



Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Sevilla – CSIC

ESTUDIO DE NTRC EN SEMILLAS DE CEREALES

Trabajo realizado para optar al grado de Doctora

por la Universidad de Sevilla

Mª Victoria Armario Nájera

Directores de la Tesis

Dr. Fco Javier Cejudo Fernández

**Catedrático en Bioquímica y
Biología Molecular**

Dra. Maricruz González García

Profesora Titular

Sevilla 2017

A mis padres

AGRACECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una beca pre-doctoral adjunta al proyecto de excelencia P10-CVI-5919, concedida por la Junta de Andalucía durante el periodo comprendido entre Febrero del 2012 y Enero del 2016.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director de tesis, el Dr. Francisco Javier Cejudo, la posibilidad que me ha dado de formar parte de su grupo de investigación, así como la confianza depositada en mí al brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta nueva línea de trabajo. Reconociendo su implicación, su disponibilidad, paciencia, así como por la libertad con la que me ha permitido trabajar estos años. Gracias también a mi co-directora de tesis, la Dra MariCruz González, por su atención, sus consejos, por transmitirme los conocimientos necesarios para encaminarme en este mundo de la biología molecular, así como por su apoyo cuando nada parecía fácil. Gracias a ambos han hecho posible la realización de esta tesis.

También quisiera agradecer su colaboración a todos aquellos que han participado directamente en la obtención de los resultados presentados en este trabajo. A los miembros del grupo de Dra Pilar Carbonero, de la Universidad Politécnica de Madrid, por proporcionarnos los protocolos necesarios para iniciar las transformaciones de *Brachypodium*. A V. Thole y P. Vain del *John Innes Center*, Norwich, por cedernos los vectores pBrachyTAG-G217 y pBrachyTAG-G210 con el que finalmente se desarrolló este trabajo. Por supuesto, agradecer su colaboración al personal técnico del IBVF: a Pablo por hacer siempre un hueco para cuidar mis *Brachypodium* y Rocío Rodríguez por su colaboración en los análisis de proteínas.

Agradecer enormemente a mis compañeros de laboratorio haber hecho tan confortables estos años. A Anna por su ayuda cada vez que he tenido dudas a la hora de realizar algún protocolo de proteínas y por preocuparse siempre por cómo iban las cosas. A Juan por prestarme su ayuda cada vez que he necesitado algo. A Leo, Julia y Bea por su ayuda a manejarme en el laboratorio durante los primeros años. A mis dos pollitos, la ya doctora Belén y mi futura doctora Valle, para vosotras... no tengo

palabras suficientes que puedan agradecer lo que habéis hecho durante estos años. Han sido tantas horas juntas y tantos momentos, dentro y fuera del laboratorio, que a veces creo que hasta os voy a echar un poco de menos, sobre todo, vuestra mala costumbre de llevarme la contraria. Y finalmente a Víctor, por su constante predisposición a echarme una mano, por animarme tanto durante este último año y contagiarme su positividad cada vez que me veía agobiaba. No cambies nunca ese *buen rollo* que transmites y por favor, no dejes que te conviertan en el tercer pollito.

A mis amigos, Miri, Camas, Mon, Manu y Anita, por estar ahí incondicionalmente, haberme cuidado y ayudado tanto durante estos últimos años, sin vosotros nada habría sido igual. A Sonia, responsable de que acabase haciendo la tesis: gracias por haberme obligado. Después de tantos años no hay nada que te pueda decir que no sepas. A Luismi y Patri, por ser, para lo bueno y lo malo, esos dos hermanos mayores que nunca he tenido, gracias por mimarme tanto. A todos vosotros, gracias por haberos convertido en mi familia Sevillana. Por otra parte, me gustaría agradecer a Alberto, mi *alter ego* masculino, no sólo su ayuda en el diseño de la portada de este trabajo, sino su más sincera y absoluta amistad desde que éramos dos adolescentes. Gracias por tu apoyo, tu cariño y tu confianza que tanto me anima. Ya sabes que aunque estemos lejos para mí siempre estás presente.

Me gustaría también agradecer a mis padres todo el amor y dedicación absoluta e infinita que siempre me han dado. Gracias por la educación que me habéis proporcionado, por vuestro apoyo en cada una de mis elecciones, por enseñarme que el trabajo y esfuerzo siempre ofrecen recompensa. Espero que estéis orgullosos porque todo esto ha sido posible gracias a vosotros. Gracias también a ti, Sofi, por tu apoyo y por animarme siempre a continuar, por tu infinita paciencia y comprensión ante un trabajo que no entiende ni de días ni de horas. Y sobre todo, gracias por tu cariño, tu confianza y por cuidarme tanto día a día, haciendo que todo sea más sencillo. Gracias también a todos mis "*Nájera's family*" por ser como sois y hacerme sentir siempre tan cerca a pesar de estar tan lejos.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ÍNDICE | 7 |
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS | 11 |
| ABREVIATURAS | 17 |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 21 |
| I.1. LA SEMILLA DE CEREALES | 23 |
| I.1.1. Estructura y composición de la semilla de cereales..... | 24 |
| I.1.2. Desarrollo y germinación de la semilla de cereales | 29 |
| I.1.2.1. Desarrollo | 29 |
| I.1.2.1. Germinación | 31 |
| I.1.3. Generación y función de las especies reactivas de oxígeno en semillas | 33 |
| I.1.4. Regulación redox en plantas..... | 38 |
| I.1.4.1. Tiorredoxinas..... | 39 |
| I.1.4.2. NADPH-tiorredoxina reductasa C | 44 |
| I.1.5. Metabolismo del almidón en el endospermo de cereales | 46 |
| I.1.5.1. Síntesis de almidón | 47 |
| I.1.5.2. Estructura y regulación de la AGPasa | 51 |
| I.1.5.3. Degradación del almidón | 53 |
| I.2. <i>BRACHYPODIUM DISTACHYON</i> COMO ORGANISMO MODELO EN EL ESTUDIO DE CEREALES | 54 |
| I.2.1. Estructura de la semilla de <i>Brachypodium</i> | 56 |
| I.3. OBJETIVOS | 59 |
| | |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS | 61 |
| II.1. MATERIAL VEGETAL..... | 63 |
| II.1.1. Esterilización de semillas | 63 |

| | |
|---|----|
| II.1.2. Germinación de semillas y condiciones de cultivo..... | 64 |
| II.2. BACTERIAS | 65 |
| II.2.1. Bacterias empleadas..... | 65 |
| I.2.2. Cultivos de bacterias en medio líquido y sólido | 66 |
| II.2.3. Obtención de bacterias competentes | 66 |
| II.2.4. Transformación de células | 67 |
| II.3. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 67 |
| II.3.1. Aislamiento de DNA plasmídico | 67 |
| II.3.2. Extracción de DNA genómico de tejidos vegetales..... | 68 |
| II.3.3. Extracción de RNA de tejidos vegetales y retrotranscripción | 68 |
| II.3.3.1. Tratamiento del RNA con DNasa y electroforesis de RNA..... | 69 |
| II.3.3.2. Retrotranscripción | 70 |
| II.3.4. Cuantificación de ácidos nucleicos..... | 70 |
| II.4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS..... | 70 |
| II.4.1. Técnica de PCR | 70 |
| II.4.1.1. Oligonucleótidos empleados para PCR convencional | 72 |
| II.4.1.2. PCR cuantitativa a tiempo real | 74 |
| II.4.2.1. Oligonucleótidos para PCR cuantitativas..... | 74 |
| II.4.3. Visualización de DNA en geles de agarosa | 75 |
| II.4.4. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa..... | 75 |
| II.4.5. Digestión con enzimas de restricción | 76 |
| II.4.6. Ligaciones..... | 76 |
| II.4.7. Escrutinio de colonias mediante PCR | 77 |
| II.4.8. Secuenciación automática de DNA | 77 |
| II.5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS..... | 78 |
| II.5.1. Obtención de extractos totales de proteínas | 78 |
| II.5.2. Fraccionamiento de proteínas de endospermo de semillas de <i>Brachypodium</i> | 78 |

| | |
|---|-----|
| II.5.3. Cuantificación de proteínas | 79 |
| II.5.4. Electroforesis de proteínas: SDS-PAGE..... | 79 |
| II.5.5. Electroforesis bidimensional..... | 80 |
| II.5.6. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida..... | 80 |
| II.5.7. Espectrometría de masas e identificación de proteínas | 81 |
| II.5.8. Análisis de proteínas mediante <i>Western-blot</i> | 81 |
| II.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ALMIDÓN Y β -GLUCANOS..... | 82 |
| II.7. TRANSFORMACIÓN DE <i>BRACHYPODIUM DISTACHYON</i> MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> | 84 |
| II.8. HERRAMIENTAS BIOINFÓRMATICAS..... | 86 |
| III. RESULTADOS | 89 |
| III.1. CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA GÉNICA DE NTRC | 91 |
| III.1.1. Estructura del gen <i>NtrC</i> | 91 |
| III.1.2. Estudio filogenético de NTRC..... | 93 |
| III.2. NTRC EN SEMILLAS DE CEREALES..... | 97 |
| III.2.1. Clonación del cDNA de <i>NtrC</i> de <i>Brachypodium distachyon</i> | 98 |
| III.2.2. Estudio de procesos de <i>splicing</i> alternativo del gen <i>NtrC</i> | 100 |
| III.2.3. Caracterización del mensajero alternativo..... | 102 |
| III.2.3.1. Mecanismo de formación del mensajero alternativo | 102 |
| III.2.3.2. Conservación del proceso de <i>splicing</i> alternativo en genes <i>NtrC</i> de plantas y expresión diferencial en tejidos fotosintéticos y heterotróficos..... | 103 |
| III.2.3.3. Efecto de factores ambientales sobre el <i>splicing</i> alternativo del gen <i>NtrC</i> | 107 |
| III.2.3.4. El producto del mensajero alternativo del gen <i>NtrC</i> codificaría para una proteína truncada | 109 |
| III.3. GENERACIÓN DE PLANTAS DE <i>BRACHYPODIUM</i> CON NIVELES ALTERADOS DE NTRC EN SEMILLAS..... | 112 |
| III.3.1. Construcción del transgén | 113 |

| | |
|---|-----|
| III.3.2. Generación de plantas de <i>Brachypodium</i> con niveles alterados de NTRC en endospermo de semillas | 115 |
| III.3.3. Caracterización de semillas procedentes de plantas transgénicas T ₀ | 123 |
| III.3.3.1. Análisis del fenotipo de semillas procedentes de plantas transgénicas T ₀ | 124 |
| III.3.3.2. Análisis de los niveles de NTRC en las líneas transgénicas seleccionadas | 126 |
| III.3.4. Caracterización de semillas procedentes de plantas T ₁ | 128 |
| III.3.4.1. Caracterización fenotípica de semillas transgénicas T ₂ | 129 |
| III.3.4.2. Análisis de la expresión del gen <i>NtrC</i> en las semillas T ₂ | 131 |
| III.3.4.3. Análisis de los niveles de proteína NTRC en el endospermo de semillas de las líneas seleccionadas | 132 |
| III.3.4.4. Determinación de los niveles de almidón y β -glucanos en las semillas T ₂ | 133 |
| III.3.4.5. Análisis de los niveles de proteínas de reserva en el endospermo de las semillas T ₂ | 134 |
| IV. DISCUSIÓN | 139 |
| IV.1. ORIGEN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN <i>NtrC</i> | 142 |
| IV.2. EL GEN <i>NtrC</i> SE ENCUENTRA SOMETIDO A UN PROCESO DE <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO | 145 |
| IV.3. GENERACIÓN DE PLANTAS DE <i>BRACHYPODIUM</i> CON NIVELES ALTERADOS DE NTRC EN EL ENDOSPERMO DE SEMILLAS | 154 |
| V. CONCLUSIONES | 169 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 173 |
| ANEXO I | 195 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---|----|
| Figura I. 1. Composición histológica del grano de trigo..... | 25 |
| Figura I. 2. Anatomía del embrión de una semilla de maíz..... | 26 |
| Figura I. 3. Gránulos de almidón (GA) y cuerpos proteicos (CP) en el endospermo de reserva en una semilla de arroz (izquierda) y trigo (derecha)..... | 27 |
| Figura I. 4. Micrografías de las capas externas de un grano de trigo sin diseccionar (izquierda) y diseccionadas (derecha)..... | 28 |
| Figura I. 5. Representación de la composición del saco embrionario femenino (A) y esquematización de las fases del desarrollo del endospermo (B) de cereales..... | 31 |
| Figura I. 6. Representación de los procesos asociados a la germinación de las semillas de cereales..... | 33 |
| Figura I. 7. Representación esquemática de la producción de ROS en plantas..... | 34 |
| Figura I. 8. Funciones de las ROS en semillas de cereales..... | 37 |
| Figura I. 9. Estructura terciaria de la Trx <i>h1</i> de cebada (A). Mecanismo de reacción de las Trxs (B)..... | 40 |
| Figura I. 10. Sistemas de reducción de Trxs..... | 41 |
| Figura I. 11. Modelo del mecanismo de reacción propuesto para NTRC..... | 45 |
| Figura I. 12. Rutas de síntesis de almidón en células fotosintéticas (A) y heterotróficas (B)..... | 50 |
| Figura I. 13. Mecanismos de regulación de la AGPasa plastidial..... | 52 |
| Figura I. 14. Esquema de la relación filogenética de <i>Brachypodium</i> con otras especies de cereales..... | 55 |
| Figura I. 15. Comparación de semillas maduras de distintos cereales..... | 57 |
| Figura III. 1. Comparación de la estructura del gen <i>NtrC</i> de varios organismos..... | 93 |
| Figura III. 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de NTRC de diferentes organismos..... | 95 |
| Figura III. 3. Matriz de identidad en tanto por ciento de NTRCs de distintos organismos..... | 95 |
| Figura III. 4. Árbol filogenético de NTRCs de diversos organismos..... | 96 |

| | |
|---|-----|
| Figura III. 5. Fragmento del alineamiento de las secuencias de los cDNAs de NTRC de hoja (<i>BdNTRC_hoja</i>) y semilla (<i>BdNTRC_semilla</i>) con la secuencia proveniente de la base de datos (<i>BdNTRC_db</i>)..... | 98 |
| Figura III. 6. Comparación de secuencias de la región del gen <i>NtrC</i> entre el final de intrón 4 y principio exón V con el cDNA clonado de semillas (<i>BdNTRC_semilla</i>) | 99 |
| Figura III. 7. A, Esquema de la estructura del gen <i>NtrC</i> de <i>Brachypodium</i> y posición de los oligonucleótidos utilizados. B, Fragmentos obtenidos mediante PCR con clones de cDNA de <i>NtrC</i> | 100 |
| Figura III. 8. A, Esquema del gen <i>NtrC</i> de <i>Brachypodium</i> y diseño de los oligonucleótidos para el estudio de <i>splicing</i> alternativo. B, Identificación de eventos de <i>splicing</i> alternativo del gen <i>NtrC</i> | 101 |
| Figura III. 9. Esquema de <i>splicing</i> alternativo y formación de dos tipos de mensajeros de <i>NtrC</i> | 102 |
| Figura III. 10. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos correspondientes al final del intrón 4 y principio del exón V del gen <i>NtrC</i> de plantas | 103 |
| Figura III. 11. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos correspondientes al final del intrón 4 y principio del exón V del gen <i>NtrC</i> en organismos eucarióticos fotosintéticos | 104 |
| Figura III. 12. Identificación de procesos de <i>splicing</i> alternativo del gen <i>NtrC</i> en <i>Arabidopsis</i> y tomate | 105 |
| Figura III. 13. Análisis de los productos de <i>splicing</i> alternativo del gen <i>NtrC</i> en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de <i>Brachypodium</i> | 106 |
| Figura III. 14. Efecto del estrés por frío en el proceso de <i>splicing</i> alternativo del gen <i>NtrC</i> de <i>Brachypodium</i> en cotiledones (A) y raíces (B) | 108 |
| Figura III. 15. Efecto del estrés por salinidad en el proceso de <i>splicing</i> alternativo del gen <i>NtrC</i> de <i>Brachypodium</i> en cotiledones (A) y raíces (B)..... | 109 |
| Figura III. 16. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de NTRC y NTRC alternativa (Alt_NTRC) de <i>Brachypodium</i> | 110 |
| Figura III. 17. Identificación de la posible forma truncada de NTRC mediante <i>Western-blot</i> de semillas (A) y cotiledones (B) de <i>Brachypodium</i> con el anticuerpo anti-NTRB..... | 111 |

| | |
|--|-----|
| Figura III. 18. Identificación de la posible forma truncada de NTRC mediante electroforesis bidimensional de extractos proteicos de semillas maduras | 112 |
| Figura III. 19. Representación esquemática de la construcción pGLU1::NtrC::NosTer introducida en el vector pBrachyTAG-G210..... | 115 |
| Figura III. 20. Producción de embriones inmaduros..... | 116 |
| Figura III. 21. Producción de callos embriogénicos compactos (CECs) en medio CIM... .. | 117 |
| Figura III. 22. Transformación de CECs y selección de callos transformados en medio CIM | 118 |
| Figura III. 23. Regeneración de plántulas..... | 119 |
| Figura III. 24. Análisis de la presencia del transgén en las plantas seleccionadas como posibles transformantes..... | 120 |
| Figura III. 25. Fenotipo de las plantas T ₀ | 124 |
| Figura III. 26. Fenotipo de las semillas maduras procedentes de las distintas líneas transgénicas obtenidas..... | 125 |
| Figura III. 27. Análisis del peso medio de semillas maduras procedentes de las distintas líneas transgénicas y de plantas no transformadas (NT) | 125 |
| Figura III. 28. Análisis de <i>Western-blot</i> de los niveles de NTRC en hojas (H) y espigas (E) de las plantas transgénicas seleccionadas | 126 |
| Figura III. 29. Análisis de <i>Western-blot</i> de los niveles de NTRC en las semillas de las líneas transgénicas seleccionadas..... | 127 |
| Figura III. 30. Fenotipo de plántulas T ₁ generadas a partir de los parentales BdNTRC#29, BdNTRC#28 y BdNTRC#1 en comparación con las plantas no transformadas (NT) | 129 |
| Figura III. 31. Fenotipo de las semillas maduras T ₂ procedentes de las distintas líneas transgénicas cultivadas..... | 130 |
| Figura III. 32. Análisis del peso medio de semillas maduras de la generación T ₂ | 130 |
| Figura III. 33. Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión del gen <i>NtrC</i> en semillas maduras de las distintas líneas transgénicas y de plantas NT | 131 |
| Figura III. 34. Análisis de los niveles de mensajero estándar y alternativo en semillas maduras de las distintas líneas transgénicas y de plantas NT..... | 132 |

| | |
|--|-----|
| Figura III. 35. Análisis del contenido de NTRC en semillas maduras de las líneas transgénicas seleccionadas de la generación T ₂ | 133 |
| Figura III. 36. Contenido de polisacáridos de reserva en semillas maduras de las líneas transgénicas seleccionadas..... | 134 |
| Figura III. 37. Análisis de los extractos crudos y fracciones de proteínas solubles en sal de semillas maduras de las líneas transgénicas seleccionadas y de plantas NT..... | 135 |
| Figura III. 38. Análisis de las fracciones solubles en alcohol de semillas maduras procedentes de las distintas líneas transgénicas seleccionadas y de plantas NT (A) y nivel relativo de las proteínas de las fracciones soluble en alcohol (B) | 136 |
| Figura III. 39. Análisis de las fracciones UCT de semillas maduras procedentes de las distintas líneas transgénicas seleccionadas y de plantas NT (A) y análisis de los niveles relativos de las proteínas de las fracciones UCT (B)..... | 137 |
| Figura IV. 1. Posible mecanismo de formación del gen <i>NtrC</i> | 143 |
| Figura IV. 2. Representación esquemática de las posibles vías seguidas por el mensajero alternativo del gen <i>NtrC</i> | 153 |
| Figura IV. 3. Representación esquemática de la síntesis de almidón en semillas transgénicas de <i>Brachypodium</i> indicando las posibles enzimas reguladas por NTRC | 163 |
| Tabla I. 1. Comparación de organismos modelo de cereales..... | 56 |
| Tabla II. 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo y sus correspondientes genotipos | 65 |
| Tabla II. 2. Concentraciones de los antibióticos empleados en este trabajo según vector o estirpe bacteriana | 66 |
| Tabla II. 3. Reactivos y volúmenes empleados para PCR convencional | 71 |
| Tabla II. 4. Reactivos y volúmenes para PCR con la polimerasa iProof | 71 |
| Tabla II. 5. Oligonucleótidos empleados para el análisis del procesamiento alternativo de los intrones del gen <i>NtrC</i> de <i>Brachypodium distachyon</i> | 72 |
| Tabla II. 6. Oligonucleótidos empleados para el análisis del procesamiento alternativo del intrón 4 del gen <i>NtrC</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y tomate..... | 73 |
| Tabla II. 7. Oligonucleótidos empleados para clonaciones en pGEM-T | 73 |

| | |
|--|-----|
| Tabla II. 8. Oligonucleótidos empleados para clonaciones en G210..... | 73 |
| Tabla II. 9. Otros oligonucleótidos empleados durante el desarrollo del trabajo | 74 |
| Tabla II. 10. Reactivos y volúmenes empleados para qPCR..... | 74 |
| Tabla II. 11. Oligonucleótidos empleados para qPCR en <i>Brachypodium distachyon</i> | 75 |
| Tabla II. 12. Reactivos y volúmenes empleados para el escrutinio de colonias transformadas..... | 77 |
| Tabla III. 1. Comparación de las características del gen <i>NtrC</i> de varios organismos | 92 |
| Tabla III. 2. Parejas de oligonucleótidos empleados para determinar la presencia del transgén en las plantas transformadas y tamaño del producto esperado | 120 |
| Tabla III. 3. Resultados de la transformación de callos embriogénicos de <i>Brachypodium distachyon</i> mediada por <i>Agrobacterium</i> | 121 |
| Tabla III. 4. Eficiencia de la transformación de callos embriogénicos de <i>Brachypodium distachyon</i> en las diferentes modificaciones del protocolo de transformación utilizadas..... | 122 |
| Tabla III. 5. Resumen de la segregación del transgén en las líneas BdNTRC#29, BdNTRC#28 y BdNTRC#1 en la generación T ₁ | 128 |
| Tabla III. 6. Resultado de la identificación de proteínas mediante MALDI-TOF de muestras procedentes de las fracción soluble en alcohol (1-10) y fracción UCT (11-22)..... | 138 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| 3-PGA | 3-Fosfoglicerato |
| A | Absorbancia |
| ABA | Acido Abscísico |
| ADP | Adenosín-5'-difosfato |
| ADP-Glu | ADP-glucosa |
| AGPasa | ADP-glucosa pirofosforilasa |
| ATP | Adenosín-5'-trifosfato |
| BLAST | Búsqueda de similitud de secuencias |
| BE | Enzima ramificante (<i>Branching enzyme</i>) |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| DAF | Días tras fertilización (<i>Days after fertilization</i>) |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAasa | Desoxirribonucleasa |
| dNTP | Desoxirribonucleosido 5'-trifosfato |
| DO | Densidad óptica |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EMS | Metanosulfonato de etilo |
| FAD | Flavín adenín dinucleotido |
| Fd | Ferredoxina |
| FNR | Ferredoxina NADP ⁺ oxidoreductasa |
| FTR | Ferredoxina tiorredoxina reductasa |
| g | Gravedad estándar |
| g | Gramos |
| GAs | Giberelinas |

| | |
|---------------------------|--|
| GBSS | Almidón sintasa unida a gránulo (<i>Granule Bound Starch Synthase</i>) |
| Glu-1-P | Glucosa-1-fosfato |
| Glu-6-P | Glucosa-6-fosfato |
| h | Hora |
| HSP | Proteína de choque térmico (<i>Heat Shock Protein</i>) |
| IBVF | Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis |
| ISA | Isoamilasas |
| IPTG | Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido |
| Kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| l | Litro |
| LB | Medio Luria-Bertani |
| LDA | Pululanasa (<i>Limit Dextrinase</i>) |
| LEA | <i>Late Embriogenesis Abundant Protein</i> |
| LS | Medio Linsmaier-Skoog |
| MS | Medio Murashige-Skoog |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| NAD(P)⁺ | Nicotinamida-adenín-dinucleotido-fosfato |
| NAD(P)H | Nicotinamida-adenín-dinucleotido-fosfato reducido |
| NMD | <i>Nonsense-mediated mRNA decay</i> |
| NTR | NADPH tiorredoxina reductasa |
| p/v | Relación peso/volumen |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PGI | Glucosa-6-fosfato isomerasa (<i>Phosphoglucose Isomerase</i>) |
| PGM | Fosfoglucomutasa (<i>Phosphoglucose Mutase</i>) |
| Pi | Fosfato inorgánico |

| | |
|-----------------------|--|
| pI | Punto isoeléctrico |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| PPi | Pirofosfato |
| Prx | Peroxirredoxina |
| PCD | Muerte celular programada (<i>Programmed Cell Death</i>) |
| qPCR | PCR cuantitativa en tiempo real |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNAsa | Ribonucleasa |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| RT | Retrotranscripción |
| s | Segundo |
| SBE | Enzima ramificante del almidón (<i>Starch Branching Enzyme</i>) |
| SDE | Enzima desramificante del almidón (<i>Starch Debranching Enzyme</i>) |
| SDS | Sodio dodecil sulfato |
| SS | Almidón sintasa |
| SSS | Almidón sintasa soluble |
| SUS | Sacarosa sintasa |
| Taq polimerasa | Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tampón de electroforesis Tris-borato/EDTA |
| TBS | Tampón Tris-NaCl |
| TCA | Acido tricloro acético |
| TE | Tampón Tris-borato/EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetra-metil-etil-diamida |
| TGM | Tampón Tris-Glicina-Metanol |
| Tris | Tris-(hidroximetil) aminometano |
| Tritón X-100 | t-Octilfenoxipoli-etilensorbitano |

| | |
|--------------------|---|
| Trx | Tiorredoxina |
| Tween-20 | Monolaurato de polioxietilensorbitano |
| UDP | Uridín-5'-difosfato |
| UDP-Glu | UDP-glucosa |
| UDPGP | UDP-glucosa pirofosforilasa |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltio |
| v/v | Relación volumen/volumen |
| X-gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido |
| λ | Longitud de onda |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grados centígrados |

BASES NITROGENADAS

| | |
|----------|----------|
| A | Adenina |
| C | Citosina |
| G | Guanina |
| T | Timina |

AMINOÁCIDOS

| | | | | | |
|----------|-----|-----------------|----------|-----|--------------|
| A | Ala | Alanina | L | Leu | Leucina |
| R | Arg | Arginina | K | Lys | Lisina |
| N | Asn | Asparagina | M | Met | Metionina |
| D | Asp | Ácido Aspártico | F | Phe | Fenilalanina |
| C | Cys | Cisteína | P | Pro | Prolina |
| E | Glu | Ácido Glutámico | S | Ser | Serina |
| Q | Gln | Glutamina | T | Thr | Treonina |
| G | Gly | Glicina | W | Trp | Triptófano |
| H | His | Histidina | Y | Tyr | Tirosina |
| I | Ile | Isoleucina | V | Val | Valina |

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA SEMILLA DE CEREALES

Las semillas son la unidad de propagación empleada por las plantas superiores para la perpetuación de la especie y, a su vez, constituyen la forma en la que la planta comienza su ciclo de vida. Su aparición, hace aproximadamente 360 millones de años, marcó la evolución de las plantas terrestres haciendo posible la expansión de estos organismos a multitud de hábitats, incluyendo los más extremos, gracias a su tolerancia a la desecación y a su capacidad de controlar la germinación bajo condiciones ambientales óptimas.

Las reservas acumuladas en las semillas garantizan el aporte energético a la nueva planta hasta que adquiera una completa capacidad fotosintética. Semillas como las de cereales, leguminosas y oleaginosas almacenan compuestos ricos en hidratos de carbono, proteínas y lípidos, respectivamente, considerándose una fuente importante para la alimentación humana y para la ganadería. En concreto, las semillas de cereales han sido el principal componente de la dieta humana a lo largo de la historia. Desde su domesticación hasta la actualidad, han jugado un papel importante tanto en el origen de las civilizaciones (el hombre pasó de nómada a sedentario cuando se hizo agricultor) como en la evolución de las mismas.

En la actualidad, los cereales constituyen la principal fuente de calorías de la población mundial, siendo uno de los cultivos más importantes con una producción anual de semillas que supera los 2.300 millones de toneladas (Mt) en comparación con los 241 Mt de semillas de leguminosas (Glemin and Bataillon, 2009). Según los últimos datos recogidos por la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), del conjunto de cereales cultivados actualmente, el maíz (872 Mt), arroz (738 Mt), trigo (631 Mt) y cebada (132 Mt) son los que presentan una mayor importancia económica, siendo con diferencia los cereales más extendidos mundialmente.

La base de la importancia económica que representan los cereales reside en el alto contenido de almidón que acumulan en sus semillas, llegando en algunos casos a representar hasta el 78% de su peso seco (Hannah and James, 2008; Nagai et al., 2009). Además de servir como alimento, el almidón tiene importantes aplicaciones

industriales: fabricación de pegamentos, emulsionantes, papel, uso en las industrias farmacéutica, textil, aplicaciones médicas, etc (Ellis et al., 1998). En la actualidad, el uso de almidón como materia prima para la producción tanto de biopolímeros como de bioalcoholes (Ariel et al., 2009), presenta gran interés como alternativa energética, ante la creciente preocupación por la dependencia de las fuentes de energía no renovables (Gray et al., 2006). Asimismo, los cereales acumulan una cantidad considerable de proteínas por lo que también son una importante fuente de nitrógeno. Esto incrementa su valor nutricional y económico ya que estas proteínas poseen también utilidad industrial, como por ejemplo el gluten de trigo que es de gran utilidad en la fabricación de pan, harinas o pastas (Shewry and Halford, 2002; Larre et al., 2010).

I.1.1. Estructura y composición de la semilla de cereales

Los cereales pertenecen a la familia de las gramíneas (*Poaceae*). Se caracterizan por ser plantas anuales o perennes, con raíces numerosas, fasciculadas y poco profundas. Los tallos son cilíndricos, por lo común huecos, a excepción de los nudos donde se insertan las hojas de tipo lineal o lanceolada. Sus flores son hermafroditas (excepto la del maíz) y presentan una estructura floral muy característica en inflorescencias, denominadas espigas o panículas. Los frutos son por lo general grandes, llamados granos o cariósides, y sus cubiertas se encuentran soldadas a las semillas. Estos granos constan principalmente de un embrión situado en un extremo y un endospermo que contiene las sustancias de reserva energética necesarias durante la germinación. Cubriendo al endospermo se encuentran una serie de capas con distinto origen celular, de más interna a más externa se localizan la aleurona, el tejido nucelar, la testa y el pericarpo (Figura I. 1). En la espiga, los granos se encuentran además protegidos por dos cubiertas adicionales, denominadas lema y palea.

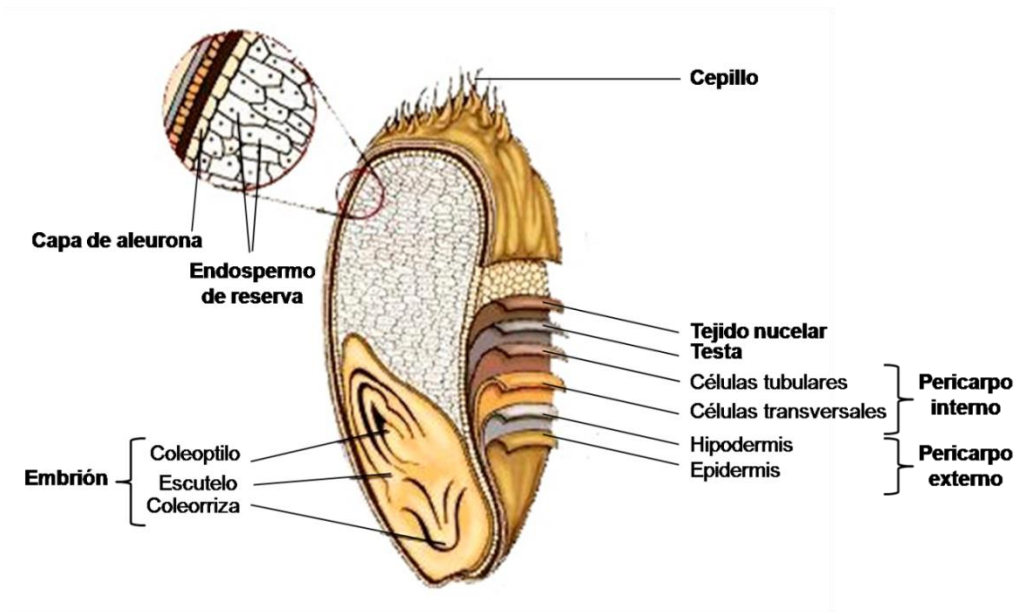


Figura I. 1. Composición histológica del grano de trigo. Adaptado de *Encyclopaedia Britannica* (1996) (<https://global.britannica.com>).

A continuación, se describe en mayor profundidad cada una de las partes que conforman el grano, así como su composición:

- Embrión.** El embrión es el resultado de la fertilización de la ovocélula del saco embrionario por uno de los núcleos espermáticos del tubo polínico. Es la parte del grano capaz de convertirse en una nueva planta. Está definido por el eje embrionario, el cual es diferente al de dicotiledóneas. En este caso, el único cotiledón se encuentra muy reducido y modificado formando el escutelo. La envoltura basal del cotiledón se encuentra alargada formando el coleoptilo, que cubre a la primera hoja. Tras el coleoptilo se encuentra el mesocotilo y en el otro extremo del embrión se halla la radícula protegida por la coleorriza (Figura I. 2). El **escutelo** se localiza entre el eje embrionario y el endospermo. Posee un epitelio capaz de secretar enzimas hidrolíticas al endospermo y, a su vez, de absorber los productos procedentes de la degradación de las sustancias de reserva y transportarlas hasta el embrión. El embrión junto con el escutelo contienen la concentración de lípidos más alta del grano, además de vitaminas liposolubles y, en más bajas concentraciones, algunos azúcares solubles (Evers and Millar, 2002). Debido a esta composición, durante el inicio de la germinación las células del escutelo pueden comenzar rápidamente la biosíntesis de proteínas.

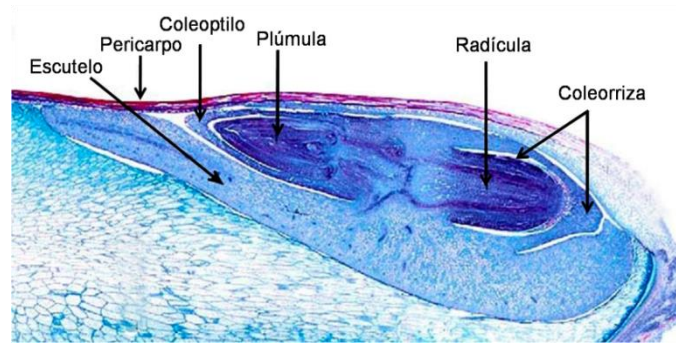


Figura 1. 2. Anatomía del embrión de una semilla de maíz. Tomada de University of Wisconsin, *Plant Teaching Collection* (<http://botit.botany.wisc.edu/>).

- **Endospermo de reserva.** El endospermo de reserva constituye la mayor parte del volumen del grano maduro y está formado, en su mayoría, por células muertas que acumulan en su citoplasma sustancias de reserva a lo largo del desarrollo hasta que finaliza con la muerte celular programada de las mismas (Domínguez and Cejudo, 2014). Las sustancias de reserva son movilizadas durante la germinación, proporcionando los nutrientes necesarios para mantener el crecimiento de la plántula hasta que se desarrolle el metabolismo autótrofo. En este tejido, el almidón constituye el principal componente de reserva y puede suponer hasta el 65-75% del peso seco final del grano en especies como el trigo o el arroz (Chen et al., 2014) e incluso el 80% en maíz (Comparot-Moss and Denyer, 2009). Se encuentra formado por dos tipos de homopolímeros de glucosa: amilosa y amilopectina, organizados en estructuras altamente ordenadas denominadas gránulos de almidón (Kang et al., 2013). Como se observa en la Figura 1. 3, estos gránulos se encuentran embebidos en una matriz acompañados por proteínas de reserva, las cuales suponen del 60-80% del total de proteínas presentes en el grano (Larre et al., 2010). Estas proteínas son sintetizadas por ribosomas unidos al retículo endoplasmático (RE) y se almacenan en forma de cuerpos proteicos, que o bien permanecen en el RE, en maíz y arroz, o son dirigidos a grandes vacuolas de almacenamiento, en el trigo (Sabelli and Larkins, 2009). Atendiendo a su solubilidad, estas proteínas se clasifican en 4 grupos diferentes: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en soluciones alcohol/agua) y glutelinas (solubles en soluciones ácidas o alcalinas) (Fincher, 1989). Las prolaminas constituyen el principal grupo de proteínas de reserva en el endospermo de semillas de trigo, cebada, centeno y maíz, mientras

que en arroz y avena las proteínas de reserva mayoritarias son las globulinas (Shewry and Halford, 2002).

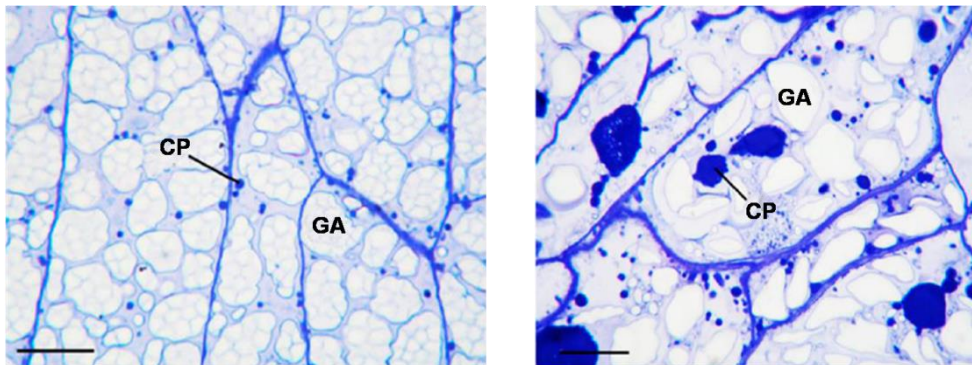


Figura I. 3. Gránulos de almidón (GA) y cuerpos proteicos (CP) en el endospermo de reserva en una semilla de arroz (izquierda) y trigo (derecha). La barra indica 20 μm . Adaptado de Zheng and Wang (2015).

- Capa de aleurona.** La capa de aleurona es un conjunto de células altamente especializadas que se originan por diferenciación de células del endospermo y que ocupan su zona más externa. A pesar de compartir un origen común, sólo las células de la aleurona permanecen vivas en los granos maduros y secos. En la mayoría de cereales se compone de una única capa de células (Freeling and Walbot, 1994), aunque en algunos casos, como en cebada o arroz, se compone de tres o un número variable de capas, respectivamente (Jones, 1969; Bechtel and Pomeranz, 1980). En general, las células de la aleurona poseen paredes gruesas y presentan un contenido rico en proteínas y lípidos (Figura I. 4). Estas proteínas, junto a un contenido elevado de ácido fítico, se acumulan en cuerpos de inclusión vacuolares denominados gránulos de aleurona, que constituyen la principal fuente de reserva de fósforo del grano (Asada et al., 1969). Además, debido a la acción quelante del ácido fítico, la aleurona constituye también una importante fuente de sales minerales de magnesio, potasio y calcio. Esta capa tiene un papel muy importante en la acumulación de compuestos durante el desarrollo de la semilla y en la movilización de los compuestos de reserva durante la germinación, secretando enzimas hidrolíticas necesarias para la movilización del almidón y proteínas presentes en el endospermo de reserva.

- Tejido nucelar.** El tejido nucelar se localiza rodeando al endospermo y al embrión. Su origen es materno y está constituido por células parenquimatosas y

epidérmicas (Evers and Millar, 2002). Las células de este tejido se encuentran sometidas a un programa de muerte celular que comienza en etapas tempranas del desarrollo, por lo que en el grano maduro el nucelo está formado por una capa de células muertas (Domínguez et al., 2001; Domínguez et al., 2004; Domínguez and Cejudo, 2014) (Figura I. 4). Su función está relacionada con el desarrollo y crecimiento del endospermo durante sus etapas más tempranas.

- **Testa.** La testa es un tejido de origen materno, procedente de la pared interna del ovario, que se va vaciando de contenido a lo largo de la maduración del grano (Figura I. 4). Durante el desarrollo de la semilla, la testa facilita el transporte de nutrientes desde el tejido vascular al tejido nucelar y de éste al endospermo. Al final del desarrollo comienza a acumular pigmentos que confieren impermeabilidad al grano en la mayor parte de su superficie.
- **Pericarpio.** El pericarpio es la capa más externa del grano y su principal función es proteger tanto al embrión como al endospermo (Figura I. 4). Su origen es materno, ya que procede de las paredes del ovario. Durante las primeras etapas del desarrollo del grano este tejido es fotosintéticamente activo y a medida que la semilla madura sufre un proceso de autólisis. El producto de su digestión es transportado al endospermo por lo que en granos maduros el pericarpio se encuentra formado por células secas y vacías.

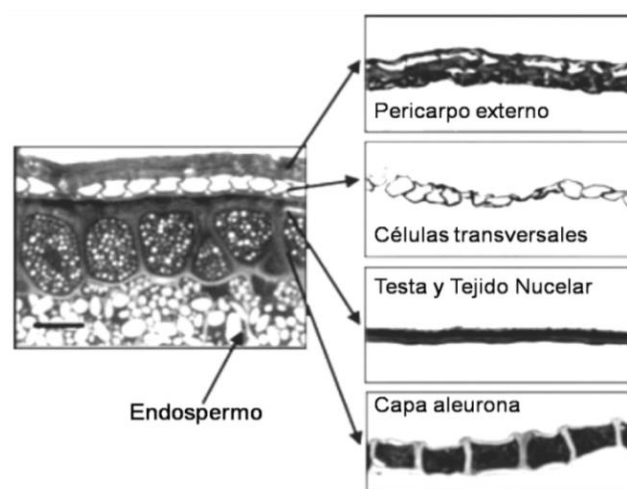


Figura I. 4. Micrografías de las capas externas de un grano de trigo sin diseccionar (izquierda) y diseccionadas (derecha). Adaptado de Mary L. Parker et al. (2005).

I.1.2. Desarrollo y germinación de la semilla de cereales

El ciclo de vida de la semilla comprende dos etapas bien diferenciadas: desarrollo y germinación. El desarrollo de la semilla se inicia con la fecundación del gametofito femenino, seguido de una fase de proliferación y diferenciación celular hasta que el grano alcanza su tamaño máximo. Esta fase finaliza con una etapa de deshidratación, dando lugar a la semilla madura que se encuentra en estado de dormición. Cuando las condiciones ambientales son favorables la semilla se rehidrata comenzando así la etapa de germinación.

I.1.2.1. Desarrollo

En cereales, como en el resto de plantas superiores, la formación de la semilla tiene lugar por reproducción sexual a través de la unión de los gametos femenino y masculino. Los gametos masculinos se localizan en las anteras, mientras que el gameto femenino u ovocélula se localiza en uno de los extremos del gametofito femenino también llamado saco embrionario. Este saco embrionario, como se muestra en Figura I. 5A, se encuentra formado por la ovocélula (haploide), dos sinérgidas en uno de los polos, dos células centrales (diploides) que forman el núcleo polar y en el otro extremo tres células antipodales que forman el micrópilo (Evers and Millar, 2002).

La formación de la semilla comienza con un doble evento de fecundación con los núcleos espermáticos haploides contenidos en el tubo polínico. Por una parte, se produce la fecundación de la ovocélula haploide (dando lugar al embrión diploide) y por otra, la fecundación de los dos núcleos polares, que origina el endospermo triploide. Tras la doble fertilización comienza la fase de desarrollo del endospermo que se divide en: formación del sincitio, celularización, diferenciación de los diferentes tejidos que componen el grano y, finalmente, maduración.

A continuación, se describen los eventos más importantes que tienen lugar durante cada una de las fases del desarrollo de la semilla (Figura I. 5B):

- **Formación del sincitio.** La fertilización del núcleo polar da como resultado la formación de un núcleo triploide (endospermo primario) que a las pocas horas de originarse comienza a sufrir una serie de divisiones mitóticas sincronizadas sin acompañamiento de citocinesis y, por tanto, con ausencia de formación de citoplasma,

membranas o paredes celulares, originando un sincitio (Lopes and Larkins, 1993; Olsen, 2004). El número de núcleos finales dependerá de la especie vegetal y varía desde los 512 núcleos contabilizados en maíz, hasta los casi 2.000 encontrados en algunas especies de trigo y cebada (Bennett et al., 1975). La formación de este sincitio se produce en torno a una gran vacuola central, que provoca la migración de los núcleos según un patrón de polaridad antero-posterior.

- **Celularización.** El sincitio sufre un proceso de celularización en el que los núcleos se separan y se aíslan formando células independientes. Este proceso tiene lugar de forma centrípeta, es decir, desde la periferia hasta la cavidad central.
- **Diferenciación.** Tras la celularización, las células sufren una serie de divisiones mitóticas periclinales generando mediante un proceso de diferenciación y especialización los 4 tipos celulares que constituyen el endospermo: endospermo de reserva, capa de aleurona, células de transferencia y zona circundante del embrión.
- **Maduración.** La maduración constituye el proceso final del desarrollo. Una vez que la división celular cesa y la acumulación de sustancias de reserva se completa, el endospermo sufre un proceso de muerte celular programada (Sabelli and Larkins, 2009; Domínguez and Cejudo, 2014). La semilla entra en una fase de desecación, ocasionada por una pérdida masiva de agua. De este modo, la adquisición de un estado quiescente incrementa la longevidad de la semilla, así como, su capacidad de resistencia a condiciones ambientales adversas. El proceso de desecación está regulado por la acción de hormonas, principalmente de ácido abscísico (ABA). Esta hormona participa en la regulación de genes que codifican proteínas tipo LEA (*Late Embriogenesis Abundant*), que intervienen en la protección frente a desecación, y proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Protein*). Además, el ABA activa las defensas frente al estrés oxidativo (Vicente-Carbajosa and Carbonero, 2005; Pulido et al., 2009; Angelovici et al., 2010) y participa en el establecimiento y mantenimiento de la semilla en estado de dormición hasta que las condiciones sean favorables para iniciar la germinación (Bewley, 1997).

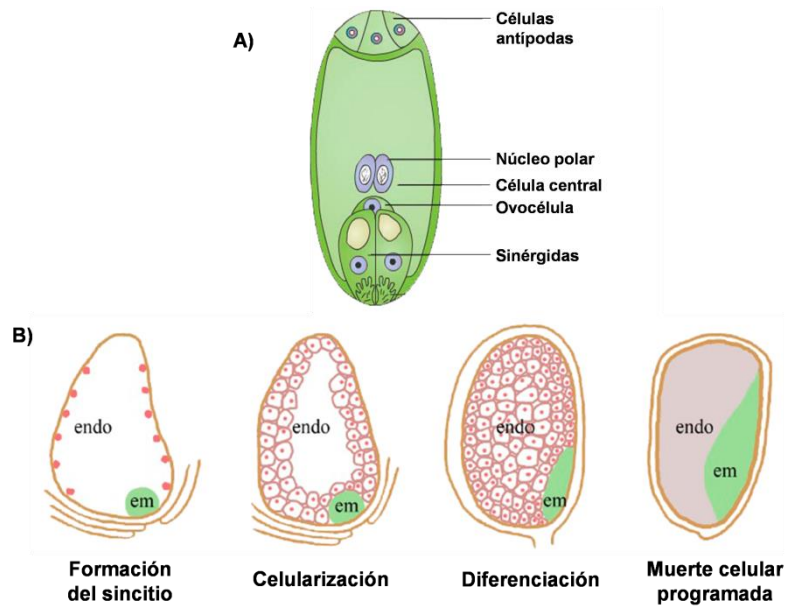


Figura I. 5. Representación de la composición del saco embrionario femenino (A) y esquematización de las fases del desarrollo del endospermo (B) de cereales. Adaptado de Bai and Settles (2015).

I.1.2.1. Germinación

La germinación es un proceso que se inicia cuando la semilla, madura y viable, es embebida en agua bajo condiciones ambientales favorables. Este proceso finaliza con la elongación de los ejes embrionarios, hasta que la radícula atraviesa las cubiertas seminales, comenzando en ese momento la etapa post-germinativa.

La absorción de agua durante la germinación es un proceso que comprende tres fases (Bewley, 1997; Bove et al., 2002):

- **Fase I: Activación del metabolismo.** Durante esta primera fase se produce una rápida absorción de agua, se activan tanto la respiración celular como la transcripción génica y síntesis de proteínas, además de iniciarse la degradación de las sustancias de reserva.
- **Fase II: Preparación para la elongación celular.** Durante esta fase la velocidad de entrada de agua decae en comparación con la fase I y comienzan a acumularse sustancias osmóticamente activas, como azúcares, aminoácidos e iones potasio. A su vez, la activación de bombas de protones presentes en los plasmodesmos provoca la acidificación del medio lo que debilita las paredes

celulares, permitiendo a las cubiertas seminales soportar la expansión del embrión. Esta fase finaliza con la emergencia de la radícula.

- **Fase III: Fase post-germinativa.** Durante esta última fase se produce la movilización total de las reservas para soportar el crecimiento de la plántula hasta que sea fotosintéticamente activa.

El proceso de la germinación está altamente regulado por hormonas, en el que los niveles de giberelinas (GAs) y ABA juegan un papel importante. Ambas hormonas poseen papeles antagónicos: mientras que el ABA inhibe la germinación, mediante la inhibición de la síntesis de enzimas hidrolíticas y la emergencia radicular (Bewley, 1997; Hoecker et al., 1999; Moreno-Risueno et al., 2007), las GAs son activadoras. El balance final de los niveles de ambas hormonas determina el potencial germinativo de la semilla (Finkelstein et al., 2002). Durante las etapas tempranas de la germinación, las GAs son liberadas por el embrión al endospermo de reserva y, al ser detectadas por las células de aleurona, inducen la síntesis de *novo* y liberación de enzimas hidrolíticas (α -amilasas, glucanasas y proteasas) al endospermo (Figura I. 6). Estas enzimas producen la degradación de los compuestos de reserva que serán absorbidos por el embrión como fuente de energía para el desarrollo de la nueva plántula (Fincher, 1989). A lo largo de esta etapa se produce también una acidificación del endospermo que favorece la solubilización de los compuestos de reserva (Hamabata et al., 1988) y a su vez, es necesaria para una óptima actividad de las proteasas que participan en su movilización (Jacobsen and Varner, 1967; Mikola and Mikola, 1980; Domínguez and Cejudo, 1999). Además, la acidificación favorece el transporte de los azúcares y aminoácidos hacia el embrión (Sopanen et al., 1980; Hardy and Payne, 1991). Una vez que finaliza la movilización de los compuestos de reserva, las GAs inducen la muerte de las células de la aleurona (Domínguez and Cejudo, 1999; Fath et al., 2002; Domínguez et al., 2004).

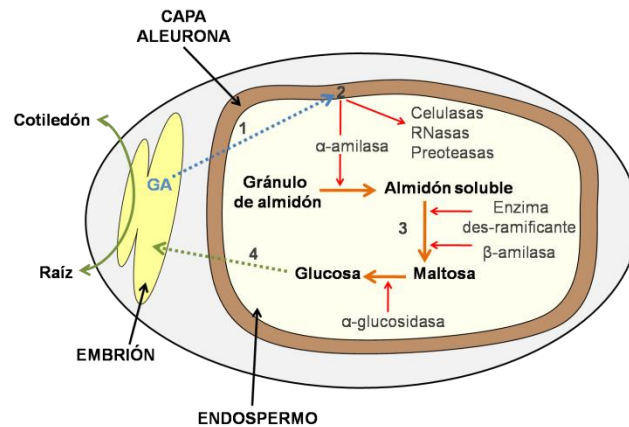


Figura I. 6. Representación de los procesos asociados a la germinación de las semillas de cereales. 1. Liberación de GAs por el embrión. 2. Estimulación de la síntesis de hidrolasas. 3. Degradación de las reservas. 4. Transporte de nutrientes al embrión.

Ya que muchos de los genes de respuesta a GAs codifican proteínas implicadas en las rutas de señalización de hormonas como etileno, jasmonato, brasinoesteroides y auxinas, se ha sugerido la posible participación de estas hormonas en el proceso de germinación (Kegui and and Yong-Qiang, 2006).

I.1.3. Generación y función de las especies reactivas de oxígeno en semillas

Las especies reactivas de oxígeno o ROS (*Reactive Oxygen Species*) son un grupo de radicales libres y moléculas reactivas que derivan del oxígeno (O_2) y cuya acumulación puede tener efectos tóxicos en la célula. La reducción del O_2 (Figura I. 7) conduce a la formación de anión superóxido (O_2^-), el cual posee un electrón desapareado que puede reaccionar con otras moléculas para estabilizarse, constituyendo una molécula con un fuerte carácter oxidante. A pesar de ello, se considera una molécula moderadamente reactiva ya que posee un tiempo de vida corto y una baja tasa de difusión. El O_2^- , en presencia de H^+ o por acción de la superóxido dismutasa, da lugar a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una molécula moderadamente reactiva, con un tiempo de vida de aproximadamente 1 ms y con capacidad de difundir a través de las membranas al ser eléctricamente neutra, lo que le permite actuar a distancia de su sitio de producción. Mediante las reacciones de Haber-Weiss y Fenton, en las que participan tanto O_2^- como el H_2O_2 , se genera en presencia de metales de transición (especialmente hierro) el radical hidroxilo $\cdot OH$, que

es el más reactivo de todos los radicales de oxígeno y tiene un tiempo de vida muy corto (Sharma et al., 2012).

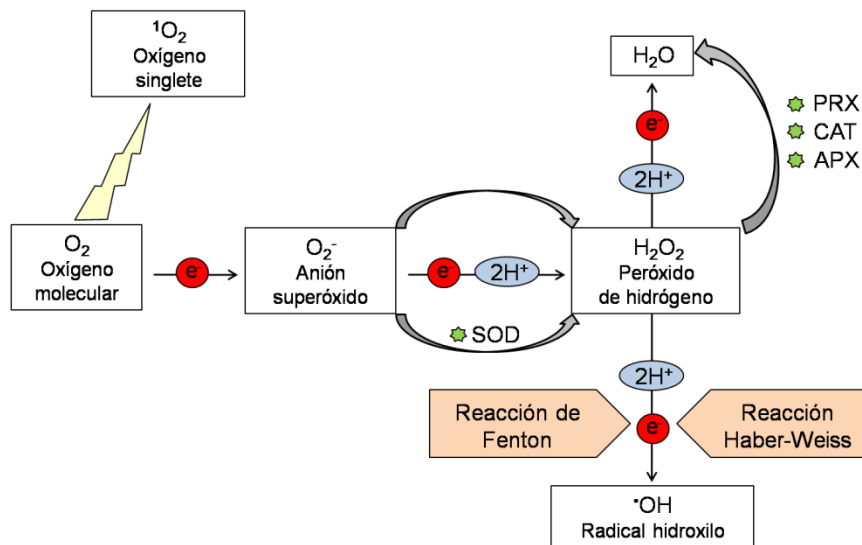


Figura 1. 7. Representación esquemática de la producción de ROS en plantas. La activación del O_2 puede tener lugar por dos mecanismos diferentes. Por una parte, la transferencia de energía al O_2 conduce a la formación de 1O_2 . Por otra, la reducción monovalente del O_2 conduce secuencialmente a la formación de O_2^- , H_2O_2 y $\cdot OH$. La formación de H_2O_2 puede ocurrir de forma espontánea o mediante la actuación de la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 es convertido en H_2O por acción de las ascorbato peroxidasa (APX), catalasas (CAT) y peroxirredoxinas (PRX), entre otras enzimas. Adaptado de Sharma et al. (2012).

Las ROS son producidas continuamente en las plantas como subproductos del metabolismo aerobio que tiene lugar en diferentes compartimentos celulares: cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. Además, se producen por actividades enzimáticas localizadas en membranas plasmáticas y paredes celulares, entre otros (Gill and Tuteja, 2010). Para controlar los niveles internos de ROS las células han desarrollado eficientes mecanismos antioxidantes que incluyen a sistemas enzimáticos como superóxido dismutasa, catalasas, peroxirredoxinas, ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa, y sistemas no enzimáticos formados por moléculas con capacidad antioxidante como ascorbato, glutatión, carotenoides, tocoferoles y compuestos fenólicos (Apel and Hirt, 2004).

En condiciones normales, en la célula existe un equilibrio entre la producción de ROS y su eliminación, pero este equilibrio puede verse alterado por diversos factores de estrés como sequía, salinidad, temperaturas extremas, radiación UV,

presencia de metales pesados o ataque por patógenos, que incrementan su producción. Cuando los niveles de estas moléculas en la célula son elevados, ésta entra en estado de estrés oxidativo en el que se produce la oxidación de proteínas, inactivación de enzimas, peroxidación de lípidos y daños en el DNA, desencadenando finalmente la activación de los programas de muerte celular (Sharma et al., 2012).

Además de su efecto tóxico, las ROS ejercen una importante función como mensajeros secundarios. Por ejemplo, la función señalizadora del H_2O_2 se relaciona con procesos como la activación de muerte celular programada (Fath et al., 2002; Pellinen et al., 2002), el cierre estomático mediado por ABA (Pei et al., 2000), la respuesta al gravitropismo en raíces mediada por auxinas, y la regulación de la expresión génica (Joo et al., 2001). Así pues, los sistemas antioxidantes presentes en las células no sólo deben proteger frente al daño oxidativo generado por la acumulación de ROS sino también ser capaces de equilibrar los procesos de producción y retirada de los mismos, con la finalidad de conservar la función señalizadora de estas especies (Mittler et al., 2004).

Las ROS están presentes y son necesarias durante el ciclo de vida de la semilla. Desde el desarrollo hasta la germinación el contenido hídrico y la actividad metabólica de la semilla varían considerablemente, por lo que las principales fuentes de producción de estas moléculas difieren en cada etapa. En el caso de semillas ortodoxas, como las de cereales, la respiración mitocondrial es muy intensa durante la embriogénesis y va decayendo a medida que la semilla madura inicia la fase de desecación, hasta convertirse en nula al entrar en estado quiescente. Una vez que la semilla se embebe en agua y comienza la germinación, la respiración se reanuda. De este modo, las mitocondrias constituyen una de las mayores fuentes de ROS durante el desarrollo y la germinación, de forma que del 2 al 3 % del oxígeno utilizado en la respiración genera O_2^- y H_2O_2 (Bailly et al., 2008). Los cloroplastos también constituyen una importante fuente de ROS pero sólo en etapas muy tempranas del desarrollo, ya que rápidamente se convierten en no funcionales. Las otras dos fuentes de producción a considerar son las formadas por los peroxisomas y las NADPH oxidasas presentes en las membranas plasmáticas. Una vez que las semillas entran en estado de dormición, la actividad enzimática cesa casi en su totalidad y probablemente la producción de ROS

sea debida a procesos oxidativos no enzimáticos como las reacciones de Amadori y Maillard (Bailly et al., 2008; Edeas et al., 2010).

En semillas, la producción de este tipo de moléculas se ha asociado durante mucho tiempo con procesos perjudiciales que generan su pérdida de viabilidad (El-Maarouf-Bouteau and Bailly, 2008). Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la importancia de las ROS en los procesos de desarrollo y germinación de la semilla (Figura I. 8).

Durante el desarrollo, la producción de ROS juega un papel primordial tanto en la embriogénesis como en el correcto llenado de la semilla, participando además en la deposición de lignina en las paredes celulares (Bailly, 2004; Karkonen and Kuchitsu, 2015). Por otra parte, se ha demostrado que la aplicación exógena de H₂O₂ en semillas maduras de cereales favorece la ruptura de la dormición y promueve la germinación (Naredo et al., 1998), generando una disminución en los niveles endógenos de ABA (Wang et al., 1995). Estos resultados sugieren que la salida del estado de dormición estaría relacionada con los niveles de estas moléculas oxidantes. Se ha propuesto que durante el desarrollo de la semilla el ABA contribuiría a mantener los niveles de enzimas antioxidantes elevados, generando como consecuencia bajos niveles de ROS. Una vez que la semilla alcanzase la madurez se produciría una acumulación de ROS de origen no enzimático, que contribuiría a disminuir los niveles de ABA e incrementar los de GAs. A su vez, esta situación provocaría la oxidación de proteínas y activación de factores de transcripción que participan en la germinación. En este sentido, se ha propuesto la necesidad de un nivel óptimo de ROS, denominado “ventana oxidativa de la germinación”, para alcanzar con éxito la germinación, ya que su acumulación en exceso generaría un daño oxidativo que tendría un efecto contraproducente. Así, se ha descrito que la acumulación de un exceso de ROS debido a la pérdida de función de la principal ascorbato peroxidasa de semillas (APX6), en *Arabidopsis*, produce una disminución de la tasa de germinación, debido al aumento de los niveles de ABA y el consiguiente efecto sobre rutas de señalización que regulan la dormición (Chen et al., 2014).

En la fase de germinación, la reactivación del metabolismo provoca cambios celulares y moleculares que van acompañados de una importante producción de ROS. La presencia de radicales hidroxilo en las paredes celulares sugiere su participación en la degradación de las mismas, debilitando la estructura del endospermo durante la germinación, proceso necesario para el crecimiento de los nuevos tejidos (Lizskay et al., 2004). Además estas moléculas estarían implicadas en la movilización de compuestos de reserva mediante la carbonilación de proteínas, un proceso de oxidación irreversible que incrementa la susceptibilidad de las proteínas a la rotura proteolítica (Job et al., 2005). También se ha propuesto que las ROS podrían participar en el crecimiento polar a través de su efecto sobre los canales de calcio (Gapper and Dolan, 2006) y que las auxinas podrían promover el crecimiento celular mediante la producción de superóxido y la consiguiente generación de radicales hidroxilos (Schopfer et al., 2002; Kawano, 2003).

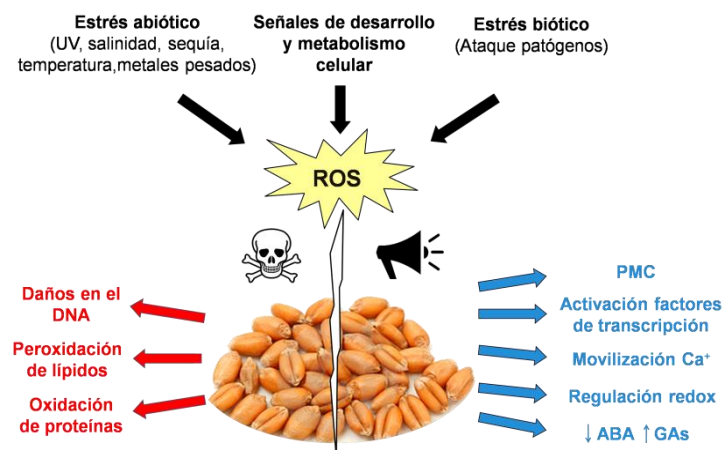


Figura 1. 8. Funciones de las ROS en semillas de cereales. Diferentes estímulos externos (estrés biótico y abiótico) e internos (señales del desarrollo y metabolismo celular) inducen la formación de ROS (negro). Estas ROS pueden actuar como moléculas señalizadoras capaces de promover diferentes procesos en respuesta a dichos estímulos (azul) o generar daños oxidativos irreparables que conducen a la muerte celular (rojo).

Por otra parte, las células que componen la capa de aleurona, una vez que cumplen su función, experimentan un proceso de muerte celular programada regulado hormonalmente por giberelinas (Domínguez et al., 2004) en el que también participa el peróxido de hidrógeno originado en los glioxisomas y mitocondrias tras la activación del metabolismo lipídico y la respiración celular (Fath et al., 2001; Fath et al., 2002).

Finalmente, se ha propuesto que la acumulación de ROS intracelular podría constituir un mecanismo de defensa frente a la infección por microorganismos, ya sea por el efecto tóxico que ejerce sobre ellos o por la activación de la respuesta hipersensible y muerte celular programada. Este mecanismo es importante porque la fase de emergencia de raíz y cotiledón es uno de los momentos de mayor susceptibilidad al ataque por patógenos (Lamb and Dixon, 1997; Grant and Loake, 2000).

I.1.4. Regulación redox en plantas

Situaciones ambientales que generan estrés, tanto biótico como abiótico, junto con la actividad metabólica celular generan ROS que pueden alterar el estado redox de la célula y provocar estrés oxidativo. Con el objetivo de evitar o minimizar posibles daños celulares, las plantas han desarrollado un complejo sistema de regulación redox que engloba a múltiples componentes, capaces de actuar a distintos niveles: a corto plazo, mediante regulación de actividades enzimáticas, y a largo plazo, mediante el control de los procesos de transcripción y traducción (Oelze et al., 2008).

El principal mecanismo de regulación redox de la actividad enzimática se basa en la reducción u oxidación reversible de los grupos tiólicos de residuos de cisteína (Cys), permitiendo el control rápido de la actividad de enzimas sensibles a regulación redox (Jacob et al., 2006). Los residuos de Cys pueden encontrarse en distintos estados de oxidación. El grupo sulfhidrilo (-SH) se puede oxidar a sulfénico (-SOH), sulfínico (-SO₂H) o sulfónico (-SO₃H). Además, puede participar en la formación de puentes disulfuro intra o intermoleculares, experimentar S-glutationilación o S-nitrosilación (-SNO) (Michelet et al., 2013).

En condiciones fisiológicas, aunque el potencial redox del citoplasma celular sea favorable para mantener los grupos sulfhidrilos en estado reducido, estos grupos tienden a oxidarse a sulfénico y sulfínico o a formar puentes disulfuro (intra o intermoleculares). Estos estados de oxidación son reversibles, pudiendo volver las Cys a la forma reducida. Cuando las condiciones son altamente oxidantes, los grupos tiolos pueden oxidarse hasta sulfónico, un estado irreversible que provoca la inactivación de la proteína y, eventualmente, favorece su degradación (Montrichard et al., 2009).

Estos cambios en el estado de oxidación de los residuos de Cys tienen un efecto importante sobre la conformación de las proteínas afectando por tanto a su actividad, solubilidad o susceptibilidad a proteasas (Balsera et al., 2014).

En la actualidad, se sabe que la regulación redox de proteínas constituye un mecanismo de regulación universal, que opera en todo tipo de organismos desde bacterias a animales y plantas, y afecta a multitud de procesos biológicos como la fotosíntesis, transcripción, división celular, señalización, detoxificación de ROS o germinación de semillas (Montrichard et al., 2009). El mantenimiento del estado redox de las proteínas es por tanto de gran importancia y en el mismo participan diferentes intermediarios entre los que se encuentran tiorredoxinas (Trx) y glutarredoxinas (Grx), proteínas pequeñas con actividad disulfuro reductasa (Rouhier et al., 2015).

I.1.4.1. Tiorredoxinas

Las Trx son proteínas pertenecientes a una gran familia de enzimas con actividad disulfuro reductasa, que están presentes en todos los tipos de organismos. Poseen un pequeño tamaño (12-14 KDa) y comparten una estructura característica denominada plegamiento tiorredoxina, compuesta por 3 α -hélices que rodean a 4 hojas β antiparalelas (Figura I. 9A). Su centro activo está compuesto por dos Cys, que forman parte de una secuencia consenso muy conservada, WCGPC (Schurmann and Jacquot, 2000).

Mientras los organismos heterotróficos contienen un bajo número de Trxs, normalmente dos, las plantas tienen una compleja familia génica para estas proteínas codificadas por al menos 25 genes (Meyer et al., 2005). Esta variedad de Trxs de plantas se clasifican atendiendo a sus características y localización celular. El cloroplasto contiene un elevado número de Trxs, que se clasifican en distintos tipos. En el caso de Arabidopsis, las Trxs cloroplastídicas son de tipo *f* (*f1* y *f2*), *m* (*m1*, *m2*, *m3* y *m4*), *y* (*y1*, *y2*), *x* y *z*, de las que hay sólo una isoforma (Meyer et al., 2002). Las Trxs de tipos *f* y *m* están implicadas en la regulación de la actividad de enzimas del metabolismo primario del carbono, como el ciclo de Calvin-Benson, así como otras vías metabólicas (Schurmann and Buchanan, 2008). Las Trxs tipo *y* y *x* participan en la defensa frente a estrés oxidativo (Collin et al., 2003; Collin et al., 2004) y la Trx *z*

participa en la transcripción de genes plastídicos (Arsova et al., 2010; Meng et al., 2010). Además, las plantas tienen Trxs en otros compartimentos celulares. Entre éstas se encuentran las de tipo *h*, que fueron inicialmente clasificadas como citosólicas pero que muestran también localización nuclear (Serrato and Cejudo, 2003), apoplástica (Zhang et al., 2011), y en la membrana plasmática (Meng et al., 2010). En mitocondrias se han descrito Trxs de tipo *o* (*o1*, *o2*) (Gelhaye et al., 2004). Por último, se ha identificado un nuevo tipo de Trx, tipo *s*, localizada en retículo endoplasmático y presente exclusivamente en los nódulos de leguminosas, donde ejerce un papel primordial en la simbiosis (Alkhalfioui et al., 2008).

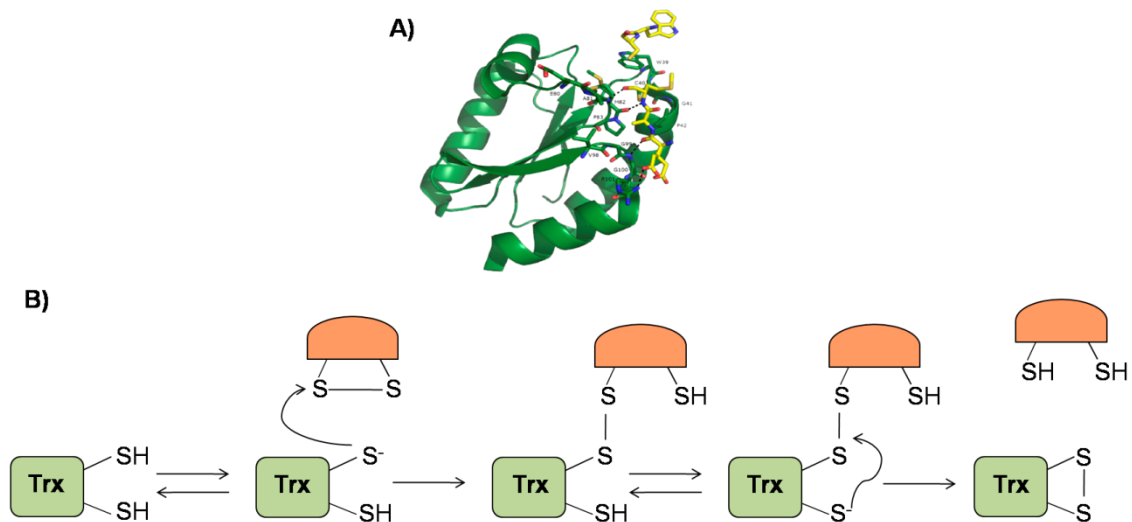


Figura I. 9. Estructura terciaria de la Trx *h1* de cebada (A) (Hagglund et al., 2016). **Mecanismo de reacción de las Trxs (B)**. La primera Cys del sitio activo realiza un ataque nucleofílico sobre uno de los átomos de azufre que forma parte del puente disulfuro de la proteína diana, generándose un complejo intermediario inestable. Un segundo ataque nucleofílico por parte de la segunda Cys del sitio activo rompe este complejo, liberando la Trx oxidada y la proteína diana reducida. Adaptado de Balsera et al. (2014).

La actividad disulfuro reductasa de las Trxs permite la reducción de puentes disulfuro en proteínas diana, modulando así la actividad de las mismas. Además, esta actividad es también importante en mecanismos de detoxificación de ROS, lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio redox celular (Michelet et al., 2013). En la Figura I. 9B se describe el mecanismo de acción de las Trxs: una de las Cys de su sitio activo está desprotonada en forma de tiolato y lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre uno de los átomos de azufre que se encuentra formando un puente disulfuro en la proteína diana, formándose un disulfuro mixto, que es inestable. Posteriormente, el

grupo tiol de la segunda Cys del sitio activo de la Trx ataca a este disulfuro intermediario, provocando la liberación de la Trx en forma oxidada y de la proteína diana reducida (Balsera et al., 2014). Para que se produzca un nuevo ciclo catalítico, la Trx oxidada debe ser nuevamente reducida. En plantas, la reducción de las Trxs se lleva a cabo por dos sistemas (Figura I. 10): el que utiliza el poder reductor de la Ferredoxina (Fd) reducida por la cadena fotosintética transportadora de electrones, que utiliza una Trx reductasa dependiente de Fd (FTR) exclusiva del plastos y el que depende de NADPH, que utiliza la reductasa dependiente de NADPH (NTR), presente en citosol y mitocondria (Montrichard et al., 2009).

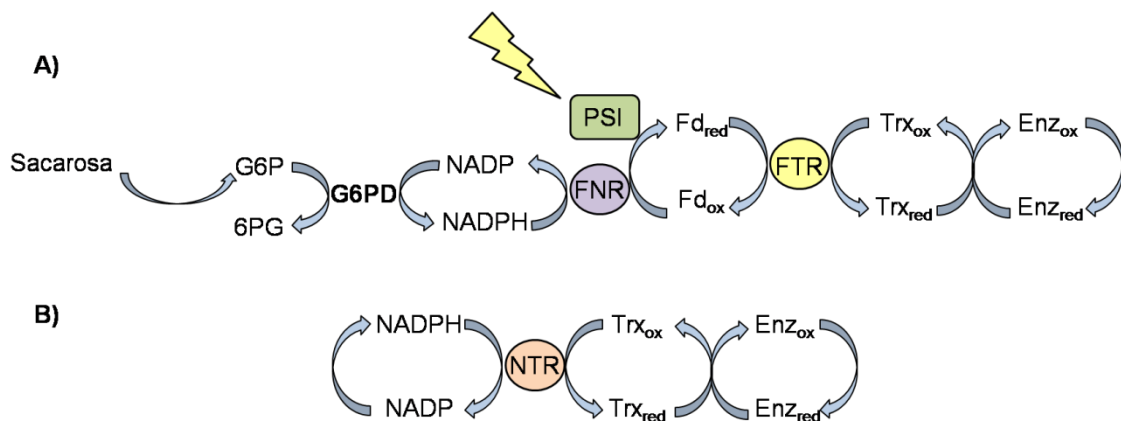


Figura I. 10. Sistemas de reducción de Trxs. El sistema Fd/FTR/Trx se encuentra tanto en cloroplastos, donde las Fd son reducidas a partir del fotosistema I (PSI), como en amiloplastos, donde las Fd son reducidas a partir de ferredoxinas NADP⁺ reductasas (FNR) (A); mientras que el sistema NTR/Trx se ha descrito en el citosol y mitocondrias (B). Adaptado de Balmer et al. (2006)

El sistema FTR/Trx utiliza Fd como donador de poder reductor. En el caso de los cloroplastos la Fd reducida es generada por la cadena fotosintética de transporte de electrones, mientras que en el caso de amiloplastos es generada por la Fd-NADP⁺ reductasa (FNR) a partir del NADPH procedente del metabolismo de azúcares. Posteriormente, la FTR, una proteína heterodimérica compuesta por una subunidad variable y otra catalítica, transfiere el poder reductor a las Trxs (Schurmann and Jacquot, 2000; Balmer et al., 2006). En el segundo sistema, las Trxs citosólicas, nucleares y mitocondriales son reducidas por NTRs, unas flavoproteínas pertenecientes a la familia de las piridín nucleótido oxidoreductasas. Estas proteínas poseen FAD como grupo prostético, de forma que los electrones son transferidos

desde el NADPH hasta el FAD y posteriormente a las Cys del sitio activo (Mustacich and Powis, 2000).

A diferencia de lo que sucede con las Trxs, la familia génica de NTR en plantas está formada sólo por 3 genes en arroz y Arabidopsis (Serrato et al., 2004; Meyer et al., 2005). Los dos primeros codifican para las isoformas NTRA, predominantemente citosólica, y NTRB, predominantemente mitocondrial (Reichheld et al., 2005). La tercera isoforma, de localización plastidial, codifica para NTRC, una NTR atípica que presenta en su extremo C-terminal un dominio Trx.

El sistema NTR/Trxs es universal, estando presente en todo tipo de organismos vivos. En semillas de cereales, este sistema se encuentra principalmente constituido por las NTRs A/B y Trxs *h*. La familia génica que codifica Trxs *h* en plantas es también compleja (Reichheld et al., 2002; Hagglund et al., 2016). Tanto las NTRs A y B como las Trxs *h* son abundantes en los diferentes tejidos que componen el grano (Santandrea et al., 2002; Serrato and Cejudo, 2003; Serrato et al., 2001), lo que indica la importancia de estas proteínas durante el desarrollo y germinación de las semillas. Entre sus principales funciones destacan:

1. Promoción de la germinación, movilización de las reservas del endospermo y reactivación del metabolismo. En semillas maduras, la mayor parte de las proteínas presentes en el endospermo de reserva y embrión se encuentran en estado oxidado. Cuando las semillas son embebidas en agua se inicia el proceso de germinación que implica la reactivación del metabolismo. Durante este proceso, las Trxs *h* participan en la movilización de los compuestos de reserva presentes en el endospermo de la semilla. Por una parte, promueven la degradación del almidón mediante la inactivación de inhibidores de las α y β amilasas, enzimas que hidrolizan el almidón, y por medio de la activación de enzimas desramificantes de almidón, entre ellas las pululanases. Por otra parte, participan en la activación de proteasas, destacando entre ellas las tiorcalsinas (proteasas de Ser) las cuales se encargan de la degradación de proteínas de reserva (Wong et al., 2003; Guo et al., 2011). Además, se ha comprobado que las Trxs también están implicadas en la reducción de las proteínas de reserva, provocando un incremento en su solubilidad y susceptibilidad a proteólisis (Yano et al., 2001; Wong et

al., 2004). Diferentes aproximaciones para la identificación de proteínas diana de Trxs *h* en endospermo de cereales (Wong et al., 2003; Alkhalfioui et al., 2007; Montrichard et al., 2009), así como la generación de cereales transgénicos con niveles alterados de Trx *h* en la semilla (Li et al., 2009; Guo et al., 2011), confirman el importante papel que ejerce este sistema de regulación redox durante la germinación de la semilla de cereales.

2. Protección frente a ROS. Durante el proceso de desecación que ocurre en la fase final del desarrollo de la semilla y durante la germinación se produce un incremento en la producción de ROS. Las células de aleurona, escutelo y embrión han desarrollado mecanismos de defensa frente a dicho estrés oxidativo. La identificación de proteínas diana de Trx *h* implicadas en la respuesta a estrés oxidativo, como la GSH-deshidroascorbato reductasa y peroxiredoxinas (Wong et al., 2003), junto con análisis inmunocitoquímicos en semillas de trigo en los que se observa acumulación de NTR y Trx *h* en el núcleo de estas células (Serrato and Cejudo, 2003), pone de manifiesto la participación de este sistema redox en la protección frente al daño oxidativo en el núcleo (Pulido et al., 2009).

3. Señalización redox y control de la expresión génica. Estudios de localización realizados en semilla en desarrollo de maíz (Santandrea et al., 2002) y trigo (Serrato and Cejudo, 2003), revelaron la presencia de Trx *h* en tejidos implicados en la comunicación de la semilla con el resto de la planta, como el pedicelo, las células de transferencia, el embrión y la capa de aleurona, sugiriendo su participación en la transmisión de señales redox. Además, estudios realizados con semillas de cebada que sobreexpresan Trx *h* (Wong et al., 2002) mostraron aceleración de la germinación e incremento de la liberación de α -amilasas por parte de las células de aleurona, lo que sugiere la implicación de las Trxs *h* en la comunicación entre aleurona y embrión. Por otra parte, la capacidad del sistema NTR/Trx *h* de interactuar con las peroxiredoxinas y regular así los niveles de H_2O_2 en la célula, junto con la regulación redox por H_2O_2 de factores de transcripción (Delaunay A et al., 2002), sugiere que este sistema podría tener como función adicional la regulación redox de la expresión génica.

I.1.4.2. NADPH-tiorredoxina reductasa C

La NADPH-tiorredoxina reductasa C (NTRC) es una enzima bimodular compuesta por un dominio NTR fusionado a un dominio Trx en su extremo C-terminal, que muestra alta afinidad por el NADPH como fuente de electrones. Por tanto, NTRC constituye un sistema NTR/Trx en un único polipéptido (Serrato et al., 2004; Moon et al., 2006; Pérez-Ruiz et al., 2006). Hasta el momento, se ha descrito que NTRC está codificada por un gen de copia única, presente exclusivamente en organismos que realizan la fotosíntesis oxigénica, encontrándose en plantas, algas y algunas cianobacterias (Pascual et al., 2010). Aunque inicialmente se describió como una enzima cloroplástica (Serrato et al., 2004), estudios posteriores del patrón de expresión del gen *NtrC* en *Arabidopsis* demostraron su presencia tanto en tejidos fotosintéticos como heterotróficos, poniendo de manifiesto la localización de la proteína en todo tipo de plastos (Kirchsteiger et al., 2012).

La forma activa de NTRC es un homodímero en el que la transferencia de electrones ocurre desde el dominio NTR de uno de los monómeros hasta el dominio Trx del otro monómero (Figura I. 11). El NADPH cede los electrones al FAD, grupo prostético del dominio NTR, desde donde son posteriormente transferidos a los residuos de Cys del sitio activo de este dominio. Posteriormente, los electrones son transferidos a los residuos de Cys del sitio activo del dominio Trx del otro monómero. Finalmente, el dominio Trx reducido interacciona con las proteínas diana reduciéndolas (Pérez-Ruiz and Cejudo, 2009; Bernal-Bayard et al., 2012).

NTRC depende de NADPH como fuente de poder reductor, mostrando una alta afinidad por este donador de electrones (Serrato et al., 2004). En el cloroplasto, el NADPH se produce durante el día a partir de la Fd reducida generada por la cadena de transporte electrónico fotosintético, la cual transfiere los electrones al NADP⁺ través de una reacción catalizada por la FNR. Durante la noche, el NADPH puede también generarse a partir de la oxidación de los azúcares en la ruta oxidativa de las pentosas fosfato. En el cloroplasto NTRC ejerce un importante papel como donador alternativo de electrones, actuando durante el día como un sistema complementario al sistema FTR/Trx y durante la noche como principal vía de regulación redox. En plastos de tejidos no fotosintéticos, donde la única fuente de poder reductor es el NADPH

generado en la ruta oxidativa de las pentosas fosfatos a partir de la sacarosa procedente de tejidos fotosintéticos, NTRC ejercería un importante papel en la regulación redox (Balmer et al., 2006).

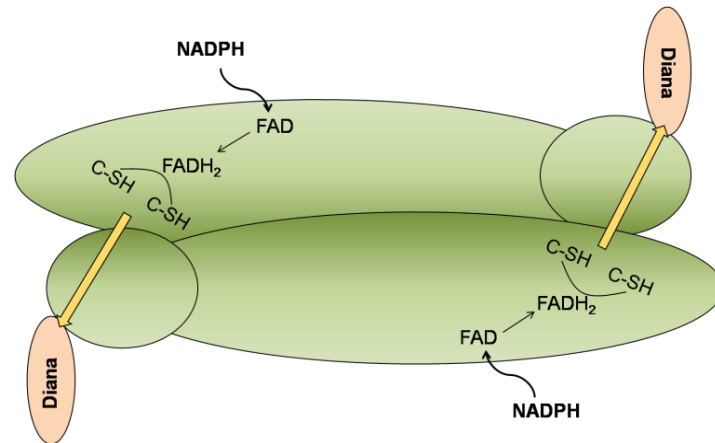


Figura I. 11. Modelo del mecanismo de reacción propuesto para NTRC. La forma catalíticamente activa de NTRC es un dímero. El NADPH dona los electrones al FAD del dominio NTR, desde donde son transferidos al dominio Trx de la otra subunidad. El dominio Trx, finalmente, reduce a las proteínas diana de NTRC. Adaptado de Cejudo et al. (2012).

La identificación de un mutante de inserción en el gen *NtrC* en *Arabidopsis* ha contribuido a determinar las posibles funciones desempeñadas por esta proteína. Las plantas mutantes *ntrc* presentan una mayor sensibilidad a diferentes estreses abióticos y diferentes alteraciones fenotípicas como crecimiento lento, reducción en el contenido de clorofila de las hojas, alteración de la estructura del cloroplasto y menor tasa de fijación de CO₂, entre otros. Además, este fenotipo es mucho más acusado en condiciones de día corto (Pérez-Ruiz et al., 2006 ; Lepisto et al., 2009). Por este motivo, se ha propuesto que la función de NTRC podría ser especialmente importante durante la noche, donde NTRC sería el principal sistema de regulación redox (Spinola et al., 2008).

Una de las primeras funciones atribuidas a NTRC es su participación en la protección frente a estrés oxidativo a través de su interacción con la 2-Cys Prx. Estudios *in vitro* han demostrado que NTRC es capaz de reducir con mayor eficiencia a la 2-Cys Prx que otras Trxs, como CDPS32 y Trx x, cuya participación en la defensa frente a estrés oxidativo se había descrito con anterioridad (Pérez-Ruiz et al., 2006; Pulido et al., 2010). Además, la actividad antioxidante del sistema NTRC/2-Cys Prx

estimula la actividad ciclasa de biosíntesis de clorofila, la cual es sensible a ROS (Stenbaek et al., 2008). Sin embargo, el fenotipo del mutante *ntrc* es mucho más severo que el de un mutante *knockdown* con niveles disminuidos de 2-Cys Prx (Pulido et al., 2010). Este resultado, junto con la redundancia de sistemas antioxidantes presentes en el cloroplasto y la localización de NTRC en plastos de tejidos no fotosintéticos, sugiere que NTRC debe participar en la regulación redox de otros procesos.

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de nuevas funciones de NTRC. Por una parte, se ha demostrado que esta enzima se encuentra implicada en la regulación de la síntesis de tetrapirroles mediante la reducción de la glutamyl-tRNA reductasa 1 (GluTR1), Mg-protoporfirina metiltransferasa (CHLM) (Richter et al., 2013) y la subunidad CHL1 de la Mg-quelataza (Pérez-Ruiz et al., 2014). Por otra parte, se ha demostrado la participación de NTRC en la regulación redox de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) tanto en hoja como raíz, con niveles reducidos de almidón en las plantas mutantes *ntrc* (Michalska et al., 2009). Finalmente, los niveles incrementados de aminoácidos aromáticos en el mutante *ntrc* sugieren la implicación de dicha proteína en la regulación de la ruta del shikimato (Lepisto et al., 2009), aunque aún se desconoce el mecanismo.

I.1.5. Metabolismo del almidón en el endospermo de cereales

En plantas superiores, el almidón constituye el carbohidrato de reserva más extendido y abundante. Dada la importancia de este polímero en la alimentación y como materia prima en diversas aplicaciones industriales, el metabolismo del almidón y las enzimas implicadas en el mismo han sido objeto de numerosos estudios, que han permitido el conocimiento de la maquinaria enzimática de su biosíntesis y degradación. A pesar de esto, aún quedan aspectos por conocer como la regulación de algunos de los componentes de esta maquinaria, especialmente en el endospermo de cereales (Pfister and Zeeman, 2016).

El almidón está compuesto por dos tipos de homopolímeros de D-glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero fundamentalmente lineal, poco ramificado, compuesto principalmente por monómeros de α -D-glucosa unidos

mediante enlaces glucosídicos α -1,4. Mientras que la amilopectina, que constituye la mayor parte del almidón, consiste en cadenas lineales de varios tamaños formadas por monómeros de α -D-glucosa con unión α -1,4, que poseen un alto grado de ramificación por la unión de cadenas de α -D-glucosas mediante enlace α -1,6. La organización de la amilosa y amilopectina genera una estructura compacta y altamente compleja que da lugar a gránulos grandes e insolubles de almidón.

En semillas de cereales, el almidón es sintetizado y almacenado en los amiloplastos de las células del endospermo. Tanto el número de gránulos como su tamaño, forma y composición es bastante diverso y dependiente de la especie vegetal. Una de las principales características del almidón de reserva es que presenta una separación temporal entre los procesos de síntesis y degradación, que tienen lugar durante distintas fases del ciclo de vida de la planta. En semillas de cereales, la síntesis de almidón se produce durante el desarrollo de la semilla y el proceso de degradación tiene lugar durante la germinación. Por otra parte, en tejidos fotosintéticos, el almidón transitorio es sintetizado y degradado de forma alterna y dinámica durante el ciclo día/noche.

I.1.5.1. Síntesis de almidón

La síntesis de almidón en plantas vasculares es el resultado de una compleja ruta metabólica en la que participan diferentes isoformas de varias enzimas. Esta ruta biosintética se encuentra muy conservada en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos, aunque ambos difieren en cuanto a la procedencia de la fuente de carbono. Mientras que en tejidos fotosintéticos el almidón es sintetizado a partir de los productos de la fijación fotosintética del carbono, en tejidos no fotosintéticos la fuente de carbono es la sacarosa sintetizada en los tejidos fotosintéticos, transportada a través del sistema vascular hasta los órganos sumidero. Mediante transportadores de sacarosa localizados en las membranas plasmáticas, la sacarosa es exportada desde las células fuente al floema y de éste a las células sumidero. Posteriormente, en el citosol, la acción secuencial de la sacarosa sintasa (SUS), UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa) y la isoforma citosólica de la fosfoglucomutasa (cPGM) generan como producto glucosa-6-fosfato (Glu-6-P). Finalmente, la Glu-6-P es importada al amiloplasto, a través de un translocador específico de hexosas, donde actúa como precursor de la síntesis de

almidón. A pesar de esta diferencia, en ambos tipos de tejidos se distinguen 4 pasos básicos que consisten en: activación del sustrato, elongación, ramificación y desramificación del polímero (Jeon et al., 2010; Pfister and Zeeman, 2016).

- **Activación del sustrato.**

En plantas, la ADP-glucosa (ADP-Glu) constituye el donador de residuos de glucosa al polímero de almidón en crecimiento. Este metabolito se sintetiza a partir de ATP y glucosa-1-fosfato (Glu-1-P) mediante una reacción catalizada por la enzima AGPasa. Aunque *in vitro* esta reacción es reversible, *in vivo* la degradación del pirofosfato desplaza la reacción hacia la formación de ADP-Glu garantizando de este modo la irreversibilidad del proceso (Tiessen et al., 2011). Esta reacción se considera un paso limitante de la síntesis de almidón y constituye un punto clave de regulación del proceso.

El endospermo de semillas de cereales presenta una peculiaridad respecto a otros órganos sumideros y es la existencia de dos isoformas distintas de AGPasa, una citosólica y otra plastidial. La ADP-Glu sintetizada en el citosol es importada al plasto a través de un tipo de transportador de nucleótidos de adenina específico de este tipo de tejido. El estudio de mutantes afectados en la isoforma citosólica de la AGPasa (Johnson et al., 2003) o en el transportador de ADP-Glu (Patron et al., 2004), ha demostrado que en el endospermo la síntesis de ADP-Glu tiene lugar mayoritariamente en el citosol.

- **Elongación del polímero de almidón.**

Durante este paso, la almidón sintasa (SS, *Starch Synthase*) se encarga de transferir el grupo glucosilo de la ADP-Glu al extremo no reductor del polímero de almidón en crecimiento, formando enlaces glucosídicos α -1,4. Se han identificado distintas isoformas de SS codificadas por diferentes genes. Las SS solubles (SSI, SSII, SSIII y SSIV) están implicadas en la síntesis de amilopectina (Hirose and Terao, 2004; Tetlow et al., 2004) mientras que la SS asociada a gránulo (GBSS, *Granule Bound Starch Synthase*) participa en la síntesis de amilosa (Tetlow et al., 2004). Además, se ha comprobado que en el endospermo de cereales existen varias isoformas para algunas

de las SS y que su patrón de expresión varía a lo largo del desarrollo de la semilla, agrupándose en SS de expresión temprana, tardía o constitutiva.

- **Ramificación del polímero de almidón.**

Las enzimas ramificantes (BE, *Branching Enzyme*) catalizan la ramificación del polímero de amilopectina rompiendo enlaces glucosídicos α -1,4 por el extremo no reductor de la cadena de poliglucano y uniéndolo al C6 de una molécula de glucosa de la misma u otra cadena mediante un enlace glucosídico α -1,6. En plantas se han descrito dos tipos de enzimas ramificantes, con diferencias en la secuencia de aminoácidos, especificidad y patrón de expresión. Además, estas enzimas también presentan un patrón de expresión espacio-temporal específico (Tetlow et al., 2004).

- **Desramificación del polímero de almidón.**

Las enzimas desramificantes (DBE, *Debranching Enzyme*), isoamilasas (ISA) y dextrinasas límite o pululaninas (LDA), catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1,6 característicos de la amilopectina (Le et al., 2010). Aunque estas enzimas se han relacionado con el proceso de degradación del almidón, estudios de plantas mutantes deficientes en esta actividad han puesto de manifiesto su participación en la síntesis del gránulo de almidón (Fujita et al., 1999; Dinges et al., 2003; Li et al., 2009). En concreto, de las tres isoformas de isoamilasas presentes en plantas, ISA1 e ISA2 están implicadas en la desramificación durante la síntesis de amilopectina.

Aunque el modelo de biosíntesis de almidón descrito anteriormente es el más aceptado, se ha propuesto un modelo alternativo según el cual la sacarosa sintasa cataliza en el citosol la síntesis de *nov* de ADP-Glu (Baroja-Fernández et al., 2003). La ADP-Glu es transportada al plasto por medio de un translocador específico y, una vez en el interior, es sustrato del conjunto de enzimas y reacciones descritas anteriormente. Sin embargo, aunque se ha demostrado *in vitro* que la SUS puede producir ADP-Glu y fructosa a partir de sacarosa y ADP, se considera que *in vivo* su función es la producción de UDP-Glu y fructosa (Streb et al., 2009; Stitt and Zeeman., 2012).

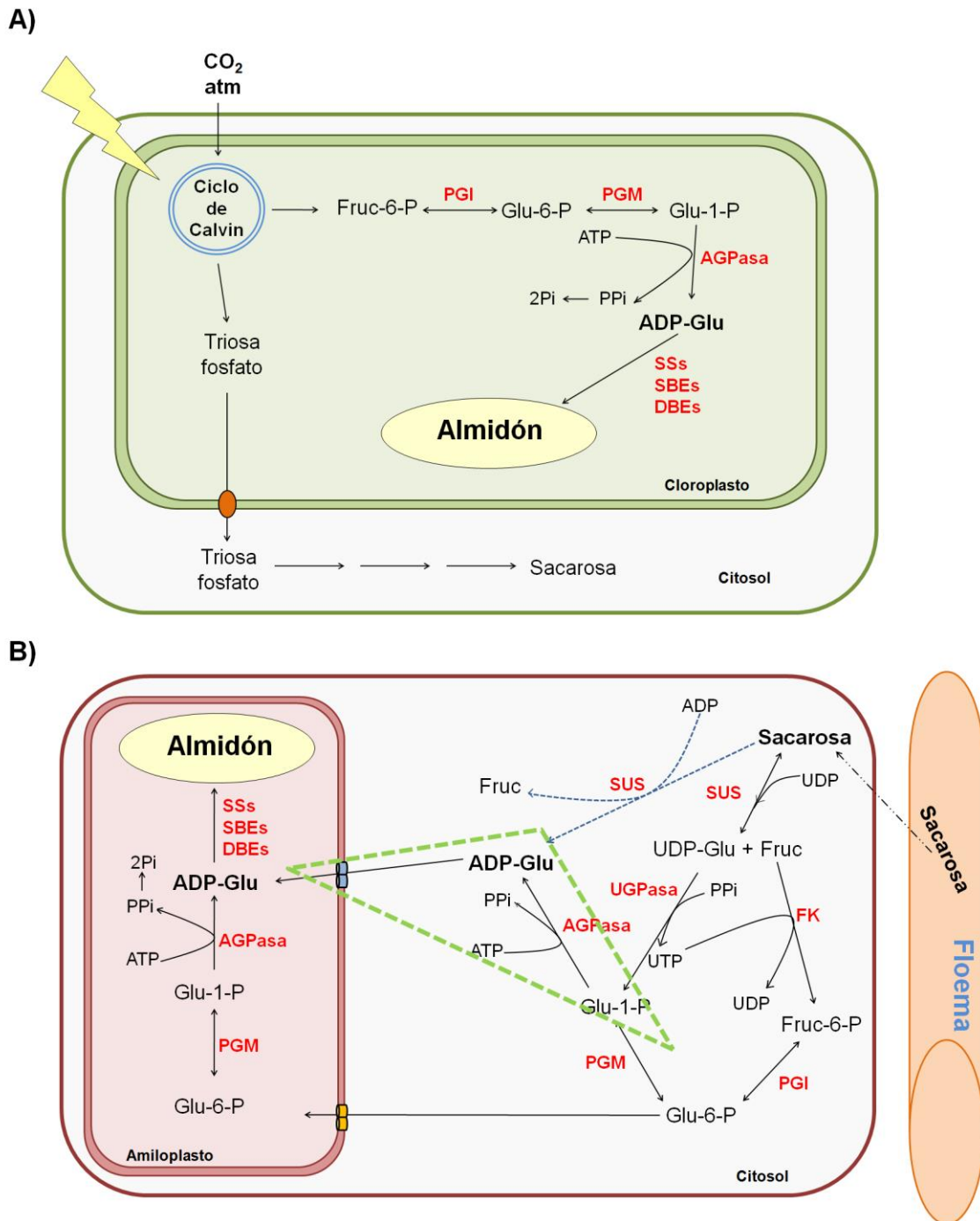


Figura I. 12. Rutas de síntesis de almidón en células fotosintéticas (A) y heterotróficas (B). La reacción resaltada en el triángulo verde es exclusiva del endospermo de cereales. Las flechas punteadas en azul indican una posible reacción catalizada por la SUS en células heterotróficas, según lo descrito por Baroja-Fernández et al. (2003). Imagen adaptada de Tuncel and Okita (2013). Las abreviaturas corresponden a: **PGI**, fosfoglucosa isomerasa; **PGM**, fosfoglucomutasa; **AGPasa**, ADP-glucosa pirofosforilasa; **SUS**, sacarosa sintasa; **UGPasa**, UDP-glucosa pirofosforilasa; **SSs**, almidón sintasa; **SBEs**, enzimas ramificantes; **DBE**, enzimas desramificantes; **FK**, fructoquinasa.

I.1.5.2. Estructura y regulación de la AGPasa

La AGPasa cataliza el paso limitante de la síntesis de almidón, por este motivo esta enzima ha sido objeto de estudio y de múltiples aproximaciones biotecnológicas destinadas a la alteración de los niveles de almidón.

En plantas superiores la AGPasa tiene localización plastidial aunque en el endospermo de cereales existe también una isoforma citosólica con algunas propiedades diferentes. La presencia en este tejido de ambas isoformas podría suponer una ventaja para la semilla, ya que de este modo se asegura la canalización del carbono hacia la formación de almidón (Comparot-Moss and Denyer, 2009).

Estructuralmente, se trata de una enzima heterotetramérica ($\alpha_2\beta_2$) compuesta por dos subunidades grandes y dos subunidades pequeñas, codificadas cada una de ellas por más de un gen (Saripalli and Gupta, 2015). Las subunidades pequeñas mantienen un elevado grado de identidad entre ellas (85 – 95 %), mientras que las grandes están menos conservadas (50 – 60 %) (Smith-White and Preiss, 1992). Además, en el endospermo de semillas de cereales se ha demostrado que los distintos tipos de subunidades se expresan con patrones espacio-temporales diferentes asociados al estado de desarrollo (Lee et al., 2007). Tanto las subunidades grandes como las pequeñas son necesarias para la óptima actividad de la enzima. Tradicionalmente se ha descrito que la actividad catalítica de la enzima reside en las subunidades pequeñas, mientras que la función reguladora reside en las subunidades grandes (Ballicora et al., 1995). Sin embargo, estudios más recientes rompen, en parte, con esta visión proponiendo que ambas subunidades son necesarias para la correcta regulación y actividad de la enzima actuando de forma sinérgica (Cross et al., 2004; Tuncel et al., 2014).

La AGPasa está sujeta a un complejo mecanismo de regulación que actúa a diferentes niveles. De este modo, la célula asegura una actividad enzimática acorde a sus necesidades. Los principales mecanismos de regulación son: regulación transcripcional, regulación alostérica por medio de metabolitos y control redox post-traducciona (Geigenberger, 2011) (Figura I. 13).

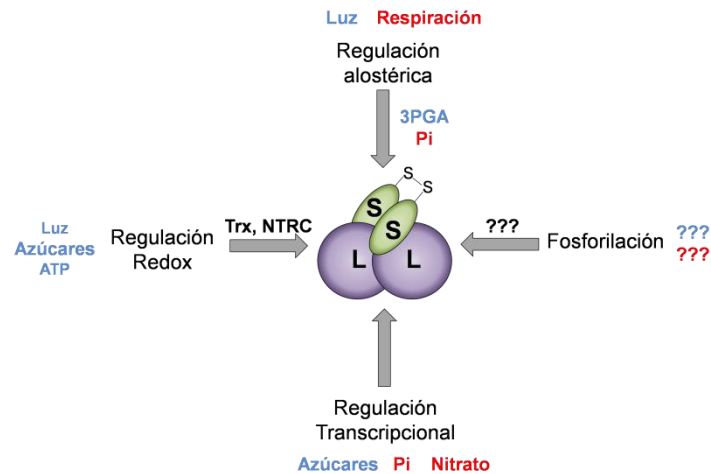


Figura I. 13. Mecanismos de regulación de la AGPasa plastidial. La regulación alostérica permite un ajuste rápido de la actividad de la AGPasa en función de los niveles de intermediarios fosforilados. Mediante la regulación redox se producen cambios graduales en la actividad de la AGPasa. La regulación transcripcional ejerce el control a largo plazo, permitiendo el ajuste de la tasa de síntesis de almidón. En hojas de *Arabidopsis* las subunidades APS1 y APL1 han sido identificadas como posibles dianas de fosforilación reversible, sin embargo, aún se desconoce la relevancia de dicho mecanismo en la regulación de la AGPasa *in vivo*. En azul se resaltan los elementos activadores de la AGPasa y en rojo los inhibidores. Adaptado de Geigenberger (2011).

- Regulación transcripcional.** Se trata de un mecanismo de control a largo plazo sobre los niveles de expresión de los genes que codifican para la AGPasa. Aunque se desconocen el mecanismo y la cascada de señalización que conducen a esta regulación, se ha comprobado que el incremento de azúcares provoca un aumento en los niveles de mRNA de algunos de los genes que codifican para esta enzima (Muller-Rober et al., 1990; Sokolov et al., 1998; Crevillen et al., 2005). Por el contrario, los niveles elevados de nitrato o fosfato producen una disminución de los mismos (Nielsen et al., 1998). Mediante este mecanismo de regulación, puede controlarse la acumulación de almidón en respuesta a cambios en las condiciones ambientales o nutricionales.
- Regulación alostérica.** A nivel post-traducciona, la AGPasa se regula alostéricamente por metabolitos intermediarios de las diferentes vías de asimilación del carbono, que actúan como indicadores del estado energético de la célula. Así, se ha demostrado que el 3-fosfoglicerato (3-PGA) actúa como activador de la AGPasa mientras que el P_i actúa como inhibidor (Ghosh and Preiss, 1966). Las isoformas citosólicas de la enzima presentes en el endospermo de cereales son en gran medida

insensibles a estos efectores (Doan et al., 1999; Gómez-Casati and Iglesias, 2002; Ballicora et al., 2004).

- **Regulación redox.** Las AGPasas plastidiales de plantas están sujetas a este mecanismo de regulación post-transduccional. La reducción de un puente disulfuro formado entre dos Cys de las subunidades pequeñas provoca su monomerización y la consiguiente activación de la enzima. La reducción de la enzima provoca un cambio drástico en sus propiedades cinéticas, debido a un incremento de la afinidad por el sustrato y de mayor sensibilidad al activador alostérico 3-PGA e insensibilidad al inhibidor PPI (Tiessen et al., 2002). Se ha demostrado que tanto las Trxs como NTRC están implicadas en la regulación redox de la AGPasa en plastos.

Estudios recientes en arroz han puesto de manifiesto que, aunque la AGPasa citosólica de cereales no conserva la Cys reguladora de la subunidad pequeña, sí podría estar sometida a regulación redox a través de dos Cys (Cys⁴⁷ y Cys⁵⁸ en arroz) presentes en la subunidad grande L2. Se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que mutantes de AGPasa alterados en estos residuos poseen menor actividad catalítica y menor sensibilidad al 3-PGA, abriendo también la posibilidad de la posible regulación alostérica de la isoforma citosólica de la AGPasa (Tuncel et al., 2014).

I.1.5.3. Degradación del almidón

Durante la germinación de la semilla, el almidón almacenado en el endospermo de reserva se degrada para aportar a la nueva plántula la energía necesaria al inicio de su crecimiento y desarrollo.

Como se ha descrito anteriormente, el proceso de germinación se encuentra altamente regulado por hormonas. Cuando los niveles de GA aumentan, el escutelo y la aleurona liberan al endospermo las enzimas hidrolíticas necesarias para la degradación del almidón. Además, la liberación de proteasas desde la capa de aleurona provoca la activación de β -amilasas acumuladas en el endospermo durante el desarrollo de la semilla. El principal producto de la degradación del almidón es la glucosa que es transferida al embrión (Zeeman et al., 2010).

En el endospermo se han identificado diferentes enzimas relacionadas con la degradación del almidón: α -amilasas, β -amilasas, α -glucosidasas (maltasas) y DBE, en concreto LDA. Sin embargo, la importancia de cada una de estas enzimas durante este proceso es poco conocida. Se cree que las α -amilasas juegan un papel principal en la degradación de almidón en el endospermo debido a que su síntesis tiene lugar de forma masiva durante la germinación y a que su supresión en endospermo de arroz provoca el retraso de la misma (Fincher, 1989; Asatsuma et al., 2005; Zeeman et al., 2010). Estas enzimas inician la degradación del gránulo de almidón por sitios específicos de su superficie y liberan glucanos lineales y ramificados. Estos fragmentos son posteriormente degradados por las α y β -amilasas y DBE generando maltosas y malto-oligosacáridos que, por medio de las α -glucosidasas, son degradados hasta glucosa (Zeeman et al., 2010).

I.2. BRACHYPODIUM DISTACHYON COMO ORGANISMO MODELO EN EL ESTUDIO DE CEREALES

El uso de organismos modelo no sólo permite estudiar procesos que resultan difíciles de analizar en otras especies, sino que también contribuye al desarrollo de nuevas herramientas que permiten avanzar significativamente en el conocimiento de dichos procesos.

Arabidopsis thaliana ha sido designada como el principal organismo modelo en el estudio de plantas. Sin embargo, su uso se encuentra limitado a la hora de analizar procesos característicos de un grupo concreto de plantas como las monocotiledóneas, que incluye especies de gran importancia agronómica. Tanto el arroz (*Oryza sativa*) como el maíz (*Zea mays*) han sido empleados como sistemas modelo en el estudio de cereales. El hecho de que estas especies presenten algunas desventajas, como el gran tamaño de la planta, largos tiempos de generación y requerimientos complejos para su crecimiento (Jung et al., 2008), llevó a proponer en 2001 el uso de *Brachypodium distachyon* como sistema modelo para el estudio de cereales (Draper et al., 2001).

Brachypodium distachyon es una gramínea anual, nativa del sur de Europa, norte de África y suroeste asiático, perteneciente a la familia *Poaceae*, subfamilia

Pooideae, a la cual pertenecen cereales de gran importancia agronómica como el trigo o la cebada. A pesar de que los análisis filogenéticos han determinado que esta especie es evolutivamente más cercana a los cereales de clima templado que a los tropicales (Figura I. 14), estudios estructurales de su genoma han demostrado que tanto el contenido como la organización de sus genes son más similares al de cereales tropicales, colocándolo en un punto intermedio entre ambos grupos de cereales.

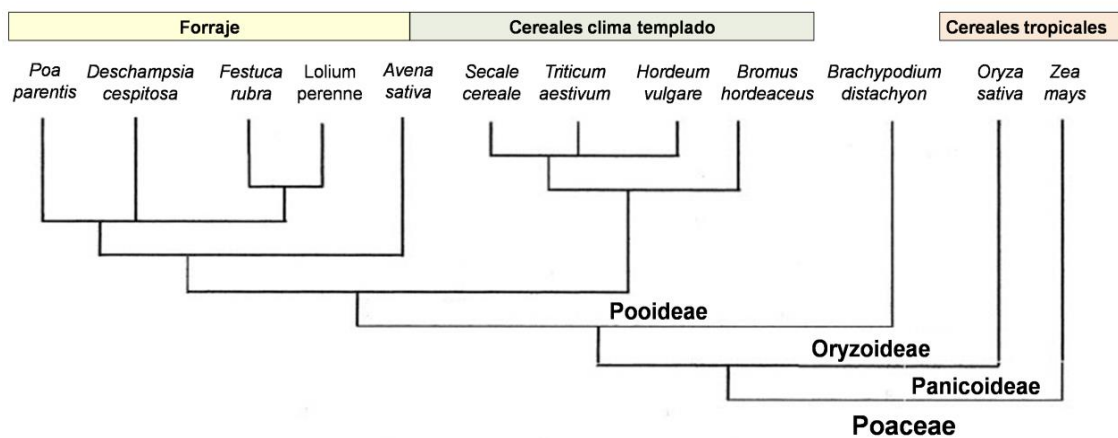


Figura I. 14. Esquema de la relación filogenética de *Brachypodium* con otras especies de cereales. Adaptado de Draper et al. (2001).

La utilidad de *Brachypodium* como organismo modelo (Draper et al., 2001) se basa en el pequeño tamaño de su genoma (~272 Mb), con un bajo contenido de secuencias de DNA repetidas (~28%) (Brkljacic et al.), y la disponibilidad de la secuencia completa del genoma de la línea Bd21 desde 2010. Además, es fácil de cultivar, es autógama, de pequeño tamaño, tiene un ciclo de vida corto, de 3 a 4 meses, y es transformable por el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Vogel et al., 2006). En la Tabla I. 1 se resumen algunas de las principales características de *Brachypodium* en comparación con otras especies modelo de cereales.

Tras la secuenciación de su genoma, se ha desarrollado una gran batería de herramientas, tanto bioinformáticas como moleculares, que han facilitado el uso de *Brachypodium* como organismo modelo: acceso a la secuencia completa del genoma, mapa genético de alta resolución, colecciones de germoplasma, colecciones de líneas mutantes por inserción de T-DNA y mutagénesis química con EMS (metanosulfonato

de etilo), además de estudios detallados relacionados con procesos del desarrollo de la planta (Mur et al., 2011; Shan et al., 2013).

Tabla I. 1. Comparación de organismos modelo de cereales. Adaptado de Brkljacic et al. (2011).

| | <i>Brachypodium</i> | Cebada | Trigo | Arroz | Maíz |
|----------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| Familia | <i>Pooideae</i> | <i>Pooideae</i> | <i>Pooideae</i> | <i>Oryzoideae</i> | <i>Panicoideae</i> |
| Nº Cromosomas y ploidía | 10 2x | 14 2x | 42 6x | 24 2x | 20 2x |
| Tamaño Genoma (Mpb) | 272 | 5.500 | 16.000 | 382 | 2.300 |
| Fertilización | Autógama | Autógama | Autógama | Autógama | Cruzada |
| Ciclo de vida (semanas) | 8-12 | 10-20 | 10-20 | 12-24 | 8-15 |
| Nº semillas por planta | 100-1.000 | 150-200 | 50-150 | >1.000 | 200-1.000 |
| Requerimiento crecimiento | Simple | Intermedio | Intermedio | Exigente | Exigente |
| Genoma secuenciado | Secuenciado | Secuenciado | En progreso | Secuenciado | Secuenciado |
| Eficiencia transformación | Muy eficiente | Eficiente | Ineficiente | Muy eficiente | Eficiente |

Numerosos estudios realizados en los últimos años han confirmado la validez de esta especie como modelo para el estudio de diferentes procesos en cereales, incluyendo la formación radicular (Chochois et al., 2012), desarrollo y germinación de la semilla (Opanowicz et al., 2011; Guillon et al., 2012), floración (Christopher J. Schwartz et al., 2010; Higgins et al., 2010), transporte de cobre en raíces (Ha-il Jung et al., 2014), interacción planta patógeno (Routledge et al., 2004; Peraldi et al., 2011), respuesta hipersensible (Ayliffe et al., 2013; Figueroa et al., 2013), y tolerancia a sequía (Luo et al., 2011; Verelst et al., 2013). Además, se ha utilizado en estudios de mejora genética destinados a la producción de biocombustibles de segunda generación (Bevan et al., 2010; Bouvier d'Yvoire et al., 2013).

1.2.1. Estructura de la semilla de *Brachypodium*

La estructura de la semilla de *Brachypodium* es la de una cariósipide típica similar a la de cereales como trigo y cebada. Sus semillas son relativamente grandes en comparación con el pequeño porte de la planta. En general poseen una longitud no superior a los 6 mm, una anchura de 1,3 - 1,6 mm y un peso medio que oscila entre los

3,5 a 6 mg/semilla (Trafford et al., 2013; Tyler et al., 2014), por lo que en comparación con algunas semillas de gran interés agronómico, como arroz o trigo, son aproximadamente un 60-80% más pequeñas que estas últimas (Figura I. 15).



Figura I. 15. Comparación de semillas maduras de distintos cereales. *Brachypodium distachyon* (Bd), *Triticum aestivum* (Ta), *Oryza sativa* (Os) y *Hordeum vulgare* (Hv).

Estudios recientes han puesto de manifiesto diferencias en la composición del endospermo de *Brachypodium* respecto a la mayoría de cereales domésticos. Así, mientras que en la mayoría de cereales el almidón es el principal carbohidrato de reserva, con un 50-70% del peso seco total de la semilla madura, en *Brachypodium* el almidón representa tan sólo del 6 al 12% del peso total seco de la semilla madura (Guillon et al., 2011; Tanackovic et al., 2014). En su semilla el almidón se dispone formando un gradiente, siendo más abundante en la parte proximal de la semilla (cerca del embrión) que en la parte distal. Sus gránulos de almidón, aplanados y de pequeño tamaño, son de tipo B (2,5-10 μm) y C (0,5-2,5 μm), y carece de gránulos tipo A ($\geq 10 \mu\text{m}$), típicos de la mayoría de cereales (Opanowicz et al., 2011; Chen et al., 2014; Tanackovic et al., 2014). Ambos tipos de polímeros, amilosa y amilopectina, están presentes en estos gránulos en una proporción similar a la de cebada. Sin embargo, el nivel de fosforilación de los gránulos de almidón en *Brachypodium* es la mitad del determinado en cebada, lo que sugiere diferencias en su movilización (Tanackovic et al., 2014).

La carencia de almidón en las semillas de *Brachypodium* se ve compensada por un mayor depósito de (1,3;1,4)- β -glucanos en las paredes celulares de sus granos, siendo el responsable del engrosamiento de estas paredes tanto en el endospermo como en las células de aleurona. A diferencia de otros cereales, como la avena o

cebada donde los (1,3;1,4)- β -glucanos suponen del 4 al 10% del peso seco de la semilla, o del maíz, trigo y sorgo donde tan sólo representa del 0,06 al 1%, en *Brachypodium* este polisacárido supone hasta un 45% del peso total de la semilla madura, constituyendo la principal reserva de carbohidratos (Burton and Fincher, 2012, 2014).

En cuanto a los monosacáridos, el endospermo de *Brachypodium* se compone principalmente de glucosa (90% del total de monosacáridos), con cantidades inferiores de xilosa (4,2%) y arabinosa (3,7%), y sólo pequeñas trazas de manosa y galactosa (Guillon et al., 2011).

Las proteínas de reserva en *Brachypodium* suponen un 16-21% del peso total de la semilla, a diferencia de los cereales domésticos como cebada, arroz, trigo o maíz, con un contenido del 7-15%. Estudios recientes de fraccionamiento proteico del endospermo de *Brachypodium* muestran que las globulinas, fundamentalmente la globulina 11S y 7S, son las principales proteínas de reserva (Laudencia-Chingcuanco and Vensel, 2008; Larre et al., 2010; Wang et al., 2010; Guillon et al., 2012). Las globulinas 7S son muy similares a las presentes en el embrión y aleurona de granos de maíz, por lo que se cree que en *Brachypodium* esta proteína debe tener la misma localización (Larre et al., 2010). Las globulinas 11S, por su parte, se almacenan en cuerpos proteicos de las células del endospermo, rodeando a los gránulos de almidón (Larre et al., 2010). Por otra parte, tan sólo se han identificado dos tipos de prolaminas, γ -gliadinas y aveninas, en el endospermo de *Brachypodium*. Estas proteínas se caracterizan por un alto contenido en glutamina y cisteína y representan tan sólo un 5% del total de proteínas de reserva en *Brachypodium*. Mientras las prolaminas representan la principal fuente de reserva proteica en semillas de trigo, cebada o maíz, la composición de proteínas de reserva de las semillas de *Brachypodium* es mucho más similar a la de arroz o avena, donde las globulinas representan en torno al 50% del total de proteínas de reserva y las prolaminas no superan el 12%.

Finalmente, el contenido de ácidos grasos en *Brachypodium*, no supera el 1,65% respecto al peso total de la semilla, siendo muy similar al de avena e inferior al

de arroz (16%) o trigo (10%). La composición de ácidos hidroxicinámicos es similar al de la mayoría de cereales, estando compuesto principalmente por ácido ferúlico y ácido p-cumárico (Guillon et al., 2011; Guillon et al., 2012).

I.3. OBJETIVOS

El objetivo central de esta tesis doctoral ha consistido en generar plantas transgénicas de *Brachypodium distachyon* con niveles alterados de NTRC en endospermo de semillas para estudiar el efecto sobre los niveles de polisacáridos y proteínas de reserva. Como paso previo se ha realizado la caracterización del gen *NtrC* de cereales.

Parte de los resultados obtenidos en el curso de esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos y aportaciones a congresos:

- **Victoria A. Nájera**, Maricruz González, Francisco Javier Cejudo. *The NtrC gene undergoes alternative splicing*. XIII-Congreso Luso-Español de Fisiología Vegetal. 2013. Lisboa, Portugal.
- **Victoria A. Nájera**, Maricruz González, Francisco Javier Cejudo. *Generation of Brachypodium distachyon transgenic plants expressing NTRC in seed endosperm*. XXI-Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal, XIV-Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. 2015. Toledo, España.
- Puerto-Galán, L., Pérez-Ruiz, J.M., Ferrández, J., Cano, B., Naranjo, B., **Nájera, VA.**, González, M., Lindahl, A. M., Cejudo, F. J. (2013). *Overoxidation of chloroplast 2-Cys peroxiredoxins: balancing toxic and signaling activities of hydrogen peroxide*. **Front Plant Sci 4**.
- **Victoria A. Nájera**, Maricruz González, Juan Manuel Pérez-Ruiz and Francisco Javier Cejudo (2017). *An event of alternative splicing affects the expression of the NTRC gene, encoding NADPH-thioredoxin reductase C, in seed plants*. **Plant Sci. En prensa** doi: 10.1016/j.plantsci.2017.02.001

- Valle Ojeda, Juan Manuel Pérez-Ruiz, Maricruz González, **Victoria A. Nájera**, Mariam Sahrawy, Antonio J. Serrato, Peter Geigenberger and Francisco Javier Cejudo. *Redox homeostasis of chloroplast cotyledons is essential for early plant development*. **En revisión**.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. MATERIAL VEGETAL

Para la realización de este trabajo se ha utilizado principalmente la especie de cereal *Brachypodium distachyon*. Además de este cereal, en algunos experimentos concretos también se han utilizado la plantas *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* (tomate).

II.1.1. Esterilización de semillas

A) Esterilización de semillas de *Brachypodium*

Las semillas de *Brachypodium* se esterilizaron mediante incubación en NaOCl 3% (v/v) durante 25 min con agitación y en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Posteriormente, las semillas se sometieron a dos lavados con agua destilada estéril, un lavado con HCl 0,01 M y, finalmente, cinco lavados con agua destilada estéril (Abdul-Baki, 1974).

B) Esterilización de semillas de *Arabidopsis*

Las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron mediante exposición a vapores de cloro (Bent, 2006). Para ello, las semillas se depositaron en tubos *Eppendorf* abiertos, colocados sobre una gradilla, en presencia de 100 ml de NaOCl 5% (v/v) y HCl 1,5% (v/v). Tras añadir el HCl se aplicó inmediatamente vacío. Debido a que un tiempo excesivo en estas condiciones puede provocar una baja tasa de germinación de las semillas, la esterilización se realizó como máximo durante 4 h. Todo este proceso se efectuó en una campana de extracción de gases.

C) Esterilización de semillas de tomate

Bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, las semillas de tomate se lavaron en primer lugar con etanol 70% (v/v) durante 1,5 min. Posteriormente, se eliminó el etanol y se añadió una solución NaOCl 1,5% (v/v) y Tween®20 10% (v/v) preparada en agua destilada estéril, donde se incubaron durante 25 min en agitación. Finalmente, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

II.1.2. Germinación de semillas y condiciones de cultivo

A) Semillas de *Brachypodium*

Para la realización de experimentos de germinación, las semillas de *Brachypodium* se esterilizaron e incubaron en placas Petri provistas de papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. Las placas se incubaron durante 2 días en frío (4°C) y oscuridad. Posteriormente, se mantuvieron a temperatura ambiente (22-25°C) y oscuridad durante 2 días más. De esta forma, se logra sincronizar la germinación y se obtiene una mayor tasa de germinación. Finalmente, según el tipo de experimento a realizar, las placas se expusieron a un fotoperiodo de día largo (16 h de luz/8 h oscuridad) o se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente. El material obtenido se diseccionó, se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su uso.

Para la obtención de plantas adultas, las semillas se germinaron de igual forma que en el caso anterior. Tras 3 días en luz, los brotes se trasplantaron a macetas conteniendo turba vegetal y se cultivaron en condiciones de día largo, a una temperatura de 22-25°C y una humedad relativa aproximada del 60%. Las plantas se regaron cada 2 días con agua y una vez por semana con medio *Hoagland* compuesto por:

- Macronutrientes (NH₄)₂PO₄ 5 mM; KNO₃ 3 mM; Ca(NO₃)₂ · 4H₂O mM; MgSO₄ · H₂O 1 mM.
- Micronutrientes: H₃BO₃ 23,12 μM; MnCl₂ · 4H₂O 4,57 μM; ZnSO₄ · 7H₂O 0,38 μM; CuSO₄ · 5H₂O 0,16 μM; Na₂MoO₄ · 2H₂O 0,05 μM.
- Fe clafwer-600 (Azko Chemical) 0,0005 % (p/v).

B) Semillas de *Arabidopsis*

Las semillas estériles de *Arabidopsis* se sembraron en medio sólido estéril Murashige y Skoog (MS, Duchefa) 4,4 g/l, suplementado con sacarosa 5 g/l y MES 0,5 g/l. El pH se ajustó a 5,7 con KOH 1 M. Para su solidificación se empleó Gelrite (Duchefa) 3 g/l. Las placas, una vez sembradas, se mantuvieron en oscuridad y frío (4°C) durante 3 días para promover y sincronizar la germinación. Tras este tiempo, se incubaron en posición vertical en condiciones de día largo y 22°C. El material vegetal

obtenido se diseccionó, se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su uso.

C) Semillas de tomate

Para la obtención de plántulas de tomate, las semillas se esterilizaron e incubaron en placas Petri provistas de papel de filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. Las placas se mantuvieron durante 2 días en frío (4°C) y oscuridad. A continuación, se cambiaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en oscuridad durante 2 días. Finalmente, se crecieron en condiciones de día largo durante 5 días. El material vegetal obtenido se diseccionó, se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su uso.

II.2. BACTERIAS

II.2.1. Bacterias empleadas

Las estirpes de bacterias empleadas durante este trabajo, junto con algunas de sus características genotípicas, se describen en la Tabla II. 1. Para la clonación y conservación de plásmidos se empleó la estirpe DH5 α de *Escherichia coli*. Para los experimentos de transformación de callos de *Brachypodium* se empleó la estirpe AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*. La conservación de las bacterias se realizó en medio LB con glicerol 25% (v/v) a -80°C . En el caso de las bacterias transformadas, este medio se suplementó con el antibiótico correspondiente.

Tabla II. 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo y sus correspondientes genotipos.

| Bacteria | Genotipo |
|--|--|
| <i>Escherichia coli</i> (DH5 α) | supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AGL1) | F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Smr) xyl5 Δ leu mtl1 |

I.2.2. Cultivos de bacterias en medio líquido y sólido

Las bacterias se cultivaron a 37°C (*E. coli*) o 28°C (*Agrobacterium*), en estufas (medios sólidos) o incubadores con agitación a 200 r.p.m. (medios líquidos). En ambos casos, se empleó como medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). Este medio se compone de triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l y, cuando el medio requería ser solidificado, agar 15 g/l. Los medios LB se suplementaron con los antibióticos necesarios tanto para la selección de cepas portadoras del plásmido deseado, como para el posterior cultivo de las mismas. Las concentraciones normales de uso para cada antibiótico quedan recogidas en la Tabla II. 2.

Tabla II. 2. Concentraciones de los antibióticos empleados en este trabajo según vector o estirpe bacteriana*.

| Antibiótico | Concentración | Vector |
|--------------------|---------------|-----------------|
| Ampicilina (Amp) | 100 µg/ml | pGemT |
| Kanamicina (Kan) | 50 µg/ml | pBrachyTAG-G210 |
| Rifampicina (Rif) | 50 µg/ml | *AGL1 |
| Tetraciclina (Tet) | 5 µg/ml | pSoup |

II.2.3. Obtención de bacterias competentes

Las bacterias competentes de *E. coli* DH5α fueron suministradas por el servicio de cultivos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF).

La obtención de *Agrobacterium* AGL1 electro-competente se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación. A partir de colonias aisladas de *Agrobacterium*, se tomó una colonia y se creció un pre-inóculo en 10 ml de medio LB suplementado con rifampicina durante 2 días a 28°C y con agitación. A continuación, se añadió el pre-inóculo a un matraz con 500 ml de medio LB fresco sin antibiótico y se dejó crecer hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0,5-1, momento en el que el cultivo se centrifugó durante 20 min a 1.500 g y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 250 ml de agua milliQ estéril fría y se centrifugó de nuevo a 1.500 g durante 20 min. Este paso se repitió 2 veces más, disminuyendo en cada caso a la mitad el volumen de agua empleado. Tras el último lavado, el precipitado se resuspendió en 1 ml de glicerol

10 % (v/v) estéril frío y se distribuyó en alícuotas que se conservaron a -80°C hasta su uso.

II.2.4. Transformación de células

La transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α con el plásmido deseado se realizó mediante choque térmico. Para ello, se mezclaron 100 μ l de células competentes, previamente descongeladas, con un volumen inferior a 10 μ l que contenía como máximo 100 ng del DNA plasmídico. La mezcla se homogeneizó y se incubó en hielo 15 min. Posteriormente, se sometió a un choque térmico de 42°C durante 90 s seguido de una incubación en hielo durante 10 min. Las células se cultivaron, tras añadir 800 μ l de medio LB, durante 1 h a 37°C con agitación. Finalmente, las bacterias se sembraron en medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado para conseguir la selección de las colonias positivas. En aquellos casos en los que se pretendía seleccionar transformantes del vector pGEM-T por color (Sambrook et al., 1989), el medio sólido se suplementó además con IPTG 0,2 mg/ml y X-Gal 0,04 mg/ml. Este método permite identificar clones portadores de moléculas recombinantes gracias a la inactivación de la actividad β -galactosidasa por la inserción en el gen *lacZ*. Las colonias con plásmidos recombinantes mostrarían color blanco, frente al color azul de las que no fuesen portadoras.

La transformación mediante electroporación de células competentes AGL1 con el vector deseado se llevó a cabo en cubetas de 2 mm (*Cell projects*) con el equipo *Easyject optimo* (EQUIBIO) con un pulso de 2.500 V durante 19,1 ms. De inmediato, se añadió LB a las bacterias y se cultivaron durante 1 h a 37°C con agitación. Posteriormente, las bacterias se sembraron en placas con medio LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados.

II.3. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

II.3.1. Aislamiento de DNA plasmídico

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el kit *DNA spin Plasmid DNA purification* (iNtRON Biotechnology) según las instrucciones del

fabricante. En general, la cantidad y calidad del DNA plasmídico obtenido mediante este método fueron adecuadas para su posterior uso.

II.3.2. Extracción de DNA genómico de tejidos vegetales

Para el aislamiento del DNA genómico el material vegetal, previamente congelado y triturado con ayuda de nitrógeno líquido, se mezcló con 300 µl de tampón de extracción 2x CTAB [bromuro de cetiltrimetilamonio 2% (p/v); NaCl 1,4 M; TrisHCl 100 mM pH 8; EDTA 20 mM] (Lukowitz et al., 2000), se homogeneizó con ayuda de un vórtex y se transfirió a tubo *Eppendorf*. A continuación, se incubó a 65°C durante al menos 10 min. Una vez enfriado, se añadió 300 µl de cloroformo y, tras mezclar en vórtex, se centrifugó durante 10 min a 16.000 g a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se mezcló con 1 volumen de etanol absoluto frío. A continuación, se centrifugó a 16.000 g durante 15 min a 4°C para precipitar el DNA. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con etanol 70% (v/v). Tras centrifugar, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, el DNA se resuspendió en agua milliQ estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

II.3.3. Extracción de RNA de tejidos vegetales y retrotranscripción

A) Aislamiento de RNA de hojas y raíces

La extracción de RNA total de hojas y raíces se llevó a cabo con el reactivo *Trisure* (Bioline). El material vegetal previamente congelado y triturado se colocó en un tubo *Eppendorf* al que se le añadió 1 ml de *Trisure*. Tras homogeneizar en vórtex e incubar 5 min a temperatura ambiente, se añadió 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 s y se centrifugó a 12.500 g durante 15 min. Al sobrenadante se le añadió 500 µl de isopropanol frío y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 4°C durante 10 min a 16.000 g. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó mediante centrifugación con 500 µl de etanol 85% (v/v). Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, el RNA se resuspendió en agua tratada con DEPC estéril.

B) Aislamiento de RNA de endospermo de semillas de *Brachypodium*

La presencia de almidón en el endospermo de semillas de cereales interfiere con el reactivo *Trissure* por lo que en este tipo de tejidos, para la extracción de RNA, se siguió el método descrito por Baulcombe and Buffard (1983). Las semillas se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se transfirió a tubo *Eppendorf*. A cada tubo se le añadió 500 µl de tampón de extracción [NaCl 0,1 M; Tris-HCl 50 mM pH 9; EDTA 10 mM pH 8; SDS 2% (p/v) y β-mercaptoetanol 14 mM] y, tras mezclar por inversión, se incubó 10 min en hielo. Posteriormente, las proteínas de la muestra se extrajeron con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Para ello, se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se agitó en vórtex y se centrifugó a 800 g durante 5 min a 4°C. La extracción se repitió para la fase acuosa hasta un total de 3 veces. Tras la última extracción, se tomó la fase acuosa, se le añadió 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó a -20°C durante 1 h, con objeto de precipitar los ácidos nucleicos. Posteriormente, se centrifugó a 4.500 g durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70% (v/v). Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 250 µl de agua DEPC estéril a la que se le adicionó 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (con objeto de precipitar el almidón pero no los ácidos nucleicos), se agitó por inversión y se centrifugó a 16.000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se precipitó de nuevo con 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó durante 1 h a -20°C. Una vez centrifugado, a 16.000 g durante 10 min a 4°C, el precipitado obtenido se resuspendió en 250 µl de LiCl 3 M y se incubó en hielo durante 60 min. A continuación, se centrifugó a 16.000 g durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 100 µl etanol 70% (v/v). Una vez seco, el precipitado de RNA se resuspendió en agua tratada con DEPC estéril.

II.3.3.1. Tratamiento del RNA con DNasa y electroforesis de RNA

Las muestras de RNA se trataron con DNasa libre de RNasas antes de ser usadas, con objeto de eliminar el DNA genómico contaminante. Para ello, se utilizó el kit comercial *DNA-free™ DNA Removal Kit* (Ambion).

Para comprobar la integridad del RNA de las muestras se tomaron 250 – 500 ng de las mismas y se analizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al

1,5% (p/v) en tampón 1x TAE [Tris 40 mM; acetato 20 mM, EDTA 1 mM pH 8]. Las muestras, antes de ser cargadas en el gel, se suplementaron con tampón de carga 10x [azul de bromofenol 0,125% (p/v); SDS 0,625% (p/v) y glicerol 62,5% (v/v)]. Para la detección del RNA se añadió bromuro de etidio a los geles a una concentración final de 0,5 µg/ml, y se visualizaron mediante el uso de un transiluminador de luz ultravioleta. Cuando el RNA no está degradado se observan dos bandas mayoritarias y definidas correspondientes a los rRNA 18S y 28S.

II.3.3.2. Retrotranscripción

La retrotranscripción (RT) del RNA total aislado de distintos tejidos vegetales se realizó con el kit *Maxima first strand cDNA synthesis for RT-qPCR* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo con 1 µg de RNA en un volumen de reacción de 20 µl.

II.3.4. Cuantificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop ND-100* (Agilent Technologies) midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. La absorbancia a 260 nm es una medida de la cantidad de ácidos nucleicos presente en las muestras, mientras que la absorbancia a 280 nm indica la posible contaminación por proteínas o compuestos fenólicos. Por este motivo, es importante observar el valor DO_{260}/DO_{280} que da una idea de la integridad de las muestras. Para el DNA se considera óptimo un valor de ~1,8, mientras que para el RNA, un valor de ~2.

II.4. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

II.4.1. Técnica de PCR

A) Amplificación de fragmentos de DNA

Para la amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR convencional, se utilizó la polimerasa *GoTaq® DNA polimerase* (Promega) y los reactivos suministrados por su fabricante. Cada reacción se preparó en un volumen final de 25 µl, tal y como se describe en la Tabla II. 3.

Tabla II. 3. Reactivos y volúmenes empleados para PCR convencional.

| Componentes | Volumen |
|----------------------------------|-------------|
| 5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer | 5 µl |
| MgCl ₂ 25 mM | 1,5 µl |
| dNTP mix 10 mM | 0,5 µl |
| Forward primer 50 µM | 0,5 µl |
| Reverse primer 50 µM | 0,5 µl |
| Polymerase GoTaq® (5 U/µl) | 0,125 µl |
| DNA/cDNA | X µl* |
| H ₂ O ₂ | Hasta 25 µl |

* El volumen final de las soluciones de DNA empleadas fue variable según el caso.

Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el fabricante, variando el tiempo de extensión en función del tamaño de los fragmentos a amplificar (30 s por cada 500 pb) y la temperatura de alineamiento según la pareja de oligonucleótidos empleada.

B) Clonación de cDNAs

Para el caso de clonaciones de cDNAs completos, la amplificación de los fragmentos se realizó usando la polimerasa de alta fidelidad *iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Bio-Rad). En este caso cada reacción se preparó en un volumen final de 50 µl según se describe en la Tabla II. 4.

Tabla II. 4. Reactivos y volúmenes para PCR con la polimerasa iProof.

| Componentes | Volumen |
|-------------------------------|-------------|
| 5x iProof HF Buffer | 10 µl |
| MgCl ₂ 25 mM | 3 µl |
| dNTP mix 10 mM | 1 µl |
| Forward primer 50 µM | 0,5 µl |
| Reverse primer 50 µM | 0,5 µl |
| Polymerase iProof (2 U/µl) | 0,5 µl |
| DNA | X µl* |
| H ₂ O ₂ | Hasta 50 µl |

* El volumen final de las soluciones de DNA empleadas fue variable según el caso.

Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el fabricante, variándose el tiempo de extensión en función del tamaño de los fragmentos a

amplificar (15 s por cada 500 pb) y la temperatura de alineamiento según la pareja de oligonucleótidos empleada.

II.4.1.1. Oligonucleótidos empleados para PCR convencional

Los oligonucleótidos utilizados para el análisis del procesamiento alternativo de los intrones del gen *NtrC* se describen en la Tabla II. 5.

Tabla II. 5. Oligonucleótidos empleados para el análisis del procesamiento alternativo de los intrones del gen *NtrC* de *Brachypodium distachyon*.

| Nombre oligonucleótido | Secuencia 5'-3' | Intrón |
|------------------------|-------------------------|--------|
| BdNTRC-11-F | CCTCCAAGCCCCTACACG | 1 |
| BdNTRC-11-R | CACCTGGTACCCTTCGAAGA | |
| BdNTRC-12-F | TCTTCGAAGGGTACCAGGTG | 2 |
| BdNTRC-12-R | CATCCTCCTGGTGAAGCTC | |
| BdNTRC-13-F | GAGCTTCACCAGGAGGATG | 3 |
| BdNTRC-13-R | CAAATATATCGCTTCCTCCG | |
| BdNTRC-14-F | CGGAGGAAGCGATATATTTG | 4 |
| BdNTRC-14-R | CTGTTTGGAGTATGCCCTATC | |
| BdNTRC-15-F | CAACAACCCCAACATAACAG | 5 |
| BdNTRC-15-R | CAGATCCAGCTGCAGTAACG | |
| BdNTRC-16-F | CGTTACTGCAGCTGGATCTG | 6 |
| BdNTRC-16-R | CCATCTCAACATCTTTGCCTG | |
| BdNTRC-17-F | CAGGCAAAGATGTTGAGATGG | 7 |
| BdNTRC-17-R | GAATACAGAACACAAATGAGACG | |
| BdNTRC-18-F | CGTCTCATTTGTGTTCTGTATTC | 8 |
| BdNTRC-18-R | CCTCCTCGATGTCAATTC | |
| BdNTRC-19-F | GAAATTGACATCGAGGAGG | 9 |
| BdNTRC-19-R | CTCCCGATATTCCTTCTTC | |

En la Tabla II. 6 se describen los oligonucleótidos empleados para la caracterización del procesamiento alternativo en el intrón 4 del gen *NtrC* de *Arabidopsis thaliana* y en el mismo intrón para las dos copias del gen en tomate.

Tabla II. 6. Oligonucleótidos empleados para el análisis del procesamiento alternativo del intrón 4 del gen *NtrC* de *Arabidopsis thaliana* y tomate.

| Nombre oligonucleótido | Secuencia 5'-3' | Intrón |
|------------------------|-------------------------|-------------------|
| F-I4AtNTRC | GCTTGTTTCGCAGAGATCAGTTG | 4 <i>AtNtrC</i> |
| R-I4AtNTRC | CGAGTTCGACTTGGCCTTCC | |
| F-I4NTRC4c_S.L. | GGACCAACTAAGGGCATCATAGG | 4 <i>SNtrC_04</i> |
| R-I4NTRC4c_S.L. | CGAGCACAGACTCTTCTCCTG | |
| F-I4NTRC10c_S.L. | GGACCAACTAAGAGCATCAAGAG | 4 <i>SNtrC_10</i> |
| R-I4NTRC10c_S.L. | CAAATTCCTCGACATCTGGC | |

Para la clonación de los cDNAs completos de NTRC y del promotor del gen *GLU1* de *Brachypodium* en pGEM-T se emplearon los oligonucleótidos recogidos en la Tabla II. 7.

Tabla II. 7. Oligonucleótidos empleados para clonaciones en pGEM-T.

| Nombre oligonucleótido | Secuencia 5'-3' | Producto |
|------------------------|---------------------------|-------------------|
| F-BdcNTRC | ATGGCGGTCACGCGC | Gen <i>BdNtrC</i> |
| R2-BdcNTRC | CTGCAACGAACACTGAGCTC | |
| F-PromotGLU1 | ACCGACGATGGTGTGAGC | Promotor |
| R-PromotGLU1 | AATTGTTTGAAGAGAAGAGAGAAGC | <i>BdGLU1</i> |

En la Tabla II. 8 se incluyen las parejas de oligonucleótidos empleadas para la clonación del promotor *GLU1*, el cDNA completo del gen *NtrC* de *Brachypodium*, el cDNA completo para el gen *NtrC* de arroz y el terminador *NOS* del vector pBrachyTAG-G210 (G210).

Tabla II. 8. Oligonucleótidos empleados para clonaciones en G210.

| Nombre oligonucleótido | Secuencia | Producto |
|------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| F-PGlu1_StuI | CGAGGCCTACCGACGATGGTGTGAGC | Promotor |
| R-PGlu1_ApaI | CAGGGCCCAATTGTTTGAAGAGAAGAGAGAAGC | <i>BdGLU1</i> |
| F-BdcNTRC_BsiwI | CTATCGTACGATGGCGGTCACGCGC | Gen <i>BdNtrC</i> |
| R-BdcNTRC_SacI | CCGAGCTCCTATTTGTTTCGATTTCGATGA | |
| F-OscNTRC_ApaI | GAGGGCCCATGGCGGTCACGCGC | Gen <i>OsNtrC</i> |
| R-OscNTRC_SacI | GGGAGCTCTCATTTGTTTGACTCGATAAAC | |
| F-NosT_SacI | GAGAGCTCGATCGTTCAAACATTTGG | Terminador |
| R-NosT_BsiwI | GGTTCGTACGGATCTAGTAACATAGATGACACC | <i>Nos</i> |

* En rojo se resalta la diana reconocida por la enzima de restricción empleada en cada caso.

Por último, en la Tabla II. 9, se describen otros oligonucleótidos empleados durante el desarrollo de este trabajo.

Tabla II. 9. Otros oligonucleótidos empleados durante el desarrollo del trabajo.

| Nombre oligonucleótido | Secuencia 5'-3' | Producto |
|------------------------|------------------------|------------------------|
| F2-PromotGlu1 | TGGAGTGAGGTCAGGAAGG | Promotor <i>BdGLU1</i> |
| F3tf-PromGlu1 | GAGAATGAACTCCTGATCAAGC | Promotor <i>BdGLU1</i> |
| R2-PromotGlu1 | CATCACCACGCACACAGAC | Promotor <i>BdGlu1</i> |
| Os_F3 | CAGGAGGATGTTGAGTTTGTG | Gen <i>OsNtrC</i> |
| Os_Rf4 | CACCACCTCCAACAACACTGC | Gen <i>OsNtrC</i> |
| Os_F6 | GTTACTGCAGCTGGATCC | Gen <i>OsNtrC</i> |
| Os_FT | CTCAGGACTGTCTCTGGTG | Gen <i>OsNtrC</i> |
| Rtrans_OsNTRC | GAGCCTATGATCACCAAGTTC | Gen <i>OsNtrC</i> |
| F-Hyg | GCAAGACCTGCCTGAAAC | Higromicina |
| R-Hyg | CCATCACAGTTTGCCAGTG | (vector pG210) |

II.4.1.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Para la cuantificación de los niveles de RNA mensajero se recurrió al análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Cada reacción de qPCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, según se describe en la Tabla II. 10.

Tabla II. 10. Reactivos y volúmenes empleados para qPCR.

| Componentes | Volumen |
|----------------------------------|---------|
| 5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer | 4 µl |
| MgCl ₂ 25 mM | 2 µl |
| dNTP mix 10 mM | 0,4 µl |
| Forward primer 100 µM | 0,03 µl |
| Reverse primer 100 µM | 0,03 µl |
| Sybr green | 2 µl |
| Polymerase (2% Go Taq) | 0,25 µl |
| cDNA | 10 µl |
| H ₂ O ₂ | 1,3 µl |

II.4.2.1. Oligonucleótidos para PCR cuantitativas

En la Tabla II. 11 se describen los oligonucleótidos empleados para la determinación de los niveles de expresión del gen *NtrC*, y de los genes de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GADH*) y ubiquitina 18 (*UBC18*) de *Brachypodium*.

Tabla II. 11. Oligonucleótidos empleados para qPCR en *Brachypodium distachyon*.

| Nombre oligonucleótido | Secuencia 5'-3' | Producto |
|------------------------|------------------------|----------------|
| F-BdqGAPDH | CCCCTAGCTAAGATCATCAATG | <i>BdGADPH</i> |
| R-BdqGAPDH | CTGGGTAGCAGTGATGGC | |
| F-BdqUBC18 | CTCAGGTCATTTTCCTCAACCC | <i>BdUbc18</i> |
| R-BdqUBC18 | CATTGCGGGTGACCAGGAG | |
| F2-BdqNTRC | TCTTGTTGAATTTACCCAGCC | <i>BdNtrC</i> |
| R2-BdqNTRC | AGATAGATCGAAGCCCATCTC | |

II.4.3. Visualización de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa preparados en tampón TAE. La concentración de agarosa en los geles varió entre el 0,8% y 4% (p/v), dependiendo del rango de resolución deseado. Las muestras se suplementaron con tampón de carga 10x [azul de bromofenol 0,125% (p/v); SDS 0,625% (p/v) y glicerol 62,5% (v/v)]. Como patrones de peso molecular se utilizaron la mezcla *100 bp Plus blue DNA ladder* (iNtRON Biotechnology) o preparaciones de restricciones de DNA del fago λ . Para la detección del DNA se añadió bromuro de etidio a los geles a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, y se visualizaron mediante un transiluminador ultravioleta (UV).

II.4.4. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA, una vez separados por electroforesis, se recortaron del gel bajo luz ultravioleta y se extrajeron mediante el uso del kit comercial *Total-Fragment DNA Purification* (iNtRON Biotechnology).

En aquellos casos en los que se requirió un mayor rendimiento en la purificación, ésta se realizó cortando un pocillo por delante de la banda a purificar una vez separados los fragmentos de DNA. El DNA a purificar se recogió mediante el relleno de dicho pocillo con polietilenglicol (PEG 8000) 30% (p/v) en TAE. El DNA se recuperó del PEG realizando una extracción con un mismo volumen de fenol:cloroformo. Tras agitar y centrifugar 5 min a 16.000 *g* a 4°C, se recuperó la fase acuosa, se le adicionó 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó a -20°C de 30 a 60 min. Tras este tiempo, el DNA se precipitó

mediante centrifugación a 16.000 *g* 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 70% (v/v). Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar completamente el precipitado y el DNA se resuspendió en 15 µl de agua milliQ estéril.

II.4.5. Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas en este trabajo fueron suministradas por Takara y Thermo Scientific. Las reacciones se efectuaron según las indicaciones recomendadas por los fabricantes.

II.4.6. Ligaciones

Las ligaciones en el vector pGEM-T se realizaron según las indicaciones suministradas con el kit *p-GEM-T® Vector System I* (Promega). Los ratios inserto:vector empleados normalmente fueron 3:1 ó 5:1, calculados según la siguiente fórmula:

$$\frac{ng \text{ de vector} \times \text{tamaño inserto (Kb)}}{\text{tamaño vector (Kb)}} \times \text{ratio molar inserto:vector} = ng \text{ de inserto}$$

Las ligaciones con otros vectores se realizaron mezclando las preparaciones de los fragmentos a ligar (inserto-vector) con T4 DNA Ligasa (USB) en el tampón de ligación adecuado. Para la reacción se emplearon entre 20 – 40 ng de DNA del vector y una proporción de inserto:vector 3:1 ó 5:1. En la mayoría de los casos, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 – 15 µl, utilizando el tampón suministrado por la firma comercial a una concentración final 1x. Las reacciones se mezclaron y se incubaron a 16°C durante 16 h. Tras este tiempo, la enzima se inactivó por incubación a 70°C durante 10 min.

En los casos en los que la enzima de restricción empleada producía extremos romos, la eficiencia de la reacción de ligación se incrementó mediante la adición de polietilenglicol (PEG-4000) 5% (p/v).

En aquellos casos en los que las restricciones se realizaron con una única enzima, los vectores linearizados se desfosforilaron antes de la ligación mediante el uso de fosfatasa alcalina FastAP *Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones suministradas por el fabricante.

II.4.7. Escrutinio de colonias mediante PCR

En una primera aproximación, las colonias procedentes de las transformaciones de bacterias se analizaron mediante PCR. Para ello, se preparó una suspensión de células de colonias aisladas en 20 µl de agua milliQ estéril. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, según se indica en la Tabla II. 12, utilizando 10 µl de la suspensión bacteriana.

Tabla II. 12. Reactivos y volúmenes empleados para el escrutinio de colonias transformadas.

| Componentes | Volumen |
|----------------------------------|---------|
| 5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer | 5 µl |
| MgCl ₂ 25 mM | 1,5 µl |
| dNTP mix 10 mM | 0,5 µl |
| Forward primer 50 µM | 0,5 µl |
| Reverse primer 50 µM | 0,5 µl |
| Polymerase (Go Taq 2%) | 0,3 µl |
| Suspensión bacteriana | 10 µl |
| H ₂ O ₂ | 6,7 µl |

El programa seguido para este tipo de PCR fue el siguiente:

| Paso previo | | | Programa PCR (x29) | | | Extensión final |
|---------------|---------------|--------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
| 95°C 5 min | 52°C 5 min | 72°C 45 s | 90°C 3 s | *Alineamiento 30 s | 72°C (1 min/Kb) | 72°C 5 min |

* Temperatura variable según la pareja de oligonucleótidos empleada.

II.4.8. Secuenciación automática de DNA

La secuenciación de los DNAs de doble cadena clonados en el curso de este trabajo se realizó por el servicio de secuenciación de Secugen, Madrid.

II.5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

II.5.1. Obtención de extractos totales de proteínas

Para la obtención de extractos totales de proteína el material vegetal se trituró con nitrógeno líquido, se homogeneizó en tampón de extracción [Tris-HCl 100 mM pH 7,9; MgCl₂ 10 mM; EDTA 1 mM pH 8; glicerol 10% (v/v); inhibidores de proteasas (Sigma) 1% (v/v) y PMSF 1 mM] y se transfirió a tubo *Eppendorf*. Tras centrifugar a 16.000 *g* durante 20 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante que contenía la fracción de proteínas solubles.

II.5.2. Fraccionamiento de proteínas de endospermo de semillas de *Brachypodium*

Para el fraccionamiento de proteínas de reserva del endospermo de semillas de *Brachypodium* se realizó una extracción secuencial, aprovechando la diferente solubilidad de las proteínas (Larre et al., 2010). En primer lugar, las semillas maduras (~15 semillas), se trituraron con nitrógeno líquido y se homogeneizaron en 0,9 ml de tampón A [tampón fosfato sódico 50 mM pH 8; NaCl 0,5 M e inhibidor de proteasas 1% (v/v)] manteniéndose toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, el extracto se centrifugó a 10.500 *g* durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante. El precipitado se lavó de nuevo con 1,5 ml de tampón A, uniéndose el sobrenadante obtenido con la fracción previamente obtenida. Estos dos sobrenadantes corresponden a la fracción de proteínas solubles en sal. Dicha fracción se dializó en agua destilada con objeto de eliminar las sales. El proceso de fraccionamiento se continuó con las proteínas presentes en el precipitado. Tras lavar con agua milliQ para eliminar restos de proteínas de la primera fracción, se añadieron 0,9 ml de tampón B [isopropanol o etanol 50% (v/v); DTT 1% (p/v) e inhibidor de proteasas 1% (v/v)] y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Tras centrifugar a 10.500 *g* durante 10 min a 4°C, se obtuvo el sobrenadante correspondiente a la fracción de proteínas soluble en alcohol. El precipitado obtenido se resuspendió en 450 µl de tampón C o tampón UCT [urea 8 M; CHAPS 2% (p/v); tiourea 2 M; DTT 18 mM e inhibidor de proteasas 1% (v/v)], mediante agitación durante la noche.

II.5.3. Cuantificación de proteínas

En general, las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (1976) con el reactivo comercial *Bradford Protein Assay* (Bio-Rad) según las indicaciones del fabricante. En aquellos casos en que el método Bradford no pudo emplearse, por interferencia con alguno de los reactivos presentes en el tampón de extracción utilizado, se usó el kit *Non interfering protein Assays™* (Calbiochem) según las indicaciones del fabricante.

II.5.4. Electroforesis de proteínas: SDS-PAGE

La separación analítica de las proteínas se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en sistema discontinuo (Laemmli, 1970). Los geles de separación se prepararon con diferentes porcentajes de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 29:1), según el rango de resolución deseado, y SDS 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 375 mM pH 8,8. Los geles de empaquetamiento, al 4% de acrilamida, contenían los mismos componentes excepto el tampón, que en este caso era Tris-HCl 125 mM pH 6,8. Los geles se polimerizaron con APS 0,5% (p/v) usando TEMED al 0,05% (v/v) como agente catalizador. Las muestras se suplementaron con tampón de carga (10x) compuesto por Tris-HCl 62 mM pH 6,8; glicerol 10% (v/v); SDS 2% (p/v) y azul de bromofenol 0,05% (p/v) en presencia o no de β -mercaptoetanol 5% (v/v) y DTT 10 mM, según se empleasen o no condiciones reductoras. Las muestras, antes de ser cargadas en el gel, se hirvieron a 95°C durante 5 min.

Los geles empleados fueron de dos tamaños diferentes. Geles de 8x6 cm y 1,5 mm de grosor (geles pequeños) que se dispusieron para la electroforesis en cubetas *Mini-Protean II-2D Cell* (Bio-Rad), a voltaje constante y temperatura ambiente. En otros casos, cuando la cantidad de proteína o la separación de las bandas deseada lo requería, se utilizaron geles de 16x18 cm (geles medianos) con separadores de 1,5 mm de grosor, que se dispusieron en cubetas *SE 600 Ruby* (GE Healthcare) a voltaje constante.

Como tampón de electroforesis se empleó una disolución de Tris-glicina que contenía Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 0,19 M y SDS 0,1% (p/v).

II.5.5. Electroforesis bidimensional

Para este tipo de electroforesis, debido a que las muestras empleadas procedían de extractos totales, se necesitó un paso previo de precipitación de las proteínas con TCA para eliminar sales y otras sustancias que pudiesen interferir en la movilidad de las muestras durante el isoelectroenfoque. Para ello, se añadió a cada muestra TCA a una concentración final del 10% (v/v) y se homogeneizó. Tras incubar 30 min en hielo, se centrifugó en frío a 16.000 *g* durante 20 min. El precipitado proteico se lavó dos veces con 400 μ l de acetona fría, centrifugándose a 16.000 *g* a 4°C, 20 min. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en tampón de rehidratación (Bio-Rad).

En función del punto isoeléctrico (pI) de la proteína de interés, se emplearon tiras IPG de Bio-Rad de 11 cm del rango de pH adecuado para cada caso. Las tiras se rehidrataron de forma pasiva con 200 μ l de tampón de rehidratación durante 12 h a 20°C. El isoelectroenfoque se realizó en el equipo *Protean IEF Cell* (Bio-Rad) según las indicaciones del fabricante.

La segunda dimensión se realizó mediante SDS-PAGE. En primer lugar, cada tira se incubó en tampón de equilibrado I [Tris-HCl 375 mM pH 8,8; urea 6 M, glicerol 20% (v/v) y SDS 2% (p/v)] suplementado con DTT 130 mM durante 10 min en agitación suave. Posteriormente, se lavó con tampón de equilibrado II (tampón de equilibrado I suplementado con iodoacetamida 135 mM) durante 10 min en agitación suave. Finalmente, tras lavar la tira con tampón 1x Tris-glicina, se colocó sobre el gel y se cubrió con *PROTEAN® Plus Overlay Agarose* (Bio-Rad) para fijarla al gel concentrador.

II.5.6. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Las proteínas se visualizaron rutinariamente mediante tinción con azul de *Coomassie*. Los geles se incubaron 30 min en agitación con solución de tinción de *Coomassie* [etanol 40% (v/v); ácido acético 10% (v/v); agua destilada 50% y azul *Coomassie* R-250 0,01% (p/v)]. Posteriormente, se destiñeron en una solución de etanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) en agitación, hasta la adecuada visualización de las bandas.

En aquellos casos en los que se requirió una mayor sensibilidad de la tinción se empleó *Coomassie* G-250. Esta tinción presenta algunas diferencias respecto a la tinción rutinaria con *Coomassie* R-250. Primero, las proteínas se fijaron mediante incubación de los geles durante toda la noche en una solución de fijación, compuesta por metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Posteriormente, los geles se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente y en agitación, con una solución de tinción compuesta por una solución A [ácido ortofosfórico 2% (p/v) y sulfato de amonio 10% (p/v)] y una solución B [azul de *Coomassie* G-250 5% (p/v)] a la que se añadió previamente 1/4 de volumen de metanol. Los geles se destiñeron mediante lavados sucesivos con agua milliQ hasta que las proteínas fueron visibles.

II.5.7. Espectrometría de masas e identificación de proteínas

Una vez teñidas las proteínas en los geles de acrilamida, se procedió a la obtención de las bandas de interés con la ayuda del picador automático *EXQuest Spot cutter* (Bio-Rad). Posteriormente, y de forma automatizada, las proteínas se sometieron a un proceso de digestión con tripsina en una estación robotizada de Bruker previamente a su análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics). El procesamiento de las muestras y su posterior análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF estuvo a cargo del Servicio de Proteómica del cicCartuja.

II.5.8. Análisis de proteínas mediante *Western-blot*

Tras la electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979). Antes de la transferencia, el gel se sumergió en tampón de transferencia Tris-glicina metanol (TGM) [Tris-HCl 48 mM; glicina 39 mM; SDS 0,037% (p/v) y metanol 20% (v/v)] durante 10 min. La transferencia de los péptidos a la membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) se realizó utilizando tampón TGM en el sistema de transferencia semi-seco *Pierce Power station* (Thermo Scientific). Una vez finalizada la transferencia, y tras comprobar su eficiencia mediante tinción de la membrana con Rojo *Ponceau* 0,1% (p/v), la membrana se sometió a los siguientes tratamientos:

1. Bloqueo. 2 incubaciones de 30 min cada una con leche desnatada 4% (p/v) preparada en tampón TBS [Tris-HCl 20 mM; NaCl 150 mM], para saturar los sitios de unión no específicos.

2. Incubación con anticuerpo primario. Tras el bloqueo, la membrana se incubó durante 12-16 h a 4°C con agitación en tampón TBS-T [TBS con Tween®20 0,1% (v/v)] y en algunos casos con leche al 2% (p/v), conteniendo el anticuerpo primario a la dilución adecuada según el caso.

3. Primer lavado. Los anticuerpos unidos inespecíficamente se eliminaron mediante 3 lavados de 10 min en tampón TBS-T.

4. Incubación con anticuerpo secundario. La membrana se incubó con anti-inmunoglobulinas de conejo marcadas con peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. El anticuerpo secundario se empleó a una dilución 1:20.000 en TBS con leche 2% (p/v). La incubación se realizó durante al menos 1 h a temperatura ambiente y agitación.

5. Segundo lavado. La membrana se lavó 3 veces, 10 min, con tampón TBS-T.

6. Tercer lavado. Los restos de detergente se eliminaron con un lavado de 10 min en tampón TBS.

7. Revelado. Las bandas de la membrana se revelaron con el revelador BCIP/NBT *Alkaline phosphatase* (Millipore), cuando el anticuerpo secundario iba marcado con fosfatasa, o bien con el revelador *Luminata™ Forte Western HRP-Substrate* (Millipore), cuando el anticuerpo secundario iba marcado con la peroxidasa, en cuyo caso las imágenes se visualizaron mediante el uso del detector de quimioluminiscencia *Chemidoc* (Bio-Rad), con ayuda del programa *Quantity One*.

II.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ALMIDÓN Y β -GLUCANOS

El contenido de almidón y β -glucanos en semillas maduras de *Brachypodium* se determinó mediante el uso de los kits *Total Starch and Mixed-Linkage Beta-Glucan* (Megazyme International), de acuerdo con las instrucciones del fabricante pero con

modificaciones en el procedimiento de extracción para su ajuste a pequeña escala y al tipo de semillas empleada (Trafford et al., 2013).

Aproximadamente 20 semillas se pesaron y se incubaron en 0,5 ml de metabisulfito de sodio 0,3% (p/v) y ácido láctico 1% (v/v) pH 3,8 a 52°C durante toda la noche, tras lo cual se descartó la solución. Una vez secadas y cortadas las semillas, se machacaron y homogeneizaron en un mortero con 0,5 ml de tampón de extracción [tampón fosfato sódico 20 mM pH 6,5]. El extracto obtenido se diluyó con tampón de extracción hasta una concentración de 0,1 ml tampón/mg de tejido. Se tomó una alícuota de 0,8 ml y se autoclavó a 121°C durante 15 min para solubilizar almidón y β -glucanos. Posteriormente, a partir de la alícuota autoclavada, se tomaron 3 alícuotas de 50 μ l que se sometieron a digestión con distintas enzimas con objeto de determinar el contenido en almidón y β -glucanos de la muestra inicial. A la alícuota 1, utilizada para la determinación de almidón, se le añadió 50 μ l de tampón de digestión de almidón [acetato de sodio 100 mM pH 5,2; CaCl_2 5 mM; 0,3 U de α -amilasa y 1 U de amiloglucosidasa]. A la alícuota 2, utilizada como blanco para la determinación de la glucosa libre en la muestra, se le añadió 50 μ l de tampón acetato de sodio 100 mM pH 5,2. A la alícuota 3, utilizada para la determinación de β -glucanos, se le añadió 0,1 U de liquenasa y, tras incubar a 37°C 1 h, se le añadió 50 μ l de tampón de digestión de β -glucanos [acetato de sodio 50 mM pH 4 y 0,1 U de β -glucosidasa]. Las tres alícuotas se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se realizaron las determinaciones de glucosa usando el reactivo glucosa oxidasa peroxidasa (GOPOD) suministrado por los kits. Los ensayos para glucosa se realizaron en un volumen final de 0,8 ml (conteniendo 0,75 ml de reactivo GOPOD, extracto y agua hasta completar los 0,8 ml) que se incubaron a 50°C durante 20 min. Una vez enfriados, se realizaron las medidas de absorbancia a 510 nm.

Para la determinación de glucosa se generó una recta de calibrado a partir de la medida de absorbancia de muestras con cantidades conocidas de glucosa (2, 5, 10, 15, 20, 30, y 50 mg) en reactivo GOPOD.

II.7. TRANSFORMACIÓN DE *BRACHYPODIUM DISTACHYON* MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

El método seguido para la transformación de *Brachypodium* por *Agrobacterium tumefaciens* en este trabajo se basó en modificaciones de protocolos publicados por Christiansen et al. (2005), Vogel et al. (2006) y Vogel y Hill (2008).

Las etapas de la transformación de *B. distachyon* fueron las siguientes:

- a) Aislamiento de embriones.
- b) Generación de callos embriogénicos.
- c) Transformación de los callos embriogénicos con *Agrobacterium*.
- d) Selección de callos embriogénicos transformados.
- e) Regeneración de las plantas de *Brachypodium* transformadas.

A) Aislamiento de embriones

Para el aislamiento de embriones en el estado adecuado de desarrollo, se recogieron las espigas de *Brachypodium* en el momento en que las semillas comenzaron a rellenarse. Tras eliminar manualmente la lema, las semillas se conservaron en agua con unas gotas de Tritón X-100, para evitar su deshidratación, hasta su uso. Una vez recolectadas, las semillas se esterilizaron en una solución NaOCl 2% (v/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v), durante 4 min con agitación suave, seguido de 5 lavados con agua destilada estéril. Mediante el uso de pinzas, aguja y con ayuda de una lupa, se aislaron los embriones de las semillas con cuidado de no dañar el escutelo. Tanto el proceso de esterilización como los pasos sucesivos, se realizaron en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

B) Inducción de callos embriogénicos

Los embriones aislados se colocaron con la cara escutelar hacia abajo, en placas Petri que contenían medio inductor de callos (CIM) [medio Linsmaier & Skoog (LS) 4,44 g/l; sacarosa 30 g/l; CuSO₄ 0,6 mg/l; ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2,5 mg/l y phytigel 2 g/l, pH 5,8]. La inducción de formación de callos embriogénicos se realizó durante un periodo de 6 semanas, manteniendo las placas en oscuridad a 25°C. Tras la primera semana, se eliminaron los tallos o raíces desarrollados y posteriormente, cada 2

semanas, los callos se dividieron en 3 ó 4 porciones y se transfirieron a medio CIM fresco.

C) Transformación mediada por *Agrobacterium*

Como paso previo a la transformación, se cultivó la cepa de *Agrobacterium* transformada en medio LB sólido, suplementado con los correspondientes antibióticos, durante 3 días a 28°C. El día de la transformación, el cultivo se recogió con un asa estéril y se resuspendió en medio CIM líquido, suplementado con acetosiringona 200 µM y 10 µl/ml de medio, de 10% synperonic PE/F68, hasta una $DO_{600} \sim 0,6$. Las bacterias se incubaron durante 45 - 60 min a temperatura ambiente y agitación suave antes de ser utilizadas.

Los callos embriogénicos se transfirieron a tubos conteniendo la suspensión de *Agrobacterium* previamente preparada y se incubaron en agitación suave durante al menos 5 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, los callos se dejaron secar unos minutos y se transfirieron a placas Petri con papel de filtro estéril donde se incubaron durante 5 días en oscuridad a 25°C.

D) Selección de callos embriogénicos transformados

Transcurridos 5 días, los callos transformados se transfirieron a placas Petri con medio de selección, medio CIM suplementado con timentina 150 mg/l (para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium*) e higromicina 50 mg/l (antibiótico de selección). Las placas se incubaron durante 1 semana en oscuridad a 25°C. Posteriormente, los callos se transfirieron a medios de selección fresco, disminuyendo la concentración de higromicina a 25 mg/l y manteniéndose las condiciones de incubación. Este paso se repitió cada 2 semanas para la selección de los callos resistentes que, por tanto, habían sido transformados.

E) Regeneración de plantas de *Brachypodium* transformadas

Los callos seleccionados se transfirieron a placas Petri con medio sólido de regeneración [medio LS 4,44 g/l; maltosa 30 g/l; kinetina 0,2 mg/l; phytigel 2g/l; pH 5,8]. Este medio se suplementó con timentina 150 mg/l e higromicina 25 mg/l. Los callos se incubaron en condiciones de día largo (16 h luz /8 h oscuridad) a 25°C durante 3-4 semanas. Tras este periodo, los callos que habían desarrollado brotes se

transfirieron a tubos de cultivo con medio para el desarrollo de raíces [MS con vitaminas 4,44 g/l; maltosa 30 g/l; phytigel 2 g/l; pH 5,8]. En este caso, el medio se suplementó sólo con timentina 150 mg/l. Los brotes se incubaron en las mismas condiciones de luz y temperatura hasta que el sistema radicular estuvo bien desarrollado. Finalmente, aquellos brotes que desarrollaron sistema radicular se trasplantaron a semilleros con turba vegetal y se crecieron en ciclo de día largo a 22°C hasta completar su ciclo.

II.8. HERRAMIENTAS BIOINFÓRMATICAS

Para el procesamiento de los resultados se emplearon distintos programas informáticos:

La búsqueda de secuencias se realizó a través de la base de datos de las páginas web *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov), *Phytozome v.11* (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), *Sol Genomics Network* (<https://solgenomics.net>) y *CyanoBase-Genome Database Resources* (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>), disponibles a través de internet. Para la búsqueda de similitud de secuencias se utilizó el algoritmo BLAST, accesible en las bases de datos.

Los análisis de traducción de secuencias de nucleótidos a aminoácidos, la conversión de secuencias a la secuencia complementaria reversa, así como el estudio de las propiedades o características de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos, se llevaron a cabo mediante herramientas disponibles en *EXPASY* (www.us.expasy.org).

El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con el programa *Clustal Omega* disponible en el servidor del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) (www.ebi.ac.uk). Tanto para procesar estos alineamientos como los resultados de las secuenciaciones se empleó el programa *BioEdit v.7.1.3.0* y para la visualización de los árboles filogenéticos *TreeView v.3.2*.

El diseño a escala de genes se realizó mediante el programa *Fancygene*, disponible en línea (<http://bio.ieo.eu/fancygene/>) y para los diseños de vectores,

construcción de transgenes, búsquedas y localización de dianas y enzimas de restricción se empleó el programa *pDRAW32*.

Finalmente, para la cuantificación relativa de la cantidad de proteínas y productos de PCR se empleó el programa *Scion Image*.

III. RESULTADOS

III.1. CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA GÉNICA DE NTRC

Cuando inicialmente se describió el gen *NtrC* (Serrato et al., 2004) se puso de manifiesto que se encontraba exclusivamente en organismos que realizan la fotosíntesis oxigénica, incluyendo en este grupo organismos eucarióticos, algas y plantas, así como procarióticos, ya que se encuentra en algunas cianobacterias (Pascual et al., 2010). Desde entonces se ha producido un extraordinario incremento del número de genomas secuenciados, por lo que uno de los objetivos del presente trabajo ha sido actualizar la información disponible en las bases de datos sobre el gen *NtrC*, así como sobre su filogenia.

III.1.1. Estructura del gen *NtrC*

Mediante búsqueda en bases de datos se obtuvo el tamaño y composición del gen *NtrC* y de la correspondiente proteína deducida de varios tipos de organismos. Como se observa en la Tabla III. 1, en la que se presentan sólo algunos ejemplos representativos de dicha búsqueda, se comprueba que, efectivamente, el gen *NtrC* está presente exclusivamente en organismos fotosintéticos oxigénicos. Hasta el momento, se había descrito como un gen de copia única en la mayor parte de las plantas analizadas, como *Arabidopsis thaliana* y arroz (*Oryza sativa*), las dos primeras en ser secuenciadas. Sin embargo, con la información actualmente disponible en las bases de datos, se pone de manifiesto la existencia de especies vegetales que tienen dos copias del gen *NtrC* localizadas en distintos cromosomas. Este es el caso de la briofita *Physcomitrella patens*, con genes *NtrC* en los cromosomas 20 y 23, *Solanum lycopersicum*, en los cromosomas 4 y 10, *Solanum tuberosum*, en los cromosomas 4 y 10, y *Glycine max*, en los cromosomas 2 y 10, estos dos últimos no mostrados en la Tabla III. 1.

Tabla III. 1. Comparación de las características del gen *NtrC* de varios organismos.

| Organismo | Tamaño gen (pb) | Tamaño secuencia codificante (pb) | Número de Aminoácidos |
|-----------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| <i>Anabaena</i> | 1.452 | 1.452 | 483 |
| <i>C. reinhardtii</i> | 5.125 | 1.611 | 536 |
| <i>P. patens</i> Cr20 | 4.410 | 1.701 | 566 |
| <i>P. patens</i> Cr23 | 4.652 | 1.722 | 573 |
| <i>B. distachyon</i> | 4.737 | 1.572 | 523 |
| <i>O. sativa</i> | 4.211 | 1.548 | 515 |
| <i>S. lycopersicum</i> Cr4 | 10.974 | 1.638 | 545 |
| <i>S. lycopersicum</i> Cr10 | 6.219 | 1.632 | 543 |
| <i>A. thaliana</i> | 2.680 | 1.590 | 529 |
| <i>T. cacao</i> | 7.601 | 1.500 | 499 |

Se indican el tamaño del gen, de la secuencia codificante y el número de aminoácidos de la proteína deducida de ejemplos representativos de los distintos grupos de organismos, desde el procarionta *Anabaena* hasta eucariotas como *C.reinhardtii* (alga verde), *P. patens* (musgo) o plantas superiores (resto de especies).

De los datos presentados en la Tabla III. 1 destaca la gran variabilidad de tamaño del gen *NtrC* entre los distintos organismos. Sin embargo, tanto el tamaño de la secuencia codificante como el de la proteína deducida tienden a ser más similares. Estos datos indican, por tanto, que la gran variabilidad de tamaños de genes *NtrC* se debe a las secuencias intrónicas presentes en dicho gen para cada organismo.

El hecho de la presencia de organismos con dos copias del gen *NtrC*, junto con la variabilidad de sus tamaños, llevó a plantear la posibilidad de si la estructura génica está conservada dentro del grupo de los organismos fotosintéticos eucarióticos. Para analizar esta posibilidad, se tomó la secuencia completa del gen *NtrC* de algunos de estos organismos y se representó la estructura para cada uno de ellos (Figura III. 1).

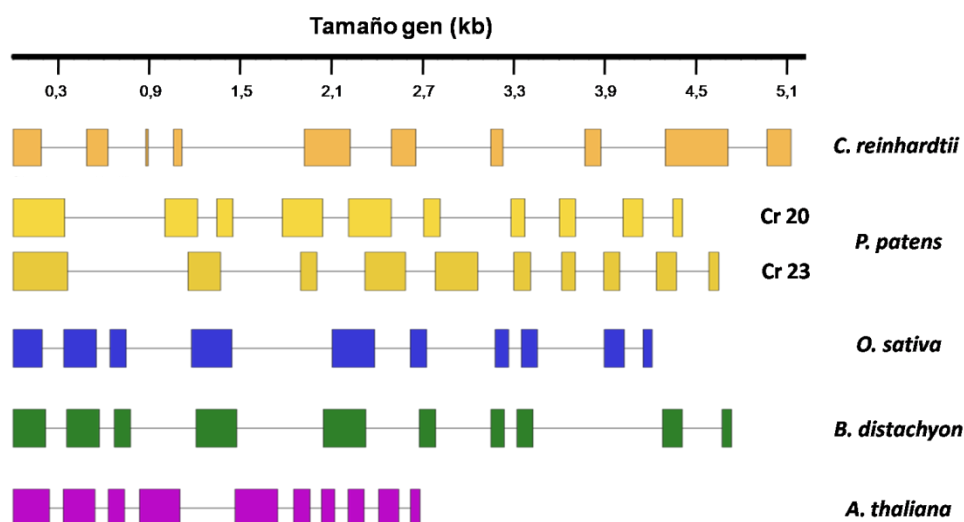


Figura III. 1. Comparación de la estructura del gen *NtrC* de varios organismos. Los recuadros en color representan las secuencias codificantes (exones) mientras que la línea representa las regiones no codificantes (intrones). Los números de acceso para cada secuencia génica se muestran entre paréntesis: *C. reinhardtii* (GeneID:5715808); *P. patens* Cr20 y Cr23 (GeneID:5916755 y GeneID:5948454, respectivamente); *O. sativa* (GeneID:102716057); *B. distachyon* (GeneID:100829068) y *A. thaliana* (GeneID:818766). La estructura, a escala, de los distintos genes *NtrC* se realizó mediante el software de diseño *Fancygen*.

A partir de los datos presentados en la figura anterior se comprobó que, efectivamente, las diferencias encontradas respecto a los tamaños del gen *NtrC* se debían, casi en su totalidad, a diferencias del tamaño de las regiones intrónicas, incluido el caso de organismos que presentaban duplicaciones. También se observó que a pesar de la variabilidad de tamaños de los intrones, la estructura de los genes *NtrC* está muy conservada independientemente del organismo, estando constituida en todos los casos por 10 exones y 9 intrones.

III.1.2. Estudio filogenético de NTRC

La comparación de las secuencias de las proteínas NTRC deducidas de los genes de diferentes organismos reveló un alto grado de conservación (Figura III. 2). Los dos dominios de NTRC, NTR y Trx, mostraron un alto grado de identidad entre los distintos grupos estudiados. El dominio NTR, a pesar del menor grado de conservación de la región N-terminal, mostró una alta conservación tanto de las Cys del sitio activo (indicadas con asterisco rojo), como de los motivos de unión del FAD (indicados con triángulos verdes) y de unión de NADPH (indicados con triángulos invertidos violetas). El dominio Trx también se encontraba muy conservado manteniendo en todos los casos las Cys del sitio activo (indicadas con asterisco azul).

C. reinhardtii -----MIQLPAT-----V
Anabaena -----
B. distachyon -MAV-----TRLAVAAAL-SSAPPSSSS-----SSSSSR
A. thaliana -----M-AASPKIGIGIAS-VSSPHRVSAA-----SALSPPHFLFLTTTT
S. tuberosum10 -MANTTPN---I-TNSVGIGIRIRT-KTRPASTMAATPATLSTGHCIPTGLLVIN-SGS
S. fallax MVASAVAAATYLAAWPASQALVERSTSCACACSSDASSPLPSSTTFYYPRIQSLLVNSRK
S. moellendorffii -MAGAAASSWLIAWPDRISSRRRNF-----

C. reinhardtii VQRRAPIG----APSAGVACNPVA---GRHRAAPALASRTRTVATPATAAPAATSTQQV
Anabaena -----MFSCHSPCRSDMLC----YIKRSRYEFVINIMSN
B. distachyon S-----RRV-SFPSCRPL-PAASC SRASKPLHATAAAPVVDEEAPSPSPDVG
A. thaliana T-----RHGGSYLLRQP-----TRTRSSDSLRLRV-----SATANSPSSSSSSGG
S. tuberosum10 S-----RRGGAARVDSVN-GHLTRSR-ASSFSIRA-----AAEVEPVGTSSSA
S. fallax HHHDELGLSKRRREKSFQQQPGRRLQGRRCG--RVYKAS--AVATEEGAPATVPV
S. moellendorffii -----K-SGAVAAA-----AAAAT--AASVAA---AVAVEELPKSSSSE



C. reinhardtii ADVENVVIIGSGPAGYTAAYAAANLKPVVFEGFRNG--RGGQLMTTTEVENFPGFPEG
Anabaena PTVENLVIIGSGPAGYTAAYAAANLKPVVFEGFQAGGLPGGQLMTTTEVENFPGFPQG
B. distachyon RGVENLVIIGSGPAGYTAAYAAANLKPVVFEGYQGGVPGGQLMTTTEVENFPGFPDG
A. thaliana EIIENVVVIIGSGPAGYTAAYAAANLKPVVFEGYQMGVPGGQLMTTTEVENFPGFPDG
S. tuberosum10 QGIENLVIIGSGPAGYTAAYAAANLKPVVFEGFQAGGVPGGQLMTTTEVENFPGFPEG
S. fallax GGVENLVIIGSGPAGYTAAYAAANLKPVMFEGYQGGVPGGQLMTTTEVENFPGFPDG
S. moellendorffii VPVENLVIIGSGPAGYTAAYAAANLKLPLVFEGYQAGGVPGGQLMTTTEVENFPGFPEG
*: *: *****: *: *: * *****: *

C. reinhardtii ITGPDLMDRMRKQAEERWGESELYTEDEVEQVDSLVRPFVIRSSDRELAHSVI IATGATAKR
Anabaena ITGPELMDRMKAQAEERWGAELYTEDEVISVDLSQRPFVTRSEEREVKAHTII IATGATAKR
B. distachyon ITGPDLMDKMRKQAEERWGAELHQEDVEFVDVKSRRPFVIRSSDREVKCHSII IATGATAKR
A. thaliana ITGPDLMKMRKQAEERWGAELYPEDVESLVTTAFTVQTSERKVKCHSIIYATGATARR
S. tuberosum10 ITGPDLMDRMRKQAEERWGAELYQEDVEFIDVKNAPFTVHSSERKVKCHSLIVATGANARR
S. fallax ITGPDLMDRMRKQAEERWGAELKTEDEVEFIDVKSRRPFVTRSSEREVCHSII IATGATAKR
S. moellendorffii ISGPDLMDRMRKQAEERWGAELRTEDEVEVDVSI RPFVTRSSEREVCHSII IATGAVAKR
*: *: *: *: *****: *: *: * *****: *



C. reinhardtii LGLPSENTFWSRGISACAI CDGASPLFKNAEVAVVGGGDSATEEAVVYTKYAKHVHLLVR
Anabaena LGLPSEHEFWSRGISACAI CDGATPIFHGAELAVIGAGDSAAEESIYLTKYGSKVLLVR
B. distachyon LRLPREEEFWSRGISACAI CDGASPLYKQVLA VVGGGDTATEEALYLTKYACHVHLLVR
A. thaliana LRLPREEEFWSRGISACAI CDGASPLFKGQVLA VVGGGDTATEEALYLTKYARHVHLLVR
S. tuberosum10 LGLPREDEFWSRGISACAI CDGASPLFKGQVLA VVGGGDTATEEALYLTKYARHVHLLVR
S. fallax LGLPREHEFWSRGISACAI CDGASPIFKGQELAVVGGGDTATEETLYLTKYARHVHLLVR
S. moellendorffii LGLPREHEFWSRGISACAI CDGASPIFKAQELAVVGGGDTATEEALYLTKYARHVHLLVR
* * * . *****: *: *: * *****: *

C. reinhardtii GERMRASKAMQDRVLANPRITVHFNTGIEDAFG--GEVLQGLRFLDTRTGEKRSLDVQGM
Anabaena SEKMRASKAMQDRVLSNPKIQVHWNTVEVVDVFG--NGHMDGVKVRNNQTGEETNVHAKGL
B. distachyon RDQLRASKAMQDRV LNNPNITVHFNTEAVDVVSNPKQMSGILRRIDTGEESVLEVKGL
A. thaliana RDQLRASKAMQDRV LNNPNITVHYNTETVDVLSNTKQMSGILRLRDLTGEETELEAKGL
S. tuberosum10 KDQLRASRAMQDRVFNNPNITVHFNTETVDVVS NPKQMSGILIRKADTQEEVLEAKGL
S. fallax RDKLRASKAMQDRVFNNPNVTVHFNTEAIDVID-NKGQMSGLKRLDLKIGEEKTLQVRGL
S. moellendorffii RDQLRASKAMQDRVFNNPNITVHFNTRVLDVVPNDKQMGV LLEDSSSGIRKTLQVKGL
*: *: *: *: *****: *: *: * *****: *

C. reinhardtii FYGIGHTPNSKLVAGQVELDEAGYV KVAHGA-ATSPVGVFSAGDLHDTEWRQAITAAGSG
Anabaena FYAIGHKPNITSLFQQGLELDEIGYVVTKHGSPETSVEGVFAAGDVQDHEWRQAITAAGSG
B. distachyon FYGIGHTPNSQLLQGI ELDSSGYILVEEGTAKTSVDGVFAAGDVQDHEWRQAVTAAGSG
A. thaliana FYGIGHSPNSQLLEGGVELDSSGYVLRREGTSNTSVEGVFAAGDVQDHEWRQAVTAAGSG
S. tuberosum10 FYGIGHSPNSQLLEGGVQLDSSGYILVKEGTANTSVEGVFAAGDVQDHEWRQAITAAGSG
S. fallax FYGIGHRPNSQLLDGQVELDEAGYV LKPGSDTDSVEGVFAAGDLQDHEWRQAITAAGSG
S. moellendorffii FYGIGHQPNSHLLAGQVELDEAGYVVTGSGGETSVEGVFAAGDLQDHEWRQAVTAAGSG
*: *: *: *: *****: *: *: * *****: *

C. reinhardtii CMAALSAERYLTANNLVREFKQKDEPAAHGHAAAAGGNGNGHAAAAANGGSEAKATSS
Anabaena CAAALLAERWLSANALIQEFHQEATINNELE-----TQPVAQKTE
B. distachyon CIAALSVERYLVTNDLLVEFHQPVREE-----TKKEITG
A. thaliana CIAALSVERYLTSNNLLVEFHQPQTEE-----AKKEFTQ
S. tuberosum10 CVAALSVERYLTNNKLLLEFHQPPTTEE-----IKKELSE
S. fallax CMAALSVERYLASNNLLVEFHQQTKEEV-----KKKELTT
S. moellendorffii CMAALAAERYLVRNNLLIEFHQPQEE-----TKKELTS
* * * . *: *: * *****: *: *: * *****: *



Figura III. 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de NTRC de diferentes organismos. El alineamiento se realizó con el programa *Clustal Omega*. Los números de acceso para cada proteína se muestran entre paréntesis: *Anabaena* sp. PCC 7120 (BAB72694.1); *C. reinhardtii* (XP_001689807.1); *S. moellendorffii* (XP_002990200); *B. distachyon* (XP_003562531.1); *A. thaliana* (NP_565954.1); *S. tuberosum* Cr10 (XP_006351311.1). Resaltados en gris se indican los residuos correspondientes al módulo NTR de la proteína y en amarillo los correspondientes al módulo Trx. Las Cys de los sitios activos de cada módulo aparecen marcadas con asteriscos en rojo y azul para los dominios NTR y Trx, respectivamente. Los triángulos verdes indican el sitio de unión de FAD. Los triángulos invertidos violeta indican el sitio de unión del NADPH.

La matriz de identidad generada durante el alineamiento de proteínas (Figura III. 3) aporta una idea, en términos numéricos, del grado de similitud existente entre estas NTRCs, indicando el porcentaje de aminoácidos idénticos que se hallan totalmente conservados. De este modo, se comprobó que aunque todas las NTRCs estudiadas comparten una identidad superior al 60%, el nivel de identidad fue mucho mayor en cada grupo de organismos, es decir, las NTRCs de plantas mostraron mayor nivel de identidad entre ellas que con las de algas y cianobacterias.

| | | | | | | | |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>C.reinhardtii</i> | 100.00 | 60.88 | 64.49 | 63.60 | 62.09 | 63.20 | 65.76 |
| <i>Anabaena</i> | 60.88 | 100.00 | 62.47 | 62.37 | 63.21 | 64.77 | 63.99 |
| <i>B.distachyon</i> | 64.49 | 62.47 | 100.00 | 76.13 | 75.73 | 73.11 | 72.84 |
| <i>A.thaliana</i> | 63.60 | 62.37 | 76.13 | 100.00 | 77.00 | 70.91 | 71.34 |
| <i>S.tuberosum_Chr10</i> | 62.09 | 63.21 | 75.73 | 77.00 | 100.00 | 69.63 | 71.28 |
| <i>S.fallax</i> | 63.20 | 64.77 | 73.11 | 70.91 | 69.63 | 100.00 | 74.75 |
| <i>S.moellendorffii</i> | 65.76 | 63.99 | 72.84 | 71.34 | 71.28 | 74.75 | 100.00 |

Figura III. 3. Matriz de identidad en tanto por ciento de NTRCs de distintos organismos. Esta matriz, generada por *Clustal Omega* durante el alineamiento de la secuencia de NTRC de la Figura III. 2, muestra el porcentaje de aminoácidos idénticos conservados entre las distintas NTRCs comparadas.

El análisis filogenético de NTRC mostró tres grupos bien diferenciados, que se representan con distintos colores en la Figura III. 4, correspondientes a cianobacterias, algas verdes y plantas. Dentro del grupo de las plantas se pueden distinguir 3 subgrupos; los constituidos por musgos, helechos y plantas con semilla. Dentro de este último grupo, se observa claramente la separación de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Este análisis permite también estudiar la relación filogenética de las NTRCs en organismos que tienen dos copias para el gen *NtrC*, sugiriendo que las duplicaciones han tenido lugar de forma independiente a lo largo de la evolución.

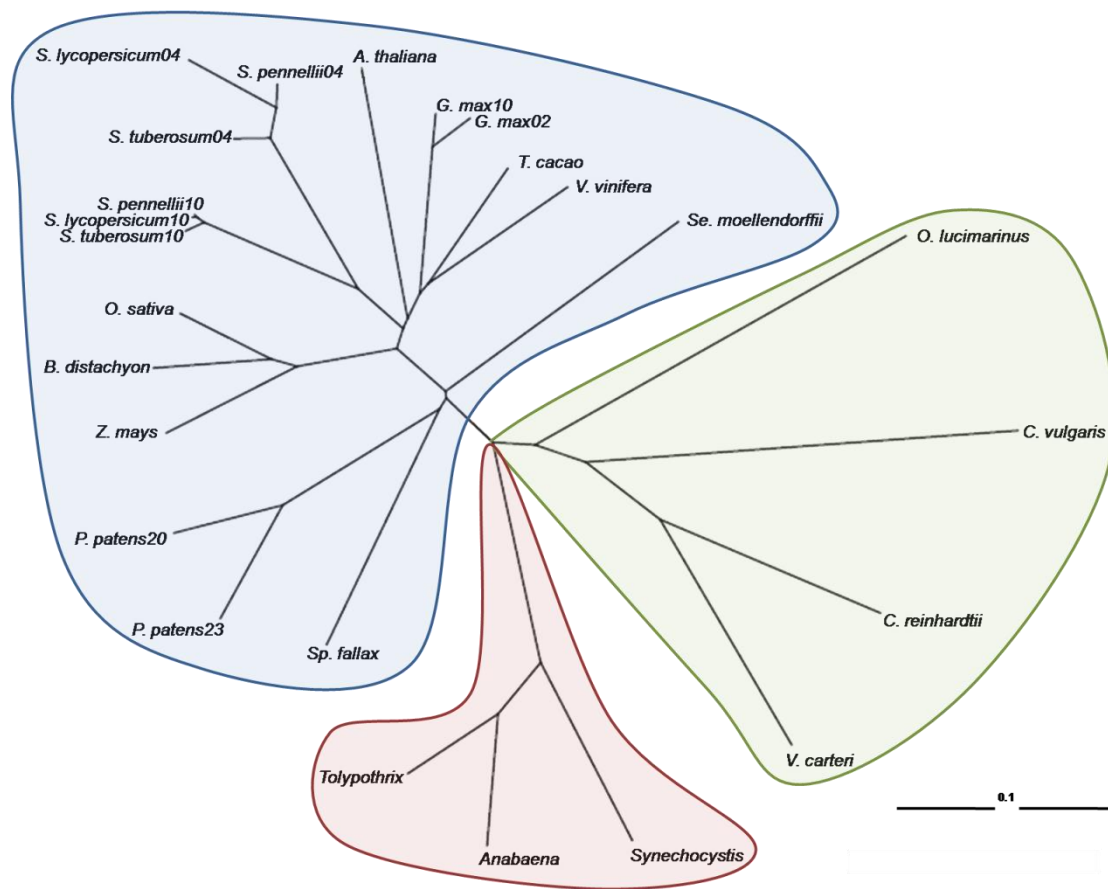


Figura III. 4. Árbol filogenético de NTRCs de diversos organismos. El árbol filogenético se construyó a partir de las secuencias completas de aminoácidos de NTRCs disponibles en las bases de datos. El alineamiento de las distintas secuencias se realizó usando el programa *Clustal Omega* y la construcción del árbol mediante el uso del programa *TreeView*. Los números de acceso para cada proteína se muestran entre paréntesis: *Anabaena* sp PCC 7120 (BAB72694.1); *Tolypothrix* sp PCC 7601 (WP_045869140.1); *Synechocystis* sp PCC 7509 (WP_009632856.1); *V. carteri* (XP_002948592.1); *C. reinhardtii* (XP_001689807.1); *C. vulgaris* (BAH29954.1); *O. lucimarinus* (XP_001422184.1); *P. patens* Cr20 y 23 (XP_001753500.1 y XP_001785248.1); *Sp. fallax* (Sphfalx0006s0389.1.p); *S. moellendorffii* (XP_002990200.1); *V. vinifera* (XP_010653766.1); *T. cacao* (XP_007028668.1); *G. max* Cr 02 y 10 (XP_003519084.1 y XP_003535866.1); *A. thaliana* (NP_565954.1); *S. pennellii* Cr04 y 10 (XP_015071469.1 y XP_015055743.1); *S. tuberosum* Cr 04 y 10 (XP_006350177 y XP_006351311.1); *S. lycopersicum* Cr04 y 10 (XP_010319181.1 y XP_004249259.1); *O. sativa* (XP_006658913.1); *B. distachyon* (XP_003562531.1); *Z. mays* (NP_001136660.1).

III.2. NTRC EN SEMILLAS DE CEREALES

Estudios iniciales, basados en fraccionamientos a partir de hojas de arroz, mostraron que NTRC se localiza en el estroma de los cloroplastos (Serrato et al., 2004). Trabajos posteriores realizados también por nuestro grupo, usando como modelo la planta *Arabidopsis thaliana* transformada establemente con el gen reportero GUS bajo control del promotor del gen *NtrC* y fusiones NTRC-GFP, pusieron de manifiesto que la expresión del gen *NtrC* tiene lugar tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos y que la proteína presenta localización en cualquier tipo de plasto, no sólo en cloroplastos de células fotosintéticas (Kirchsteiger et al., 2012). Estos resultados sugieren la posibilidad de que NTRC pueda estar también localizada en plastos de tejidos heterotróficos en otras especies vegetales, como los amiloplastos del endospermo de semillas de cereales.

Dado que el principal objetivo de este trabajo consistía en generar plantas transgénicas de cereales con niveles alterados de NTRC en el endospermo de semillas, con el fin de estudiar su efecto sobre la síntesis de almidón y otros compuestos de reserva, se consideró de interés un estudio previo de la presencia de NTRC en semillas de cereales, empleando para ello el cereal modelo *Brachypodium distachyon*. Debido a que el genoma de este cereal se encuentra secuenciado, se ha podido llevar a cabo una aproximación bioinformática para la caracterización del gen que codifica para NTRC en esta planta. Como se ha descrito a lo largo del apartado III. 1, *Brachypodium* contiene una única copia del gen *NtrC*, como el resto de las monocotiledóneas para las que se dispone de secuencias. Como en otras plantas, la estructura del gen *NtrC* de *Brachypodium* está conservada y consta de 10 exones separados por 9 intrones, teniendo un tamaño total de 4.737 pb (Tabla III. 1 y Figura III. 1). La proteína NTRC de *Brachypodium* está formada por 523 aminoácidos, con un peso molecular de 56,8 kDa y un alto grado de similitud con las NTRCs de otras especies. El grado de conservación es total para los sitios de unión del FAD y NADPH, al igual que las Cys que forman parte de los sitios activos de los dominios NTR y Trx (Figura III. 2).

III.2.1. Clonación del cDNA de *NtrC* de *Brachypodium distachyon*

Como un primer paso en el estudio de NTRC en el endospermo de semillas de *Brachypodium*, se clonó el cDNA correspondiente para el gen *BdNtrC* mediante una estrategia de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos específicos F-BdcNTRC y R2-BdcNTRC (Tabla II. 7) diseñados a partir de la secuencia disponible en la base de datos. Se utilizaron RNAs aislados de dos tipos de tejidos, hojas y semillas maduras. Los productos de estas reacciones se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificaron y se clonaron en el vector pGEM-T para su secuenciación.

Al comparar las secuencias de estos cDNAs con la procedente de la base de datos se comprobó que, mientras el cDNA de hoja era idéntico al depositado en dicha base de datos, el de semilla era mayor debido a una inserción de 23 pb adicionales que no alineaban con ninguna región de las otras dos secuencias. En la Figura III. 5 se muestra el fragmento de alineamiento correspondiente a la región donde se localiza el inserto de 23 pb. El alineamiento completo de las secuencias se muestra en el Anexo I.

```
[1-720]

BdNTRC semilla      TATTTGACAAAAATATGCCTGTCATGTTTCATTTACTTGTTCGAAGGGATCAGCTACGAGCA
BdNTRC_hoja        TATTTGACAAAAATATGCCTGTCATGTTTCATTTACTTGTTCGAAGGGATCAGCTACGAGCA
BdNTRC_db          TATTTGACAAAAATATGCCTGTCATGTTTCATTTACTTGTTCGAAGGGATCAGCTACGAGCA
*****

BdNTRC_semilla     TCCAAAGCTATGCAGGATCGGTTGATTATGGCGAATGCTTCAGAGTACTCAACAACCCCA
BdNTRC_hoja        TCCAAAGCTATGCAGGATCGA-----GTACTCAACAACCCCA
BdNTRC_db          TCCAAAGCTATGCAGGATCGA-----GTACTCAACAACCCCA
*****

BdNTRC_semilla     ACATAACAGTACATTTCAATACAGAAGCTGTGGATGTTGTCAGCAATCCCAAGGCCAGA
BdNTRC_hoja        ACATAACAGTACATTTCAATACAGAAGCTGTGGATGTTGTCAGCAATCCCAAGGCCAGA
BdNTRC_db          ACATAACAGTACATTTCAATACAGAAGCTGTGGATGTTGTCAGCAATCCCAAGGCCAGA
*****

[901-1572]
```

Figura III. 5. Fragmento del alineamiento de las secuencias de los cDNAs de NTRC de hoja (*BdNTRC_hoja*) y semilla (*BdNTRC_semilla*) con la secuencia proveniente de la base de datos (*BdNTRC_db*). El alineamiento de las secuencias de nucleótidos se realizó mediante el programa *Clustal Omega*.

Cuando se compararon las secuencias del cDNA aislado de semilla con la del gen *BdNtrC* (Figura III. 6) se observó que la secuencia adicional de 23 pb correspondía al final del intrón 4.

```

gBdNtrC_Db          TGTTAGCTCCTCTTCAGTTGCATGATGTATTAAATGAAGTAAAATTTCAAT
BdNTRC_semilla     -----

gBdNtrC_Db          TCCCTGGATGTTTGGTTAACAGGTTGATTATGGCGAATGTTTCAGAGTAC
BdNTRC_semilla     -----GTTGATTATGGCGAATGCTTCAGAGTAC
                      *****

gBdNtrC_Db          TCAACAACCCCAACATAACAGTACATTTCAATACAGAAGCTGTGGATGTT
BdNTRC_semilla     TCAACAACCCCAACATAACAGTACATTTCAATACAGAAGCTGTGGATGTT
                      *****

gBdNtrC_Db          GTCAGCAATCCCAAAGGCCAGATGTCGGGTATTCAATTGAGGAGAATCGA
BdNTRC_semilla     GTCAGCAATCCCAAAGGCCAGATGTCGGGTATTCAATTGAGGAGAATCGA
                      *****
    
```

Figura III. 6. Comparación de secuencias de la región del gen *NtrC* entre el final del intrón 4 y principio del exón V con el cDNA clonado de semillas (*BdNTRC_semilla*). La secuencia del gen *NtrC* se obtuvo de la base de datos (*gBdNtrC_Db*). En verde se resalta la secuencia intrónica, correspondiente al final del intrón 4, y en negro, la secuencia exónica (exón V). Subrayada se resalta la secuencia conservada de 23 pb. El alineamiento de las secuencias de nucleótidos se realizó mediante el programa *Clustal Omega*.

Estos datos sugirieron la posibilidad de que el mensajero que codificaba para NTRC en semilla se procesase de forma diferente al de hoja, de este modo, se obtendrían dos mensajeros distintos para NTRC según el tipo de tejido. Para testar si estos dos tipos de transcritos podrían identificarse mediante electroforesis en estudios de RT-PCR, se diseñó una pareja de oligonucleótidos localizados al final del exón IV y principio del V (*BdNTRC-I4-F* y *BdNTRC-I4-R*; Tabla II. 5), de forma que flanquease al intrón 4 (Figura III. 7A). En aquellos casos donde se conservasen los 23 pb, el tamaño de la secuencia amplificada sería ligeramente mayor.

El análisis de distintos clones de cDNA de *NtrC* obtenidos a partir de RNA aislado de semillas de *Brachypodium* (Figura III. 7B) mostró que en este tejido coexistían los dos tipos de mensajeros, a los que denominamos estándar (SS) y alternativo (AS), siendo el mensajero alternativo el que se obtuvo en tres de los cuatro clones analizados.

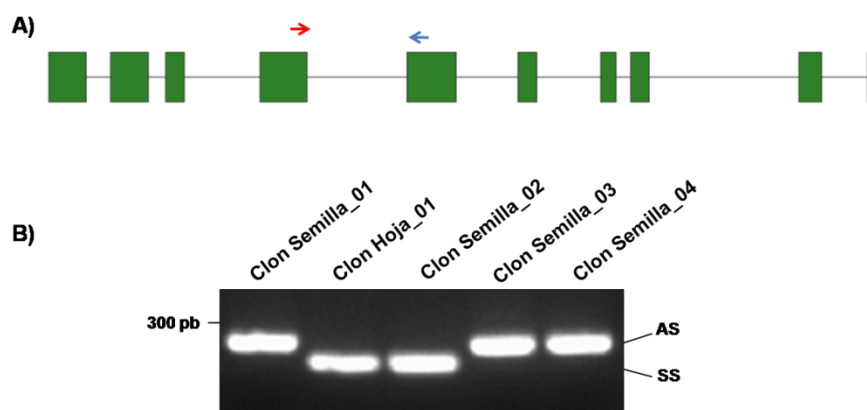


Figura III. 7. A, Esquema de la estructura del gen *NtrC* de *Brachypodium* y posición de los oligonucleótidos utilizados. Las flechas indican la zona en la cual se diseñó la pareja de oligonucleótidos, rojo (sentido) y azul (anti-sentido). B, Fragmentos obtenidos mediante PCR con clones de cDNA de *NtrC*. Como controles se emplearon los clones de *NtrC* de semilla (01) y hoja (01) que habían sido previamente secuenciados.

III.2.2. Estudio de procesos de *splicing* alternativo del gen *NtrC*

Los resultados obtenidos en el apartado anterior, mostrando la presencia de mensajeros alternativos del gen *BdNtrC*, sugirieron la posibilidad de que se produjeran diversos procesos de *splicing* alternativo en la expresión de este gen. El hecho de haberse identificado en cDNAs de semillas sugirió también que estos procesos podían estar asociados al tipo de tejido.

Para abordar el estudio de posibles eventos de *splicing* alternativo se utilizó el siguiente diseño experimental. Se diseñaron distintas parejas de oligonucleótidos en las secuencias que flanquean a cada intrón (Tabla II. 5), como se indica en la Figura III. 8A, de modo que mediante análisis de RT-PCR podrían identificarse los casos donde hubiese retenciones totales o parciales del intrón, que darían lugar a la aparición de más de una banda en electroforesis en geles de agarosa. Para este estudio se empleó cDNA sintetizado a partir de RNAs aislados de 3 tejidos diferentes: cotiledón, raíz y semilla madura de *Brachypodium*. Los cotiledones y raíces se diseccionaron de semillas germinadas durante 5 días. Como control negativo se empleó RNA sin retrotranscribir procedente de cada uno de los tejidos analizados.

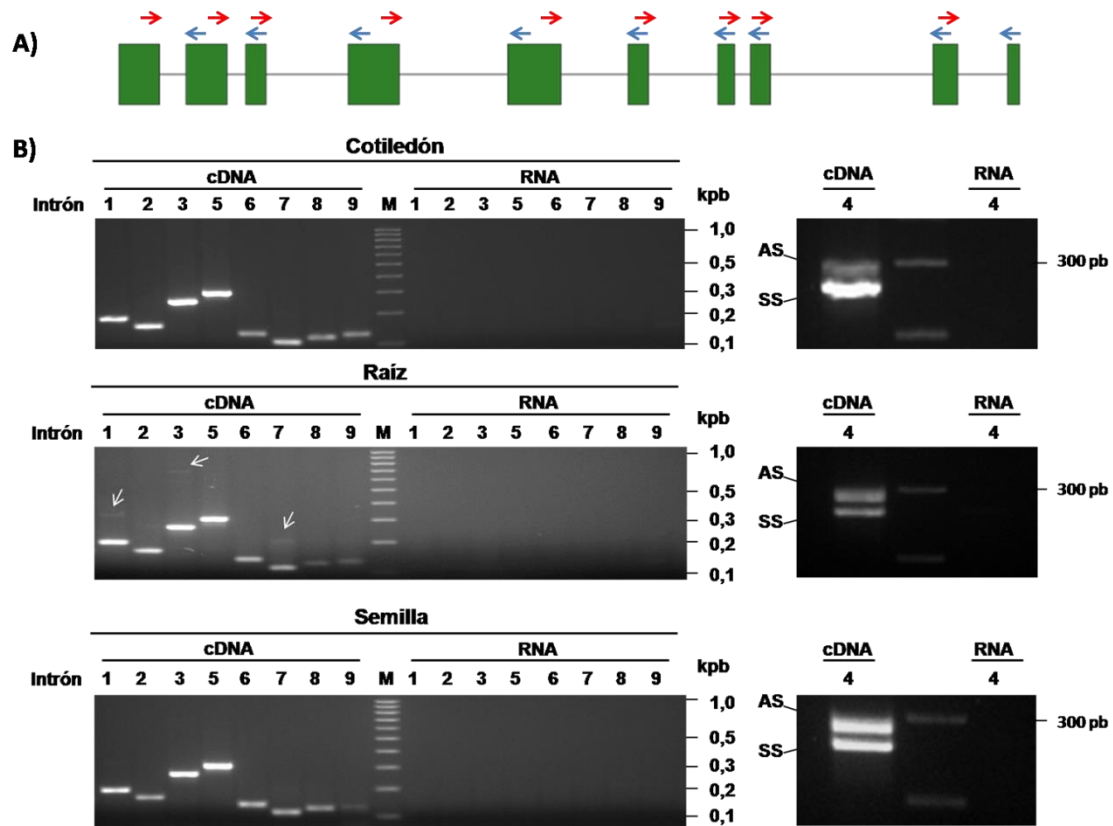


Figura III. 8. A, Esquema del gen *NtrC* de *Brachypodium* y diseño de los oligonucleótidos para el estudio de *splicing* alternativo. Cada oligonucleótido sentido (rojo) va acompañado de su oligonucleótido anti-sentido (azul) que se encuentra en el exón contiguo. B, Identificación de eventos de *splicing* alternativo del gen *NtrC*. Para la correcta visualización de los productos de las PCRs se realizaron geles al 2,5% en todos los casos, salvo para la región del intrón 4, donde se utilizaron geles del 3,5% de agarosa.

Los resultados obtenidos (Figura III. 8B) mostraron la existencia de dos poblaciones de mensajeros para NTRC asociados a la retención de la secuencia de 23 pb correspondientes al final del intrón 4. Ambas poblaciones de mensajeros estaban presentes tanto en tejidos fotosintéticos como heterotróficos pero existían diferencias entre los niveles de expresión según el tejido: en tejidos fotosintéticos el mensajero SS era mucho más abundante que el AS, mientras que en tejidos heterotróficos (tanto raíz como semilla) el nivel de expresión de ambos mensajeros era similar.

No se observaron otros fenómenos de *splicing* alternativo ni en hoja ni semilla, pero sí en raíces. Tanto en el intrón 1, como en los intrones 3 y 7 se observaron dos bandas, una inferior de mayor intensidad, que se correspondería con el mensajero estándar y otra superior, de intensidad muy débil, que correspondería con el tamaño esperado para la retención total del correspondiente intrón. Así pues, de estos

resultados se concluye que la expresión del gen *NtrC* se encuentra sujeta a fenómenos de *splicing* alternativo y que al menos uno de estos fenómenos se produce en todos los tejidos estudiados.

III.2.3. Caracterización del mensajero alternativo

III.2.3.1. Mecanismo de formación del mensajero alternativo

El mensajero alternativo del gen *NtrC* observado en los distintos tejidos de *Brachypodium* correspondería a la retención de una secuencia de 23 pb al final del intrón 4. El análisis de la secuencia retenida en dicho mensajero muestra la presencia de un dinucleótido canónico "AG", 23 nucleótidos aguas arriba del aceptor que genera el transcrito normal, y que podría ser utilizado como aceptor alternativo por la maquinaria del espliceosoma. La adición de estos 23 nucleótidos resulta en un cambio en la fase de lectura, provocando la aparición de un codón de parada prematuro en el mensajero (Figura III. 9).

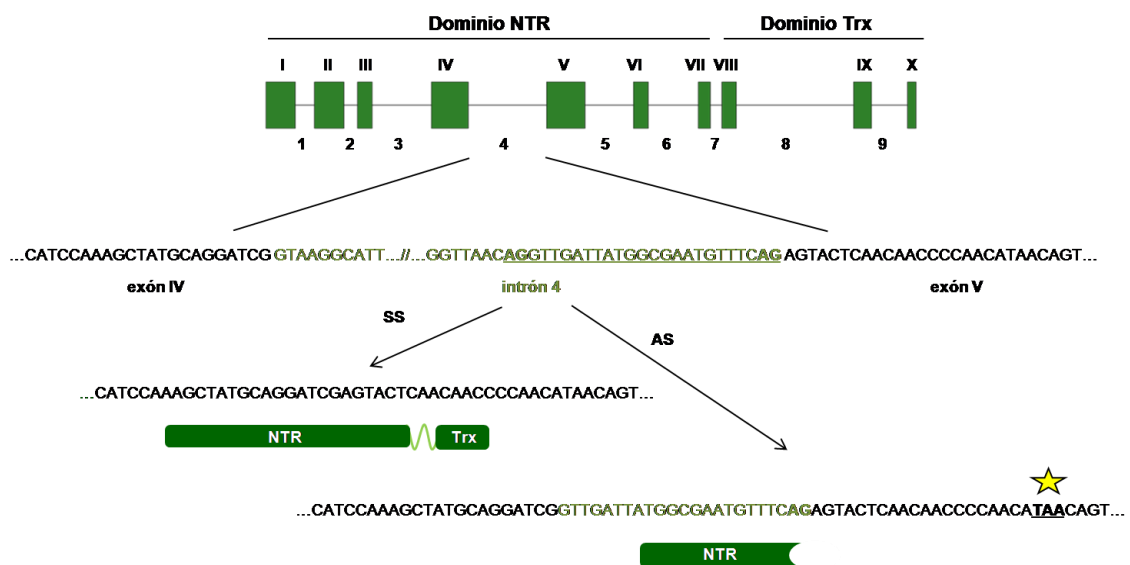


Figura III. 9. Esquema de *splicing* alternativo y formación de dos tipos de mensajeros de *NtrC*. Se muestra la estructura del gen *NtrC* de *Brachypodium* señalándose las regiones que componen cada dominio. En la representación se muestra la secuencia de los exones IV y V (en negro) así como, la secuencia intrónica que los separa (en verde), resaltándose las 2 parejas de dinucleótidos "AG" aceptores para el proceso de escisión de intrones y ensamblaje de exones. El mensajero alternativo contiene 23 nucleótidos adicionales que provocan la aparición de un codón de parada prematuro (estrella amarilla).

III.2.3.2. Conservación del proceso de *splicing* alternativo en genes *NtrC* de plantas y expresión diferencial en tejidos fotosintéticos y heterotróficos

La presencia del mensajero alternativo, debido a la retención de 23 nucleótidos correspondientes al final del intrón 4, identificado aquí para el gen *NtrC* de *Brachypodium*, se había observado previamente en el gen de arroz (Pérez-Ruiz, 2006). Este resultado sugería la posibilidad de que se tratara de un fenómeno conservado en más organismos. Para comprobar esta posibilidad se realizó el alineamiento de esta región del gen *NtrC* de distintas plantas. La Figura III. 10 muestra que, aunque la composición de este intrón es muy variable entre los organismos comparados, la secuencia final correspondiente a los 23 nucleótidos del evento de *splicing* alternativo se encuentra muy conservada, manteniendo además todas ellas el dinucleótido canónico “AG” necesario para el procesamiento alternativo.



Figura III. 10. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos correspondientes al final del intrón 4 y principio del exón V del gen *NtrC* de plantas. En verde se muestra la secuencia correspondiente al final del intrón 4, en negro la secuencia correspondiente al exón V y subrayada la secuencia de 23 nucleótidos correspondientes al final del intrón. En el recuadro rojo se señala la conservación del dinucleótido aceptor “AG” alternativo, necesario para la formación del nuevo mensajero. El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el programa *Clustal Omega*. Los números de acceso para cada secuencia son los mostrados entre paréntesis: *G. max* Cr 02 y Cr 10 (GeneID:100794561 y GeneID:100819254); *T. cacao* (GeneID:18598885); *V. vinifera* (GeneID:100262307); *S. lycopersicum* Cr 04 y 10 (GeneID:101266017 y GeneID:101254347); *S. tuberosum* (GeneID:102585390); *A. thaliana* (GeneID:818766); *Z. mays* (GeneID:100216789); *O. sativa* (GeneID:102716057); *B. distachyon* (GeneID:100829068).

Por el contrario, cuando se incorporaron a este análisis las secuencias correspondientes al gen *NtrC* para el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y el musgo *Physcomitrella patens* (Figura III. 11) no se encontró la secuencia de 23 nucleótidos en la región comparada.

Estos datos indican, por tanto, que el procesamiento alternativo del gen *NtrC* está altamente conservado en plantas superiores y ausente en el resto de organismos fotosintéticos.



Figura III. 11. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos correspondientes al final del intrón 4 y principio del exón V del gen *NtrC* en organismos eucarióticos fotosintéticos. En verde se muestra la secuencia correspondiente al final del intrón 4, en negro la secuencia correspondiente a la región exónica V y subrayada la secuencia de 23 nucleótidos correspondientes al final del intrón, presente tan sólo en el grupo de plantas con semillas. El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el programa *Clustal Omega*. Los números de acceso para cada secuencia son los siguientes: *C. reinhardtii* (GenelD:5715808); *P. patens* Cr 20 y 23 (GenelD:5916755 y GenelD:5948454); *S. lycopersicum*Cr10 (GenelD:101254347); *A. thaliana* (GenelD:818766); *B. distachyon* (GenelD:100829068).

Una vez identificada la presencia de la secuencia de 23 pb que sufre *splicing* alternativo en genes *NtrC* de distintas especies vegetales, se utilizó la técnica de RT-PCR para comprobar la presencia de ambos mensajeros en algunas de estas especies. Para ello se diseñaron oligonucleótidos flanqueando la región de interés para los genes *NtrC* de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y también para las dos copias del gen presentes en tomate (Figura III. 12A y Tabla II. 6). En este último caso, los oligonucleótidos se diseñaron de modo que permitiesen discernir entre la amplificación de las dos copias del gen en tomate. En el caso de esta planta, al proceder las muestras de semillas germinadas durante 5 días, se pudieron analizar los tres tipos de tejido presentes en esa fase de desarrollo: cotiledones, hipocotilo y

raíces. Para el caso de *Arabidopsis* se analizaron las hojas y raíces procedentes de plántulas de 15 días crecidas en medio MS con sacarosa.

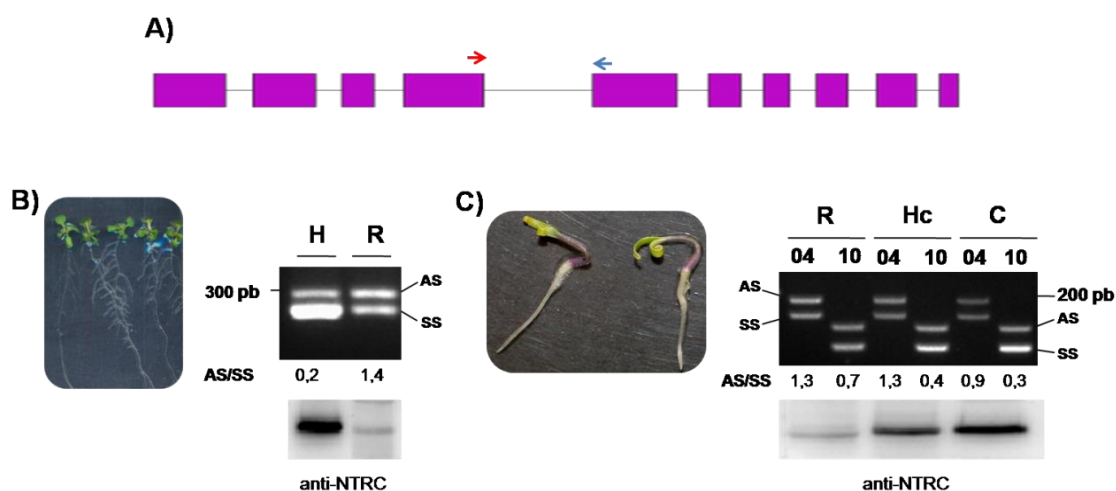


Figura III. 12. Identificación de procesos de *splicing* alternativo del gen *NtrC* en *Arabidopsis* y tomate. (A) Las flechas sobre el gen indican la zona donde se diseñaron los oligonucleótidos, sentido (rojo) y anti-sentido (azul). Análisis de los productos de RT-PCR obtenidos a partir de RNA total aislado de los tejidos indicados de *Arabidopsis* (B) y tomate (C). Para el caso de tomate se indica el cromosoma (04 ó 10) en el que se encuentra la copia del gen *NtrC*. Para ambos casos se determinó la proporción AS/SS mediante la cuantificación de la intensidad de las bandas con el programa *Scion Image*. El contenido de proteína NTRC en estos tejidos se determinó mediante *Western-blot* a partir de extractos proteicos totales de cada uno de los tejidos estudiados (12,5 µg para hojas y cotiledones, 25 µg para hipocotilo y raíces) usando el anticuerpo primario anti-NTRC. H, hoja; C, cotiledón; R, raíz; Hc, hipocotilo.

Los resultados de este análisis (Figura III. 12B y 12C) revelaron que, efectivamente, este fenómeno de *splicing* alternativo se producía también en otras plantas, y que en organismos con dos copias para el gen *NtrC* ambas se expresaban y sufrían este tipo de procesamiento alternativo.

Los resultados también mostraron que en estas plantas, al igual que en *Brachypodium*, existían diferencias entre los niveles de un tipo de mensajero u otro según el tejido analizado, y que en el caso de tomate existían también diferencias entre los niveles de ambos transcritos del gen *NtrC* de los dos cromosomas. Acorde a lo observado mediante RT-PCR, los niveles de proteína NTRC tanto en *Arabidopsis* como en tomate resultaron ser inferiores en raíces que en hipocotilo y cotiledón, presentando este último los niveles más elevados. Estos resultados, sugieren que este evento de *splicing* alternativo, que afecta a la expresión de los genes *NtrC* de plantas,

no sólo está conservado sino que podría participar en la regulación de los niveles totales de proteína NTRC.

Para testar esta posibilidad, se realizó un estudio en mayor profundidad de los niveles de los dos mensajeros y de la proteína total que se acumula en distintos tejidos de *Brachypodium*. En concreto, se analizaron distintos estadios de desarrollo de semillas, así como semillas germinadas, cotiledones y raíces.

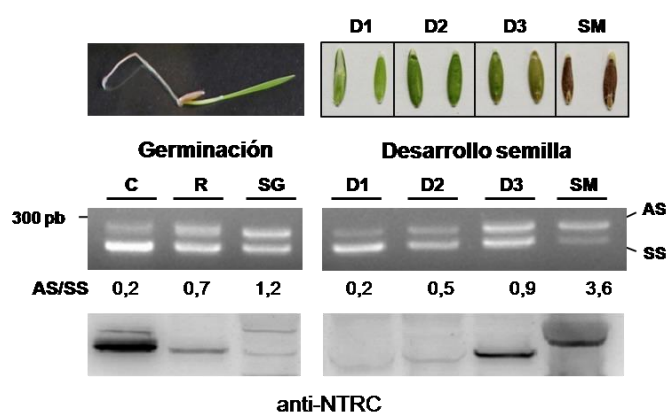


Figura III. 13. Análisis de los productos de *splicing* alternativo del gen *NtrC* en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de *Brachypodium*. Las semillas en desarrollo se clasificaron en las clases **D1** a **D3**, según su estado de desarrollo, y semillas maduras (**SM**). El análisis en post-germinación se realizó en semillas que se habían embebido en agua durante 5 días, de las que se diseccionaron cotiledones (**C**), raíces (**R**) y semilla germinada (**SG**). En cotiledones y raíces se cargó la mitad del volumen de la PCR, mientras que en semillas germinadas y en desarrollo se cargó todo el volumen del producto de PCR. La proporción mensajeros AS/SS se cuantificó mediante el uso del software *Scion Image*. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 3,5%. El contenido de proteína NTRC en estos tejidos se determinó mediante *Western-blot* a partir de extractos proteicos totales de cada uno de los tejidos estudiados (12,5 µg para cotiledones y 25 µg para raíces y semillas) usando el anticuerpo primario anti-NTRC.

Los resultados de estos análisis (Figura III. 13) mostraron diferencias en los niveles de mensajeros alternativos y estándar en los distintos tejidos analizados durante la germinación de la semilla, observándose un mayor nivel del mensajero alternativo en tejidos no fotosintéticos. Del mismo modo, los resultados de los *Western-blot* para dichos tejidos mostraron un mayor nivel de proteína NTRC en cotiledones que en raíces y semillas germinadas, acorde a los niveles de los dos tipo de mensajeros del gen. Por otro lado, los análisis realizados durante el desarrollo de la semilla mostraron que a lo largo de este proceso se invierten los niveles relativos de ambos mensajeros (Figura III. 13). En las primeras fases del desarrollo el mensajero estándar es más abundante que el alternativo pero a medida que el proceso de maduración avanza el mensajero alternativo se hace más abundante respecto al

estándar. A pesar de estos resultados, cuando se analizó el contenido de proteína NTRC no se detectó señal para la proteína hasta los estadios más avanzados del desarrollo y en la semilla madura, indicando un posible desfase entre los procesos de transcripción y traducción.

III.2.3.3. Efecto de factores ambientales sobre el *splicing* alternativo del gen *NtrC*

En los últimos años se le ha dado cada vez más relevancia a los fenómenos de *splicing* alternativo en plantas, considerándose como una fuente de variabilidad para la obtención de nuevas proteínas a partir de un único gen o como un mecanismo regulador de los niveles finales de una determinada proteína (Syed et al., 2012). Recientemente se han descrito diversos ejemplos de cómo tanto el estrés biótico como abiótico afectan a la expresión de determinados genes mediante mecanismos de *splicing* alternativo (Dubrovina et al., 2013). Así mismo, también se ha comprobado que muchos de los genes implicados en el reloj del ciclo circadiano o regulados por el mismo, se ven afectados por este tipo de procesamiento (Filichkin and Mockler, 2012; Filichkin et al., 2015). Por ello, en este trabajo se ha analizado si el proceso de *splicing* alternativo identificado para el gen *NtrC* de *Brachypodium* se ve afectado por condiciones ambientales, entre las cuales se seleccionaron frío y salinidad.

Para el desarrollo de los experimentos de estrés por frío las semillas de *Brachypodium* se germinaron en oscuridad durante 4 días a 25°C. Tras este tiempo, las semillas se incubaron en frío, a 4°C, durante 24 h, manteniendo la condición de oscuridad. A partir de las muestras obtenidas se diseccionaron los cotiledones y raíces y se analizó la presencia de los mensajeros AS y SS del gen *NtrC* de *Brachypodium*, mediante RT-PCR, así como los niveles de proteína NTRC mediante *Western-blot*. Los análisis de RT-PCR del RNA aislado de cotiledones y raíces mostraron la presencia de ambos tipos de mensajeros en las condiciones analizadas. En el caso de cotiledones, se observó que las muestras sometidas a frío sufrían una reducción de 5 veces en la proporción AS/SS respecto a los niveles detectados en el control, como consecuencia de una disminución en los niveles de mensajero alternativo mientras que los análisis de *Western-blot* no detectaron diferencias en los niveles de proteínas NTRC (Figura III. 14A).

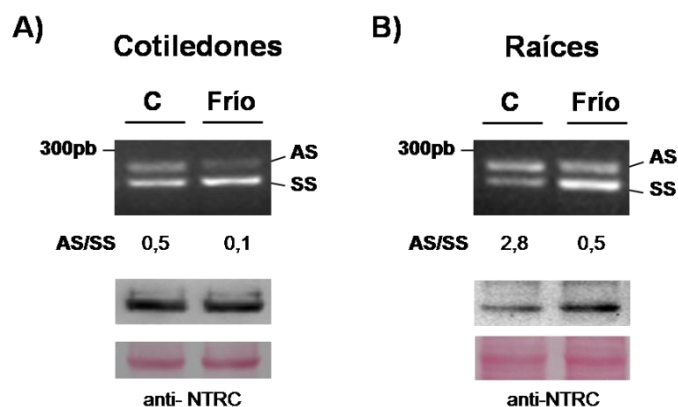


Figura III. 14. Efecto del estrés por frío en el proceso de *splicing* alternativo del gen *NtrC* de *Brachypodium* en cotiledones (A) y raíces (B). Los productos de RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3,5%. La proporción mensajeros AS/SS se cuantificó mediante el uso del software *Scion Image*. El contenido en proteína NTRC se analizó mediante *Western-blot* a partir de extractos de proteínas. En los geles de cotiledones se cargaron 12,5 μ g de proteína total y 25 μ g en el caso de raíces. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-NTRC. Los geles de acrilamida se realizaron al 10% en condiciones reductoras. La eficiencia de la transferencia y el nivel de carga se comprobaron mediante tinción con *Ponceau*. C (muestra control), Frío (muestra tratada con frío).

En el caso de raíces, el análisis del *splicing* alternativo del gen *NtrC* mostró un comportamiento similar al observado en cotiledones, donde tras el tratamiento con frío se produjo una disminución de la relación AS/SS, observándose una inversión en los patrones de expresión de ambos mensajeros entre las muestras tratadas y no tratadas. Los análisis de *Western-blot* mostraron que tras el tratamiento por frío se incrementaron los niveles de proteína NTRC en las raíces tratadas en frío respecto a las muestras control (Figura III. 14B).

Para el desarrollo de los experimentos de estrés salino, las semillas de *Brachypodium* se germinaron en luz en condiciones de día largo a 25°C. Tras el cuarto día de crecimiento, las semillas germinadas se traspasaron a nuevas placas que contenían papel de filtro humedecido con NaCl 170 mM, donde se incubaron durante 24 h. Tras este tiempo se procedió del mismo modo descrito para el caso anterior. Los resultados de las RT-PCR en cotiledones mostraron la presencia de ambos tipos de mensajeros tanto en las muestras tratadas como en las control (Figura III. 15A). Los análisis de la relación AS/SS mostraron un valor inferior en las muestras sometidas a estrés por salinidad (0,1) respecto al control (0,2). A pesar de ello, los análisis de *Western-blot*, no mostraron diferencias significativas respecto a los niveles totales de proteína NTRC.

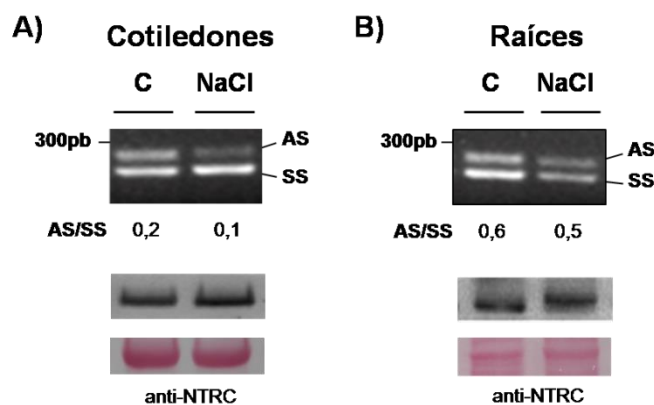


Figura III. 15. Efecto del estrés por salinidad en el proceso de *splicing* alternativo del gen *NtrC* de *Brachypodium* en cotiledones (A) y raíces (B). Los productos de RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3,5%. La proporción mensajeros AS/SS se cuantificó mediante el uso del software *Scion Image*. El contenido en proteína NTRC se analizó mediante *Western-blot* a partir de extractos de proteínas. En los geles para cotiledones se cargaron 12,5 μ g de proteína total y 25 en el caso de raíces. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-NTRC. Los geles de acrilamida se realizaron al 10% en condiciones reductoras. La eficiencia de la transferencia y el nivel de carga se comprobaron mediante tinción con *Ponceau*. **C** (muestra control), **NaCl** (muestra incubada con 170 mM de NaCl).

Un patrón similar se observó en el caso de raíces, en las que se observó también la presencia de ambos mensajeros en las muestras analizadas (Figura III. 15B). Al igual que en cotiledones, en las raíces tratadas también se produjo una ligera disminución de la relación AS/SS con respecto al control, sin apreciarse cambios en los niveles totales de proteína NTRC.

III.2.3.4. El producto del mensajero alternativo del gen *NtrC* codificaría para una proteína truncada

Como se indicó anteriormente, la presencia de los 23 nucleótidos adicionales en el mensajero alternativo daría lugar a un codón de parada prematuro que, por tanto, generaría una proteína NTRC truncada. Como se indica en la Figura III. 16, esta proteína tendría un peso molecular aproximado de 29,8 kDa frente a los 56,8 kDa esperados para la proteína normal y conservaría la mayor parte del dominio NTR, incluyendo las Cys del sitio activo y los sitios de unión del FAD y del NADPH, sin embargo, carecería por completo del dominio Trx.

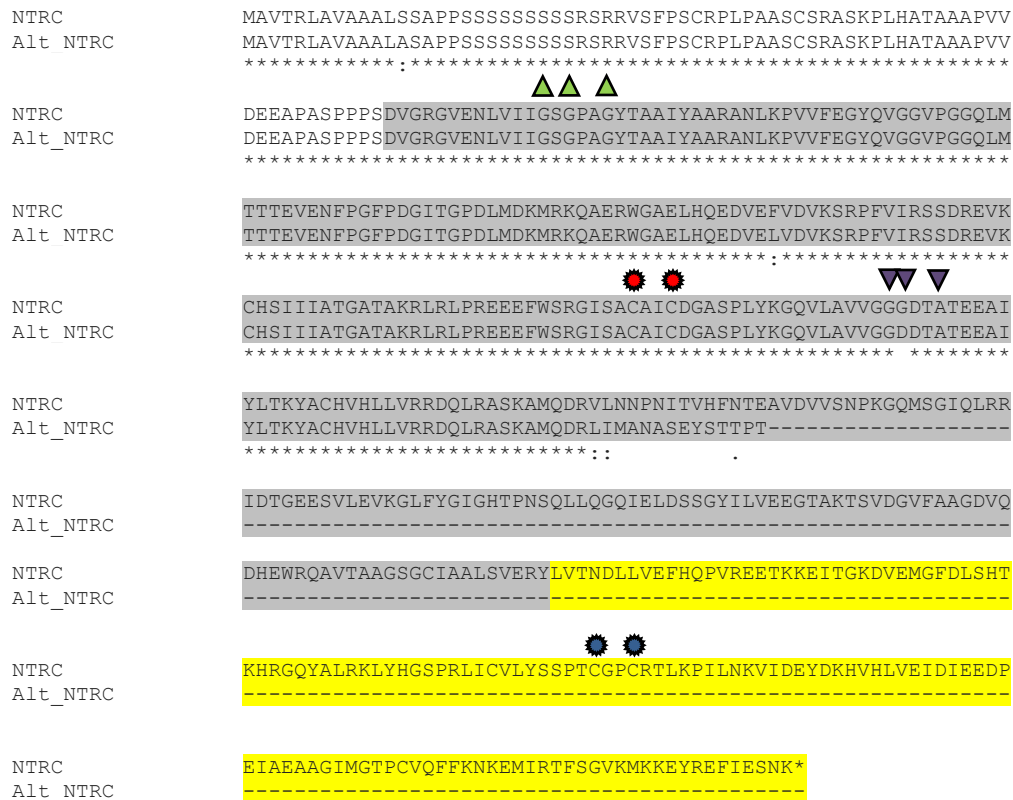


Figura III. 16. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de NTRC y NTRC alternativa (Alt_NTRC) de *Brachypodium*. Los residuos correspondientes al dominio NTR de la proteína se indican en gris y en amarillo los correspondientes al módulo Trx. Las Cys de los sitios activos de cada dominio aparecen marcadas con asteriscos rojo y azul. Los triángulos verdes indican el sitio de unión del FAD y los triángulos violetas invertidos el sitio de unión del NADPH. El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el programa *Clustal Omega*.

Dado que la posible proteína truncada que se produce mediante el evento de *splicing* alternativo contendría la mayor parte del dominio NTR de NTRC, existe la posibilidad de que se genere una NTR adicional *in vivo*. En este trabajo se ha analizado esta posibilidad a través de distintas aproximaciones.

En primer lugar, mediante la técnica de *Western-blot* utilizando el anticuerpo anti-NTRB que detectaría el dominio NTR de las proteínas NTRA, NTRB y NTRC, en contraposición con el anticuerpo anti-NTRC que detectaría exclusivamente el dominio Trx de esta última, se intentó determinar la presencia de la proteína truncada. Para ello, se realizó una extracción de proteína de semillas en desarrollo, semillas maduras, semillas germinadas y cotiledones de *Brachypodium*, tejidos con diferentes proporciones de mensajero alternativo. El análisis de *Western-blot* identificó una banda de unos ~30 kDa en muestras de semillas germinadas y maduras (Figura III. 17A), pero no en las de cotiledones ni semillas en desarrollo, donde sólo aparecía la

señal correspondiente a las NTRs A y B (Figura III. 17A y B). Por tanto, esta banda podría corresponder a la proteína truncada, y la ausencia de señal en semillas en desarrollo y cotiledones, que contienen el mensajero alternativo, podría deberse a los bajos niveles del mismo en estos tejidos.

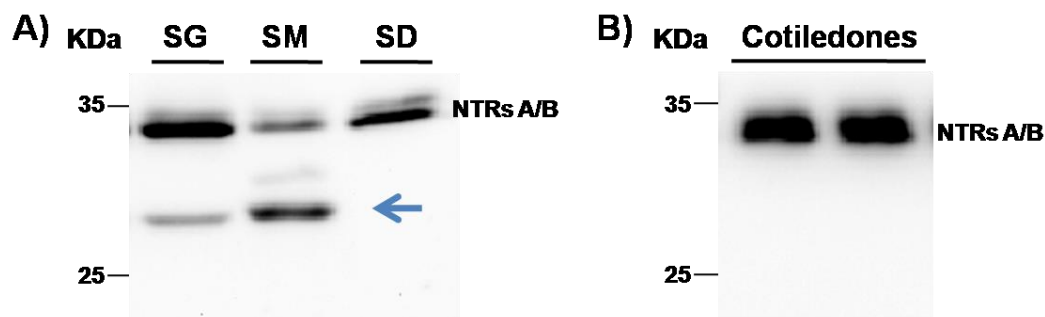


Figura III. 17. Identificación de la posible forma truncada de NTRC mediante *Western-blot* de semillas (A) y cotiledones (B) de *Brachypodium* con el anticuerpo anti-NTRB. La posible presencia de una forma truncada de NTRC se analizó mediante *Western-blot* usando como anticuerpo anti-NTRB. Para ello, se analizaron 25 μ g de extracto proteico en geles desnaturalizantes de acrilamida al 11%, en condiciones reductoras, de semillas germinadas tras 5 días (SG), semilla madura (SM) semilla en desarrollo (SD) y cotiledón de 5 días. La flecha azul señala la inmunodetección de la posible forma alternativa de NTRC.

En segundo lugar, para determinar si la proteína observada en estos análisis de *Western-blot* correspondía a la NTRC truncada, se realizó una electroforesis bidimensional usando como muestra extracto proteico de semillas maduras. La técnica se llevó a cabo por duplicado, uno de los geles se analizó mediante *Western-blot*, que se reveló con el anticuerpo anti-NTRB, mientras que el otro se empleó en una tinción con azul de *Coomasie* para su posterior identificación por MALDI-TOF. Aunque en el análisis de *Western-blot* se detectaron 3 señales que podrían corresponder con la proteína NTRC truncada, NTRA y NTRB, respectivamente, el gel teñido con *Coomasie* presentaba una gran abundancia de proteínas en esa misma región (Figura III. 18), dificultando la identificación de la posible forma truncada de NTRC en los análisis de MALDI-TOF.

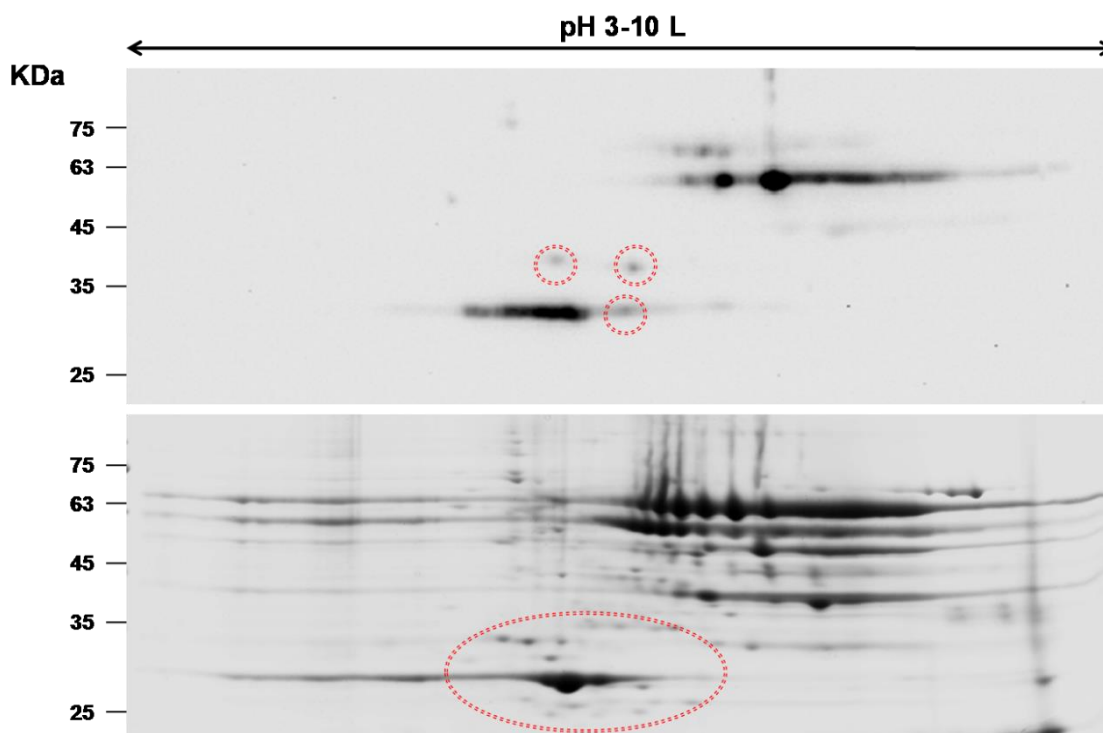


Figura III. 18. Identificación de la posible forma truncada de NTRC mediante electroforesis bidimensional de extractos proteicos de semillas maduras. Se emplearon 500 μ g de extracto proteico para la electroforesis bidimensional. Para la primera dimensión se emplearon tiras de IPTG de rango pH 3 a 10 lineal. En la segunda dimensión se utilizaron geles de acrilamida al 11%. **Arriba**, resultado del *Western-blot* usando como anticuerpo anti-NRTB. **Abajo**, tinción del gel con azul de *Coomasie*. En rojo se señalan las manchas candidatas a ser la proteína de interés.

III.3. GENERACIÓN DE PLANTAS DE *BRACHYPODIUM* CON NIVELES ALTERADOS DE NTRC EN SEMILLAS

El descubrimiento de la presencia de NTRC en plastos de tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos, como la raíz (Kirchsteiger et al., 2012), sugirió la posibilidad de que esta enzima pudiese estar también presente en plastos de otros tejidos heterotróficos como los amiloplastos del endospermo de semillas de cereales. En este tipo de tejido el almidón constituye el principal polisacárido de reserva. Una de las enzimas claves en el proceso de síntesis de almidón es la AGPasa que cataliza la conversión de Glu-1-P en ADP-Glu, forma activada de la glucosa que se incorpora al polisacárido. La reacción catalizada por la AGPasa constituye un paso limitante en la ruta de síntesis de almidón y está sometida a regulación por diferentes mecanismos. Entre estos se encuentra la regulación redox de la AGPasa plastidial, mediada por Trx *f* y NTRC (Lepisto et al., 2013; Thormahlen et al., 2013; Geigenberger and Fernie, 2014). En este sentido, cabe

destacar que los mutantes de *Arabidopsis* carentes de NTRC muestran alteración del estado redox de la AGPasa, que presenta menor nivel de reducción en respuesta a luz o azúcares lo que se relaciona con el menor contenido de almidón en hojas y raíces de estas plantas (Michalska et al., 2009). Resultados previos obtenidos por nuestro grupo mostraron que NTRC está presente en el endospermo de semillas de cereales como el arroz y el trigo (Cano, 2013). Aunque se desconocen los mecanismos de regulación de la AGPasa en endospermo de cereales, el estudio de proteínas diana de NTRC de este tejido, mediante cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación, permitió identificar diversas proteínas implicadas en la síntesis de almidón, como la AGPasa, el transportador de ADP-Glu y enzimas ramificantes, entre otras, que serían por tanto posibles proteínas reguladas por NTRC (Cano, 2013). Estos resultados plantearon la posibilidad de que el proceso de síntesis de almidón en el endospermo esté sujeto a control redox, donde NTRC podría jugar un papel central regulando enzimas que participan de forma directa o indirecta en la síntesis de este polisacárido.

Dada la importancia económica del almidón, no sólo por ser el principal aporte de carbohidratos de la dieta humana y del ganado, sino también como combustible y aditivo en numerosos procesos industriales, las estrategias biotecnológicas encaminadas a mejorar el contenido de almidón en cereales son de gran relevancia. Basándonos en los datos previamente descritos que indican la posible función de NTRC en el proceso de regulación de su síntesis, otro de los objetivos de este trabajo ha consistido en analizar en mayor profundidad la participación de NTRC en la regulación redox de la síntesis de almidón en semillas de cereales y su posible aplicación biotecnológica. Para abordar este objetivo se eligió como planta modelo el cereal *Brachypodium distachyon* y se desarrollaron estrategias para generar plantas transgénicas de este cereal con niveles alterados de NTRC en endospermo de semillas.

III.3.1. Construcción del transgén

Para la generación de plantas transgénicas de *Brachypodium* se utilizó un vector de expresión basado en el vector binario pBrachyTAG-G210 (G210), cedido por V. Thole y P. Vain del *John Innes Center*, Norwich (Reino Unido). Este vector posee un tamaño total de 5.848 pb, proporciona resistencia a kanamicina en bacterias y

contiene como marcador de selección de las plantas transformadas el gen de resistencia a higromicina.

Respecto al diseño del transgén, como nuestro objetivo consistía en expresar *NtrC* específicamente en endospermo de semillas de *Brachypodium*, se abordó una búsqueda de genes de este cereal con alto nivel de expresión en endospermo. Como resultado de esta búsqueda se identificó el gen *GLU1*, que codifica para una glutenina y que, efectivamente, muestra un alto nivel de expresión específicamente en endospermo de semillas sin que se detecte un nivel significativo de expresión en el embrión ni en otros órganos de la planta (Coussens et al., 2012). Por tanto, se eligió el promotor del gen *GLU1* para expresar *NtrC*.

La clonación del promotor *GLU1* se realizó por PCR a partir de DNA genómico de hoja utilizando la pareja de oligonucleótidos F-PromotGlu1 y R-PromotGlu1 (Tabla II. 7). Los productos procedentes de la amplificación se clonaron en el vector pGEM-T y se secuenciaron. Ya que en nuestro grupo se había caracterizado el gen *NtrC* de arroz, se utilizaron tanto el cDNA de NTRC de arroz como el de *Brachypodium*, previamente clonados en pGEM-T, para la generación de plantas transgénicas. El cDNA completo del gen *NtrC* de *Brachypodium* se amplificó mediante RT-PCR a partir de mRNA total de hoja, usando las parejas de oligonucleótidos F-BdcNTRC y R2-BdcNTRC (Tabla II. 7). Los productos obtenidos se clonaron en el vector pGEM-T y se secuenciaron. Para completar la estructura del transgén se añadió el terminador *NosTer*, que se clonó a partir del vector G210.

La construcción del transgén se llevó a cabo de forma secuencial empleando las dianas de restricción *StuI*, *Apal* y *BsiwI* presentes en el T-DNA del vector G210 y situadas aguas abajo de p35S::Hyg. El promotor *GLU1* se amplificó a partir de la secuencia ya clonada en el vector pGEM-T utilizando una nueva pareja de oligonucleótidos (F-PGlu1_ *StuI* y R-PGlu1_ *Apal*; Tabla II. 8) que añadían las secuencias dianas de *StuI* y *Apal* a los extremos 5' y 3' del promotor, respectivamente. Para la clonación en G210 del cDNA de *NtrC* y el terminador *NosTer* se siguió la siguiente estrategia. Las secuencias de cDNA del gen *NtrC* se amplificaron a partir de las ya clonadas en pGEM-T, empleando los oligonucleótidos F-BdNTRC_ *BsiwI* y

R-BdNTRC_SacI para el cDNA de *Brachypodium* y F-OsNTRC_ApaI y R-OsNTRC_SacI para el cDNA de arroz, que añadieron las correspondientes dianas de restricción (Tabla II. 8). El terminador *Nos* se amplificó a partir del vector G210, empleando los oligonucleótidos F-NosT_SacI y R-NosT_BsiwI (Tabla II. 8). Los productos obtenidos se digirieron con la enzima *SacI* que permitió la posterior ligación del terminador con el cDNA de *NtrC*. Los productos de esta ligación, *NtrC::NosTer*, se clonaron en un vector G210 que ya contenía el promotor *GLU1*. Las construcciones finales (Figura III. 19) se secuenciaron para comprobar la total integridad del transgén así.

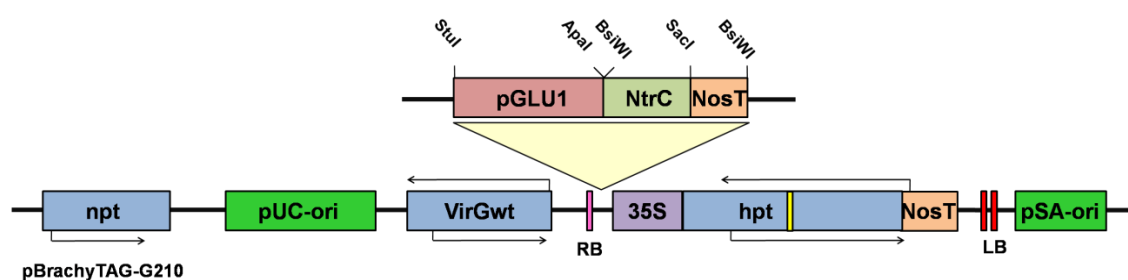


Figura III. 19. Representación esquemática de la construcción *pGLU1::NtrC::NosTer* introducida en el vector *pBrachyTAG-G210*. La clonación se realizó en dos pasos, primero la inserción del promotor *GLU1* y luego la inserción del cDNA del gen *NtrC* (de arroz o de *Brachypodium*) fusionada a *NosTer*. Esquema a escala indicando los sitios de restricción empleados en la clonación. Diseño realizado con el programa *pDraw32*.

Finalmente, el vector *G210::pGLU1::NtrC_{Bd/Os}::NosTer* se co-transfirió junto al plásmido *pSoup*, mediante electroporación, a la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

III.3.2. Generación de plantas de *Brachypodium* con niveles alterados de NTRC en endospermo de semillas

Para la generación de plantas transgénicas de *Brachypodium* se transformaron callos embriogénicos compactos (CECs) con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* portadora de las construcciones descritas en el apartado anterior. Para ello se optimizó un protocolo de transformación de callos de *Brachypodium* mediante modificaciones de protocolos ya publicados (Christiansen et al., 2005; Vogel et al., 2006; Vain et al., 2008; Vogel and Hill, 2008), que se explica con detalle en el apartado II. 7 de Materiales y métodos. A continuación se describe de manera esquemática cada

uno de los pasos de dicho protocolo, resaltando los principales puntos críticos en cada uno de ellos.

a) Obtención de embriones. Los embriones inmaduros se aislaron de semillas en desarrollo que presentaban un endospermo flexible y blando al tacto. Durante la extracción y manipulación del embrión se evitó dañar el escutelo, ya que a partir de éste se originan los callos embriogénicos compactos (CECs). La adecuada selección del embrión supone el primer paso crítico de la transformación. No todos los embriones son capaces de generar CECs. Los embriones pequeños y translúcidos, como el mostrado en la Figura III. 20, son los que generaron callos de mejor calidad y rendimiento. A medida que el embrión madura la tasa de formación de CECs decae.

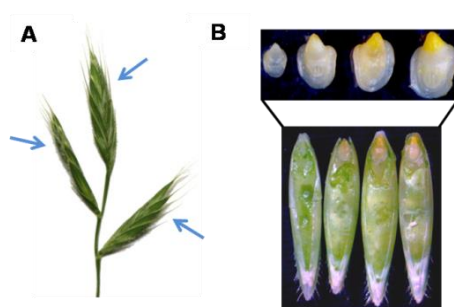


Figura III. 20. Producción de embriones inmaduros. Las espigas se obtuvieron de plantas de *Brachypodium distachyon* Bd21 tras 10 semanas de crecimiento. Las flechas azules señalan la localización en la espiga de las semillas de interés para el aislamiento de embriones (A). En el panel B se muestran distintos estadios de desarrollo de embriones aislados, de más inmaduro (izquierda) a más maduro (derecha).

b) Generación de CECs. Los embriones aislados se colocaron con la cara del escutelo hacia abajo en medio CIM, durante un periodo total de 6 semanas. Como se observa en la Figura III. 21, tras la primera semana cada embrión generó un brote que se eliminó tan pronto como fue posible ya que su crecimiento afecta a la formación del callo. A partir del escutelo se observó la formación de distintos tipos de tejidos, por un lado callos blanquecinos de aspecto acuoso, no compactos, que se descartaron y, por otro lado, callos de color amarillo compactos, que se transfirieron y sub-cultivaron en medio CIM fresco hasta que estos CECs estuvieron listos para ser transformados. Durante esta etapa se comprobó que existe una estrecha relación entre el estado de desarrollo del embrión y la proporción de la formación de ambos tipos de callos.

Cuanto más maduro es el embrión mayor es la proporción de callos no compactos generados.

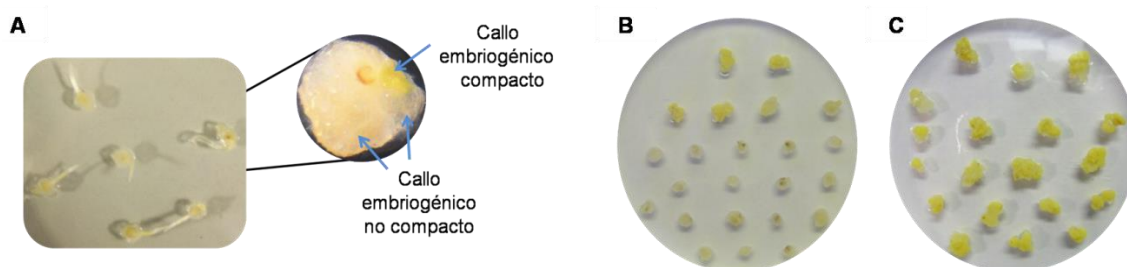


Figura III. 21. Producción de callos embriogénicos compactos (CECs) en medio CIM. Eliminación de brotes durante la primera semana y selección de callos embriogénicos compactos (A). Selección y multiplicación de callos tras 4 semanas en medio CIM (B). Callos tras 6 semanas en medio CIM, antes de ser transformados (C).

c) Transformación. Los CECs se transfirieron a tubos que contenían la suspensión de *Agrobacterium* portadora del vector G210 con el transgén y se incubaron a temperatura ambiente con agitación suave durante al menos 5 min, pudiendo prolongarse este tiempo hasta 30-45 min. Se comprobó que tiempos superiores de incubación afectaban a la integridad de los callos, complicando su posterior manipulación. Tras la incubación, se descartó la suspensión de bacterias y los CECs se transfirieron a placas Petri con papel de filtro estéril, consiguiendo así eliminar el excedente de *Agrobacterium*. Los callos se dejaron secar unos minutos y, a diferencia de lo descrito en los protocolos empleados como referencia, se transfirieron a nuevas placas Petri con papel de filtro estéril y seco, en vez de humedecerlo con medio CIM y acetosiringona. Posteriormente, se incubaron por un periodo de 5 días en oscuridad a temperatura ambiente.

El secado de los callos tras la incubación con *Agrobacterium* supone el principal punto crítico del proceso de transformación. A través de este paso se promueve la transformación del callo y se limita el sobre-crecimiento de *Agrobacterium*, evitando posteriores problemas de contaminación del medio por esta bacteria.

d) Selección de callos transformados. La selección de callos transformados se realizó en medio CIM suplementado con timentina, que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium*, e higromicina, que inhibe el crecimiento de los callos no

transformados. En la Figura III. 22 se observa como durante la primera semana de selección los callos experimentaron un rápido crecimiento y se comenzó a distinguir dos grupos, uno formado por callos de color amarillo y con aspecto saludable, y otro formado por callos de color más oscuro, que mostraron menor crecimiento. El proceso de selección no debe ser superior a 5 semanas, ya que pasado este tiempo los callos van perdiendo capacidad de regeneración. Siempre que las condiciones lo permitieron, se estableció 4 semanas como el tiempo óptimo de selección.

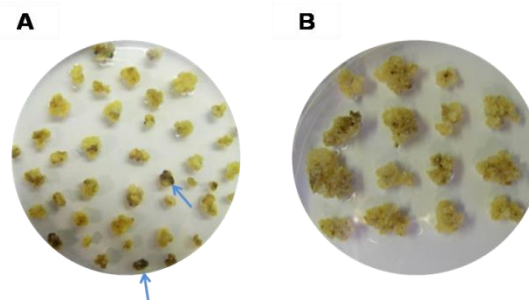


Figura III. 22. Transformación de CECs y selección de callos transformados en medio CIM. Los callos no transformados (flechas azules) mueren durante las primeras semanas en medio de selección (A). Los callos de aspecto saludable (B) se transfieren a medios de regeneración

Durante el proceso de optimización de este protocolo se comprobó que la exposición continua a elevadas concentraciones de higromicina terminaba generando daños bien a los callos al final del proceso de selección, o bien a los callos o brotes durante el proceso de regeneración, provocando una importante pérdida de eficiencia en la aparición de posibles transformantes. Con el fin de evitar este problema, y a diferencia de lo descrito en los protocolos de referencia utilizados, la concentración de higromicina se redujo a la mitad tras la primera semana de selección, manteniéndose esta nueva concentración durante las siguientes fases.

e) Regeneración de plantas transformadas. Los callos de aspecto saludable se transfirieron a medio de regeneración suplementado con timentina e higromicina y se incubaron en luz en condiciones de día largo, durante un periodo máximo de 4 semanas. Posteriormente, los brotes se trasplantaron a tubos que contenían medio inductor de raíces suplementado con timentina y se incubaron en las condiciones anteriores hasta que se desarrolló completamente el sistema radicular. Es importante

que durante el traspaso de los brotes a los tubos se arrastre la menor cantidad posible de restos del callo ya que éstos pueden dar lugar a una nueva plántula completa que es difícil de separar de la ya regenerada a partir del brote. Finalmente, las plántulas se transfirieron a semilleros con turba vegetal y se aclimataron a las nuevas condiciones de crecimiento en fitotrones a 22-25°C y humedad relativa del 70%, por un periodo de dos semanas, antes de ser transferidas las cámaras de cultivo donde se crecieron hasta completar su ciclo.

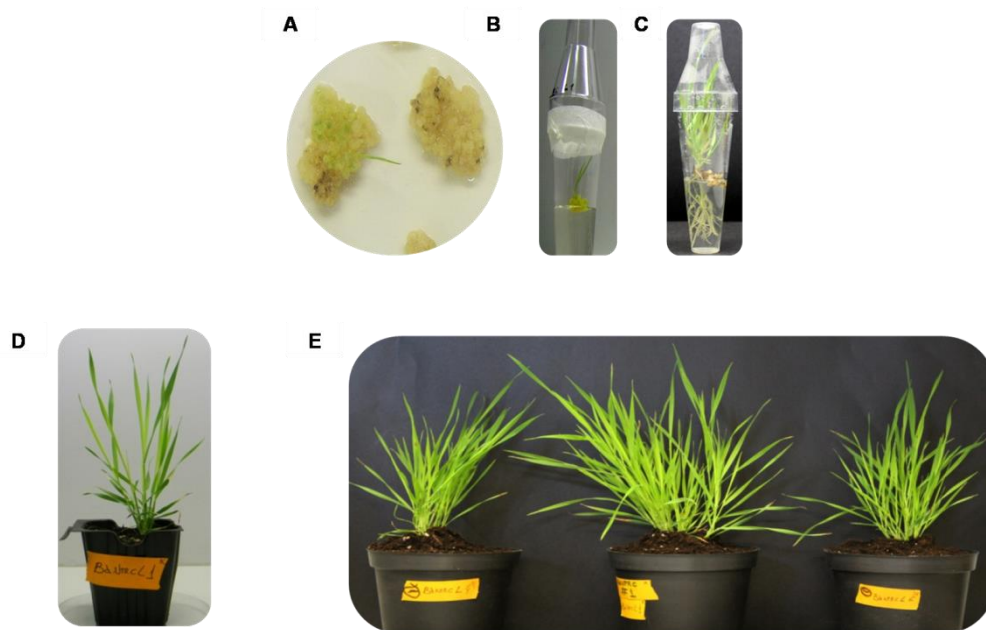


Figura III. 23. Regeneración de plántulas. Los callos transformados se transfieren a medios de formación de tallos hasta que generan brotes sanos (4 semanas) (A) que se transfieren a medios de enraizamiento (B) hasta que desarrollan un sistema radicular adecuado para su transferencia a tierra (3 semanas) (C). **Plantas transformadas crecidas en tierra hasta completar su ciclo.** Fotografía de planta tras 2 (D) y 8 semanas (E) en tierra.

Durante el desarrollo y adecuación de este protocolo se co-cultivaron con *Agrobacterium* un total de 1.129 callos embriogénicos, consiguiéndose regenerar completamente 37 plantas, de las cuales 22 procedían de transformaciones con la construcción de cDNA de *NtrC* de *Brachypodium* y 15 de la de arroz.

La determinación de la presencia del transgén en las plantas transformadas se llevó a cabo mediante PCR a partir de DNA genómico de hoja, tomando dos muestras independientes por cada planta. Para dicho objetivo se emplearon 3 parejas diferentes de oligonucleótidos recogidos en la Tabla III. 2, cuyas se secuencias se muestran en las

Tablas II. 5, 8 y 9, que amplifican distintas regiones del T-DNA, de forma que se comprobare la integración completa del mismo en el genoma de la planta (Figura III. 24A).

Tabla III. 2. Parejas de oligonucleótidos empleados para determinar la presencia del transgén en las plantas transformadas y tamaño del producto esperado.

| | Parejas | Oligonucleótidos | | Tamaño amplicón |
|--------|---------|------------------|---------------|-----------------|
| | | Sentido | Anti-sentido | |
| BdNTRC | P1 | F3tf-PromotGlu1 | BdNTRC-I1-R | 952 pb |
| | P2 | BdNTRC-I7-F | R-NosT_BsiwI | 606 pb |
| OsNTRC | P1 | F3tf-PromotGlu1 | R-TransOsNTRC | 839 pb |
| | P2 | Os_F6 | R-NosT_BsiwI | 724 pb |
| | Hyg | F-Hyg | R-Hyg | 390 pb |

De las 37 plantas analizadas, 16 contenían la construcción *pGlu1::BdNTRC::NosTer* mientras que 4 contenían la construcción *pGlu1::OsNTRC::NosTer* (Figura III. 24B y C).

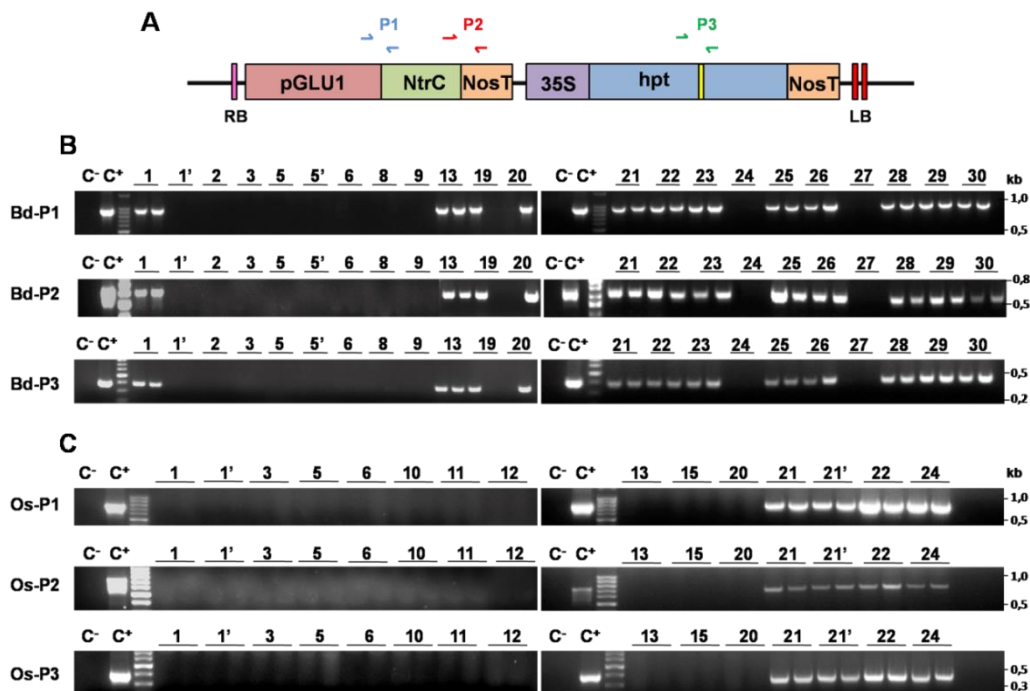


Figura III. 24. Análisis de la presencia del transgén en las plantas seleccionadas como posibles transformantes. A, Esquema mostrando la posición de las parejas de oligonucleótidos empleados (P1, P2 y P3). Análisis de los fragmentos de DNA en plantas portadoras de la construcción BdNTRC (B) y OsNTRC (C). Como control positivo se utilizó el vector portador de la construcción y como control negativo DNA genómico procedente de hojas de plantas de *Brachypodium* no transformadas. El análisis de la presencia del transgén se realizó por duplicado a partir de DNA genómico procedente de dos hojas individuales por cada planta seleccionada. En el caso de que varias plantas se originaran a partir del mismo callo, se nombraron con el mismo número y el superíndice ' para distinguirlas (por ejemplo, 1 y 1'). Visualización en geles de agarosa al 1,5%.

A continuación se resumen los resultados obtenidos durante las distintas fases del proceso de transformación de *Brachypodium* (Tabla III. 3). De un total de 1.129 callos embriogénicos infectados únicamente 623 lograron superar la selección por higromicina, a partir de los cuales se generaron 58 posibles líneas transformantes. Varias de estas líneas no sobrevivieron al ser trasplantadas a tierra descendiendo su número hasta 36, de las cuales sólo 16 resultaron ser portadoras del transgén.

Tabla III. 3. Resultados de la transformación de callos embriogénicos de *Brachypodium distachyon* mediada por *Agrobacterium*.

| | Nº Callos infectados | Nº Callos resistentes | Líneas | Sobreviven | Positivas | Eficiencia transformación (%) |
|--------------|----------------------|-----------------------|-----------|------------|-----------|-------------------------------|
| BdNTRC | 662 | 384 | 30 | 21 | 12 | 1,81 |
| OsNTRC | 467 | 239 | 28 | 15 | 4 | 0,85 |
| Total | 1.129 | 623 | 58 | 36 | 16 | 1,42% |

La eficiencia total de transformación (calculada como número de plantas positivas x 100 / nº callos transformados), fue del 1,42%. Sin embargo, este resultado no muestra la eficiencia real del protocolo descrito anteriormente. Puesto que en nuestro grupo nunca antes se había realizado transformación de cereales, parte de este trabajo ha consistido en la optimización de un protocolo de transformación acorde a las condiciones de trabajo y materiales disponibles. En la Tabla III. 4 se recoge la evolución de los resultados obtenidos desde las primeras transformaciones, aplicando los protocolos descritos en la bibliografía empleada, hasta las transformaciones realizadas finalmente con el protocolo descrito en este trabajo. A continuación se describe las modificaciones realizadas en cada evento de transformación:

- E1, recoge los resultados obtenidos tras aplicar el protocolo cedido por el grupo de la Dra Pilar Carbonero (González-Calle, 2014).
- E2, recoge los resultados obtenidos al incrementar hasta 400 µM la concentración de acetosiringona en el medio CIM para la resuspensión de las células de *Agrobacterium* utilizadas en la transformación.

- E3, recoge los resultados obtenidos al disminuir a la mitad la concentración de higromicina tras la primera semana de selección sin aplicar los cambios realizados durante el evento de transformación E2.
- E4, recoge los resultados obtenidos en el protocolo descrito en los Materiales y métodos este trabajo, donde se optó por cultivar los callos, tras su incubación con *Agrobacterium*, en placas de Petri con papel de filtro estéril y seco y disminuir a la mitad la concentración de higromicina tras la primera semana de selección como se ha descrito en el evento de transformación E3.

Así pues, si se comparan los resultados obtenidos desde las primeras transformaciones hasta el protocolo desarrollado en E4 la eficiencia de transformación mejoró desde el 0,3% hasta el 3,52%, lográndose obtener una eficiencia acorde a la descrita en la bibliografía.

Tabla III. 4. Eficiencia de la transformación de callos embriogénicos de *Brachypodium distachyon* en las diferentes modificaciones del protocolo de transformación utilizadas.

| Grupos | Nº Callos Infectados | Nº Callos resistentes | Líneas | Sobreviven | Positivas | % eficiencia transformación |
|-----------|----------------------|-----------------------|--------|------------|-----------|-----------------------------|
| E1 | | | | | | |
| BdNTRC | 215 | 96 | 4 | 1 | 1 | |
| OsNTRC | 120 | 55 | 1 | 1 | 0 | |
| | | | | | | 0,298% |
| E2 | | | | | | |
| BdNTRC | 210 | 149 | 9 | 8 | 1 | |
| OsNTRC | 122 | 56 | 6 | 4 | 0 | |
| | | | | | | 0,301% |
| E3 | | | | | | |
| BdNTRC | 56 | 14 | 3 | 1 | 0 | |
| OsNTRC | 65 | 43 | 16 | 8 | 2 | |
| | | | | | | 1,65% |
| E4 | | | | | | |
| BdNTRC | 181 | 125 | 14 | 12 | 10 | |
| OsNTRC | 160 | 85 | 5 | 2 | 2 | |
| | | | | | | 3,52% |

Cada evento de transformación E1-E4, recoge los resultados obtenidos a partir de dos grupos independientes de transformación para un mismo protocolo.

III.3.3. Caracterización de semillas procedentes de plantas transgénicas T₀

A las plantas regeneradas tras el proceso de transformación que contenían el transgén se les denominó generación T₀. Estas plantas junto con plantas no transformadas y plantas no transformadas procedentes de semillas (NT), se crecieron en cámaras de cultivo en condiciones de día largo hasta completar su ciclo y obtener las semillas correspondientes a la generación T₁.

Las plantas transformadas mostraron alteraciones significativas de su ciclo de vida en comparación con las plantas NT procedentes de semillas. Mientras que las plantas NT que procedían de semillas, en las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo, completaron su ciclo de vida en ~4 meses, las plantas transformadas que lograron completar su ciclo tardaron aproximadamente 8 meses, lo que conllevó en algunos casos un mayor desarrollo de las estructuras vegetativas. Aunque no se observaron diferencias en cuanto al aspecto de las espigas o del número de espigas por planta respecto a las plantas NT, las líneas transgénicas generaron un menor número de semillas por espiga, presentando muchos casos inflorescencias completamente vacías. Como consecuencia, el número total de semillas obtenidas por planta fue muy reducido. Las plantas regeneradas mediante esta aproximación que resultaron no ser transgénicas presentaron el mismo comportamiento que las plantas transgénicas, lo que sugiere que la baja producción de semillas o ausencia de producción de las mismas por parte de algunas líneas, estaba relacionada con la procedencia de la planta a partir de callos, y no con la presencia del transgén. En la Figura III. 25 se muestra el fenotipo de las plantas que completaron su ciclo de vida y generaron semillas en comparación con plantas NT procedentes de callos.

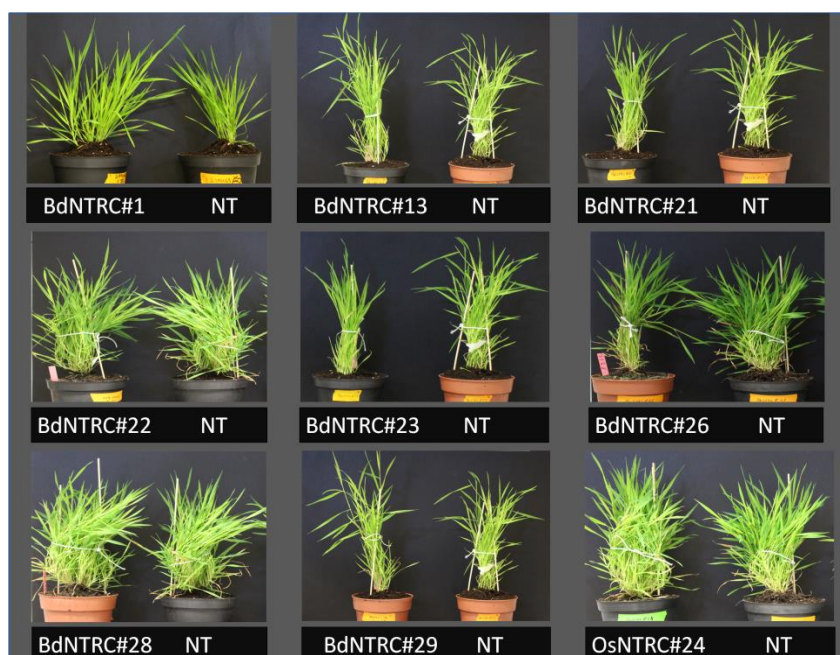


Figura III. 25. Fenotipo de las plantas T_0 . Fotografía tomada a las 8 semanas de cultivo en tierra. A la izquierda se muestra la correspondiente línea transgénica y a la derecha su control (planta NT procedente de callo).

El bajo número de semillas obtenidas por cada línea resultó insuficiente para poder evaluar en profundidad los efectos de la expresión de NTRC exógena en el endospermo. Sin embargo, sí fue posible determinar niveles de NTRC en semillas de las plantas transgénicas. En base a estos resultados, y en función del fenotipo que presentaron las semillas procedentes de plantas transgénicas, se seleccionaron las líneas de interés para obtener la siguiente generación de plantas (T_1) con el fin de generar un mayor número de semillas T_2 .

III.3.3.1. Análisis del fenotipo de semillas procedentes de plantas transgénicas T_0

En comparación con plantas NT procedentes de semillas, los granos obtenidos de las líneas transgénicas mostraron una mayor heterogeneidad en su fenotipo, con una gran proporción de semillas de menor grosor y tamaño (Figura III. 26), siendo más acusada esta diferencia en las líneas BdNTRC#13, #21 y #26.

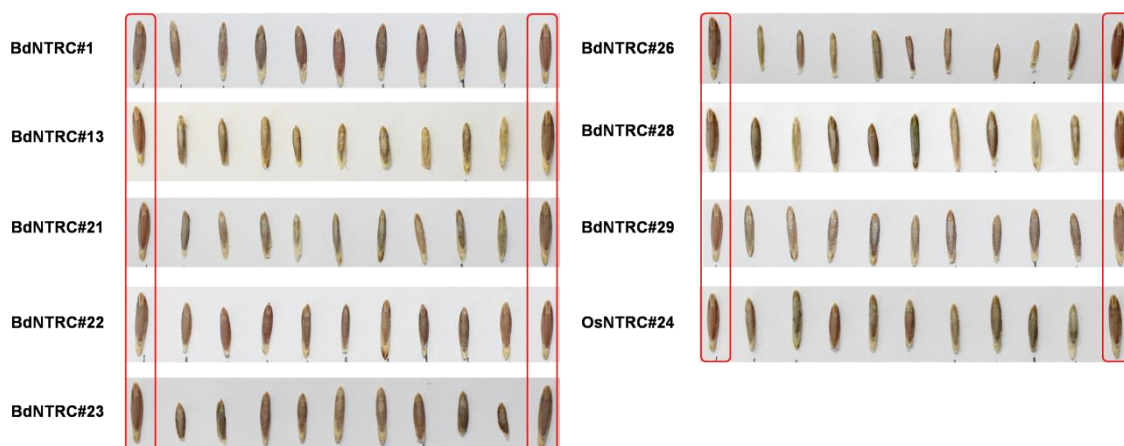


Figura III. 26. Fenotipo de las semillas maduras procedentes de las distintas líneas transgénicas obtenidas. Se muestran semillas correspondientes a cada línea transgénica seleccionada y en los extremos, enmarcadas en rojo, se muestran semillas procedentes de plantas NT.

El análisis del peso medio de las semillas (Figura III. 27) confirmó que, efectivamente, las semillas generadas por las plantas transgénicas tenían un peso medio inferior a las procedentes de plantas NT, existiendo además diferencias significativas entre algunas de las líneas generadas.

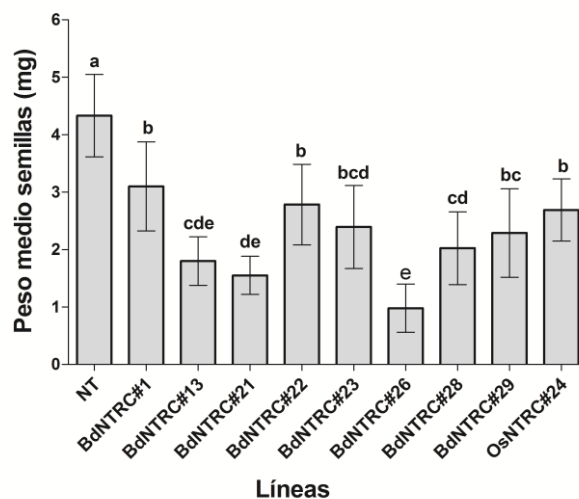


Figura III. 27. Análisis del peso medio de semillas maduras procedentes de las distintas líneas transgénicas y de plantas no transformadas (NT). Las barras de error indican la desviación estándar (SD). Las distintas letras representan diferencias significativas al $P \leq 0,05$ acorde al test de Tamhane (ANOVA).

III.3.3.2. Análisis de los niveles de NTRC en las líneas transgénicas seleccionadas

Con objeto de comprobar si las plantas transgénicas poseían niveles alterados de NTRC exclusivamente en semillas, se llevaron a cabo análisis de *Western-blot* de extractos proteicos de hoja, espiga, semillas maduras y, en los casos que fue posible, semillas en desarrollo, de cada una de las líneas seleccionadas. Los niveles de NTRC en cada muestra se compararon con los niveles de la correspondiente muestra de plantas NT.

Los resultados mostraron niveles similares de NTRC en hojas de las plantas transgénicas con respecto a las plantas control (Figura III. 28). Respecto a los niveles de NTRC en espigas, éstos fueron similares a los de las plantas control en algunas de las líneas transgénicas seleccionadas, pero significativamente superiores en las líneas BdNTRC#1, #21, #22, #28 y #29.

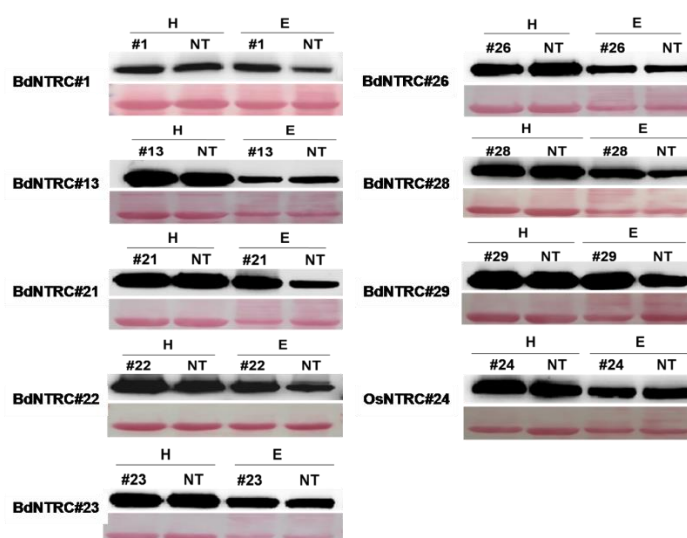


Figura III. 28. Análisis de *Western-blot* de los niveles de NTRC en hojas (H) y espigas (E) de las plantas transgénicas seleccionadas. Se obtuvieron extractos de hojas y espigas de las distintas líneas transgénicas, que se indican a la izquierda, así como de plantas no transformadas (NT). Alícuotas de estos extractos (25 μ g) se fraccionaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) en condiciones reductoras, se transfirieron a membranas y la presencia de NTRC se detectó con el anticuerpo anti-NTRC. La eficiencia de la transferencia y el nivel de carga se comprobaron mediante tinción con *Ponceau*.

El análisis de los niveles de NTRC en semillas maduras y, en las líneas en que fue posible, en desarrollo, reveló diferentes tipos de comportamiento respecto de las semillas de plantas no transformadas. Las líneas BdNTRC#13, #21, #22 y #26

presentaron niveles de NTRC similares o ligeramente inferiores a las plantas NT. En las líneas BdNTRC#1, #23 y OsNTRC#24 no se detectó la proteína NTRC en semilla, por lo que se consideraron como posibles líneas supresoras. De las líneas BdNTRC#28 y #29 se obtuvieron dos tipos de semillas, finas (f) y gruesas (g), por lo que se decidió analizar su contenido en NTRC de forma separada. Este análisis mostró niveles superiores de NTRC en las semillas finas respecto a las gruesas, siendo el contenido de NTRC en éstas similar al de semillas de plantas NT (Figura III. 29). Por tanto, estas líneas se consideraron como posibles plantas sobre-expresoras de NTRC en semilla. De estas dos líneas, así como de la línea OsNTRC#24, cuyo contenido de NTRC en semilla fue indetectable, se analizó también la fase de desarrollo. El contenido de NTRC en semillas en desarrollo de las líneas BdNTRC#28 y #29 resultó más elevado en comparación al de semillas NT, así como, respecto a los niveles que presentaron en sus respectivas semillas maduras. Por el contrario, la línea OsNTRC#24 presentó niveles inferiores de NTRC tanto en semillas en desarrollo como maduras en comparación con las semillas NT. Estos datos sugieren que la expresión del transgén y acumulación de la proteína tengan lugar principalmente durante el desarrollo de la semilla.

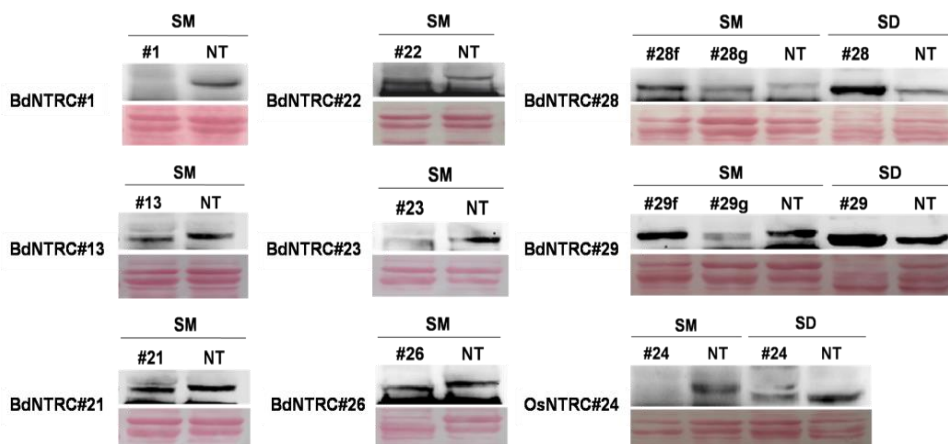


Figura III. 29. Análisis de *Western-blot* de los niveles de NTRC en las semillas de las líneas transgénicas seleccionadas. Se obtuvieron extractos de semillas maduras (SM) y semillas en desarrollo (SD) de las distintas líneas transgénicas, que se indican a la izquierda, así como de plantas no transformadas (NT). Alícuotas de estos extractos (25 µg) se fraccionaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) en condiciones reductoras, se transfirieron a membranas y la presencia de NTRC se detectó con el anticuerpo anti-NTRC. La eficiencia de la transferencia y el nivel de carga se comprobaron mediante tinción con *Ponceau*.

III.3.4. Caracterización de semillas procedentes de plantas T₁

Una vez establecidos los contenidos de NTRC en las líneas transgénicas seleccionadas en la generación de plantas T₀, se seleccionaron las líneas BdNTRC#28 y #29, como posibles candidatas a ser sobre-expresoras de NTRC, así como una de las posibles líneas supresoras, BdNTRC#1, para la posterior caracterización de las semillas T₂.

Las semillas T₁, obtenidas a partir de las plantas transgénicas T₀, incluyen tanto semillas silvestres como transgénicas. Por este motivo, se determinó la presencia del transgén en las plantas T₁ del mismo modo descrito anteriormente. En la Tabla III. 5 se muestra un resumen del número de semillas T₁ germinadas y la proporción de plantas generadas que presentaron el transgén para cada línea. La segregación obtenida para las líneas BdNTRC#1 y #28 sugiere que estas líneas podrían tener más de una copia del transgén.

Tabla III. 5. Resumen de la segregación del transgén en las líneas BdNTRC#29, BdNTRC#28 y BdNTRC#1 en la generación T₁.

| Líneas | Nº de semillas a germinar | Total semillas germinadas | Nº plántulas genotipadas | Nº plántulas transgénicas | Segregación (%) |
|-----------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------|
| BdNTRC#29 | 20 | 13 | 12 | 9 | 75% |
| BdNTRC#28 | 23 | 18 | 17 | 14 | 82,4% |
| BdNTRC#1 | 24 | 20 | 20 | 18 | 90% |
| NT | 13 | 13 | - | - | - |

Así, las plantas generadas de las líneas transgénicas de las que se había confirmado la presencia del transgén se cultivaron en invernadero, junto a plantas NT, hasta completar su ciclo de vida con la consiguiente producción de una nueva generación de semillas.

No se observaron diferencias significativas durante el desarrollo de las plantas transgénicas seleccionadas en relación con las NT (Figura III. 30). Ambos grupos de plantas completaron su ciclo de vida en un periodo total de ~4 meses. Tampoco se observaron diferencias respecto al porte de la planta, número de espigas y estructura de las mismas, siendo por tanto indistinguibles fenotípicamente. Todas las espigas secas de plantas que completaron su ciclo fueron recogidas y almacenadas para su posterior estudio.

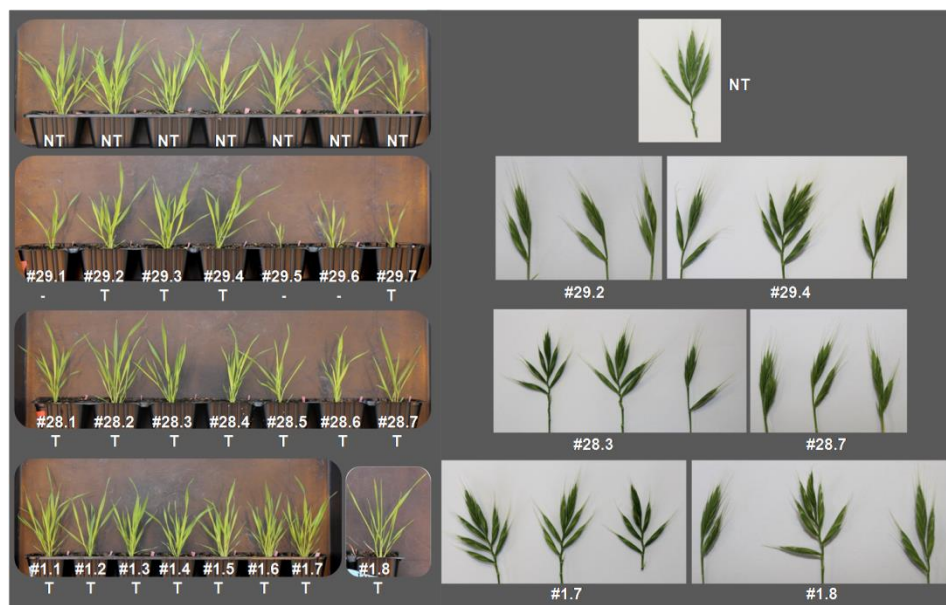


Figura III. 30. Fenotipo de plántulas T_1 generadas a partir de los parentales BdNTRC#29, BdNTRC#28 y BdNTRC#1 en comparación con plantas no transformadas (NT). T, planta positiva para el inserto; -, planta negativa para el inserto. Imagen tomada a los 30 días de la germinación. A la derecha, se muestra el aspecto de las espigas de algunas de las líneas representativas de cada parental.

El número de semillas obtenidas por línea fue suficiente para poder analizar los efectos de la alteración de los niveles de NTRC en el endospermo. Se obtuvo un total de 15 plantas transgénicas de las cuales 3 procedían del parental BdNTRC#29, 5 plantas del parental BdNTRC#28 y 7 procedentes del parental BdNTRC#1.

III.3.4.1. Caracterización fenotípica de semillas transgénicas T_2

Semillas representativas de las distintas líneas seleccionadas mostraron diferencias fenotípicas en comparación con las procedentes de plantas NT, siendo el rasgo más característico el menor grosor de las mismas, sin que se observasen cambios significativos en su longitud (Figura III. 31).

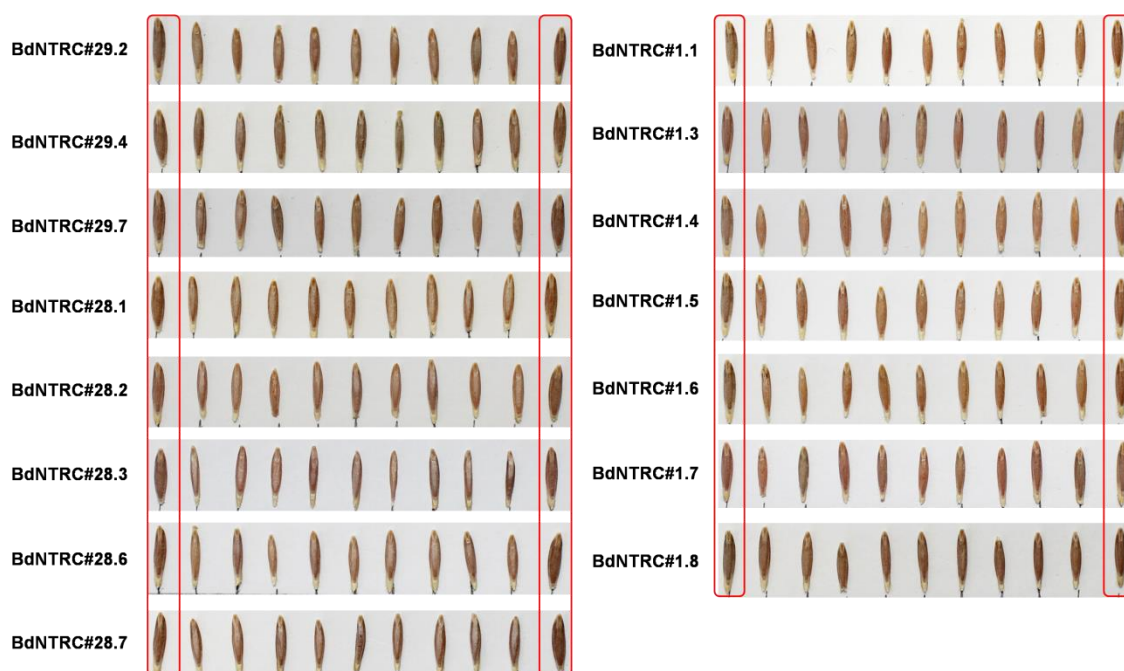


Figura III. 31. Fenotipo de las semillas maduras T₂ procedentes de las distintas líneas transgénicas cultivadas. En los extremos, enmarcadas en rojo, se muestran semillas procedentes de plantas NT.

El análisis del peso medio de las distintas líneas de semillas obtenidas mostró que las semillas procedentes de plantas transgénicas poseen un peso medio significativamente inferior al de semillas de plantas NT (Figura III. 32), siendo estas diferencias más acusadas en las tres líneas procedentes del parental BdNTRC#29 y en las líneas BdNTRC#28.3 y BdNTRC#1.7.

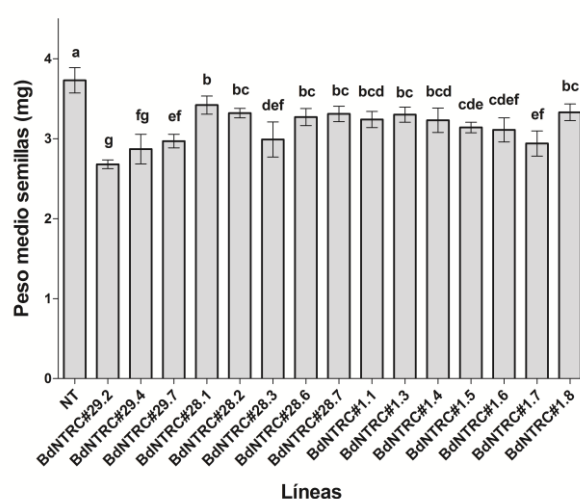


Figura III. 32. Análisis del peso medio de semillas maduras de la generación T₂. Las barras de error indican desviación estándar (SD). Las distintas letras representan diferencias estadísticas significativas al P≤0,05 acorde al test de Tukey (ANOVA).

III.3.4.2. Análisis de la expresión del gen *NtrC* en las semillas T₂

Con objeto de comprobar si las semillas T₂ obtenidas presentaban niveles alterados de expresión de *NtrC*, se analizaron los niveles de mensajeros de dicho gen mediante PCR cuantitativa empleando los oligonucleótidos recogidos en la Tabla II. 11. En la Figura III. 33 se representa la expresión relativa del gen *NtrC* en semillas de cada una de las líneas analizadas, así como de semillas NT. Los niveles de mensajeros de *NtrC* se normalizaron frente a los niveles de transcritos de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y ubiquitina 18 (*Ubq18*) y se representaron los niveles relativos frente al nivel de expresión en semillas NT, al que se les asignó el valor de 1. En comparación con las semillas silvestres, todas las líneas transgénicas mostraron un incremento de los niveles de mensajero *NtrC*, a excepción de la línea BdNTRC#1.4 que mostró un nivel de expresión similar al de semillas NT.

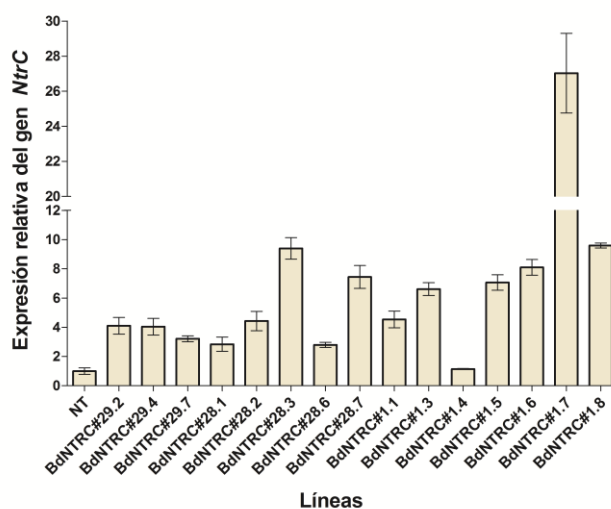


Figura III. 33. Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión del gen *NtrC* en semillas maduras de las distintas líneas transgénicas y de plantas NT.

Por otra parte, como se describió en el capítulo anterior, en *Brachypodium*, como en otras plantas, el gen *NtrC* sufre un proceso de *splicing* alternativo por lo que en las semillas maduras de plantas NT coexisten dos poblaciones de mensajeros, siendo el mensajero AS predominante frente al mensajero SS. Debido a que el transgén introducido contiene el cDNA completo, portador de la secuencia canónica (mensajero SS) del gen *NtrC*, sería de esperar que la expresión de dicha construcción provocase alteración de las proporciones AS/SS. Con objeto de analizar esta

posibilidad, se analizaron mediante RT-PCR los niveles de transcritos estándar y alternativos en las semillas T₂. Los resultados mostraron que las semillas de plantas transgénicas presentaban una reversión en las proporciones AS/SS, con niveles superiores de mensajero estándar respecto al alternativo, salvo en el caso de la línea BdNTRC#1.4 cuyo comportamiento fue similar al de las semillas de plantas NT (Figura III. 34).

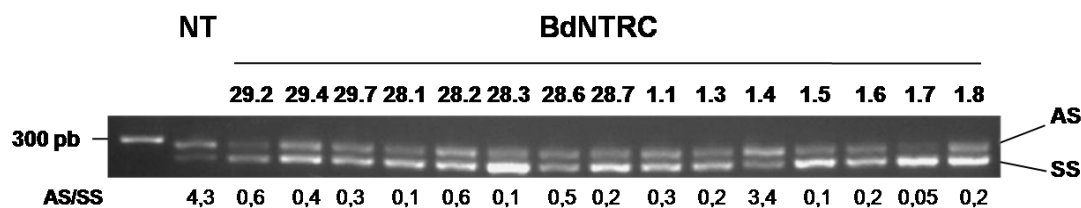


Figura III. 34. Análisis de los niveles de mensajero estándar y alternativo en semillas maduras de las distintas líneas transgénicas y de plantas NT. Los contenidos de mensajeros estándar (SS) y alternativo (AS) se determinaron mediante análisis de RT-PCR utilizando como molde cDNA sintetizado a partir de RNA total aislado de las semillas que se indican. Los fragmentos se separaron en geles de agarosa al 3,5%. La cuantificación de las bandas se realizó con el programa *Scion Image*. El ratio entre estos mensajeros se indica debajo de cada muestra. A la izquierda se muestra el tamaño del marcador.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron para los análisis posteriores, por cada parental, las dos líneas que mostraron los niveles más elevados de transcritos: BdNTRC#29.2 y #29.4, BdNTRC#28.3 y #28.7 y BdNTRC#1.7 y #1.8.

III.3.4.3. Análisis de los niveles de proteína NTRC en el endospermo de semillas de las líneas seleccionadas

Mediante análisis de *Western-blot* se analizaron los niveles de proteína NTRC en el endospermo de semillas de las 6 líneas seleccionadas. Estos resultados mostraron una mayor acumulación de NTRC en el endospermo de las semillas transgénicas respecto a las plantas transformadas, a excepción de la línea BdNTRC#29.4 que mostró niveles inferiores en comparación a los de las otras líneas transgénicas. Sin embargo, las diferencias en los niveles de proteína NTRC fueron inferiores a las observadas a nivel de transcrito.

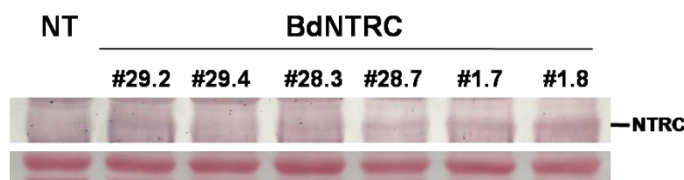


Figura III. 35. Análisis del contenido de NTRC en semillas de las líneas transgénicas seleccionadas de la generación T₂. Se obtuvieron extractos proteicos de semillas maduras de las líneas transgénicas que se indican, así como de plantas no transformadas (NT). Alícuotas de estos extractos se fraccionaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas y la proteína NTRC se detectó mediante el anticuerpo anti-NTRC. La flecha indica la banda correspondiente a NTRC. La transferencia y el nivel de carga se comprobaron mediante tinción con *Ponceau*.

III.3.4.4. Determinación de los niveles de almidón y β -glucanos en las semillas T₂

Como se ha descrito anteriormente, resultados previos sugerían la participación de NTRC en la regulación redox de la biosíntesis de almidón en endospermo de semillas de cereales. La estrategia de generar plantas transgénicas de *Brachypodium* con niveles alterados de NTRC en endospermo de semillas tenía el objetivo de alterar los niveles de almidón y otros polisacáridos de reserva, así como analizar el efecto que pudiera producirse sobre el contenido de proteínas de reserva, ya que las semillas de los cereales constituyen también una importante fuente de proteínas. Así pues, una vez seleccionadas las líneas transgénicas descritas en el apartado anterior se procedió a la caracterización de su contenido en estos compuestos de reserva.

Los análisis del contenido en almidón no mostraron diferencias significativas entre las semillas de las líneas BdNTRC#29.2, #28.3, #28.7 y #1.8 y las semillas de plantas NT. Sin embargo, las semillas de las líneas BdNTRC#29.4 y #1.7 mostraron una disminución de en torno al 50% del contenido en almidón (Figura III. 36A). Los análisis de los niveles de β -glucanos mostraron que las semillas de las líneas transgénicas presentaban en general mayor contenido de estos polisacáridos, siendo las diferencias significativas en el caso de las líneas BdNTRC#28.3 y BdNTRC#1.8 (Figura III. 36B). El análisis de la proporción en los contenidos de almidón/ β -glucanos en las semillas mostró una disminución de dicha relación en todas las líneas transgénicas con respecto a las semillas NT, siendo estas diferencias mucho más acusadas en las líneas BdNTRC#29.4 y #1.7 con una disminución aproximada del 50% (Figura III. 36C).

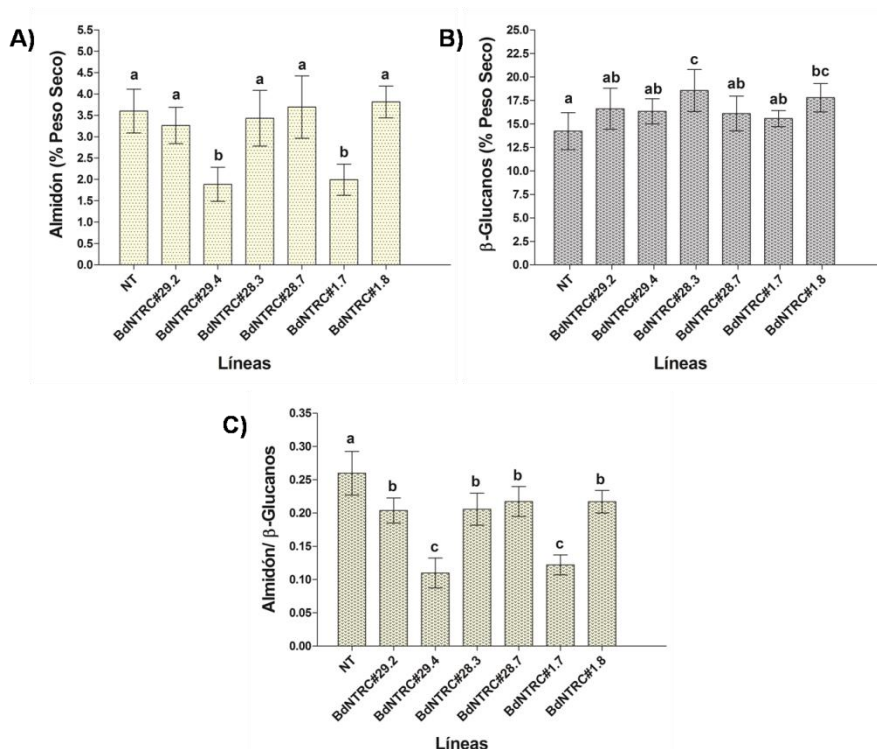


Figura III. 36. Contenido de polisacáridos de reserva en semillas maduras de las líneas transgénicas seleccionadas y de plantas NT. La determinación de almidón (A) y β-glucanos (B) se llevó a cabo como se indica en Materiales y métodos. A partir de estos datos se analizó y la proporción almidón/β-glucanos (C). Las letras indican diferencias estadísticas significativas al $P \leq 0,05$ obtenidas con el test de Tukey (ANOVA).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de un patrón común en el comportamiento de las distintas líneas transgénicas analizadas, que se caracteriza por un ligero incremento en los niveles de β-glucanos y una disminución de la proporción almidón/β-glucanos. Estos resultados sugieren que NTRC podría estar implicada en la regulación de la síntesis o partición de carbohidratos en el endospermo durante el desarrollo de la semilla.

III.3.4.5. Análisis de los niveles de proteínas de reserva en el endospermo de las semillas T₂

Para estudiar en mayor profundidad las posibles alteraciones bioquímicas de las semillas transgénicas se analizó su contenido en proteínas de reserva. Para ello, se fraccionaron las proteínas del endospermo en base a su solubilidad diferencial. Mediante este proceso, se obtuvieron las fracciones de proteínas solubles en sal (tampón fosfato sódico y NaCl), solubles en alcohol y la fracción UCT (Urea, CHAPS y Tiourea). Además, en paralelo, se llevaron a cabo extracciones de proteína total. Las

distintas fracciones obtenidas se separaron mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida.

No se observaron diferencias significativas en el patrón de proteínas obtenido del análisis de los extractos crudos ni de las fracciones solubles en sal de las distintas líneas (Figura III. 37A y 37B).

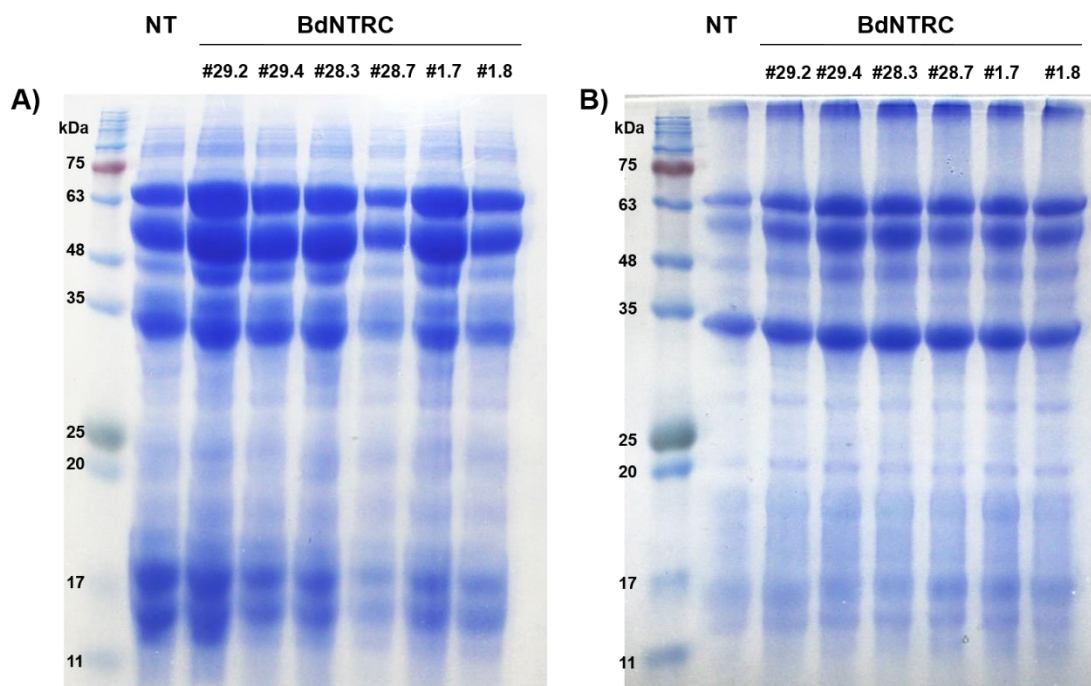


Figura III. 37. Análisis de los extractos crudos y fracciones de proteínas solubles en sal de semillas maduras de las líneas transgénicas seleccionadas y de plantas NT. A partir de semillas de las líneas que se indican se obtuvieron extractos crudos (A) y fracciones solubles en sal (B). Alícuotas de estas fracciones, 80 µg de proteínas de extracto crudo y fracción soluble en sal, se precipitaron con TCA y se resuspendieron en Tris-HCl 100 mM pH 7,9. A todas las muestras se les añadió tampón de carga suplementado con β-ME 14 mM y DTT 10 mM y se analizaron en geles al 12% de acrilamida

Por el contrario, sí se observaron cambios en los niveles de algunas proteínas en las fracciones solubles en alcohol y UCT entre las distintas líneas transgénicas analizadas y respecto a las semillas de plantas NT (Figura III. 38A y Figura III. 39A). Con objeto de analizar dichos cambios con mayor detalle, las bandas de los geles correspondientes a las fracciones solubles en alcohol y UCT se identificaron con los números 1 a 22 (en rojo) y se cuantificó su intensidad. Las Figura III. 38B y Figura III. 39B, muestran los valores relativos de cada una de estas bandas normalizadas frente al valor obtenido para la banda 3, en el caso de las fracciones solubles en alcohol, y la

banda 18, en el caso de las fracciones UCT, ya que estas bandas no mostraron diferencias entre las distintas líneas. A los valores obtenidos para las semillas procedentes de plantas NT se les asignó arbitrariamente el valor 100%.

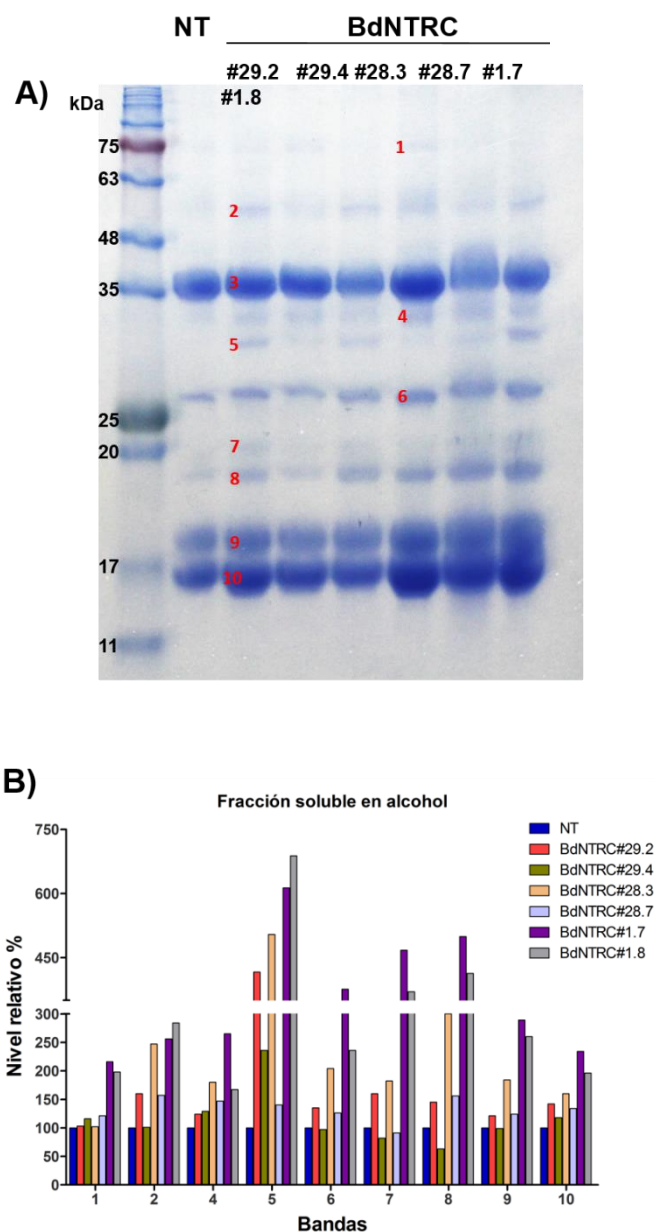


Figura III. 38. Análisis de las fracciones solubles en alcohol de semillas maduras procedentes de las distintas líneas transgénicas seleccionadas y de plantas NT (A) y nivel relativo de las proteínas de las fracciones soluble en alcohol (B). Alícuotas de estas fracciones, 100 µg, se precipitaron con TCA y se resuspendieron en Tris-HCl 100 mM pH 7,9. A todas las muestras se les añadió tampón de carga suplementado con β-ME 14 mM y DTT 10 mM y se analizaron en geles al 12% de acrilamida. Las proteínas correspondientes a la fracción soluble en alcohol se cuantificaron mediante el programa *Scion Image* y se normalizaron frente a los niveles de proteína de la banda 3.

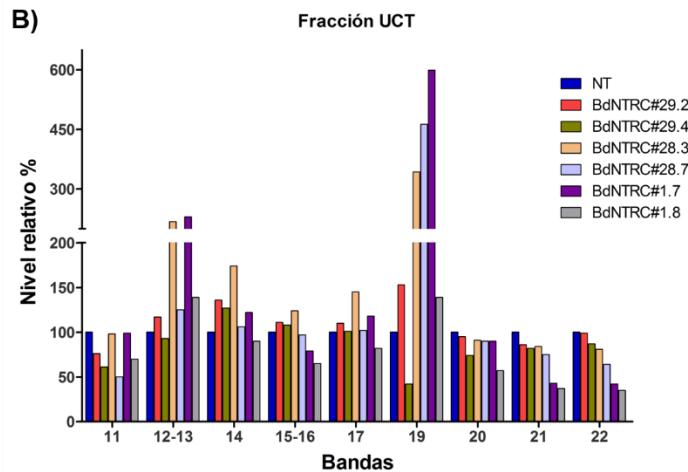
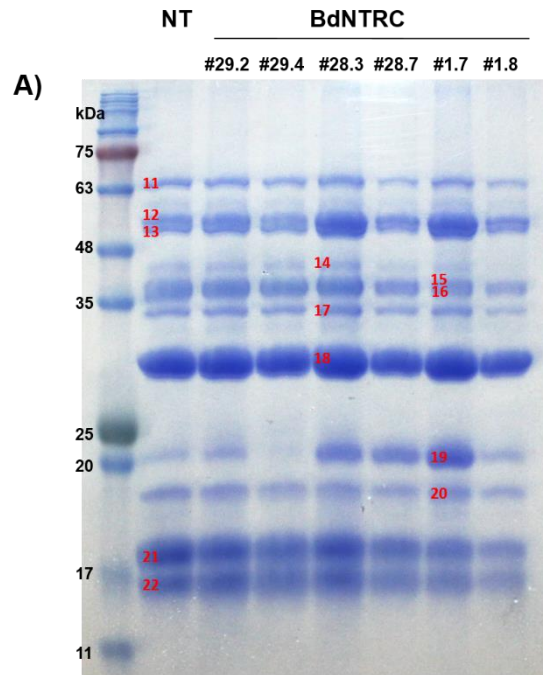


Figura III. 39. Análisis de las fracciones UCT de semillas maduras procedentes de las distintas líneas transgénicas seleccionadas y de plantas NT (A) y análisis de los niveles relativos de las proteínas de las fracciones (B). Alícuotas de 80 µg se precipitaron con acetona fría y se resuspendieron en tampón Urea 4 M. A todas las muestras se les añadió tampón de carga suplementado con β-ME 14 mM y DTT 10 mM y se analizaron en geles al 12% de acrilamida. Las proteínas correspondientes a la fracción soluble en alcohol se cuantificaron mediante el programa *Scion Image* y se normalizaron frente a los niveles de proteína de la banda 18.

Los resultados de las cuantificaciones mostraron, efectivamente, diferencias en los niveles relativos de algunas de estas proteínas en semillas de las líneas transgénicas indicando que la alteración del contenido de NTRC tiene efectos notables sobre estas semillas. Con el fin de determinar a qué proteína se correspondía cada una de las bandas observadas en los geles se procedió a su identificación mediante MALDI-TOF.

En la Tabla III. 6 se recogen las proteínas identificadas, resaltándose en rojo aquellas que mostraron niveles alterados en comparación a las semillas de plantas NT. Como se puede observar en las Figuras III. 38 y Figuras III. 40, la tendencia observada es similar en todas las líneas analizadas con la excepción de BdNTRC#29.4. Se observó un aumento en los niveles de las bandas 2, 5, 7 y 19, correspondientes a la globulina 11S, así como en la 8, correspondiente a una γ -gliadina. En el caso de la línea BdNTRC#28.7 aunque los niveles de la globulina 11S en la fracción soluble en alcohol (banda 7) disminuyen, la banda correspondiente en la fracción UCT (banda 19) aumenta respecto al control. Finalmente, cabe destacar que en el caso de las bandas 9 y 10 (21 y 22 en UCT), correspondientes a un tipo de avenina, hay un cambio en la solubilidad en las líneas BdNTRC#1.7 y #1.8 con un aumento en los niveles de proteína soluble en alcohol y una disminución en la fracción UCT.

Tabla III. 6. Resultado de la identificación de proteínas mediante MALDI-TOF de muestras procedentes de las fracción soluble en alcohol (1-10) y fracción UCT (11-22).

| Banda | Proteína identificada | Nº Acceso Gen |
|----------------|---|---|
| 1 | γ -gliadin-like | gi 960475329 |
| 2-12-13 | 11S seed storage globulin | gi 357130026 |
| 3 | γ -gliadin-like | gi 960475329 |
| 4 | γ -gliadin-like avenin-like a4 | gi 960475329 gi 960453757 |
| 5-18 | 11S seed storage globulin | gi 357130026 |
| 6 | γ -gliadin-like | gi 960475329 |
| 7-19 | 11S seed storage globulin | gi 357130026 |
| 8 | γ-gliadin-like | gi 960475329 |
| 9-21 | avenin-3-like avenin-3-like | gi 960468470 gi 721641196 |
| 10-22 | avenin-like a4 | gi 960453757 |
| 11 | globulin-1 S allele | gi 357115673 |
| 14 | γ -gliadin-like | gi 960475329 |
| 15-16 | 11S seed storage globulin-like γ -gliadin-like Full=Avenin | gi 357130026 gi 960475329 gi 114720 |
| 17 | basic 7S globulin-like | gi 721648762 |
| 20 | 11S seed storage globulin 11S seed storage globulin Full=Avenin | gi 357130026 gi 721679388 gi 114720 |

En rojo se resaltan aquellas proteínas que mostraron niveles diferentes respecto a las de plantas NT.

IV. DISCUSIÓN

La regulación redox basada en el intercambio disulfuro-ditiol de residuos de Cys que están generalmente muy conservados constituye un mecanismo regulatorio universal, presente en todo tipo de organismos desde bacterias a plantas y animales. Se trata de una modificación post-traducciona rápida y reversible por lo que permite la rápida adaptación del metabolismo a situaciones ambientales cambiantes y, en particular en el caso de las plantas, impredecibles.

En este sistema de regulación juegan un papel importante las Trxs, pequeñas proteínas con actividad disulfuro reductasa, que necesitan ser reducidas para realizar nuevos ciclos catalíticos (Figura I. 9B). En plantas, la fuente de poder reductor para la reducción de Trxs depende de la localización de las mismas. Así, las Trxs cloroplastídicas se reducen por el sistema Fd/FTR, mientras que en otras localizaciones celulares su reducción depende de NADPH en una reacción catalizada por las NTRs. Las NTRs son flavoproteínas cuya familia génica, en plantas, está formada por 3 genes: *NtrA*, *NtrB* y *NtrC*. Los dos primeros codifican proteínas muy similares con distinta localización celular, NTRA predominante en el citosol y NTRB predominante en la mitocondria (Reichheld et al., 2005). El tercer miembro de la familia, NTRC, codifica una NTR peculiar que presenta en su extremo C-terminal un dominio Trx. Inicialmente NTRC se describió como una enzima exclusiva de tejidos fotosintéticos de localización cloplastídica, sin embargo, estudios posteriores sobre el patrón de expresión del gen *NtrC* de *Arabidopsis* revelaron que este gen se expresa tanto en tejidos fotosintéticos como heterotróficos y que la proteína se localiza en todo tipo de plastos (Kirchsteiger et al., 2012). Desde su descubrimiento hasta la actualidad se ha avanzado en el conocimiento de la función de NTRC, demostrándose su participación en la destoxificación de peróxidos, regulación redox en la síntesis de clorofila (Richter et al., 2013; Pérez-Ruiz et al., 2014), síntesis de almidón (Michalska et al., 2009; Lepisto et al., 2013) y ATP sintasa (Carrillo et al., 2016). Es decir, la mayor parte del conocimiento de NTRC se ha centrado en su participación en la función fotosintética. Sin embargo, la presencia de la enzima en plástidos de tejidos no fotosintéticos sugiere funciones adicionales.

En trabajos previos de nuestro grupo se puso de manifiesto que entre las dianas de NTRC en endospermo de semillas de cereales, trigo y arroz, destacaban

varias enzimas que participan en la síntesis y almacenamiento de almidón en este tejido. Estos resultados indican por tanto la posible participación de NTRC en la regulación redox del metabolismo del endospermo, un tejido de enorme importancia agronómica. Basándonos en estos resultados, el principal objetivo de este trabajo ha consistido en analizar la participación de NTRC en la regulación redox del endospermo de semillas de cereales. Para ello, se ha seguido una estrategia basada en la generación de cereales transgénicos con niveles alterados de NTRC en el endospermo de la semilla. De este modo se pretende identificar la contribución de dicha proteína en la regulación redox de enzimas implicadas en el metabolismo del carbono en tejidos sumideros, así como, de explorar una posible utilidad biotecnológica a partir de estos resultados. El gen *NtrC* se identificó por nuestro grupo cuando se disponía de la secuencia de sólo dos plantas, *Arabidopsis thaliana* y arroz (*Oryza sativa*) (Serrato et al., 2004). En el tiempo transcurrido desde entonces, el nivel de conocimiento de secuencias genómicas de plantas y, más concretamente de cereales, ha incrementado extraordinariamente. Por ello, para abordar el objetivo mencionado anteriormente, se consideró de interés realizar un estudio actualizado de la filogenia del gen *NtrC*, que ha sido por tanto otro objetivo de este trabajo.

IV.1. ORIGEN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN *NtrC*

La identificación inicial del gen *NtrC* y su posterior análisis puso de manifiesto que se trata de un gen exclusivo de organismos que realizan la fotosíntesis oxigénica, ya que se encuentra en todas las plantas y algas cuyos genomas han sido secuenciados y en algunas cianobacterias, no en todas (Serrato et al., 2004; Pascual et al., 2011). La disponibilidad de genomas secuenciados de cianobacterias junto con los análisis filogenéticos de los genes NTR de estos organismos, identificaron el gen *alr2204*, que codifica para una NTR en *Anabaena* sp. PCC 7120. Es interesante resaltar que el gen adyacente, *alr2205*, codifica para una Trx inusual (Florencio et al., 2006). En conjunto, estos datos sugieren que el gen *NtrC*, que codifica una proteína con dominios NTR y Trx, pudo originarse mediante la desaparición del codón de fin de traducción del gen que codifica NTR generando así una proteína con características similares a NTRC, como se describe en la Figura IV. 1. La presencia de dominios NTR y Trx en una misma

enzima hace que su actividad Trx tenga una gran eficiencia catalítica (Pérez-Ruiz and Cejudo, 2009) por lo que la adquisición de esta nueva enzima pudo suponer una mejora en los procesos de regulación redox. El hecho de que el gen *NtrC* se encuentre parcialmente distribuido en cianobacterias pero esté en todos los organismos fotosintéticos eucarióticos indica el éxito evolutivo de este gen en la función cloroplastídica de algas y plantas.

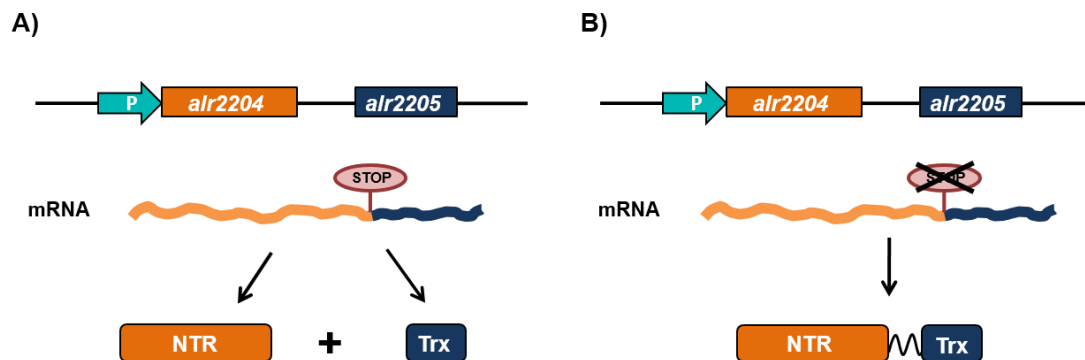


Figura IV. 1. Posible mecanismo de formación del gen *NtrC*. La desaparición del codón de fin de traducción del gen *alr2204* pudo ocurrir por mutación puntual del mismo o por una pequeña deleción en la región intergénica de los genes *alr2204* y *alr2205*, manteniendo la pauta de lectura.

Para establecer la filogenia del gen *NtrC*, se realizó una aproximación bioinformática haciendo uso de la información disponible en las bases de datos. Los resultados obtenidos a través de la búsqueda de las secuencias de los genes *NtrC* y de la correspondiente proteína deducida de distintos tipos de organismos fotosintéticos (Tabla III. 1) han revelado datos desconocidos hasta el momento y que resultan de interés. En primer lugar, estos análisis han confirmado la presencia del gen *NtrC* exclusivamente en organismos fotosintéticos, poniendo de manifiesto el éxito de la adquisición de este nuevo sistema redox durante la evolución de algas y plantas terrestres. En segundo lugar, y en contraposición a lo descrito hasta el momento, este análisis ha revelado la existencia de especies con dos copias del gen *NtrC* localizadas en distintos cromosomas. Entre estas especies se encuentra la briofita *Physcomitrella patens* que posee genes *NtrC* en los cromosomas 20 y 23, plantas de interés agronómico como *Solanum lycopersicum* y *Solanum tuberosum* cuyos genes *NtrC* se localizan en los cromosomas 4 y 10, y la especie *Glycine max*, cuyas copias se localizan

en los cromosomas 2 y 10. La alejada posición filogenética que existe entre el musgo *Physcomitrella*, *G. max* y ambas especies del género *Solanum*, sugieren que la adquisición de la segunda copia del gen *NtrC* debió tener lugar mediante eventos de duplicación génica independientes a lo largo de la evolución. En este trabajo hemos analizado la expresión de las dos copias del gen *NtrC* de tomate (*S. lycopersicum*) encontrando mensajeros de ambos (Fig. III. 12), lo que indica que ambos genes permanecen transcripcionalmente activos y es un dato más a favor de la importancia de NTRC en la evolución de la función cloroplastídica de las plantas.

Por otra parte, los resultados procedentes de la comparación de la estructura de los diferentes genes *NtrC* en distintos tipos de organismos mostraron una gran variabilidad respecto a su tamaño incluso entre las dos copias de las especies que presentaban duplicaciones (Tabla III. 1). Tanto el tamaño de la secuencia codificante como el de la proteína deducida presentaron una mayor homogeneidad entre ellos, por lo que las diferencias encontradas en el tamaño de los genes eran debidas a la gran heterogeneidad presente en las regiones intrónicas. La representación de la estructura génica de algunos de los genes *NtrC* de estos organismos demostró que se encuentra muy conservada entre los distintos grupos de organismos analizados, estando constituido en todos ellos por 10 exones y 9 intrones (Figura III. 1).

En todos los organismos comparados, la secuencia de aminoácidos de la proteína y, por tanto, su estructura bimodular se encuentran altamente conservadas, presentando las mayores diferencias en el extremo N-terminal, correspondiente a la secuencia del péptido de tránsito (Figura III. 2). La reconstrucción del árbol filogenético generado en este trabajo (Figura III. 4) agrupó las NTRCs en tres grupos principales: cianobacterias, algas y plantas terrestres. Este análisis mostró una mayor proximidad entre las NTRCs de cianobacterias y algas, quedando las enzimas de plantas terrestres más alejadas. Entre las NTRCs de plantas terrestres el análisis filogenético estableció 3 subgrupos: briofitas (musgos), licofitas (helechos) y eufilofitas (plantas con semillas). A su vez, este último grupo separó claramente las NTRCs correspondientes a monocotiledóneas de las de dicotiledóneas. De nuevo, la reconstrucción del árbol filogenético apoya la hipótesis de que las duplicaciones halladas para el gen *NtrC* han debido tener lugar de forma independiente y que en el caso de las especies

seleccionadas de *Solanum* la copia correspondiente al cromosoma 10 presenta menor divergencia respecto a las NTRCs de otros organismos que la copia localizada en el cromosoma 4. Este análisis filogenético apoya también la idea del origen cianobacteriano de este gen y su éxito en la evolución de los organismos fotosintéticos eucarióticos.

IV.2. EL GEN *NtrC* SE ENCUENTRA SOMETIDO A UN PROCESO DE *SPLICING* ALTERNATIVO

En organismos eucarióticos la transcripción del DNA da lugar a un transcrito primario denominado pre-mRNA. Este mensajero incluye en su secuencia fragmentos de secuencias no codificantes (intrones), que son eliminadas durante la maduración del RNA. Durante este proceso de maduración, un mismo pre-mRNA puede ser procesado de diferentes maneras. Este fenómeno, denominado *splicing* alternativo, incrementa en gran medida la plasticidad del transcriptoma, ampliando la capacidad codificante de los genes y la complejidad del proteoma.

En plantas se estima que más del 60% de los genes producen diferentes transcritos debido a fenómenos de *splicing* alternativo (Márquez et al., 2012; Syed et al., 2012). En particular, los análisis realizados en *Arabidopsis* mostraron que al menos el 42% de los genes que contienen intrones se encuentran sometidos a *splicing* alternativo (Filichkin et al., 2010). Por otro lado, los estudios realizados hasta el momento en cereales, a partir de marcadores de secuencias expresadas y de las secuencias de mRNA disponibles, han identificado un total de 8.734 eventos de *splicing* alternativo en *Oryza sativa* subespecie japónica, 2.657 en *O. sativa* subespecie indica, 3.971 en *Sorghum bicolor*, 10.687 en *Zea mays* y 1.219 en *Brachypodium distachyon* (Walters et al., 2013; Min et al., 2015). Se ha propuesto que estos fenómenos de *splicing* alternativo constituyen un mecanismo adicional de regulación de la expresión génica durante el desarrollo de la planta y su adaptación al entorno (Mastrangelo et al., 2012; Leviatan et al., 2013; Seo et al., 2013; Staiger and Brown, 2013; Filichkin et al., 2015).

La primera evidencia de que el gen *NtrC* podría sufrir *splicing* alternativo se obtuvo mediante el análisis de clones de cDNA obtenidos a partir de RNAs aislados de diferentes tejidos de arroz (Pérez-Ruiz, 2006). Entre los clones obtenidos la mayoría presentaba la secuencia correspondiente a la proteína completa, sin embargo, se obtuvieron también clones que presentaban un codón de parada prematura dando por tanto lugar a una hipotética forma truncada de la proteína. En el desarrollo de este trabajo, la clonación de los cDNAs del gen *NtrC* de *Brachypodium*, a partir de mRNAs aislados de hojas y semillas maduras, confirmó la presencia de dos tipos de mensajeros para NTRC (Figura III. 5). Mientras que los cDNAs obtenidos a partir de tejidos fotosintéticos correspondían mayoritariamente a la secuencia anotada para esta especie en las bases de datos, que codifica una NTRC completa, entre los clones de cDNA obtenidos a partir de semilla madura se observó con mayor frecuencia la presencia de clones que presentaban una secuencia adicional de 23 pb que provoca la aparición de un codón de parada prematuro (Figura. III. 7B). La comparación de este cDNA con la correspondiente secuencia génica permitió determinar que estos 23 pb correspondían con el final del intrón 4 (Figura III. 6). Por tanto, estos resultados sugieren que el gen *NtrC* de *Brachypodium*, como el de arroz, estaría sometido a un proceso de *splicing* alternativo que afecta al intrón 4 del gen y que este proceso ocurre con más frecuencia en semilla que en tejidos fotosintéticos.

La identificación de este mensajero alternativo del gen *NtrC* nos llevó a realizar un análisis en mayor profundidad de los mensajeros del gen con el fin de detectar otros posibles eventos de *splicing* alternativo. Este estudio se realizó a partir del RNA total procedente de tres tejidos diferentes: hoja, raíz y semilla (Figura III. 8 B). Los resultados mostraron la retención total de los intrones 1, 3 y 7 en mensajeros procedentes de raíces pero no en los de hojas o semillas. La retención de estos intrones introducía en todos los casos un condón de parada prematuro. Tan sólo la retención de la secuencia final del intrón 4 se encontró conservada en los tres tejidos analizados, mostrando diferencias en las proporciones de ambos transcritos según el tipo de tejido. Este análisis mostró que de todos los procesos de *splicing* observados en el gen *NtrC* de *Brachypodium*, el que afecta a la retención de 23 pb del intrón 4 es el más abundante, por lo que nos centramos en el análisis en profundidad del mismo.

La formación del mensajero alternativo para *NtrC* se encuentra conservada en plantas con semillas y es dependiente del tejido analizado

La primera evidencia de la importancia de este evento de *splicing* alternativo se puso de manifiesto tras comprobar su elevado grado de conservación dentro del grupo de plantas con semillas (Figura III. 10). La comparación de la secuencia correspondiente al final del intrón 4 – inicio del exón V del gen *NtrC* de diferentes organismos eucarióticos fotosintéticos demostró que, pese a existir una alta heterogeneidad en la secuencia del intrón 4 (como en el resto de los intrones), los últimos 23 pb mostraron un alto grado de conservación en el caso de plantas con semilla, incluyendo las dos copias del mismo en los organismos que las presentan. En todos los casos analizados se mantenía el aceptor alternativo “AG” necesario para la formación del mensajero alternativo. En cambio, no se pudo identificar esta conservación de secuencia al incluir en los análisis los genes *NtrC* de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Physcomitrella patens* como organismos representativos del grupo de las algas verdes y musgos, respectivamente (Figura III. 11). Por tanto, este análisis muestra que el *splicing* alternativo que se produce por la retención de 23 pb del intrón 4 es un proceso que afecta exclusivamente a los genes *NtrC* de plantas con semilla pero no a los de algas y briofitas.

Tras la demostración *in silico* de la conservación de la secuencia de 23 pb en los genes *NtrC* de plantas con semillas, se procedió a analizar si efectivamente se producía *splicing* alternativo del gen *NtrC* en distintas especies de plantas, así como el patrón de expresión de ambos mensajeros en diferentes tipos de tejidos. Para abordar este estudio se seleccionaron las especies *A. thaliana* y *B. distachyon*, como organismos representativos de dicotiledóneas y monocotiledóneas, respectivamente. Además, se incluyó a *S. lycopersicum*, una de las especies identificadas como portadora de dos copias del gen *NtrC*. Mediante RT-PCR, a partir de RNA de tejidos fotosintéticos y heterotróficos, generados tras la germinación de las semillas, se determinaron los niveles relativos de mensajeros SS y AS (Figuras III. 12B y 12C y Figura III. 13). Estos resultados mostraron en primer lugar que, acorde a lo esperado, el procesamiento alternativo del gen *NtrC* tiene lugar en todos los tejidos analizados de las distintas especies seleccionadas. En segundo lugar, se demostró que en tomate ambas copias

del gen se expresan activamente en todos los tejidos y que además ambas están sujetas a este mecanismo de *splicing* alternativo.

Por otra parte, la comparación de la proporción de mensajeros AS y SS mostró una dependencia del tipo de tejido analizado, siendo la proporción de mensajero alternativo mayor en tejidos heterotróficos que en tejidos fotosintéticos. Así pues se observó que en raíces de *Arabidopsis*, tomate y *Brachypodium* la proporción de ambos mensajeros era aproximadamente 1:1, sin embargo, en tejidos fotosintéticos la proporción de mensajeros AS/SS disminuía drásticamente, indicando por tanto una mayor predominancia del mensajero SS. En el caso de tomate se encontró una peculiaridad en los tejidos fotosintéticos analizados (hoja e hipocotilo), ya que se comprobó que la copia del gen *NtrC* localizada en el cromosoma 4 presentó una proporción para ambos mensajeros similares a las observadas en raíces (1:1), mientras que la copia del gen localizada en el cromosoma 10 mostró mayor proporción del mensajero SS en tejidos fotosintéticos, comportándose como los equivalentes de *Arabidopsis* y *Brachypodium*. La posibilidad de incluir en este estudio semillas de *Brachypodium* en distintas fases del desarrollo y germinadas, demostró que durante los primeros estadios del desarrollo el mensajero SS predomina sobre el alternativo, sin embargo, conforme se avanza hacia la madurez de la semilla el mensajero AS prevalece sobre el SS, y que tras la germinación de la semilla los niveles de ambos mensajeros se equilibran (Figura III. 13).

En conjunto, la conservación de los 23 pb del intrón 4 de los genes *NtrC* en plantas con semillas, junto con la expresión diferencial de ambos transcritos según el tejido analizado y su variación durante el desarrollo de la semilla sugirieron la posibilidad de que este mecanismo de *splicing* alternativo pudiese influir, al menos parcialmente, en los niveles finales de la proteína NTRC en los diferentes tejidos de plantas. Los análisis tipo *Western-blot*, empleando el anticuerpo anti-NTRC, realizados en paralelo a los experimentos de RT-PCR, demostraron que en raíces los niveles de NTRC eran más reducidos en comparación a los detectados en tejidos fotosintéticos, acorde a la abundancia de ambos mensajeros en dichos tejidos y como ya había sido descrito con anterioridad (Kirchsteiger et al., 2009). En el caso de semillas de *Brachypodium* se comprobó de nuevo que los niveles de NTRC eran también inferiores

en comparación a tejidos fotosintéticos. Estos resultados sugieren que este mecanismo de *splicing* alternativo constituye un componente adicional en la regulación de los niveles de NTRC en los distintos tejidos de plantas, en las que este mecanismo está muy conservado. Además, la carencia en los genes *NtrC* de algas y briofitas de dicho mecanismo de regulación, sugiere su aparición durante la evolución de las plantas superiores que se reproducen mediante la formación de semillas.

El frío y la luz alteran la relación de mensajeros AS/SS que codifican para NTRC

Los estudios transcriptómicos realizados en plantas durante los últimos años han demostrado que el *splicing* alternativo afecta a muchos más transcritos de lo que inicialmente se había asumido. La gran mayoría de estos eventos se han relacionado con mecanismos de respuesta a estrés biótico y abiótico, además de funciones esenciales de la planta como fotosíntesis, floración, regulación del ciclo circadiano o calidad de los granos (Reddy, 2007). Por ello, en este trabajo se ha analizado la posibilidad de que este evento de *splicing* alternativo esté sometido a regulación por variaciones ambientales, entre las cuales se han seleccionado el estrés por frío y el estrés salino.

Las bajas temperaturas tienen un gran impacto en el crecimiento y desarrollo de plantas, lo cual limita significativamente la distribución geográfica de las distintas especies vegetales. El frío disminuye la actividad biosintética de las plantas, e inhibe funciones normales implicadas en diversos procesos fisiológicos pudiendo llegar a causar lesiones permanentes e incluso la muerte celular (Xu et al., 2014). Para evitar estos problemas las plantas han desarrollado distintos mecanismos de adaptación alterando sus procesos fisiológicos y bioquímicos por medio de modificaciones transcripcionales, post-transcripcionales y post-traduccionales (Chinnusamy et al., 2007; Miura et al., 2011). Entre las modificaciones post-transcripcionales más comunes en respuesta al frío, destaca el procesamiento alternativo de mensajeros que introduce en la mayoría de casos codones de parada prematura de la traducción (Leviatan et al., 2013; Lee et al., 2016). De igual modo, el estrés salino supone en gran parte del mundo una grave amenaza para la agricultura. Los elevados niveles de sal

producen alteraciones osmóticas e iónicas que afectan la homeostasis celular y pueden provocar daños en las plantas debido a la desorganización de estructuras celulares, toxicidad metabólica y generación de ROS, que finalmente acaba comprometiendo la fotosíntesis y agotando la energía celular disponible, conduciendo a un crecimiento anormal e incluso la muerte celular (Zhang et al., 2016). Las plantas muestran una gran variedad de respuestas frente al estrés salino entre las que se encuentran modificaciones de la cromatina, modificaciones epigenéticas e inducción de la expresión de genes que codifican entre otros para factores de transcripción, proteínas implicadas en la homeostasis iónica o en la biosíntesis de osmolitos y proteínas implicadas en procesos de detoxificación, chaperonas, proteasas y enzimas implicadas en el marcaje de otras proteínas mediante ubiquitinación (Feng et al., 2015). Aunque la mayoría de los estudios anteriores se han centrado en la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional, se ha demostrado que también existe una regulación a nivel post-transcripcional donde la formación de mensajeros alternativos, al igual que para el frío, juega un papel fundamental (Ding et al., 2014).

Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que existen condiciones ambientales que pueden alterar la relación de mensajeros AS/SS para el gen *NtrC* en plántulas de *Brachypodium*. Mediante análisis de RT-PCRs se comprobó que en las dos condiciones de estrés estudiadas ambos tipos de mensajeros están siempre presentes tanto en los cotiledones como en las raíces de muestras tratadas y sin tratar. El análisis de la relación AS/SS en plántulas etioladas sometidas a tratamiento a baja temperatura mostró una disminución de esta relación de 5 y 5,6 veces en cotiledones y raíces, respectivamente (Figura III. 14). Sin embargo, según lo observado en los resultados el motivo de esta disminución diferiría según el tejido analizado, mientras que en cotiledones se observa una disminución del mensajero alternativo respecto al control, en raíces se produce una inversión en los patrones de expresión de ambos mensajeros donde el mensajero canónico se ve incrementado respecto al alternativo. Del mismo modo, los análisis del nivel de proteína NTRC realizados por *Western-blot* mostraron un incremento de los niveles de la enzima en raíces pero no así en cotiledones (Figura III. 14). Por otra parte, los resultados obtenidos tras el tratamiento con NaCl de plántulas crecidas en luz, han mostrado que

este estrés no afecta en gran medida a la relación AS/SS en cotiledones ni raíces, siendo los cambios obtenidos de 2 y 1,2 veces respectivamente, sin contemplarse además variaciones en los niveles totales de proteína NTRC en ninguno de los tejidos analizados (Figura III. 15). Además de estos resultados, la comparación entre la proporción de mensajeros AS/SS obtenida para los cotiledones y raíces de las muestras no tratadas de los experimentos de frío y salinidad, ha puesto de manifiesto la existencia de una tercera condición ambiental capaz de modificar dicha proporción, la luz. De manera que se observa como en cotiledones la proporción de los mensajeros AS/SS es 2,5 veces mayor en muestras etioladas que en no etioladas, característica que se mantiene en raíces, donde esta proporción se ve incrementada hasta 4,7 veces. La comparación de los niveles de NTRC muestra una disminución en el contenido de esta proteína en las raíces procedentes de plántulas etioladas, que concuerda con el incremento de la relación AS/SS observada en este tejido como consecuencia de la reducción de los niveles de mensajero estándar.

A pesar de que la información relativa a los mecanismos de regulación de expresión del gen *NtrC* en plantas es muy limitada, los hallazgos aquí recogidos sugieren que el *splicing* alternativo del gen *NtrC* puede constituir un mecanismo adicional en la regulación de los niveles de NTRC y que este mecanismo tiene más relevancia a la hora de regular la cantidad de NTRC en tejidos que poseen un bajo contenido de la enzima, como en raíces, que en tejidos fotosintéticos, donde NTRC es más abundante (Serrato et al., 2004; Kirchsteiger et al., 2012), y otros factores pueden ser más importantes.

El mensajero alternativo codificaría para una proteína truncada

Como ya se ha descrito, el mensajero alternativo para *NtrC* se caracteriza por la presencia de un aceptor "AG" adicional, localizado 23 nucleótidos aguas arriba del aceptor que genera el mensajero estándar (Figura III. 9). En plantas, este tipo de procesamiento que supone la retención parcial de un intrón representa el segundo más abundante tras la retención completa del intrón, que es el tipo de *splicing* alternativo más abundante (Chamala et al., 2015; Min et al., 2015). La retención de estos 23 pb produce un cambio en la fase de lectura del mensajero, originando un

codón de parada prematuro que, en el caso de ser traducido, generaría una proteína NTRC truncada (Figura III. 16). Esta versión truncada de NTRC tendría un tamaño de 29,8 KDa, perdería por completo el dominio Trx y parte del dominio NTR pero conservaría las Cys del sitio activo y motivos de unión del FAD y NADPH de dicho dominio.

Mediante distintas aproximaciones, en este trabajo se ha tratado de comprobar la posibilidad de que la versión truncada de NTRC producida a partir del mensajero alternativo fuera estable. Por una parte, haciendo uso del anticuerpo anti-NTRB, que reconoce el dominio NTR de NTRC, se realizaron análisis tipo *Western-blot* de extractos proteicos de tejidos que presentaban diferentes niveles de mensajero alternativo. Estos resultados identificaron la presencia de una banda adicional del tamaño esperado para la NTRC truncada, además de las NTRs A y B, en las muestras procedentes de semillas maduras y germinadas (Figura III. 17A). Sin embargo, en cotiledones y semillas en desarrollo sólo se obtuvo señal para las NTRs A y B (Figura III. 17B). Estos resultados apoyaron inicialmente la posibilidad de la presencia de una NTR alternativa, cuya señal era identificada en tejidos donde los niveles de transcrito AS eran predominantes frente a los mensajeros SS y que su no detección en cotiledones y semillas en desarrollo se explicaría por los bajos niveles de dicho mensajero. En una segunda aproximación, mediante electroforesis bidimensional y MALDI-TOF, se procedió a la identificación de la posible NTRC truncada usando como muestra extracto proteico de semillas maduras. Aunque los análisis tipo *Western-blot* con anti-NTRB realizados a partir de electroforesis bidimensional detectaron 3 manchas de las cuales dos se corresponderían con las NTRs A y B y la tercera con la posible proteína truncada, los geles empleados para la tinción con *Coomasie* presentaron una gran abundancia de proteínas en la región de interés que interfirieron en la identificación de la posible NTRC truncada, por lo que la identidad de dicha señal no pudo ser confirmada (Figura III. 18).

Aunque los resultados obtenidos sugieren la posible participación de este *splicing* alternativo como un mecanismo adicional en la regulación de los niveles totales de NTRC en plantas con semilla, debido a la imposibilidad de confirmar la presencia de una versión truncada de NTRC, el mecanismo de acción por el cual este

mensajero alternativo es capaz de regular dichos niveles no ha podido ser esclarecido, quedando abiertas distintas posibilidades. Según lo recogido en la bibliografía reciente, la opción más probable es que el mensajero alternativo al contener un codón de parada prematuro sea reconocido y degradado por un mecanismo de control denominado NMD (*Nonsense Mediated mRNA Decay*) regulando así los niveles totales de proteína. Por otra parte, estudios realizados en mutantes *ntrc* de *Arabidopsis* donde se ha expresado exclusivamente el dominio NTR de NTRC, demostraron que a pesar de que la proteína estaba presente y no era degradada, la presencia exclusiva del dominio NTR no era suficiente para revertir el fenotipo *ntrc* (Toivola et al., 2013). Atendiendo a estos resultados, en el caso de que el mensajero alternativo fuese insensible al NMD y codificase para una proteína NTRC truncada, esta versión de la proteína posiblemente carecería de actividad y sería degradada. Sin embargo, recientemente se ha descrito que, al menos en plantas, genes que codifican para proteínas que son funcionales como homodímeros son capaces de generar mensajeros alternativos en cuya secuencia se originan codones de parada prematuros. Estos mensajeros alternativos son traducidos y generan una versión truncada de la proteína que mantiene la capacidad de unirse a la proteína canónica, inhibiendo de este modo su actividad (Graeff and Wenkel, 2012; Seo et al., 2013). Por lo que, teniendo en cuenta que NTRC es funcional como homodímero, otra opción posible sería que el mensajero alternativo fuese traducible y generase una versión truncada de NTRC capaz de interactuar con la versión canónica e inhibir así su actividad.

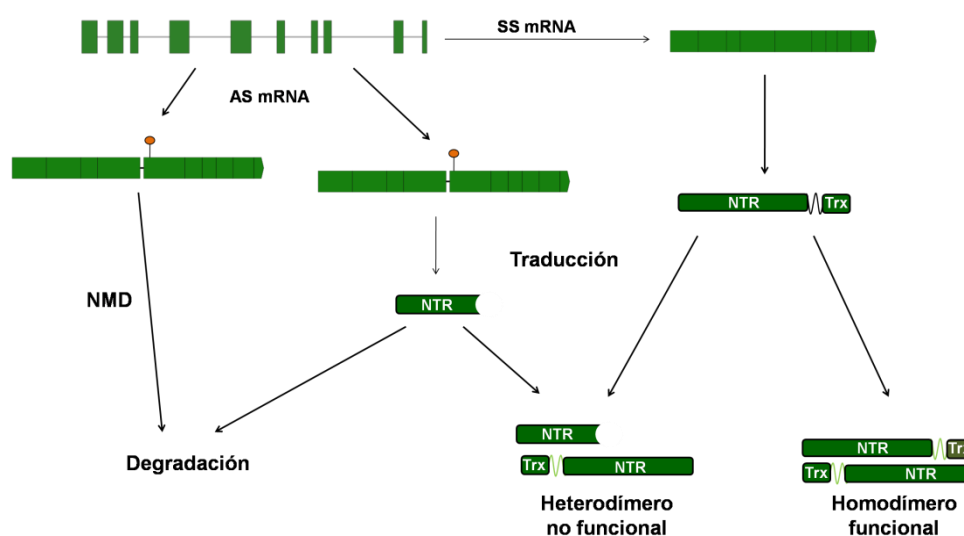


Figura IV. 2. Representación esquemática de las posibles vías seguidas por el mensajero alternativo del gen *NtrC*.

IV.3. GENERACIÓN DE PLANTAS DE *BRACHYPODIUM* CON NIVELES ALTERADOS DE NTRC EN EL ENDOSPERMO DE SEMILLAS

Aunque los estudios iniciales sobre NTRC describieron a esta enzima como una proteína de localización cloroplastidial (Serrato et al., 2004), estudios posteriores demostraron que, aunque sus niveles en tejidos fotosintéticos son superiores a los de tejidos heterotróficos, NTRC se localiza también en plastos de tejidos como la raíz (Kirchsteiger et al., 2012). Estos resultados sugirieron la posibilidad de que esta enzima pudiese estar también presente en los amiloplastos del endospermo de semillas de cereales, tejido especializado en la acumulación de almidón durante el desarrollo del grano. Este aspecto fue analizado en la tesis doctoral de Beatriz Cano (2013), realizada en nuestro grupo, demostrando la presencia de NTRC en el endospermo de semillas de arroz y trigo. Los resultados obtenidos en los estudios de cromatografía de afinidad e inmunolocalización para identificar posibles proteínas reguladas por NTRC, sugirieron además que esta enzima podría estar implicada en la regulación de una amplia variedad de procesos, entre los que se incluyen el metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos; síntesis y transformación de ATP; así como la síntesis y degradación de proteínas. En concreto, la identificación de enzimas clave en la biosíntesis de almidón, como las subunidades grande y pequeña de la AGPasa, el transportador de ADP-glucosa, enzimas ramificantes y desramificantes (isoamilasas y pululanases) y la almidón fosforilasa, sugiere la posibilidad de que la síntesis de almidón en el endospermo de cereales esté sujeta a control redox mediado por NTRC. Esta idea se vio apoyada por la existencia de un patrón similar de localización espacio-temporal de la NTRC y la AGPasa en las semillas de trigo en desarrollo observado mediante inmunolocalización (Cano, 2013). Además, cabe destacar que la AGPasa de plastos está sometida a control redox mediado por NTRC en *Arabidopsis* (Michalska et al., 2009).

Basándonos en los resultados anteriores y con objeto de abordar el estudio de la participación de NTRC en la regulación de la síntesis de almidón en endospermo y explorar su posible aplicación biotecnológica, se generaron cereales transgénicos con niveles alterados de NTRC en el endospermo de semillas de cereales, en concreto del cereal modelo *Brachypodium distachyon*.

La generación de plantas transgénicas de *Brachypodium* se llevó a cabo mediante la infección de callos embriogénicos compactos con la cepa AGL1 de *Agrobacterium* transformada con el vector G210 portador la de construcción pGLU1::NtrC_{Bd/Os}::NosTer (Figura III. 19), en el que la expresión de *BdNtrC* u *OsNtrC* estaba dirigida por el promotor *BdGLU1*, específico de endospermo (Coussens et al., 2012).

El uso de *Brachypodium* como cereal modelo ha llevado al desarrollo de varios protocolos de transformación de callos, basados en el uso de distintos medios de cultivo o de líneas diploides diferentes, como Bd21 o Bd21-3 (Vogel and Hill, 2008). En nuestro caso, se utilizó la línea Bd21 y el protocolo de transformación empleado en el grupo de la Dra. Pilar Carbonero (González-Calle, 2014) basado en el desarrollado por Vogel y Hill (2008). Durante el proceso de generación de plantas transgénicas se intentó optimizar este protocolo a las condiciones de cultivo disponibles y al plásmido utilizado en la transformación. Como se observa en la Tabla III. 4, tanto la experiencia de adquirida durante el manejo del protocolo como los cambios introducidos en el curso de los diferentes eventos de transformación, permitieron incrementar la eficiencia de transformación desde el 0,3% al 3,52% suponiendo una mejora de la eficiencia de transformación de casi 12 veces. En concreto, se observó que la infección de los callos por *Agrobacterium* supone un paso crítico, determinante de la eficiencia de transformación, de forma que el secado de los callos tras la infección mejoró de forma notable la eficiencia (evento de transformación 4), de forma similar a lo que se ha descrito en la transformación de trigo mediada por *Agrobacterium* (Cheng et al., 2003). Asimismo, la reducción de la concentración de higromicina, tras la primera semana de selección de los callos (evento de transformación 3), mejoró de forma notable el proceso de regeneración de los brotes resultando en la mayor supervivencia de los callos y de los brotes generados a partir de estos. La eficiencia obtenida en el último experimento de transformación, del 3,52%, es próxima a las eficiencias obtenidas por otros autores Christiansen et al. (2005) y Vogel et al. (2006). Aunque la eficiencia de la transformación de Bd21 obtenida en algunos casos fue superior a la aquí descrita, en torno al 20%, cabe destacar que esos resultados de eficiencia se obtuvieron con vectores diferentes, fundamentalmente pVec8, y empleando callos

procedentes de embriones inmaduros obtenidos a partir de plantas Bd21 regeneradas mediante cultivo de tejidos, siendo este último aspecto especialmente importante para el logro de dichas altas eficiencias de transformación (Vain et al., 2008; Alves et al., 2009). En nuestro caso la incompatibilidad de los sitios de restricción para la clonación en pVec8 impidió utilizar este tipo de vector. Además, se ha observado que la propia identidad del transgén afecta a la eficiencia del proceso de transformación, observándose por ejemplo una reducción de ésta cuando se utiliza como gen reportero GFP en lugar de GUS, ambos bajo el control del mismo promotor (Murray et al., 2004).

En total se generaron 16 líneas transgénicas de las cuales sólo 9 produjeron un número reducido de semillas T_1 . Ya que las plantas T_0 eran heterocigotas para la presencia del transgén, sólo una parte de las semillas T_1 obtenidas presentaban el mismo. De forma que las semillas de la generación T_1 constituían una mezcla heterogénea de semillas silvestres, heterocigotas y homocigotas. Aunque el número de semillas obtenidas no permitió un análisis en profundidad del efecto de la expresión de NTRC en el endospermo, si se pudieron analizar los niveles de proteína NTRC en las plantas T_0 y semillas T_1 , así como el fenotipo de dichas semillas.

Los resultados de los *Western-blot* para la generación T_0 de plantas transformadas mostraron que NTRC se expresaba en las hojas de las plantas transgénicas a niveles similares a los de las plantas no transformadas. Además, sólo en algunas de las líneas los niveles de NTRC en espigas fueron significativamente superiores a los de las plantas NT, probablemente debido a la presencia de óvulos fecundados en las espigas utilizadas (Figura III. 28). En semillas, el anticuerpo anti-NTRC detectó una banda de movilidad electroforética similar a la detectada en hoja (Figura III. 29). Cabe destacar que para la detección de NTRC en semillas fue necesario incubar las membranas dos veces con el anticuerpo, ya que una única incubación producía una señal muy débil, mostrando que los niveles de NTRC en semilla son muy inferiores a los de tejidos fotosintéticos, de forma similar a lo que ocurre en raíces de *Arabidopsis* (Kirchsteiger et al., 2012). Estos resultados concuerdan con los bajos niveles de transcritos del gen *NtrC* en semillas y raíces de cereales (Cano, 2013). Sin embargo, a diferencia de lo observado anteriormente en semillas de trigo y cebada en

las que NTRC se inmunodetectó como una banda de movilidad electroforética inferior (Cano, 2013), nuestros análisis mostraron que la NTRC de semillas tiene un tamaño similar a la de tejidos fotosintéticos, con un tamaño aproximado de 53 kDa (Serrato et al., 2004). Estos resultados explicarían el hecho de que el RNA mensajero de *NtrC* que se expresa en semillas sea similar al de hoja, habiéndose detectado sólo un fenómeno mayoritario de procesamiento alternativo que en lugar de generar una proteína de mayor tamaño generaría una proteína truncada, conteniendo exclusivamente el módulo NTR (Figura III. 8 y 16). Los niveles de NTRC en las semillas T₁ mostraron un comportamiento diferencial, con la presencia de líneas con niveles incrementados de NTRC (BdNTRC#28 y #29), líneas con niveles reducidos con respecto al control (BdNTRC#1, #23 y OsNTRC#24) y líneas con niveles no alterados.

A partir de estos resultados se seleccionaron dos líneas sobre-expresoras (BdNTRC#28 y #29) y una de las posibles líneas supresoras (BdNTRC#1) para obtener un mayor número de semillas y poder evaluar el efecto de la alteración de los niveles de expresión de NTRC en el endospermo.

Las semillas transgénicas poseen un fenotipo alterado en comparación a las de plantas no transformadas

Las plantas T₁ de las líneas seleccionadas, en las que se confirmó la presencia del transgén, se crecieron para la obtención de semillas T₂. Cabe destacar que, a diferencia de la generación anterior, las plantas T₁ presentaron un crecimiento normal completando su ciclo de vida en aproximadamente 4 meses. Por tanto, el retraso en el crecimiento observado en la generación T₀, que tardó aproximadamente 8 meses en producir semillas, se relaciona con la regeneración de plantas a partir de callos y no con la presencia del transgén. En las plantas T₁ no se observaron alteraciones fenotípicas ni en el crecimiento vegetativo de la planta ni en la producción de espigas en comparación con plantas procedentes de semillas NT (Figura III. 30). Sin embargo, tanto las semillas T₁ como T₂ mostraron alteración en su fenotipo, con una disminución de grosor respecto a las semillas de plantas NT (Figura III. 26 y 31). Estas diferencias fueron más pronunciadas en el caso de las semillas T₁ como consecuencia de la alteración en el crecimiento de la planta debida a su procedencia de callos. Los análisis

del peso medio confirmaron que las semillas transgénicas presentaban un peso medio inferior en comparación a las NT (Figura III. 27 y 32). Dentro del grupo de semillas T₂, todas las líneas presentaron una disminución del peso en torno al 10-30% siendo las líneas BdNTRC#29.2, #29.4, #29.7, #28.3 y #1.7 las que presentaron las diferencias más acusadas.

Las semillas T₂ procedentes plantas transformadas sobre-expresan el transgén y acumulan la proteína NTRC en su endospermo

Con el fin de evaluar la expresión del transgén en las semillas procedentes de plantas transformadas, se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de transcritos para el gen *NtrC* en semillas maduras T₂, de cada una de las líneas T₁ generadas. Estos resultados mostraron que todas las líneas analizadas, a excepción en la línea BdNTRC#1.4, presentaban niveles de expresión al menos dos veces superiores a los de las plantas NT, alcanzándose niveles 27 veces superiores al control en la línea BdNTRC#1.7 (Figura III. 33). Como se muestra en la Figura III. 34 el incremento de la expresión del gen *NtrC* se relaciona además con una reversión del patrón de *splicing* alternativo en comparación a lo descrito para semillas NT, con niveles del mensajero estándar incrementados respecto a los del mensajero alternativo en las diferentes líneas, a excepción de BdNTRC#1.4.

Para los análisis posteriores, se seleccionaron dos de las líneas con niveles superiores de expresión para cada uno de los parentales: BdNTRC#29.2 y #29.4, BdNTRC#28.3 y #28.7 y BdNTRC#1.7 y #1.8.

En primer lugar se analizó si efectivamente el incremento en los niveles de mensajero de *NtrC* se asociaba a niveles incrementados de proteína en las semillas. Los análisis de *Western-blot* confirmaron el incremento de proteína NTRC en las semillas T₂ de las líneas seleccionadas, en comparación a los determinados en semillas NT (Figura III. 35). En comparación con los resultados obtenidos en las semillas T₁, en la generación T₂ los niveles de proteína NTRC detectados en las distintas líneas fueron más homogéneos y no se correlacionaban directamente con los niveles de expresión antes mencionados. Esto puede ser debido a la existencia de mecanismos de regulación post-transcripcional. Por otra parte, cabe destacar que los análisis de

Western-blot realizados a partir de semillas T₁ en desarrollo de las líneas BdNTRC#28 y #29 (Figura III. 29) mostraron un contenido más elevado de NTRC en comparación con las semillas maduras. Estos resultados concuerdan con los de Kang et al. (2013) en los que se expresó la subunidad grande de la AGPasa bajo el control del promotor *GLU1* de trigo, observándose que los niveles máximos de expresión se alcanzaban durante el desarrollo y no en las semillas maduras. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la sobre-expresión del transgén y, por tanto, la acumulación de la proteína tenga lugar principalmente durante el desarrollo de la semilla y que posteriormente en la fase de maduración decaiga.

La sobre-expresión de NTRC en el endospermo de semilla altera la relación almidón/ β -glucanos

Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo de la generación de las plantas transgénicas aquí descritas era analizar el papel de NTRC en la regulación redox de la AGPasa y, por tanto, de la biosíntesis de almidón en el endospermo.

La AGPasa, enzima clave en el control de la biosíntesis de almidón, es una enzima de localización plastidial en tejidos fotosintéticos, en los que está sometida entre otros mecanismos de regulación a control redox mediado por Trxs y NTRC (Balmer et al., 2006; Michalska et al., 2009; Geigenberger, 2011). En el endospermo de semillas de cereales, la AGPasa presenta una localización dual en el citosol, mayoritaria, y en amiloplastos. La importante reducción del contenido en almidón y peso en semillas de plantas mutantes para la AGPasa citosólica de maíz, arroz y cebada sugieren que esta isoforma controla la síntesis de almidón en el endospermo (Lee et al., 2007; Tuncel and Okita, 2013). La observación de un patrón de localización similar de NTRC y AGPasa en el endospermo, así como la identificación de proteínas citosólicas como posibles dianas de NTRC, apoyaba la idea de que NTRC estuviera implicada en la regulación de la AGPasa en el citosol (Cano, 2013). Aunque el residuo de Cys sujeto a regulación redox en la subunidad pequeña de la AGPasa no está conservado en la isoforma citosólica, los estudios bioquímicos de la enzima de arroz sugieren que esta isoforma también está sujeta a control redox, en este caso mediante modificación de la subunidad grande (Tuncel et al., 2014).

En el caso de que NTRC regulase la síntesis de almidón en este tejido, sería de esperar que las semillas transgénicas generadas contuvieran niveles incrementados de almidón. Sin embargo, el análisis del contenido de almidón en las semillas T₂ mostró valores semejantes a los de las semillas procedentes de plantas no transformadas en 4 de las 6 líneas analizadas, BdNTRC#29.2, #28.3, #28.7 y #1.8, mientras que las otras dos líneas, BdNTRC#29.4 y #1.7, presentaron una reducción del 50% de los valores de las semillas control (Figura III. 36A).

Los β -glucanos constituyen el principal polisacárido de reserva en *Brachypodium*. Por tanto, si NTRC regulase la distribución de azúcares en el endospermo sería posible que sus niveles apareciesen alterados en las semillas transgénicas (Burton and Fincher, 2012, 2014). El análisis del porcentaje en peso de β -glucanos en las semillas transgénicas T₂, mostró un comportamiento más homogéneo entre las diferentes líneas analizadas, con una tendencia a niveles ligeramente incrementados respecto a los de semillas control, aunque sin diferencias significativas en la mayor parte de las líneas (Figura III. 36B). Sin embargo, cuando se analizó la proporción almidón/ β -glucanos se observó que todas las líneas transgénicas presentaban una disminución significativa de esta proporción de al menos el 20% en comparación al control, siendo estas diferencias mucho más acusadas en las líneas BdNTRC#29.4 y #1.7 con una disminución en torno al 50% (Figura III. 36C).

Nuestros resultados muestran, por tanto, que el incremento en los niveles de NTRC en endospermo de semillas de *Brachypodium* genera una alteración en la distribución de azúcares hacia la biosíntesis de polisacáridos. Estudios recientes han demostrado que el contenido de almidón en el endospermo de *Brachypodium* es significativamente inferior al de cebada, mientras que su contenido en (1-3)(1-4) β -glucanos es marcadamente superior (Tanackovic et al., 2014). De hecho, aunque esta especie posee toda la maquinaria enzimática necesaria para la biosíntesis y degradación del almidón, los niveles y el patrón de expresión de los genes en el endospermo durante el desarrollo de la semilla y la actividad enzimática de las proteínas correspondientes difieren claramente de los de otras semillas de cereales (Trafford et al., 2013; Tanackovic et al., 2014). En concreto, mientras que en cebada la expresión de la almidón sintasa *ssIV*, implicada en la iniciación del gránulo de almidón

incrementa tras la etapa de celularización, alcanzando un máximo en los estadíos tardíos de maduración del endospermo, en *Brachypodium* su expresión es máxima en el estado de pre-celularización y disminuye hacia la maduración del endospermo, indicando que este proceso es menos importante en este cereal (Tanackovic et al., 2014). Además, en *Brachypodium*, la expresión de la mayoría de los genes implicados en la síntesis de almidón, como la almidón sintasa (*SSI*, *SSIIa*), las subunidades L1 y S2 de la AGPasa (*AGP-L1* y *AGP-S2*), *GBSSs1a*, enzimas ramificantes (*SBEIIa*, *SBEIIb*), isoamilasas (*ISA1*) y α -glucano fosforilasa (*PHO1*) muestra un máximo a los 5 días tras la fertilización (DAF), antes del proceso de celularización, y decae notablemente a los 25 DAF, mientras que en cebada su expresión es máxima a los 16 DAF y luego decae o se mantiene en niveles elevados (Tanackovic et al., 2014). Además, los transcritos de genes implicados en la síntesis de almidón se expresan a menor nivel que ortólogos de cebada (Trafford et al., 2013). Esta reducción de los niveles de expresión en *Brachypodium* se acompaña además de una reducción en la actividad de enzimas como la AGPasa, que en *Brachypodium* es un orden de magnitud inferior respecto a cebada, y la almidón sintasa, que en *Brachypodium* es la mitad de la de cebada (Trafford et al., 2013). Sin embargo, los niveles de expresión del gen *cellulose synthase-like F6* (*CsIF6*), necesario para la síntesis de β -glucanos, en cebada y su ortólogo en *Brachypodium* son similares (Trafford et al., 2013). Estos resultados muestran que la reducción en la capacidad de síntesis de almidón sería responsable de la reducción de los niveles de almidón en *Brachypodium*, mientras que el mayor contenido de β -glucanos no parece deberse a una mayor expresión de los genes implicados en su síntesis sino más bien a la menor síntesis de almidón.

Estudios recientes de compartimentalización del metabolismo del almidón en cebada han mostrado que la ADP-Glu, precursora de la síntesis de almidón, se encuentra de forma mayoritaria en el citosol de las células del endospermo de semillas en desarrollo. Concentraciones similares se encuentran de Glu-1-P y ATP, sustratos de la AGPasa, así como, de PPI. Estos resultados indican que la enzima tendría *in vivo* la capacidad de catalizar la reacción a velocidades similares en ambos sentidos. La dirección de la reacción *in vivo* dependerá de las concentraciones de sus sustratos y del transporte de ADP-Glu al plasto (Tiessen et al., 2011). Las concentraciones de

ADP-Glu en el citosol y ADP en el plasto, también están próximas a los valores de Km del transportador de ADP-Glu, el cual presenta baja afinidad por la ADP-Glu (Tiessen et al., 2011). La gran diferencia de concentración de este azúcar nucleótido en el citosol con respecto al plasto favorecería, por tanto, la entrada de la ADP-Glu al plasto para la síntesis de almidón. Por tanto, el transporte de ADP-Glu al plasto, desplazado del equilibrio, constituye un punto importante de regulación de la síntesis de almidón en el endospermo de cereales. De hecho, las semillas de cebada deficientes en la actividad del transportador de ADP-Glu *brittle1*, con niveles reducidos de almidón, muestran no sólo una distribución alterada del azúcar nucleótido sino también niveles totales incrementados respecto a las semillas silvestres (Patron et al., 2004; Tiessen et al., 2011). Como hemos mencionado, resultados previos obtenidos en el grupo identificaron no sólo a la AGPasa, sino también al transportador de ADP-Glu, como posibles dianas de NTRC. Otros estudios han identificado también a este transportador como una diana potencial de Trxs (Balmer et al., 2006). El transportador de ADP-Glu, *Brittle1*, contiene varias Cys conservadas, lo cual apoya su posible regulación redox, que podría estar mediada entre otros por NTRC. Sin embargo, aún no se ha demostrado que exista este mecanismo de regulación.

Teniendo en cuenta todos estos hechos, una posible explicación de la disminución de la proporción almidón/ β -glucanos observada en las semillas transgénicas es que la sobre-expresión de NTRC en el endospermo de la semilla de *Brachypodium* conduciría a un aumento de la actividad de la AGPasa plastidial y, consecuentemente, de la concentración de ADP-Glu en el plasto. Este incremento en la concentración de ADP-Glu no resultaría en un incremento en los niveles de almidón como consecuencia de la reducida expresión y actividad de la maquinaria de síntesis de almidón existente en este cereal. Como consecuencia, al incrementar la concentración de ADP-Glu plastidial se alteraría la diferencia de concentración del azúcar nucleótido entre el plasto y el citosol, con la consecuente disminución del transporte y aumento en la concentración de ADP-Glu citosólica. Esto resultaría en un desvío de azúcares a la biosíntesis de otros polisacáridos, como los β -glucanos. Cabe destacar que tanto el carácter reversible de la reacción catalizada por la AGPasa en el citosol de células del endospermo, como la previamente descrita regulación por NTRC

de la AGPasa plastidial apoyarían esta distribución alterada de azúcares en *Brachypodium*, un cereal con una capacidad de síntesis de almidón reducida respecto a otros cereales (Michalska et al., 2009; Tiessen et al., 2011).

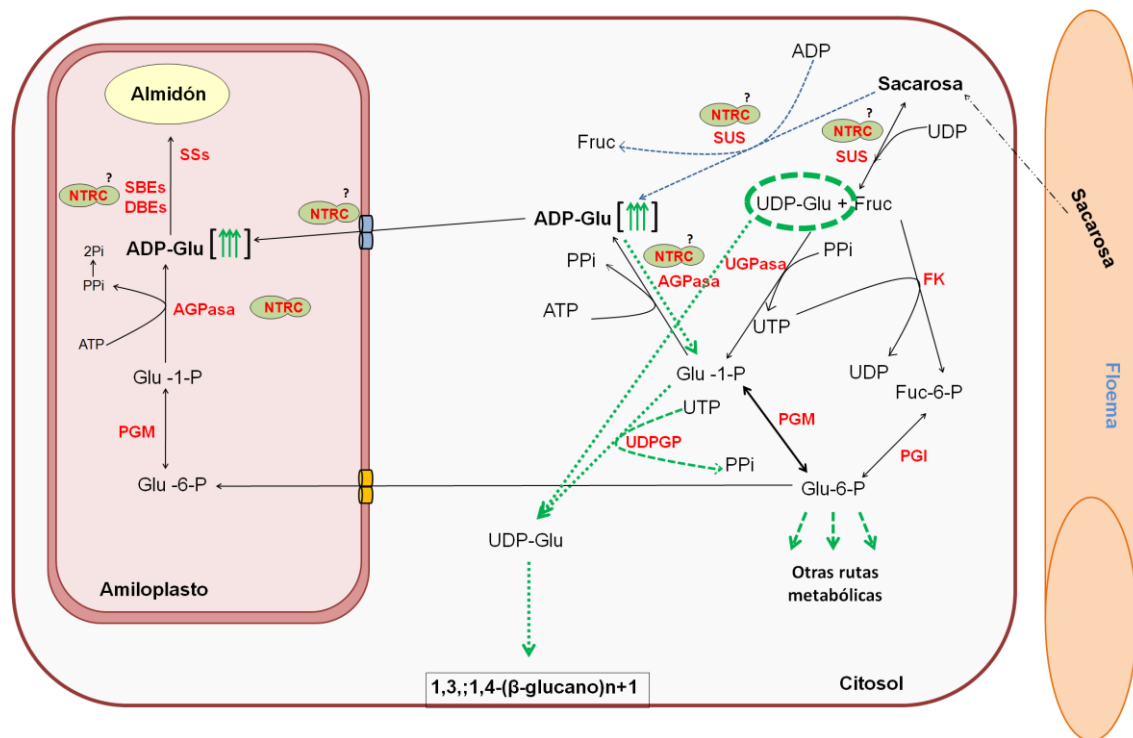


Figura IV. 3. Representación esquemática de la síntesis de almidón en semillas transgénicas de *Brachypodium* indicando las posibles enzimas reguladas por NTRC. La flecha punteada en verde resalta las posibles rutas alternativas que puede seguir la ADP-Glu acumulada en el citosol. Las abreviaturas corresponden a: PGI, fosfoglucosa isomerasa; PGM, fosfoglucomutasa; AGPasa, ADP-glucosa pirofosforilasa; SUS, sacarosa sintasa; UGPasa, UDP-glucosa pirofosforilasa; SSs, almidón sintasa; SBEs, enzimas ramificantes; DBE, enzimas desramificantes; FK, fructoquinasa y UDPGP, UDP-glucosa pirofosforilasa.

La sobre-expresión de NTRC afecta a la solubilidad de la globulina 11S y de las prolaminas

Las proteínas acumuladas en el endospermo de las semillas de cereales constituyen una fuente de reserva de aminoácidos y nitrógeno durante la germinación de la semilla. Estudios previos habían identificado a la sacarosa sintasa como posible diana de NTRC en el endospermo. La activación por reducción de esta enzima podría incrementar los niveles de azúcares destinados, entre otras cosas, a la síntesis de proteínas de reserva (Cano, 2013). Estos estudios identificaron también algunas proteínas de reserva, como las gluteninas y otras proteínas pertenecientes a la familia

de las cupinas del endospermo de trigo y arroz como posibles proteínas reguladas por NTRC (Cano, 2013). Además, como se ha mencionado anteriormente, el aumento de la actividad AGPasa en el plasto podría resultar en un aumento de la disponibilidad de azúcares para la síntesis de proteínas de reserva, entre otros procesos. Por este motivo, analizamos mediante un fraccionamiento de las proteínas de reserva, basado en su diferente solubilidad, el contenido proteico de las semillas de las 6 líneas seleccionadas.

Los resultados procedentes del fraccionamiento no mostraron cambios en los patrones de proteínas de los extractos crudos ni de la fracción soluble en sal entre las semillas de las distintas líneas transgénicas y las de plantas NT (Figura III. 37A y B). Sin embargo, sí se apreciaron cambios en los niveles de algunas proteínas tanto en la fracción soluble en alcohol como en la fracción UCT (Figura III. 38A y 39B). Los análisis de MALDI-TOF permitieron identificar a la globulina 11S, y a dos tipos de prolaminas, γ -gliadinas y aveninas, como proteínas con niveles alterados o con diferente solubilidad en las semillas de las líneas transgénicas con respecto a los de las semillas de plantas NT.

La familia de las globulinas 11S constituye la principal proteína de reserva en el endospermo de *Brachypodium*. Estas globulinas son sintetizadas como un precursor que tras perder su péptido de tránsito tiene un tamaño aproximado de 52 kDa. Posteriormente, este precursor se rompe originando dos fragmentos, un fragmento ácido, denominado α -polipéptido, con un tamaño aproximado de 30 kDa, y un segundo fragmento, básico, denominado β -polipéptido que posee un tamaño aproximado de 22 kDa (Larre et al., 2010). De acuerdo con lo observado en los resultados, las bandas 2 y 12-13 se corresponderían con la proproteína de la globulina 11S, las bandas 5 y 18 con el fragmento ácido y las bandas 7, 19 y 20 con el fragmento básico. A diferencia de otras globulinas que son solubles en soluciones salinas, las globulinas 11S son insolubles en este tipo de soluciones, por lo que también se denominan gluteninas (Shewry et al., 1995). El principal motivo de su insolubilidad reside en que estas proteínas contienen varios residuos de Cys que forman enlaces disulfuros entre sus cadenas α y β durante la maduración de la semilla, por lo que su extracción sólo es posible en condiciones altamente reductoras (Larre et al., 2010; Wang

et al., 2010). Nuestros resultados muestran que en las líneas transgénicas parte de las globulinas 11S, bandas 2, 5 y 7, han sido extraídas en la fracción soluble en alcohol mientras que están ausentes en esta fracción de las semillas NT (Figura III. 38A). Estudios realizados con harinas, han demostrado que cuando las gluteninas se encuentran reducidas aumenta su solubilidad en soluciones alcohol-agua (Wieser, 2007). Por otra parte, se ha descrito que las proteínas de reserva son reducidas durante el proceso de germinación para incrementar su solubilidad y susceptibilidad proteolítica, siendo las Trx *h* una de las principales enzimas implicadas en dicha reducción (Kobrehel et al., 1992; Gelhaye et al., 2004; Hagglund et al., 2016). Estos datos, junto con la identificación de las gluteninas y otras proteínas pertenecientes a la familia de las cupinas como posibles dianas de NTRC, sugieren que en las líneas transgénicas las globulinas 11S muestran un incremento en solubilidad en la fracción alcohólica debido a un mayor grado de reducción. Además de este resultado, al comparar los niveles relativos de dicha proteína en ambas fracciones se observó que las bandas 2 y 7 de la fracción soluble en alcohol y sus correspondientes bandas 12-13 y 19 de la fracción UCT, se encontraban incrementadas respecto a los niveles relativos determinados para las semillas NT. Este dato muestra que no sólo la solubilidad de la proteína se ve afectada sino también sus niveles totales, ya que de no ser así lo que cabría esperar es que el incremento de globulina 11S en la fracción alcohólica se asociara a una disminución de sus niveles en la fracción UCT. El incremento en el contenido total de globulina 11S podría ser debido a la mayor disponibilidad de azúcares para procesos biosintéticos en las semillas transgénicas, según lo descrito en el apartado IV. 3. 2.

Por otra parte, en *Brachypodium*, las prolaminas sólo están representadas por las γ -gliadinas y aveninas, al igual que en arroz y avena, y a diferencia de trigo o cebada donde las prolaminas constituyen la principal proteína de reserva del endospermo (Larre et al., 2010). Nuestros resultados han identificado estos dos tipos de prolaminas en fracción de proteínas solubles en alcohol y fracción UCT del endospermo de *Brachypodium* de todas las líneas analizadas. Se ha descrito que las γ -gliadinas, que poseen varios residuos de Cys, se encuentran en el endospermo formando estructuras monoméricas con enlaces disulfuros intracatenarios. Al igual que las globulinas,

durante el proceso de germinación estas prolaminas se reducen por acción de las Trx *h* (Kobrehel et al., 1992; Gelhaye et al., 2004; Hagglund et al., 2016). El incremento de intensidad observado en la banda 8, correspondiente a la γ -gliadina, en todas las líneas transgénicas (a excepción de la línea BdNTRC#29.4) indica que en estas semillas sus niveles son superiores a los determinados en semillas de plantas NT. Los resultados obtenidos por Kobrehel et al. (1992) demostraron que la reducción *in vitro* de extractos de gliadinas procedentes de harinas de trigo por medio de un sistema completo NADPH NTR/Trx o DTT y Trx, produce un aumento en la solubilidad de las mismas en la solución alcohólica en comparación con muestras no tratadas o tratadas con sistemas glutatión/glutatión reductasa/NADPH y NADPH/glutatión. De acuerdo con estos resultados, el incremento de señal observado para las γ -gliadinas en las líneas transgénicas podría corresponderse con un incremento de la solubilidad de las mismas como consecuencia de una mayor reducción de estas proteínas, presumiblemente por acción de NTRC. Si bien cabe destacar que este incremento también podría ser debido a un aumento de la síntesis de γ -gliadinas como consecuencia de la redistribución de los azúcares que no pueden ser utilizados para la síntesis de almidón. Finalmente, para el caso de las aveninas, proteínas de las que se dispone de poca información, se sabe que pueden encontrarse como monómeros o formando agregados, donde la formación de puentes disulfuro juega un papel fundamental (Real et al., 2012). Nuestros resultados han mostrado su presencia tanto en la fracción soluble en alcohol, bandas 9 y 10, como en la fracción UCT, bandas 21 y 22. La comparación de los niveles relativos de esta proteína en ambas fracciones demostró que mientras sus niveles en la fracción alcohólica se ven incrementados (Figura III. 38B), principalmente en las líneas BdNTRC#1.7 y #1.8, sus correspondientes niveles en la fracción UCT se ven disminuidos (Figura III. 39B). Aunque no existe información sobre regulación redox de aveninas, basándonos en su similitud con las gliadinas, los resultados aquí obtenidos sugieren que en el endospermo de semillas transgénicas las aveninas podrían presentar un mayor nivel de reducción, posiblemente por acción de NTRC, que provocaría un incremento de número de monómeros reducidos en el endospermo. De esta forma se explicaría el aumento de señal y de niveles relativos de estas proteínas en la fracción soluble en alcohol y su

consecuente disminución en la fracción UCT en las semillas transgénicas frente a las procedentes de plantas NT.

V. CONCLUSIONES

1. El gen *NtrC* se encuentra exclusivamente en organismos que realizan fotosíntesis oxigénica. Aunque estaba considerado un gen de copia única, se han identificado especies de plantas que presentan dos copias activas del mismo, que probablemente surgieron mediante eventos independientes de duplicación a lo largo de la evolución.
2. El gen *NtrC* se encuentra sometido a procesos de *splicing* alternativo. De ellos, el que se produce por retención de 23 pares de bases en el extremo 3' del intrón 4 está altamente conservado en plantas con semilla, incluidas las dos copias del gen en los organismos que las presentan.
3. El mensajero alternativo presenta un codón de parada de traducción prematuro, por lo que generaría una proteína NTRC truncada probablemente sin función. La relación mensajero alternativo/mensajero estándar del gen *NtrC* es dependiente del tipo de tejido, mostrando los tejidos fotosintéticos mayor proporción de mensajero estándar. Condiciones ambientales como la luz y el frío afectan a la proporción de ambos mensajeros.
4. Se ha optimizado un protocolo de transformación de *Brachypodium distachyon* que ha permitido la obtención líneas transgénicas con niveles alterados de NTRC exclusivamente en el endospermo de semilla.
5. La sobre-expresión de NTRC en el endospermo de semillas de *Brachypodium* afecta a la relación almidón/ β -glucanos así como a los niveles y solubilidad de sus principales proteínas de reserva: globulina 11S, γ -gliadinas y aveninas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Baki AA** (1974) Pitfalls in using sodium hypochlorite as a seed disinfectant in C incorporation studies. *Plant Physiol* **53**: 768-771
- Alkhalfioui F, Renard M, Frenedo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C, Montrichard F** (2008) A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol* **148**: 424-435
- Alkhalfioui F, Renard M, Vensel WH, Wong J, Tanaka CK, Hurkman WJ, Buchanan BB, Montrichard F** (2007) Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiol* **144**: 1559-1579
- Alves SC, Worland B, Thole V, Snape JW, Bevan MW, Vain P** (2009) A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nat Protoc* **4**: 638-649
- Angelovici R, Galili G, Fernie ARa, Fait A** (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Sci* **15**: 211-218
- Apel Ka, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Ariel Cardona C, Eduardo Orrego C, Cristina Paz I** (2009) The Potential for production of bioethanol and bioplastics from potato starch in Colombia. *Fruit, Veg Cereal Sci Biotech* **3**: 102-114
- Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustun S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Bornke F** (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **22**: 1498-1515
- Asada K, Tanaka K, Kasai Z** (1969) Formation of phytic acid in cereal grains. *Ann NY Acad Sci*. **165**: 801-814
- Asatsuma S, Sawada C, Itoh K, Okito M, Kitajima A, Mitsui T** (2005) Involvement of alpha-amylase I-1 in starch degradation in rice chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **46**: 858-869
- Ayliffe M, Singh D, Park R, Moscou M, Pryor T** (2013) Infection of *Brachypodium distachyon* with selected grass rust pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **26**: 946-957
- Bai F, and Settles AM** (2015) Imprinting in plants as a mechanism to generate seed phenotypic diversity. *Front Plant Sci* **5**: 780
- Bailly C** (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* **14**: 93-107

- Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F** (2008) From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C R Biol* **331**: 806-814
- Balmer Y, Vensel WH, Cai N, Manieri W, Schurmann P, Hurkman WJ, Buchanan BB** (2006) A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2988-2993
- Balsera M, Uberegui E, Schurmann P, Buchanan BB** (2014) Evolutionary development of redox regulation in chloroplasts. *Antioxid Redox Signal* **21**: 1327-1355
- Ballicora MA, Iglesias AA, Preiss J** (2004) ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Regulatory Enzyme for Plant Starch Synthesis. *Photosynth Res* **79**: 1-24
- Ballicora MA, Laughlin MJ, Fu Y, Okita TW, Barry GF, and Preiss J** (1995) Adenosine 5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase from potato tuber. Significance of the N terminus of the small subunit for catalytic properties and heat stability. *Plant Physiol* **109**: 245-251
- Baroja-Fernández E, Muñoz FJ, Saikusa T, Rodríguez-López M, Akazawa T, and Pozueta-Romero J** (2003) Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADP-glucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol* **44**: 500-509
- Baulcombe DC, Buffard D** (1983) Gibberellic-acid-regulated expression of alpha-amylase and six other genes in wheat aleurone layers. *Planta* **157**: 493-501
- Bechtel D, Pomeranz Y** (1980) The rice kernel. *In* P Y, ed, *Advances in cereal science and technology*, Vol 3. Am Assoc Cereal Chem, St Paul, Minnesota, pp 73-113
- Bennett MD, Smith JBa, Barclay I** (1975) Early Seed Development in the Triticeae. *Philos Trans Royal Soc Lond: Biol Sci* **272**: 199-227
- Bent A** (2006) *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods Mol Biol* **343**: 87-103
- Bernal-Bayard P, Hervas M, Cejudo FJ, Navarro JA** (2012) Electron transfer pathways and dynamics of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC). *J Biol Chem* **287**: 33865-33872
- Bevan MW, Garvin DF, Vogel JP** (2010) *Brachypodium distachyon* genomics for sustainable food and fuel production. *Curr Opin Biotechnol* **21**: 211-217
- Bewley JD** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**: 1055-1066

- Bouvier d'Yvoire M, Bouchabke-Coussa O, Voorend W, Antelme S, Cezard L, Legee F, Lebris P, Legay S, Whitehead C, McQueen-Mason SJ, Gomez LD, Jouanin L, Lapiere C, Sibout R** (2013) Disrupting the cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 gene (BdCAD1) leads to altered lignification and improved saccharification in *Brachypodium distachyon*. *Plant J* **73**: 496-508
- Bove J, Jullien M, Grappin P** (2002) Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol* **3**: REVIEWS1002
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Britannica E** (1996). Encyclopaedia Britannica
- Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, Vain P, Brutnell T, Sibout R, Bevan M, Budak H, Caicedo A, Gao C, Yong Gu, Hazen SP, Holt III BF, Hong SY, Jordan M, Manzaneda AJ, Mitchell-Olds T, Mochida K, Mur LA, Park CM, Sedbrook J, Watt M, Zheng SJ, and , Vogel J** (2011) *Brachypodium* as a model for the grasses: Today and the future. *Plant Physiol* **157**: 3–13
- Burton RA, Fincher GB** (2012) Current challenges in cell wall biology in the cereals and grasses. *Front Plant Sci* **3**: 130
- Burton RA, Fincher GB** (2014) Evolution and development of cell walls in cereal grains. *Front Plant Sci* **5**: 456
- Cano B** (2013) Regulación redox de la síntesis de almidón en cereales. Universidad de Sevilla, Sevilla
- Carrillo LR, Froehlich JE, Cruz JA, Savage LJ, Kramer DM** (2016) Multi-level regulation of the chloroplast ATP synthase: the chloroplast NADPH thioredoxin reductase C (NTRC) is required for redox modulation specifically under low irradiance. *Plant J* **6**: 654-663
- Cejudo FJ, Ferrández J, Cano B, Puerto-Galán L, Guinea M** (2012) The function of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system in plastid redox regulation and signalling. *FEBS Lett* **586**: 2974-2980
- Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M** (2003) The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J Biol Chem* **278**: 23747-23752
- Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz KJ, Issakidis-Bourguet E** (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new γ -type. *Plant Physiol* **136**: 4088-4095

- Comparot-Moss S, Denyer K** (2009) The evolution of the starch biosynthetic pathway in cereals and other grasses. *J Exp Bot* **60**: 2481-2492
- Coussens G, Aesaert S, Verelst W, Demeulenaere M, De Buck S, Njuguna E, D. I, Lijsebettens aMV** (2012) *Brachypodium distachyon* promoters as efficient building blocks for transgenic research in maize. *J Exp Bot* **63**: 1 - 11
- Crevillen P, Ventriglia T, Pinto F, Orea A, Merida A, Romero JM** (2005) Differential pattern of expression and sugar regulation of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase-encoding genes. *J Biol Chem* **280**: 8143-8149
- Cross JM, Clancy M, Shaw JR, Greene TW, Schmidt RR, Okita TW, and Hannah LC** (2004) Both Subunits of ADP-Glucose Pyrophosphorylase Are Regulatory. *Plant Physiol.* **135**: 137-134
- Chamala S, Feng G, Chavarro Ca, Barbazuk WB** (2015) Genome-wide identification of evolutionarily conserved alternative splicing events in flowering plants. *Front Bioeng and Biotechno* **3**: 33
- Chen C, Letnik I, Hacham Y, Dobrev P, Ben-Daniel B-H, Vanková R, Amir Ra, Miller G** (2014) Ascorbate Peroxidase6 protects Arabidopsis desiccating and germinating seeds from stress and mediates cross talk between reactive oxygen species, abscisic acid, and auxin. *Plant Physiol* **166**: 370–383
- Chen G, Zhu J, Zhou J, Subburaj S, Zhang M, Han C, Hao P, Li X, Yan Y** (2014) Dynamic development of starch granules and the regulation of starch biosynthesis in *Brachypodium distachyon*: comparison with common wheat and *Aegilops peregrina*. *BMC Plant Biol* **14**: 198
- Cheng M, Hu T, Layton J, Liu Ca, Fry J** (2003) Desiccation of plant tissues post-Agrobacterium infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* **29**: 595–604
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK** (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Sci* **12**: 444-451
- Chochois V, Vogel JP, Watt M** (2012) Application of *Brachypodium* to the genetic improvement of wheat roots. *J Exp Bot* **63**: 3467-3474
- Christiansen P, Andersen CH, Didion T, Folling M, Nielsen KK** (2005) A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Rep* **23**: 751-758
- Christopher J. Schwartz, Mark R. Doyle, Antonio J. Manzaneda, Pedro J. Rey, Mitchell-Olds T, Amasino aRM** (2010) Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *Bioenerg Res* **3**: 38–46

- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, MB. T** (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**: 471-481
- Ding F, Cui P, Wang Z, Zhang S, Ali S, Xiong L** (2014) Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in Arabidopsis. *BMC Genomics* **15**: 431
- Dinges JR, Colleoni C, James MG, Myers AM** (2003) Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell* **15**: 666-680
- Doan DN, Rudi H, Olsen OA** (1999) The allosterically unregulated isoform of ADP-glucose pyrophosphorylase from barley endosperm is the most likely source of ADP-glucose incorporated into endosperm starch. *Plant Physiol* **121**: 965-975
- Domínguez F, Cejudo FJ** (1999) Patterns of starchy endosperm acidification and protease gene expression in wheat grains following germination. *Plant Physiol* **119**: 81-88
- Domínguez F, Moreno J, Cejudo FJ** (2004) A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death. *J Biol Chem* **279**: 11530-11536
- Domínguez F, Moreno Ja, Cejudo FJ** (2001) The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta* **213**: 352-360
- Domínguez Fa, Cejudo FJ** (2014) Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination. *Front Plant Sci* **5**: 366
- Draper J, Mur LA, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge AP** (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* **127**: 1539-1555
- Dubrovina AS, Kiselev KV, Zhuravlev YN** (2013) The role of canonical and noncanonical pre-mRNA splicing in plant stress responses. *Biomed Res Int* **2013**: 264314
- Edeas M, Attaf D, Mailfert AS, Nasu M, Joubet R** (2010) Maillard reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants. *Pathol Biol (Paris)* **58**: 220-225
- El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C** (2008) Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal Behav* **3**: 175-182
- Ellis RP, Cochrane MP, Dale MFB, Dupus CM, Lynn A, Morrison IM, Prentice RDM, Swanston JS, Tiller aSA** (1998) Starch production and industrial use. *J Sci Food Agr* **77**: 289-311

- Evers T, Millar aS** (2002) Cereal Grain Structure and Development: Some Implications for Quality. *J Cereal Sci* **36**: 261-284
- Fath A, Bethke P, Beligni V, Jones R** (2002) Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J Exp Bot* **53**: 1273-1282
- Fath A, Bethke PC, and Jones R** (2001) Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in Barley aleurone. *Plant Physiol* **126**: 156-166
- Feng J, Li J, Gao Z, Lu Y, Yu J, Zheng Q, Yan S, Zhang W, He H, Ma L, Zhu Z** (2015) SKIP confers osmotic tolerance during salt stress by controlling alternative gene splicing in Arabidopsis. *Mol plant* **8**: 1038-1052
- Figuroa M, Alderman S, Garvin DF, Pfender WF** (2013) Infection of *Brachypodium distachyon* by formae speciales of *Puccinia graminis*: early infection events and host-pathogen incompatibility. *PLoS One* **8**: e56857
- Filichkin S, Priest HD, Megraw M, Mockler TC** (2015) Alternative splicing in plants: directing traffic at the crossroads of adaptation and environmental stress. *Curr Opin Plant Biol* **24**: 125-135
- Filichkin SA, Mockler TC** (2012) Unproductive alternative splicing and nonsense mRNAs: a widespread phenomenon among plant circadian clock genes. *Biol Direct* **7**: 20
- Filichkin SA, Priest HD, Givan SA, Shen R, Bryant DW, Fox SE, Wong WK, Mockler TC** (2010) Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* **20**: 45-58
- Fincher GB** (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **40**: 305-346
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**: S15-45
- Florencio FJ, Pérez-Pérez ME, Lopez-Maury L, Mata-Cabana A, Lindahl M** (2006) The diversity and complexity of the cyanobacterial thioredoxin systems. *Photosyn Res* **89**: 157-171
- Freeling M, and Walbot V** (1994) Overview of key steps in aleurone development. In: Freeling M, Walbot V, eds *The maize handbook*. New York, USA: Springer-Verlag, 78-80

- Fujita N, Kubo A, Francisco PB, Jr., Nakakita M, Harada K, Minaka N, Nakamura Y** (1999) Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. *Planta* **208**: 283-293
- Gapper C, Dolan L** (2006) Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* **141**: 341-345
- Geigenberger P** (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiol* **155**: 1566-1577
- Geigenberger P, Fernie AR** (2014) Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antioxid Redox Signal* **21**: 1389-1421
- Gelhaye E, Rouhier Na, Jacquot JP** (2004) The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiol Biochem* **42**: 265-271
- Ghosh HP, Preiss J** (1966) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *J Biol Chem* **241**: 4491-4504
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **48**: 909-930
- Glemin S, Bataillon T** (2009) A comparative view of the evolution of grasses under domestication. *New Phytol* **183**: 273-290
- Gómez-Casati DF, Iglesias AA** (2002) ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat endosperm. Purification and characterization of an enzyme with novel regulatory properties. *Planta* **214**: 428-434
- González-Calle V** (2014) Factores transcripcionales de la clase DOF en *Brachypodium distachyon*: caracterización molecular de BdDOF24 durante la germinación de las semillas. Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid
- Graeff M, Wenkel S** (2012) Regulation of protein function by interfering protein species. *Biomol Concepts* **3**: 71-78
- Grant JJ, Loake GJ** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* **124**: 21-29
- Gray KA, Zhao L, Emptage M** (2006) Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol* **10**: 141-146
- Guillon F, Bouchet B, Jamme F, Robert P, Quemener B, Barron C, Larre C, Dumas P, Saulnier L** (2011) *Brachypodium distachyon* grain: characterization of endosperm cell walls. *J Exp Bot* **62**: 1001-1015

- Guillon F, Larre C, Petipas F, Berger A, Moussawi J, Rogniaux H, Santoni A, Saulnier L, Jamme F, Miquel M, Lepiniec L, Dubreucq B** (2012) A comprehensive overview of grain development in *Brachypodium distachyon* variety Bd21. *J Exp Bot* **63**: 739-755
- Guo H, Zhang H, Li Y, Ren J, Wang X, Niu H, Yin J** (2011) Identification of changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds proteome in response to anti-trx s gene. *PLoS One* **6**: e22255
- Ha-il Jung, Sheena R. Gayomba, Yan J, Vatamaniuk OK** (2014) *Brachypodium distachyon* as a model system for studies of copper transport in cereal crops. *Front Plant Sci* **5**
- Hagglund P, Finnie C, Yano H, Shahpiri A, Buchanan BB, Henriksen A, Svensson B** (2016) Seed thioredoxin *h*. *Biochim Biophys Acta* **8**: 974-782
- Hamabata A, Garcia-Maya M, Romero T, Bernal-Lugo I** (1988) Kinetics of the acidification capacity of aleurone layer and its effect upon solubilization of reserve substances from starchy endosperm of wheat. *Plant Physiol* **86**: 643-644
- Hannah LC, James M** (2008) The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Curr Opin Biotechnol* **19**: 160-165
- Hardy DJ, Payne JW** (1991) Analysis of the peptide carrier in the scutellum of barley embryos by photoaffinity labelling. *Planta* **186**: 44-51
- Higgins JA, Bailey PC, and Laurie DA** (2010) Comparative genomics of flowering time pathways using *Brachypodium distachyon* as a model for the temperate. *PLoS One* **5**: e10065
- Hirose T, Terao aT** (2004) A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **220**: 9-16
- Hoecker U, Vasil IK, McCarty DR** (1999) Signaling from the embryo conditions Vp1-mediated repression of alpha-amylase genes in the aleurone of developing maize seeds. *Plant J* **19**: 371-377
- Jacob C, Knight I, Winyard PG** (2006) Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem* **387**: 1385-1397
- Jacobsen JV, Varner JE** (1967) Gibberellic Acid-induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. *Plant Physiol* **42**: 1596-1600
- Jeon JS, Ryoo N, Hahn TR, Walia H, Nakamura Y** (2010) Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol Biochem* **48**: 383-392

- Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D** (2005) Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol* **138**: 790-802
- Johnson PE, Patron NJ, Bottrill AR, Dinges JR, Fahy BF, Parker ML, Waite DN, K. aD** (2003) A low-starch barley mutant, Risø 16, lacking the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoforms and the identity of the plastidial small subunit. *Plant Physiol* **131**: 684–696
- Jones RL** (1969) The fine structure of barley aleurone cells. *Planta* **85**: 359-375
- Joo JH, Bae YS, Lee JS** (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* **126**: 1055-1060
- Jung KH, An G, Ronald PC** (2008) Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. *Nat Rev Genet* **9**: 91-101
- Kang G, Liu G, Peng X, Wei L, Wang C, Zhu Y, Ma Y, Jiang Y, Guo T** (2013) Increasing the starch content and grain weight of common wheat by overexpression of the cytosolic AGPase large subunit gene. *Plant Physiol Biochem* **73**: 93-98
- Karkonen A, Kuchitsu K** (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* **112**: 22-32
- Kawano T** (2003) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep* **21**: 829-837
- Kegui C, and Yong-Qiang CA** (2006) Transcriptional responses to gibberellin and abscisic acid in barley aleurone. *J Integr Plant Biol* **48** 591–612
- Kirchsteiger K, Ferrández J, Pascual MB, González M, Cejudo FJ** (2012) NADPH thioredoxin reductase C is localized in plastids of photosynthetic and nonphotosynthetic tissues and is involved in lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 1534-1548
- Kirchsteiger K, Pulido P, González M, Cejudo FJ** (2009) NADPH Thioredoxin reductase C controls the redox status of chloroplast 2-Cys peroxiredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **2**: 298-307
- Kobrehel K, Wong JH, Balogh A, Kiss F, Yee BCa, Buchanan BB** (1992) Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin *h*. *Plant Physiol*. **99**: 919-924
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Larre C, Penninck S, Bouchet B, Lollier V, Tranquet O, Denery-Papini S, Guillon F, Rogniaux H** (2010) *Brachypodium distachyon* grain: identification and subcellular localization of storage proteins. *J Exp Bot* **61**: 1771-1783
- Laudencia-Chingcuanco DL, Vensel WH** (2008) Globulins are the main seed storage proteins in *Brachypodium distachyon*. *Theor Appl Genet* **117**: 555-563
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, Drews GN, Fischer RL, Okamoto JK, Harada JJ, Goldberg RB** (2010) Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 8063-8070
- Lee A, Lee SS, Jung WY, Park HJ, Lim BR, Kim HS, Ahn JC, Cho HS** (2016) The *OsCYP19-4* gene is expressed as multiple alternatively spliced transcripts encoding isoforms with distinct cellular localizations and PPLase activities under cold stress. *Int Journal Mol Sci* **17**:1154
- Lee SK, Hwang SK, Han M, Eom JS, Kang HG, Han Y, Choi SB, Cho MH, Bhoo SH, An G, Hahn TR, Okita TW, Jeon JS** (2007) Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Mol Biol* **65**: 531-546
- Lepisto A, Kangasjarvi S, Luomala EM, Brader G, Sipari N, Keranen M, Keinanen M, Rintamaki E** (2009) Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**: 1261-1276
- Lepisto A, Pakula E, Toivola J, Krieger-Liszkay A, Vignols F, Rintamaki E** (2013) Deletion of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase results in inability to regulate starch synthesis and causes stunted growth under short-day photoperiods. *J Exp Bot* **64**: 3843-3854
- Leviatan N, Alkan N, Leshkowitz D, Fluhr R** (2013) Genome-wide survey of cold stress regulated alternative splicing in *Arabidopsis thaliana* with tiling microarray. *PLoS One* **8**: e66511
- Li QF, Zhang GY, Dong ZW, Yu HX, Gu MH, Sun SS, Liu QQ** (2009) Characterization of expression of the *OsPUL* gene encoding a pullulanase-type debranching enzyme during seed development and germination in rice. *Plant Physiol Biochem* **47**: 351-358

- Li YC, Ren JP, Cho MJ, Zhou SM, Kim YB, Guo HX, Wong JH, Niu HB, Kim HK, Morigasaki S, Lemaux PG, Frick OL, Yin J, Buchanan BB** (2009) The level of expression of thioredoxin is linked to fundamental properties and applications of wheat seeds. *Mol Plant* **2**: 430-441
- Liszkay A, E. VdZ, and Schopfer P** (2004) Production of reactive oxygen intermediates $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , and $\bullet OH$ by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* **136**: 3114-3123
- Lopes MAa, Larkins BA** (1993) Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* **5**: 1383-1399
- Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible WR** (2000) Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* **123**: 795-805
- Luo N, Liu J, Yu X, and Jiang Y** (2011) Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiol Plant*. **141**: 19-29.
- Márquez Y, Brown JW, Simpson C, Barta A, Kalyna M** (2012) Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Res* **22**: 1184-1195
- Mary L. Parker, Annie Ng, Waldron aKW** (2005) The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *J Sci Food Agr* **85**: 2539–2547
- Mastrangelo AM, Marone D, Laido G, De Leonardis AM, De Vita P** (2012) Alternative splicing: enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity. *Plant Sci* **185-186**: 40-49
- Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB** (2010) A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 3900-3905
- Meyer Y, Reichheld JP, Vignols F** (2005) Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynth Res* **86**: 419-433
- Meyer Y, Vignols Fa, Reichheld JP** (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol* **347**: 394-402
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P** (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 9908-9913

- Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, Francia F, Danon A, Marchand CH, Fermani S, Trost P, Lemaire SD** (2013) Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci* **4**: 470
- Mikola L, Mikola J** (1980) Mobilization of proline in the starchy endosperm of germinating barley grain. *Planta* **149**: 149-154
- Min XJ, Powell B, Braessler J, Meinken J, Yu F, Sablok G** (2015) Genome-wide cataloging and analysis of alternatively spliced genes in cereal crops. *BMC Genomics* **16**: 721
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490-498
- Miura K, Ohta M, Nakazawa M, Ono M, Hasegawa PM** (2011) ICE1 Ser403 is necessary for protein stabilization and regulation of cold signaling and tolerance. *Plant J* **67**: 269-279
- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB** (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J Proteomics* **72**: 452-474
- Moon JC, Jang HH, Chae HB, Lee JR, Lee SY, Jung YJ, Shin MR, Lim HS, Chung WS, Yun DJ, Lee KO** (2006) The C-type Arabidopsis thioredoxin reductase ANTR-C acts as an electron donor to 2-Cys peroxiredoxins in chloroplasts. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 478-484
- Moreno-Risueno MA, Diaz I, Carrillo L, Fuentes R, Carbonero P** (2007) The HvDOF19 transcription factor mediates the abscisic acid-dependent repression of hydrolase genes in germinating barley aleurone. *Plant J* **51**: 352-365
- Muller-Rober BT, Kossmann J, Hannah LC, Willmitzer L, Sonnewald U** (1990) One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Mol Gen Genet* **224**: 136-146
- Mur LA, Allainguillaume J, Catalan P, Hasterok R, Jenkins G, Lesniewska K, Thomas I, Vogel J** (2011) Exploiting the Brachypodium Tool Box in cereal and grass research. *New Phytol* **191**: 334-347
- Murray F, Brettell R, Matthews P, Bishop D, Jacobsen J** (2004) Comparison of Agrobacterium-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Rep* **22**: 397-402
- Mustacich D, and Powis G** (2000) Thioredoxin reductase. *Biochem J* **346**: 1-8

- Nagai YS, Sakulsingharoj C, Edwards GE, Satoh H, Greene TW, Blakeslee B, Okita TW** (2009) Control of starch synthesis in cereals: metabolite analysis of transgenic rice expressing an up-regulated cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds. *Plant Cell Physiol* **50**: 635-643
- Naredo MEB, Juliano AB, Lu BR, De Guzman Fa, T. JM** (1998) Responses to seed dormancy-breaking treatments in rice species (*Oryza* L.). *Seed Sci Technol* **26**: 675-689
- Nielsen TH, Krapp A, Röper-Schwarz U, Stitt M** (1998) The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant, Cell and Environ* **21**: 443-454
- Oelze ML, Kandlbinder A, Dietz KJ** (2008) Redox regulation and overreduction control in the photosynthesizing cell: complexity in redox regulatory networks. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1261-1272
- Olsen OA** (2004) Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16 Suppl**: S214-227
- Opanowicz M, Hands P, Betts D, Parker ML, Toole GA, Mills EN, Doonan JH, Drea S** (2011) Endosperm development in *Brachypodium distachyon*. *J Exp Bot* **62**: 735-748
- Pascual MB, Mata-Cabana A, Florencio FJ, Lindahl M, Cejudo FJ** (2011) A comparative analysis of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system from plants and cyanobacteria. *Plant Physiol* **155**: 1806-1816
- Pascual MB, Mata-Cabana A, Florencio FJ, Lindahl Ma, Cejudo FJ** (2010) Overoxidation of 2-Cys peroxiredoxin in prokaryotes: cyanobacterial 2-Cys peroxiredoxins sensitive to oxidative stress. *J Biol Chem* **285**: 34485-34492
- Patron NJ, Greber B, Fahy BF, Laurie DA, Parker ML, Denyer K** (2004) The lys5 mutations of barley reveal the nature and importance of plastidial ADP-Glc transporters for starch synthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol* **135**: 2088-2097
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734
- Pellinen RI, Korhonen MS, Tauriainen AA, Palva ET, Kangasjarvi J** (2002) Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiol* **130**: 549-560

- Peraldi A, Beccari G, Steed A, Nicholson P** (2011) *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study *Fusarium* head blight and other *Fusarium* diseases of wheat. *BMC Plant Biol* **11**: 100
- Pérez-Ruiz JM** (2006) Identificación y caracterización de un nuevo tipo de tiorredoxina reductasa de plantas. Sevilla, Sevilla
- Pérez-Ruiz JM, Spínola M, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo F** (2006) Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* **18**: 2356-2368
- Pérez-Ruiz JM, Cejudo FJ** (2009) A proposed reaction mechanism for rice NADPH thioredoxin reductase C, an enzyme with protein disulfide reductase activity. *FEBS Lett* **583**: 1399-1402
- Pérez-Ruiz JM, Guinea M, Puerto-Galán L, Cejudo FJ** (2014) NADPH thioredoxin reductase C is involved in redox regulation of the Mg-chelatase I subunit in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol Plant* **7**: 1252-1255
- Pérez-Ruiz JM, Guinea M, Puerto-Galán L, Cejudo FJ** (2014) NADPH thioredoxin reductase C is involved in redox regulation of the Mg-chelatase I subunit in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol Plant* **7**: 1252-1255
- Pfister B, Zeeman SC** (2016) Formation of starch in plant cells. *Cell Mol Life Sci* **73**: 2781-2807
- Pulido P, Cazalis R, Cejudo FJ** (2009) An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. *Plant J* **57**: 132-145
- Pulido P, Spinola MC, Kirchsteiger K, Guinea M, Pascual MB, Sahrawy M, Sandalio LM, Dietz KJ, González M, Cejudo FJ** (2010) Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *J Exp Bot* **61**: 4043-4054
- Real A, Comino I, de Lorenzo L, Merchán F, Gil-Humanes J, Giménez MJ, López-Casado MA, Torres MI, Cebolla A, Sousa C, Barro F, Pistón F** (2012) Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for celiac disease. *PLoS One* **7**: e48365
- Reddy AS** (2007) Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 267-294
- Reichheld J, Mestres-Ortega D, Laloí Ca, Y. M** (2002) The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiol Biochem* **40**: 685–690

- Reichheld J, Meyer E, Khafif M, Bonnard G, and, Y. M** (2005) AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. **17**: 337-342
- Richter AS, Peter E, Rothbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamaki E, Grimm B** (2013) Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. Plant Physiol **162**: 63-73
- Richter AS, Peter E, Rothbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamaki E, Grimm B** (2013) Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. Plant Physiol **162**: 63-73
- Rouhier N, Cerveau D, Couturier J, Reichheld J-P, and Rey P** (2015) Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. Biochim Biophys Acta **1850** 1479–1496
- Routledge AP, Shelley G, Smith JV, Talbot NJ, Draper J, Mur LA** (2004) *Magnaporthe grisea* interactions with the model grass *Brachypodium distachyon* closely resemble those with rice (*Oryza sativa*). Mol Plant Pathol **5**: 253-265
- Sabelli PA, Larkins BA** (2009) The development of endosperm in grasses. Plant Physiol **149**: 14-26
- Sambrook J, Fritsch. EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Ed 2nd edition New York
- Santandrea G, Guo Y, O'Connell T, Thompson RD** (2002) Post-phloem protein trafficking in the maize caryopsis: zmTRXh1, a thioredoxin specifically expressed in the pedicel parenchyma of *Zea mays* L., is found predominantly in the placentochalaza. Plant Mol Biol **50**: 743-756
- Saripalli G, Gupta PK** (2015) AGPase: its role in crop productivity with emphasis on heat tolerance in cereals. Theor Appl Genet **128**: 1893-1916
- Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahy G, A. aW** (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. Planta **214**: 821-828
- Schurmann P, Buchanan BB** (2008) The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. Antioxid Redox Signal **10**: 1235-1274
- Schurmann P, Jacquot JP** (2000) Plant Thioredoxin Systems Revisited. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **51**: 371-400
- Seo PJ, Park MJ, Park CM** (2013) Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: mechanisms and functions. Planta **237**: 1415-1424

- Serrato A, Crespo J, Florencio F, Cejudo F** (2001) Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Mol Biol.* **46**: 361-371
- Serrato AJ, Cejudo FJ** (2003) Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* **217**: 392-399
- Serrato AJ, Pérez-Ruiz JM, Spinola MC, Cejudo FJ** (2004) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 43821-43827
- Shan Q, Wang Y, Chen K, Liang Z, Li J, Zhang Y, Zhang K, Liu J, Voytas DF, Zheng X, Gao C** (2013) Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol Plant* **6**: 1365-1368
- Sharma P, Bhushan Jha A, Shanker Dubey Ra, Pessaraki M** (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot* **2012**
- Shewry PR, Halford NG** (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot* **53**: 947-958
- Shewry PR, Napier JA, Tatham AS** (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 945-956
- Smith-White BJ, Preiss J** (1992) Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J Mol Evol* **34**: 449-464
- Sokolov LN, Dejardin A, Kleczkowski LA** (1998) Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem J* **336 (Pt 3)**: 681-687
- Sopanen T, Uuskallio M, Nyman S** (1980) Characteristics and development of leucine transport activity in the scutellum of germinating barley grain. *Plant Physiol* **65**: 249-253
- Spinola M, Pérez-Ruiz JM, Pulido P, Kirchsteiger K, Guinea M, González M, Cejudo F** (2008) NTRC new ways of using NADPH in the chloroplast. *Physiol Plant* **133**: 516-524
- Staiger D, Brown JW** (2013) Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *The Plant cell* **25**: 3640-3656
- Stenbaek A, Hansson A, Wulff RP, Hansson M, Dietz KJ, Jensen PE** (2008) NADPH-dependent thioredoxin reductase and 2-Cys peroxiredoxins are needed for the protection of Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase. *FEBS Lett* **582**: 2773-2778

- Stitt M, Zeeman SC** (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 282–292
- Streb S, Egli B, Eicke S, Zeeman SC** (2009) The debate on the pathway of starch synthesis: a closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localized pathway. *Plant Physiol.* **151**: 1769–1772.
- Syed NH, Kalyna M, Marquez Y, Barta A, Brown JW** (2012) Alternative splicing in plants-coming of age. *Trends Plant Sci* **17**: 616-623
- Tanackovic V, Svensson JT, Jensen SL, Buleon A, Blennow A** (2014) The deposition and characterization of starch in *Brachypodium distachyon*. *J Exp Bot* **65**: 5179-5192
- Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ** (2004) Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* **55**: 2131-2145
- Thormahlen I, Ruber J, von Roepenack-Lahaye E, Ehrlich SM, Massot V, Hummer C, Tezycka J, Issakidis-Bourguet E, Geigenberger P** (2013) Inactivation of thioredoxin *f1* leads to decreased light activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and altered diurnal starch turnover in leaves of *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Environ* **36**: 16-29
- Tiessen A, Hendriks JH, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farré E, and Geigenberger P** (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* **14**: 2191-2213
- Tiessen A, Nerlich A, Faix B, Hümmer C, Fox S, Trafford K, Weber H, Weschke W, and Geigenberger P** (2011) Subcellular analysis of starch metabolism in developing barley seeds using a non-aqueous fractionation method. *J Expl Bot* **63**: 2071-2087
- Toivola J, Nikkanen L, Dahlström KM, Salminen TA, Lepistö A, Vignols F, and Rintamäki E** (2013) Over expression of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in *Arabidopsis* enhances leaf growth and elucidates in vivo function of reductase and thioredoxin domains. *Front Plant Sci* **4**: 389
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354
- Trafford K, Haleux P, Henderson M, Parker M, Shirley NJ, Tucker MR, Fincher GB, Burton RA** (2013) Grain development in *Brachypodium* and other grasses: possible interactions between cell expansion, starch deposition, and cell-wall synthesis. *J Exp Bot* **64**: 5033-5047

- Tuncel A, Cakir B, Hwang SK, Okita TW** (2014) The role of the large subunit in redox regulation of the rice endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase. *FEBS J* **281**: 4951-4963
- Tuncel A, Okita TW** (2013) Improving starch yield in cereals by over-expression of ADPglucose pyrophosphorylase: expectations and unanticipated outcomes. *Plant Sci* **211**: 52-60
- Tyler L, Fangel JU, Fagerstrom AD, Steinwand MA, Raab TK, Willats WG, Vogel JP** (2014) Selection and phenotypic characterization of a core collection of *Brachypodium distachyon* inbred lines. *BMC Plant Biol* **14**: 25
- Vain P, Worland B, Thole V, McKenzie N, Alves SC, Opanowicz M, Fish LJ, Bevan MW, Snape JW** (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnol J* **6**: 236-245
- Verelst W, Bertolini E, De Bodt S, Vandepoele K, Demeulenaere M, Pe ME, Inze D** (2013) Molecular and physiological analysis of growth-limiting drought stress in *Brachypodium distachyon* leaves. *Mol Plant* **6**: 311-322
- Vicente-Carbajosa J, Carbonero P** (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *Int J Dev Biol* **49**: 645-651
- Vogel J, Hill T** (2008) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* **27**: 471-478
- Vogel JP, Garvin DF, Leong OMa, Hayden DM** (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tissue and Org Cult* **84**: 199–211
- Walters B, Lum G, Sablok G, Min XJ** (2013) Genome-wide landscape of alternative splicing events in *Brachypodium distachyon*. *DNA Res* **20**: 163-171
- Wang K, Han X, Dong K, Gao L, Li H, Mac W, Yan Ya, Ye Y** (2010) Characterization of seed proteome in *Brachypodium distachyon*. *J Cereal Sci* **52** 177-186
- Wang M, Heimovaara-Dijkstra Sa, Van Duijn B** (1995) Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta* **195**: 586-592
- Wieser H** (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* **24** 115–119
- Wong JH, Balmer Y, Cai N, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB** (2003) Unraveling thioredoxin-linked metabolic processes of cereal starchy endosperm using proteomics. *FEBS Lett* **547**: 151-156

- Wong JH, Cai N, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB (2004)** Thioredoxin reduction alters the solubility of proteins of wheat starchy endosperm: an early event in cereal germination. *Plant Cell Physiol* **45**: 407-415
- Wong JH, Kim YB, Ren PH, Cai N, Cho MJ, Hedden P, Lemaux PG, Buchanan BB (2002)** Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16325-16330
- Xu W, Li R, Zhang N, Ma F, Jiao Y, Wang Z (2014)** Transcriptome profiling of *Vitis amurensis*, an extremely cold-tolerant Chinese wild *Vitis* species, reveals candidate genes and events that potentially connected to cold stress. *Plant Mol Biol* **86**: 527-541
- Yano H, Wong JH, Cho MJ, Buchanan BB (2001)** Redox changes accompanying the degradation of seed storage proteins in germinating rice. *Plant Cell Physiol* **42**: 879-883
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM (2010)** Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 209-234
- Zhang C, Zhao B, Ge W, Zhang Y, Song Y, Sun D, Y. aG (2011)** An apoplastic *h*-type thioredoxin is involved in the stress response through regulation of the apoplastic reactive oxygen species in rice. *Plant Physiol* **157**
- Zhang F, Zhu G, Du L, Shang X, Cheng C, Yang B, Hu Y, Cai C, Guo W (2016)** Genetic regulation of salt stress tolerance revealed by RNA-Seq in cotton diploid wild species, *Gossypium davidsonii*. *Scie Rep* **6**: 20582
- Zheng Y, Wang Z (2015)** The cereal starch endosperm development and its relationship with other endosperm tissues and embryo. *Protoplasma* **252**: 33-40

ANEXO I

| | |
|------------------------|---|
| <i>BdNTRC</i> _semilla | ATGGCGGTACGCGCCTCGCCGTGGCCGCCGCCCTCGCGTCGGCCCCGCCCTCCTCCTCC |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | ATGGCGGTACGCGCCTCGCCGTGGCCGCCGCCCTCCTCGTCGGCCCCGCCCTCCTCCTCC |
| <i>BdNTRC</i> _db | ATGGCGGTACGCGCCTCGCCGTGGCCGCCGCCCTCCTCGTCGGCCCCGCCCTCCTCCTCC ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | TCTTCTCCTCTTCTCCTCCCGCAGCCGCCGGGTCTCCTTCCCTTCTCGCCGCCCTCCTCCC |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | TCTTCTCCTCTTCTCCTCCCGCAGCCGCCGGGTCTCCTTCCCTTCTCGCCGCCCTCCTCCC |
| <i>BdNTRC</i> _db | TCTTCTCCTCTTCTCCTCCCGCAGCCGCCGGGTCTCCTTCCCTTCTCGCCGCCCTCCTCCC ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | GCCGCTCCTGCTCCCGCCTCCAAGCCCTACACGCCACAGCCGCCGCCCGCTCGTC |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | GCCGCTCCTGCTCCCGCCTCCAAGCCCTACACGCCACAGCCGCCGCCCGCTCGTC |
| <i>BdNTRC</i> _db | GCCGCTCCTGCTCCCGCCTCCAAGCCCTACACGCCACAGCCGCCGCCCGCTCGTC ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | GACGAGGAAGCCCGCCTCCCTCCCCCTCAGACGTCGGCAGGGGAGTGGAGAACCTG |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | GACGAGGAAGCCCGCCTCCCTCCCCCTCAGACGTCGGCAGGGGAGTGGAGAACCTG |
| <i>BdNTRC</i> _db | GACGAGGAAGCCCGCCTCCCTCCCCCTCAGACGTCGGCAGGGGAGTGGAGAACCTG ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | GTGATCATCGGCTCGGGCCCGCGGGGTACACGGCGGCATCTACGCCGCGCGGGCGAAC |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | GTGATCATCGGCTCGGGCCCGCGGGGTACACGGCGGCATCTACGCCGCGCGGGCGAAC |
| <i>BdNTRC</i> _db | GTGATCATCGGCTCGGGCCCGCGGGGTACACGGCGGCATCTACGCCGCGCGGGCGAAC ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | CTCAAGCCCGTGGTCTTCAAGGGTACCAGGTAGGCGGTGTCCCGGGAGGGCAGCTCATG |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | CTCAAGCCCGTGGTCTTCAAGGGTACCAGGTAGGCGGTGTCCCGGGAGGGCAGCTCATG |
| <i>BdNTRC</i> _db | CTCAAGCCCGTGGTCTTCAAGGGTACCAGGTAGGCGGTGTCCCGGGAGGGCAGCTCATG ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | ACCACCACCGAGGTCGAGAACTTCCCGGCTTCCCGACGGCATCACCGGGCCCGATCTC |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | ACCACCACCGAGGTCGAGAACTTCCCGGCTTCCCGACGGCATCACCGGGCCCGATCTC |
| <i>BdNTRC</i> _db | ACCACCACCGAGGTCGAGAACTTCCCGGCTTCCCGACGGCATCACCGGGCCCGATCTC ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | ATGGACAAAATGCGGAAGCAGCGGAGCGGTGGGGTGGGAGCTTACCAGGAGGATGTG |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | ATGGACAAAATGCGGAAGCAGCGGAGCGGTGGGGTGGGAGCTTACCAGGAGGATGTG |
| <i>BdNTRC</i> _db | ATGGACAAAATGCGGAAGCAGCGGAGCGGTGGGGTGGGAGCTTACCAGGAGGATGTG ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | GAGCTTGTGGATGTTAAGAGCAGACCGTTTGTATCCGTAGCAGTGACCGTGAGGTA |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | GAGCTTGTGGATGTTAAGAGCAGACCGTTTGTATCCGTAGCAGTGACCGTGAGGTA |
| <i>BdNTRC</i> _db | GAGCTTGTGGATGTTAAGAGCAGACCGTTTGTATCCGTAGCAGTGACCGTGAGGTA ** ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | TGCCACAGCATAATTATTGCAACCGGAGCTACTGCTAAGCGCTCCGGTTACCTCGTGAA |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | TGCCACAGCATAATTATTGCAACCGGAGCTACTGCTAAGCGCTCCGGTTACCTCGTGAA |
| <i>BdNTRC</i> _db | TGCCACAGCATAATTATTGCAACCGGAGCTACTGCTAAGCGCTCCGGTTACCTCGTGAA ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | GAAGAATTTGGAGTAGAGGTATCAGCGCATGCGCAATATGTGATGGAGCATCACCGCTG |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | GAAGAATTTGGAGTAGAGGTATCAGCGCATGCGCAATATGTGATGGAGCATCACCGCTG |
| <i>BdNTRC</i> _db | GAAGAATTTGGAGTAGAGGTATCAGCGCATGCGCAATATGTGATGGAGCATCACCGCTG ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | TATAAGGGTCAAGTCTTGCAGTCGTCGGGGTGACGATACAGCCACGGAGGAAGCGATA |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | TATAAGGGTCAAGTCTTGCAGTCGTCGGGGTGACGATACAGCCACGGAGGAAGCGATA |
| <i>BdNTRC</i> _db | TATAAGGGTCAAGTCTTGCAGTCGTCGGGGTGACGATACAGCCACGGAGGAAGCGATA ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | TATTTGACAAAATATGCCTGTGATGTTTCACTTACTTGTTCGAAGGGATCAGCTACGAGCA |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | TATTTGACAAAATATGCCTGTGATGTTTCACTTACTTGTTCGAAGGGATCAGCTACGAGCA |
| <i>BdNTRC</i> _db | TATTTGACAAAATATGCCTGTGATGTTTCACTTACTTGTTCGAAGGGATCAGCTACGAGCA ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | TCCAAAGCTATGCAGGATCG GTTCGATTATGGCGAATGCTTCAG AGTACTCAACAACCCCA |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | TCCAAAGCTATGCAGGATCGA-----GTACTCAACAACCCCA |
| <i>BdNTRC</i> _db | TCCAAAGCTATGCAGGATCGA-----GTACTCAACAACCCCA ***** |
| <i>BdNTRC</i> _semilla | ACATAACAGTACATTTCAATACAGAAGCTGTGGATGTTGTGTCAGCAATCCCAAAGGCCAGA |
| <i>BdNTRC</i> _hoja | ACATAACAGTACATTTCAATACAGAAGCTGTGGATGTTGTGTCAGCAATCCCAAAGGCCAGA |
| <i>BdNTRC</i> _db | ACATAACAGTACATTTCAATACAGAAGCTGTGGATGTTGTGTCAGCAATCCCAAAGGCCAGA ***** |

```

BdNTRC_semilla      TGTCGGGTATTCAATTGAGGAGAATCGATACGGGAGAGGAATCGGTTCTTGAAGTAAAG
BdNTRC_hoja         TGTCGGGTATTCAATTGAGGAGAATCGATACGGGAGAGGAATCGGTTCTTGAAGTAAAG
BdNTRC_db           TGTCGGGTATTCAATTGAGGAGAATCGATACGGGAGAGGAATCGGTTCTTGAAGTAAAG
*****

BdNTRC_semilla      GTCTATTTTATGGGATAGGGCATACTCCAAACAGTCAACTTTTACAAGGTCGAATTGAAC
BdNTRC_hoja         GTCTATTTTATGGGATAGGGCATACTCCAAACAGTCAACTTTTACAAGGTCGAATTGAAC
BdNTRC_dbG         GTCTATTTTATGGGATAGGGCATACTCCAAACAGTCAACTTTTACAAGGTCGAATTGAAC
*****

BdNTRC_semilla      TTGATAGTTCTGGATATATTTTGGTTGAGGAAGGCACAGCAAAAACCTTCAGTTGATGGCG
BdNTRC_hoja         TTGATAGTTCTGGATATATTTTGGTTGAGGAAGGCACAGCAAAAACCTTCAGTTGATGGCG
BdNTRC_db           TTGATAGTTCTGGATATATTTTGGTTGAGGAAGGCACAGCAAAAACCTTCAGTTGATGGCG
*****

BdNTRC_semilla      TATTTGCTGCCGGCGATGTGCAGGATCATGAATGGAGGCAAGCCGTTACTGCAGCTGGAT
BdNTRC_hoja         TATTTGCTGCCGGCGATGTGCAGGATCATGAATGGAGGCAAGCCGTTACTGCAGCTGGAT
BdNTRC_db           TATTTGCTGCCGGCGATGTGCAGGATCATGAATGGAGGCAAGCCGTTACTGCAGCTGGAT
*****

BdNTRC_semilla      CTGGATGTATAGCTGCTTTGTCTAGTCGAAAGATACTTAGTCACCAATGATCTTCTTGTGTG
BdNTRC_hoja         CTGGATGTATAGCTGCTTTGTCTAGTCGAAAGATACTTAGTCACCAATGATCTTCTTGTGTG
BdNTRC_db           CTGGATGTATAGCTGCTTTGTCTAGTCGAAAGATACTTAGTCACCAATGATCTTCTTGTGTG
*****

BdNTRC_semilla      AATTTACCAGCCGTTTCGAGAAGAAACAAAGAAAGAGATTACAGGCAAGATGTTGAGA
BdNTRC_hoja         AATTTACCAGCCGTTTCGAGAAGAAACAAAGAAAGAGATTACAGGCAAGATGTTGAGA
BdNTRC_db           AATTTACCAGCCGTTTCGAGAAGAAACAAAGAAAGAGATTACAGGCAAGATGTTGAGA
*****

BdNTRC_semilla      TGGGCTTCGATCTATCTCACACAAAGCACAGGGGGCAGTATGCGCTCCGAAATATATACC
BdNTRC_hoja         TGGGCTTCGATCTATCTCACACAAAGCACAGGGGGCAGTATGCGCTCCGAAATATATACC
BdNTRC_db           TGGGCTTCGATCTATCTCACACAAAGCACAGGGGGCAGTATGCGCTCCGAAATATATACC
*****

BdNTRC semilla     ATGGAAGTCCACGTCTCATTGTGTTCTGTATTCTTCTCCCACGTGTGGTCCCTGCAGAA
BdNTRC_hoja         ATGGAAGTCCACGTCTCATTGTGTTCTGTATTCTTCTCCCACGTGTGGTCCCTGCAGAA
BdNTRC_db           ATGGAAGTCCACGTCTCATTGTGTTCTGTATTCTTCTCCCACGTGTGGTCCCTGCAGAA
*****

BdNTRC semilla     CCTTAAACCAATATTGAACAAGGTTATAGATGAGTATGACAAACACGTTTCATCTTGTGTG
BdNTRC_hoja         CCTTAAACCAATATTGAACAAGGTTATAGATGAGTATGACAAACACGTTTCATCTTGTGTG
BdNTRC_db           CCTTAAACCAATATTGAACAAGGTTATAGATGAGTATGACAAACACGTTTCATCTTGTGTG
*****

BdNTRC semilla     AAATTGACATCGAGGAGGATCCTGAAATAGCAGAAGCTGCAGGCATCATGGGAACACCGT
BdNTRC_hoja         AAATTGACATCGAGGAGGATCCTGAAATAGCAGAAGCTGCAGGCATCATGGGAACACCGT
BdNTRC_db           AAATTGACATCGAGGAGGATCCTGAAATAGCAGAAGCTGCAGGCATCATGGGAACACCGT
*****

BdNTRC semilla     GTGTTCAATTTTAAAGAACAAGAAATGATCAGGACTTTCTCTGGCGTGAAGATGAAGA
BdNTRC_hoja         GTGTTCAATTTTAAAGAACAAGAAATGATCAGGACTTTCTCTGGCGTGAAGATGAAGA
BdNTRC_db           GTGTTCAATTTTAAAGAACAAGAAATGATCAGGACTTTCTCTGGCGTGAAGATGAAGA
*****

BdNTRC semilla     AGGAATATCGGGAGTTCATCGAATCGAACAAATAG
BdNTRC_hoja         AGGAATATCGGGAGTTCATCGAATCGAACAAATAG
BdNTRC_db           AGGAATATCGGGAGTTCATCGAATCGAACAAATAG
*****

```

Alineamiento de las secuencias de los cDNAs de NTRC de hoja (*BdNTRC_hoja*) y semilla (*BdNTRC_semilla*) con la secuencia proveniente de la base de datos (*BdNTRC_db*). El alineamiento de las secuencias de nucleótidos se realizó mediante el programa *Clustal Omega*.