, K. J., Hall, A. J. & Penfield, S. 2013. *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES1* is required for circadian periodicity through the promotion of nucleo-cytoplasmic mRNA export in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 25: 4391–404.
- Mergner, J. & Schwechheimer, C. 2014. The NEDD8 modification pathway in plants. *Frontiers in plant science*, 5: 1-15.
- Mézard, C., Tagliaro Jahns, M., & Grelon, M. 2015. Where to cross? New insights into the location of meiotic crossovers. *Trends in Genetics*: 1–9.
- Parry, G. 2014. Components of the *Arabidopsis* nuclear pore complex play multiple diverse roles in control of plant growth. *Journal of Experimental Botany*, 65: 6057–6067.
- Parry, G., Ward, S., Cernac, A., Dharmasiri, S., & Estelle, M. 2006. The *Arabidopsis* SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE proteins are nucleoporins with an important role in hormone signaling and development. *The Plant cell*, 18: 1590–1603.
- Pradillo, M. & Santos, J.L. 2011. The template choice decision in meiosis: is the sister important? *Chromosoma*, 120: 447–54.
- Pradillo, M., Varas, J., Oliver, C., & Santos, J.L. 2014. On the role of *AtDMC1*, *AtRAD51* and its paralogs during *Arabidopsis* meiosis. *Frontiers in plant science*, 5: 1-13.
- Roth, C. & Wiermer, M. 2012. Nucleoporins Nup160 and Seh1 are required for disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, 7: 1212–1214.
- Sanchez Moran, E., Armstrong, S.J., Santos, J.L., Franklin, F.C., & Jones, G.H. 2001. Chiasma formation in *Arabidopsis thaliana* accession Wassileskija and in two meiotic mutants. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 9: 121–128.
- Tamura, K., Fukao, Y., Iwamoto, M., Haraguchi, T., & Hara-Nishimura, I. 2010. Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 22: 4084–4097.
- Tamura, K. & Hara-Nishimura, I. 2013. The molecular architecture of the plant nuclear pore complex. *Journal of Experimental Botany*, 64: 823–832.

- The Arabidopsis Genome Initiative 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796–815.
- Timpte, C., Lincoln, C., Pickett, F.B., Turner, J., & Estelle, M. 1995. The *AXR1* and *AUX1* genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 8: 561–569.
- Varas, J., Graumann, K., Osman, K., Pradillo, M., Evans, D.E., Santos, J.L., & Armstrong, S.J. 2015a. Absence of SUN1 and SUN2 proteins in *Arabidopsis thaliana* leads to a delay in meiotic progression and defects in synapsis and recombination. *Plant Journal*, 81: 329–346.
- Varas, J., Sánchez-Morán, E., Copenhaver, G.P., Santos, J.L., & Pradillo, M. 2015b. Analysis of the Relationships between DNA Double-Strand Breaks, Synaptonemal Complex and Crossovers Using the *Atfas1-4* Mutant. *PLoS genetics*, 11: 1-29.
- Wiermer, M., Cheng, Y.T., Imkampe, J., Li, M., Wang, D., Lipka, V., & Li, X. 2012. Putative members of the *Arabidopsis* Nup107-160 nuclear pore sub-complex contribute to pathogen defense. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 70: 796–808.
- Wijnker, E., Deurhof, L., van de Belt, J., de Snoo, C.B., Blankestijn, H., Becker, F., Ravi, M., Chan, S.W., van Dun, K., Lelivelt, C.L., de Jong, H., Dirks, R. & Keurentjes, J.J. 2014. Hybrid recreation by reverse breeding in *Arabidopsis thaliana*. *Nature protocols*, 9: 761–72.
- Wijnker, E. & Schnittger, A. 2013. Control of the meiotic cell division program in plants. *Plant Reproduction*, 26: 143–158.
- Zamariola, L., Tiang, C.L., De Storme, N., Pawlowski, W., & Geelen, D. 2014. Chromosome segregation in plant meiosis. *Frontiers in plant science* 5: 1-19.
- Zhang, Y. & Li, X. 2005. A putative nucleoporin 96 Is required for both basal defense and constitutive resistance responses mediated by *suppressor of npr1-1, constitutive 1*. *The Plant cell*, 17: 1306–1316.