

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

El papel en el crecimiento de las endo-1,4- β -glucanasas de tipo B y C en *Arabidopsis thaliana*

O rol no crecemento das endo-1,4- β -glucanasas de tipo B e C en *Arabidopsis thaliana*

The role of type B and C endo-1,4- β -glucanases in the development of *Arabidopsis thaliana*



Alejandra Vidal Fernández

Febrero, 2019

ÍNDICE

RESUMEN	1
RESUMO	1
SUMMARY	2
PALABRAS CLAVE	2
KEYWORDS	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 La pared celular primaria	3
1.2 Importancia de la pared celular en el crecimiento	4
1.3. Endoglucanasas vegetales	4
1.3.1 Características y clasificación	4
1.3.2 Endoglucanasas de tipo B y crecimiento	5
1.3.3 Endoglucanasas de tipo C y crecimiento	7
1.4 Técnicas de genética funcional	8
1.4.1 Análisis de líneas promotor-reportero	8
1.4.2 Análisis de líneas mutantes y de sobreexpresión	8
1.5 Experimentos previos	10
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 Origen del material vegetal	12
3.2. Condiciones de crecimiento	12
3.2.1 En sustrato	12
3.2.2 En placa	12
3.3 Extracción del ADN	13
3. 4 Selección de mutantes y líneas de sobreexpresión	13
3. 5 Secuenciación	14
3.5.1 Mediante PCR	14
3.5.2 Mediante clonación	14
3.6 Tinción histoquímica	14
3.7 Fotografía y análisis de imagen	15
3.8 Procesado de los datos y estadística	15
4. RESULTADOS	15
4.1 Líneas promotor-reportero	15
4.1.1 PrGH9B1::GUS	15
4.1.2 PrGH9B2::GUS	16

4.1.3 PrGH9B13::GUS.....	18
4.1.4 PrGH9B7::GUS.....	19
4.1.5 PrGH9B8::GUS.....	20
4.1.6 PrGH9C2::GUS.....	21
4.1.7 PrGH9C3::GUS.....	22
4.2 Caracterización de líneas de sobreexpresión.....	23
4.3 Obtención y caracterización de mutantes.....	25
4.3.1 Mutantes <i>gh9b1 gh9b13</i> y <i>gh9b1 gh9b2 gh9b13</i>	26
4.3.2 Mutantes <i>gh9b7 gh9b8 gh9c2</i> y <i>gh9b7 gh9b8 gh9c2 gh9c3</i>	27
5. DISCUSIÓN.....	29
5.1 Tinción histoquímica.....	29
5.2 Efecto de sobreexpresión y mutantes	31
6. CONCLUSIONES	34
7. BIBLIOGRAFÍA	34
8. ANEXO.....	38

RESUMEN

La pared celular vegetal es una estructura compleja que participa en muchas funciones esenciales para las plantas. Una de ellas es el control del crecimiento celular por parte de la pared primaria. Las enzimas endo-1,4- β -glucanasas actúan sobre diversos polisacáridos de pared y existen evidencias de que podrían ser importantes para el crecimiento vegetal. En este estudio se caracterizaron siete endoglucanasas de *Arabidopsis thaliana* (GH9B1, GH9B2, GH9B7, GH9B8, GH9B13, GH9C2 y GH9C3), escogidas por presentar una alta coexpresión con celulosas de la pared primaria. La expresión del gen reportero GUS unido a sus promotores se asoció a tejidos en desarrollo y zonas de abscisión de órganos. La sobreexpresión de GH9B1 aceleró la floración. Para la sobreexpresión de GH9C2 no se detectó un fenotipo, y lo mismo sucedió con el mutante triple *gh9b1 gh9b2 gh9b13*. Otro mutante triple, *gh9b7 gh9b8 gh9c2*, produjo plantas un poco más pequeñas, fenotipo que se exageró en el mutante cuádruple *gh9b7 gh9b8 gh9c2 gh9c3*. Estos resultados indican que algunas de las endoglucanasas estudiadas podrían tener un papel importante en el desarrollo y que es posible que exista redundancia genética entre GH9C3 y una o varias de las otras enzimas analizadas en el mutante cuádruple.

RESUMO

A parede celular vexetal é unha estrutura complexa que participa en moitas funcións esenciais para as plantas. Unha delas é o control do crecemento celular pola parede primaria. As enzimas endo-1,4-beta-glucanasas actúan sobre diversos polisacáridos de parede, e existen evidencias de que poderían ser importantes para o crecemento vexetal. Neste estudo caracterizáronse sete endoglucanasas de *Arabidopsis thaliana* (GH9B1, GH9B2, GH9B7, GH9B8, GH9B13, GH9C2 y GH9C3), escollidas por presentar unha alta coexpresión con celulosa sintasas da parede primaria. A expresión do xene reporteiro GUS unido aos seus promotores asociouse con tecidos en desenvolvemento e zonas de abscisión. A sobreexpresión de GH9B1 acelerou a floración. Para a sobreexpresión de GH9C2 non se detectou ningún fenotipo, de igual forma que no mutante triplo *gh9b1 gh9b2 gh9b13*. Outro mutante triplo, *gh9b7 gh9b8 gh9c2*, produzo plantas un pouco máis pequenas, fenotipo que se esaxerou no mutante cuádruplo *gh9b7 gh9b8 gh9c2 gh9c3*. Estes resultados indican que varias das endoglucanasas estudiadas poderían xogar roles importantes no desenvolvemento de *Arabidopsis*, e que é probable que exista redundancia xénica entre GH9C3 e algunha ou varias das outras enzimas analizadas no mutante cuádruplo.

SUMMARY

The plant cell wall is a very complex structure that takes part in many essential functions for plants. One of them is the regulation of primary growth. The endo-1,4- β -glucanases have activity against a variety of wall polysaccharides and there is evidence of their importance for plant growth. In this study, seven endoglucanases from *Arabidopsis thaliana* (GH9B1, GH9B2, GH9B7, GH9B8, GH9B13, GH9C2 y GH9C3), chosen because of their high levels of co-expression with cellulose synthases of the primary wall, were characterized. Expression of the reporter gene GUS coupled to their promoters was associated with young, developing tissues and with abscission zones. GH9B1 overexpression accelerated flowering. No phenotype was observed for GH9C2 overexpression nor in the triple mutant *gh9b1 gh9b2 gh9b13*. Another triple mutant, *gh9b7 gh9b8 gh9c2*, produced slightly smaller plants, and this phenotype was augmented in the quadruple mutant *gh9b7 gh9b8 gh9c2 gh9c3*. These results show that some of the studied endoglucanases may play an important role in the development of *Arabidopsis*, and it is likely that genetic redundancy exists between GH9C3 and one or several of the other enzymes analyzed in the quadruple mutant.

PALABRAS CLAVE

Celulasa, endoglucanasa, familia 9 de glicosil hidrolasas, *Arabidopsis*, crecimiento

KEYWORDS

Cellulase, endoglucanase, glycosyl hydrolase family 9, *Arabidopsis*, growth

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La pared celular primaria

Las células vegetales en crecimiento activo, o con capacidad para crecer, están rodeadas por una matriz extracelular especializada denominada pared celular primaria, compuesta por diversos polisacáridos y proteínas. Su componente más característico es la celulosa, cuya estructura básica consiste en repeticiones del dímero celobiosa, constituido a su vez por dos moléculas de glucosa rotadas 180° una con respecto a la otra y unidas por un enlace glucosídico $\beta(1,4)$. De 18 a 36 cadenas así formadas se asocian mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals dando lugar a largas microfibrillas (Keegstra, 2010; Somerville, 2006). En las plantas, estas microfibrillas son sintetizadas por un complejo multiproteico hexamérico en la membrana plasmática, que contiene celulosa sintasas y otras proteínas asociadas (McFarlane *et al.*, 2014). Las microfibrillas están compuestas por celulosa en forma cristalina y no cristalina, la segunda caracterizada por estar menos ordenada y presentar menos puentes de hidrógeno entre cadenas adyacentes. La celulosa cristalina se encuentra mayoritariamente en las regiones internas de las microfibrillas, conteniendo las capas más superficiales un porcentaje variable de celulosa amorfa (Hayashi *et al.*, 1994).

Las microfibrillas están rodeadas por polisacáridos más flexibles y metabólicamente activos, fundamentalmente hemicelulosas y pectinas. En las paredes primarias, la hemicelulosa más abundante es el xiloglucano, y las pectinas más representativas son el homogalacturonano y el ramnogalacturonano I y II (Wolf *et al.*, 2012). La forma en que estos polímeros se organizan junto con la celulosa para constituir una pared funcional todavía no está clara, y no existe un modelo capaz de explicar todas sus propiedades (Brummell, 2006). En general, se considera que el xiloglucano se une a la superficie de las microfibrillas mediante puentes de hidrógeno, conectándolas de forma indirecta, creando una red que constituye el elemento principal de soporte mecánico (Keegstra, 2010). En cuanto a las pectinas, originalmente se consideraba que formaban una matriz aparte rodeando al armazón de celulosa y xiloglucano, pero se ha demostrado su capacidad para unirse a la celulosa *in vitro*, y parece que constituyen también redes de soporte, en paralelo con el xiloglucano (Zykwinska *et al.*, 2005). Recientemente se ha propuesto que pequeñas fracciones de xiloglucano y pectinas podría estar atrapadas en el interior de las microfibrillas; también es posible que el xiloglucano forme uniones covalentes con la celulosa y/o las pectinas (Cosgrove, 2014; Wang *et al.*, 2015).

1.2 Importancia de la pared celular en el crecimiento

La pared celular primaria participa en muchas funciones esenciales, entre las que se encuentran el aporte de estabilidad estructural a tejidos y órganos, la comunicación entre células adyacentes, la interacción con el medio extracelular y la defensa contra patógenos potenciales (Keegstra, 2010). Este trabajo se centra en su relevancia como elemento de control del crecimiento celular. Las células vegetales se originan en pequeños conjuntos de células en división, llamados meristemos, localizados en los puntos de crecimiento de las raíces, tallos y otros órganos. Cuando las células abandonan los meristemos, normalmente pasan por una prolongada fase de crecimiento y/o diferenciación durante la cual el volumen celular aumenta mucho. El crecimiento se alcanza llenando de agua una gran vacuola central y está regulado por la capacidad de la pared para expandirse en respuesta a esta presión de turgencia (Cosgrove, 1993). Las microfibrillas de celulosa son rígidas, por lo que la expansión de la pared requiere una reordenación y/o pérdida de enlaces con los polímeros de matriz que las rodean y mantienen unidas (Cosgrove, 2000).

Los mecanismos mediante los que la pared se relaja para permitir la expansión celular constituyen todavía un problema sin resolver, pero se conocen una serie de moléculas que podrían participar en los cambios estructurales necesarios. Entre ellas están las α -expansinas, cuyo método de acción parece ser debilitar las uniones no covalentes entre polisacáridos, como los puentes de hidrógeno; y las enzimas con actividad hidrolasa sobre dichos polisacáridos, como las xiloglucano endotransglicosilasas/hidrolasas (XTH) o las endoglucanasas (Chebli y Geitmann, 2017; Del Campillo, 1999). Estas últimas, y su efecto sobre el crecimiento, son el objeto de este estudio. En un trabajo reciente se demostró la capacidad de varias endoglucanasas derivadas de hongos, que hidrolizan de forma conjunta xiloglucano y celulosa, para inducir expansión celular (Park y Cosgrove, 2012). La capacidad de las endoglucanasas endógenas de plantas para producir el mismo efecto todavía está por determinar.

1.3. Endoglucanasas vegetales

1.3.1 Características y clasificación

También conocidas como celulasas o EGAsas, este amplio grupo de enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos β (1-4) internos entre dos moléculas de glucosa (Hayashi *et al.*, 2005). En las plantas superiores, todas las celulasas conocidas hasta el momento pertenecen a la familia 9 de glicosil hidrolasas (GH9), caracterizadas por tener una estructura tridimensional compuesta por 6 horquillas helicoidales y poseer actividad sobre diversos polímeros vegetales de pared, mayoritariamente celulosa no cristalina, xiloglucano y glucanos mixtos (Brummell *et al.* 1994;

del Campillo *et al.*, 2012). La función concreta que desempeñan en el desarrollo vegetal es desconocida para la mayoría de los miembros de esta familia, pero existen evidencias de que muchas podrían participar en el control de procesos que requieren relajación de las paredes celulares, como la elongación y diferenciación celular, la diferenciación vascular, la abscisión de órganos o la maduración de la fruta (del Campillo y Bennett, 1996; Lashbrook *et al.*, 1994; Milioni *et al.*, 2002).

La familia GH9 cuenta con 25 miembros en *Arabidopsis thaliana*, el organismo modelo escogido por este estudio. Se trata de una planta dicotiledónea herbácea de la familia Brassicaceae que, a pesar de su escasa importancia económica, es muy valorada como objeto de estudios de laboratorio. Esto se debe a cualidades como su pequeño tamaño, su ciclo de vida corto, su naturaleza autógama, el tamaño reducido de su genoma en el que además escasea el ADN repetitivo y la amplia disponibilidad de recursos biológicos (Meyerowitz, 1987). Además, es un modelo excelente para los estudios de pared celular, ya que sus paredes son similares a las de muchas plantas y árboles de importancia agrícola (Reiter, 1998).

Las enzimas de la familia GH9 se clasifican en 3 subclases estructurales: A, B y C. Las de la subclase A son las más estudiadas. Están codificadas por los genes KORRIGAN y son proteínas ancladas a membrana implicadas en la biosíntesis de celulosa. La subclase B es muy variable, pero en general comprende proteínas de secreción con solo un dominio catalítico. Las que pertenecen a la subclase C poseen, además del mismo dominio catalítico, un característico dominio de unión a celulosa (CBM) en su extremo C-terminal (Urbanowicz *et al.*, 2007a). Los CBM son dominios no catalíticos que facilitan la unión de la enzima al sustrato y potencian su actividad (Urbanowicz *et al.*, 2007b).

En este estudio, se pretende caracterizar desde el punto de vista de la genética funcional, a un grupo de siete endoglucanasas de las clases B y C: GH9B1, GH9B2, GH9B7, GH9B8, GH9B13, GH9C2 y GH9C3. La selección de estas enzimas fue realizada en base a una revisión de los resultados publicados y a su potencial actividad en la pared primaria, debido a su elevado nivel de coexpresión con celulosa sintetasas asociadas a esta, según la base de datos de expresión ATTED-II (Aoki *et al.*, 2015).

1.3.2 Endoglucanasas de tipo B y crecimiento

Las endoglucanasas de clase B mejor estudiadas con respecto a sus efectos sobre el crecimiento son PaPopCel1 y PaPopCel2, procedentes del álamo común (*Populus alba*). El silenciamiento de estas dos enzimas en su planta de origen causa una reducción en el crecimiento de las hojas, que a su vez se relaciona con una disminución de la celulosa en la pared (Ohmiya *et al.*, 2003) En *Arabidopsis thaliana*, la sobreexpresión constitutiva de

PaPopCell da lugar a plantas con rosetas de mayor tamaño, y a cambios en las propiedades mecánicas de la pared celular, en concreto una disminución del xiloglucano unido a las microfibrillas de celulosa. Además, las plantas transgénicas muestran una mayor proporción de celulosa cristalina que las de tipo silvestre (Park *et al.*, 2003).

Además de en *Arabidopsis*, PaPopCell también se ha sobreexpresado en *Albizia chinensis*, una leguminosa arbórea tropical. Los resultados de dicho estudio es que aumentan la longitud y el ancho de los tallos, así como el tamaño de las hojas, que además muestran un color verde más intenso que las hojas de los árboles de tipo silvestre. A su vez, las hojas de las plantas transgénicas contienen menos xiloglucano en sus paredes y se cierran más lentamente durante la puesta de sol (Hartati *et al.*, 2008).

En cuanto a las endoglucanasas de tipo B propias de *Arabidopsis*, varias han sido asociadas con el desarrollo de tejidos concretos, como es el caso de GH9B3, que participa en la iniciación de las raíces laterales, o GH9B4, que facilita la separación de las células de la cofia en el ápice de la raíz (Del Campillo *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2013). Con respecto a las enzimas objeto de estudio de este trabajo, GH9B1 se considera importante para la elongación de la raíz y el tallo en *Arabidopsis* (Shani *et al.*, 1997). Anticuerpos específicos la localizan en las paredes celulares de tejidos jóvenes en crecimiento (Shani *et al.*, 2006). El silenciamiento del gen que codifica para GH9B1 en *Arabidopsis* dio lugar a plantas con tallos y raíces más cortos y débiles que las de tipo silvestre que, además, germinaron y florecieron de 1 a 2 días más tarde (Tsabary *et al.*, 2006). Adicionalmente, existen estudios que relacionan a este gen con las interacciones planta-nematodo, encontrándose actividad de su promotor en las células gigantes que estos parásitos provocan en los huéspedes vegetales (Mitchum *et al.*, 2004; Sukno *et al.*, 2006). La especificidad de sustrato de esta enzima no se ha estudiado, pero su ortólogo en la fresa (FaCel1) es activo tanto frente a celulosa como xiloglucano. En la fresa, esta proteína se expresa exclusivamente en la fruta y se relaciona con el proceso de maduración (Woolley *et al.*, 2001).

GH9B2, por su parte, se expresa en el septum y los primordios de los óvulos de las flores en desarrollo. Además, es ortóloga a TPP18, un gen del tomate que se expresa de forma predominante en los pistilos jóvenes (Yung *et al.*, 1999). Con respecto a su estudio en plantas modificadas genéticamente, se han descrito mutantes de pérdida de función de GH9B2 sin fenotipo visible, pero que afectaron al desarrollo de nematodos. Esta enzima, al igual que GH9B1, también se relaciona con el desarrollo de estos parásitos, mostrando su promotor una alta expresión en los sincitios inducidos por *Heterodera schachtii* en las raíces de las plantas huéspedes. La formación de estos sincitios implica alteraciones importantes de las paredes celulares, como engrosamientos o fusiones con células adyacentes (Wieczorek *et al.* 2008).

GH9B7 se diferencia de las demás en que tiene anclaje GPI y ha sido localizada en la membrana plasmática (Nelson *et al.*, 2006). Esto unido al hecho de que presenta coexpresión con celulosa sintasas abre la posibilidad de que esta enzima participe de algún modo en la síntesis de celulosa, mediante interacciones con los complejos celulosa sintasa localizados en la membrana, según concluye el estudio de Yu *et al.*, (2013). Estos autores estudiaron un ortólogo de GH9B7, la proteína PtrCel9A6 de *Populus trichocarpa*, que también está anclada a membrana y su expresión está restringida al tejido del xilema en diferenciación. Es específica de celulosa, hidrolizando mayoritariamente celulosa amorfa, sin mostrar apenas actividad sobre la celulosa cristalina u otros polisacáridos de pared. El silenciamiento de este gen en su planta de origen redujo el grosor de las paredes secundarias. En contraparte, su sobreexpresión en *Arabidopsis* promovió la expansión y elongación celular en hojas raíces y tejidos vasculares, pero indujo esterilidad masculina al impedir que las anteras se abran y liberen el polen. Dado que la dehiscencia de las anteras requiere un engrosamiento de la pared secundaria mediante la deposición de bandas fibrosas que consisten mayoritariamente en celulosa, se supone que la supresión de este engrosamiento por la mayor actividad endoglucanasa es lo que previene que las anteras se rompan y liberen el polen de forma normal (Yu *et al.*, 2013).

GH9B8 cuenta con un ortólogo en *Eucaliptus globulus* cuya expresión se localiza en el floema de la madera joven (Goulao *et al.*, 2011). En el único estudio con plantas modificadas genéticamente para esta enzima hasta el momento, líneas de sobreexpresión de GH9B8 no presentaron ningún efecto sobre el crecimiento. Sin embargo, la sobreexpresión simultánea de esta enzima con una α - expansina (EXPA-5) aumentó ligeramente la elongación de las raíces por encima del incremento que ya se obtenía sobreexpresando solo la expansina. Los autores proponen que este gen genera efectos sinérgicos con las expansinas en la extensión de la pared celular y que quizás el proceso de relajación de la pared celular necesita de la cooperación estrecha de muchas proteínas diferentes (Xu *et al.*, 2014)

1.3.3 Endoglucanasas de tipo C y crecimiento

Gran parte de la información disponible sobre estas endoglucanasas en relación con el crecimiento procede del estudio de Glass *et al.* (2015). En este se suprimió la actividad de las tres endoglucanasas de tipo C conocidas en *Arabidopsis* (GH9C1, GH9C2 y GH9C3), dando lugar a plantas más altas y con rosetas más grandes, y a una disminución en la cristalinidad de la celulosa en sus paredes celulares. Estos mismos autores estudiaron la sobreexpresión del ortólogo de GH9C2 del álamo en *Arabidopsis*, obteniendo plantas de menor tamaño que las de tipo silvestre y con mayor cristalinidad de la pared celular.

GH9C2 y GH9C3 están codificadas por un par de genes en segmentos de DNA duplicados, por lo que poseen alta identidad de secuencia (del Campillo *et al.*, 2012). A pesar de ello sus patrones de expresión son diferentes. GH9C2 es en Arabidopsis una enzima prevalente en muchos tejidos, pero se encuentra sobretodo en el primer nódulo y segundo internódulo del tallo, en los hipocotilos y en las hojas de la roseta, y su expresión es alta durante el crecimiento activo del xilema. Por su parte GH9C3 se expresa también mayoritariamente en el tallo y los órganos foliares, pero además en el polen (Glass *et al.*, 2015; Honys y Twell, 2003).

Con respecto a la especificidad de sustrato, se ha estudiado en un ortólogo de ambas (OsCel9A) del arroz, que tiene una especificidad bastante amplia con actividad frente a celulosa no cristalina, arabinoxilano y glucanos mixtos, pero no xiloglucano (Yoshida y Komae, 2006).

1.4 Técnicas de genética funcional

1.4.1 Análisis de líneas promotor-reportero

Una forma muy común de analizar la expresión génica en tejidos vegetales es el empleo de genes reporteros que codifiquen para una actividad enzimática que no se encuentre en el organismo que se pretende estudiar, fusionados al promotor del gen de interés. Uno de los genes reporteros más utilizados es el que codifica para la β -glucuronidasa de *E. coli*. Esta enzima, codificada por el locus *uidA*, es una proteína hidrolasa que cataliza la rotura de una amplia variedad de β -glucurónidos, muchos de los cuales están disponibles como sustratos comerciales. Además, muchas plantas, incluyendo Arabidopsis, carecen de actividad glucuronidasa detectable, y los ensayos para esta enzima son sencillos, sensibles y baratos (Jefferson *et al.*, 1987).

1.4.2 Análisis de líneas mutantes y de sobreexpresión

Es posible caracterizar los efectos de la ausencia de una proteína mediante el estudio de mutantes de pérdida de función. Muchos de ellos tienen su origen en la mutagénesis de inserción, que consiste en insertar un fragmento conocido de ADN en el gen de interés. Dicho método tiene la ventaja de que la secuencia insertada sirve como “etiqueta” del gen mutado, facilitando su aislamiento. En Arabidopsis la mutagénesis de inserción se consigue mayoritariamente mediante ADN transferente (T-DNA). Este no posee un sitio diana preferente, por lo que su empleo en mutagénesis genera inserciones aleatorias, pudiendo encontrarse T-DNA en exones, intrones y regiones flanqueantes 5' y 3'. También tiene la ventaja de generar un bajo número de copias, con un número medio de 1.5 insertos

independientes por genoma diploide (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997). *Arabidopsis* cuenta con una gran colección, siempre en crecimiento, de mutantes de inserción. Una importante es la del Instituto Salk de Estudios Biológicos, que cuenta con mutantes para más de 20000 genes, identificables por resistencia a kanamicina y con los eventos de integración localizados en el genoma. Esto se consigue mediante secuenciación de las zonas de unión T-DNA/genoma y alineamiento con la secuencia de los cromosomas de *Arabidopsis* (Alonso *et al.*, 2003).

La reciente tecnología de edición génica CRISPR-Cas es una buena alternativa para obtener mutantes en loci que no cuentan con alelos de inserción de T-DNA en las poblaciones existentes. Es un sistema que se descubrió a partir del estudio de mecanismos de defensa de bacterias contra la invasión de virus o ADN extraño. Las bacterias que contienen este tipo de mecanismos pueden incorporar fragmentos de 20 pbs de ADN extraño a una región del cromosoma bacteriano denominada CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas). Esta región del ADN bacteriano se transcribe y procesa para generar fragmentos de ARN pequeño no codificante (crRNAs) con la ayuda de un ARN transactivador (tracrRNA). Ambos ARNs forman un complejo con la proteína Cas, que contiene dos dominios nucleasa capaces de cortar la doble cadena del ADN. Este complejo es capaz de unirse a una de las hebras del ADN viral o extraño, mediante hibridación de la secuencia complementaria de 20 pbs contenida en el crRNA. La rotura de la doble hebra sucede en un lugar del ADN corriente arriba a un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) compuesto por unos pocos (2-5) nucleótidos (Jiang *et al.*, 2013).

El desarrollo de los RNAs guía únicos (sgRNA), mediante fusión de tracrRNA y crRNA en una única unidad transcripcional, permite dirigir eficazmente a la enzima Cas a cualquier región genómica de interés siempre que esté adyacente a una secuencia PAM (Hyun *et al.*, 2014). La utilidad de este método para la generación de mutantes radica en que las roturas de doble cadena conducen en muchos casos a la aparición de mutaciones en la secuencia diana, como resultado de la actuación del mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ), que suelen consistir en deleciones o inserciones de unos pocos nucleótidos (Jiang *et al.*, 2013).

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que el sistema CRISPR-Cas es totalmente funcional, utilizando transformación con *Agrobacterium tumefaciens* por el método de inmersión floral (Jiang *et al.*, 2014). Se ha comprobado que produce mutaciones en los genes diana, sobre todo indels, y el análisis mediante secuenciación de múltiples líneas transgénicas de *Arabidopsis* no detectó ninguna mutación off-target, indicando que el efecto mutagénico de este sistema es altamente específico en esta planta (Feng *et al.*, 2014).

Una estrategia complementaria a la caracterización de mutantes de pérdida de función es el estudio de líneas en las que la expresión de la proteína es más alta de lo habitual. Esto se consigue mediante el inserto en el genoma de la planta de una o varias copias de los genes de interés unidas a un promotor fuerte, como puede ser el 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) (Fang *et al.*, 1989). También es posible utilizar un promotor específico, en el caso de que interese estudiar la sobreexpresión localizada en un tejido o momento del desarrollo determinado.

1.5 Experimentos previos

El grupo de investigación de Biotecnología de la Universidad de Santiago de Compostela, en el cual se realizó este trabajo de fin de máster, llevó a cabo una serie de experimentos relacionados con estas enzimas cuyos datos aún no fueron publicados. En primer lugar se construyó un árbol filogenético (Fig. 1 del anexo), según los resultados del cual las enzimas se dividieron en dos grupos: por un lado GH9B1, GH9B2 y GH9B13; y por otro GH9B7, GH9B8, GH9C2 y GH9C3. Mutantes de inserción de T-DNA fueron estudiados para todas ellas. A excepción de los de GH9B2, que resultaron ser artefactos, se determinó que ninguno presentó fenotipo a pesar de no producir el RNA correspondiente. Lo mismo sucedió al estudiar mutantes dobles *gh9b1 gh9b13* y triples *gh9b7 gh9b8 gh9c2*. El siguiente paso fue la introducción de mutaciones en GH9B2 en los mutantes dobles *ghb1 ghb13* mediante tecnología CRISPR-Cas, pero las líneas así obtenidas no llegaron a caracterizarse.

También se desarrollaron, como parte de estos experimentos, líneas promotor-reportero para los 7 genes y líneas de sobreexpresión para GH9B1 y GH9C2, bajo el control del promotor de la celulosa sintasa de pared primaria CESA3. La sobreexpresión de GH9B1 produjo líneas con un mayor crecimiento de raíces e hipocótilos cuando las semillas fueron sembradas en medio de cultivo pobre en nutrientes. La sobreexpresión de GH9C2 no dio resultados claros, aunque algunas líneas podrían ser algo menores. En base a estos resultados, se determinaron los objetivos de este trabajo de fin de máster.

2. OBJETIVOS

Estudio del efecto sobre el crecimiento de enzimas endo-1,4- β -glucanasas de la familia GH9, de las clases estructurales B y C, en *Arabidopsis thaliana*, empleando diferentes aproximaciones:

- Determinación de patrones de expresión mediante tinción histoquímica de líneas promotor-reportero para los genes GH9B1, GH9B2, GH9B7, GH9B8, GH9B13, GH9C2 y GH9C3.
- Caracterización del fenotipo de líneas de sobreexpresión de GH9B1 y GH9C2.
- Caracterización del fenotipo de mutantes triples para GH9B1, GH9B2 y GH9B13.
- Obtención y caracterización de mutantes cuádruples para GH9B7, GH9B8, GH9C2 y GH9C3.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen del material vegetal

Los mutantes de inserción de T-DNA para GH9B1 (SALK_147379), GH9B7 (SALK_071693), GH9B13 (SALK_045908), GH9C2 (SALK_063722) y GH9C3 (SALK_059190) pertenecen a la colección del Laboratorio de Análisis Genómico del instituto SALK (Alonso *et al.*, 2003). El mutante para GH9B8 (WiscDsLox377-380F12) procede del Centro Biotecnológico de la Universidad de Wisconsin-Madison (datos no publicados). Los mutantes múltiples fueron obtenidos mediante cruces de los respectivos progenitores y selección de homocigotos entre los descendientes.

Las líneas promotor-reportero y de sobreexpresión fueron obtenidas por el grupo de investigación de biotecnología de la Universidad de Santiago de Compostela. El mismo grupo introdujo las mutaciones en GH9B2 en plantas doble mutantes para GH9B1 y GH9B13, mediante tecnología CRISPR-Cas.

Como control de tipo silvestre para comparación con mutantes y líneas de sobreexpresión se utilizaron plantas de fenotipo Columbia (CS60000).

3.2. Condiciones de crecimiento

3.2.1 En sustrato

Las semillas se sembraron en cestillos contenidos en bandejas de plástico, o bien en macetas individuales, tras haberse mantenido en frío (4°C) por al menos 2 días para activar la germinación. El sustrato de crecimiento consistió en una mezcla de tierra y vermiculita en proporción 1:3. Las bandejas o macetas se mantuvieron en una cámara de crecimiento, simulando días de 16 h (4700 lx, 24°C) y noches de 8 h (oscuridad, 20°C), y se les proporcionó agua a necesidad.

3.2.2 En placa

Las semillas fueron esterilizadas por inmersión en etanol de 70° durante 10 min y a continuación brevemente en etanol puro. Inmediatamente después fueron sembradas con palillos estériles en placas petri con los medios detallados en la tabla 1, solidificados con agar al 1,2%. Estas placas se colocaron en una cámara fría (4°C) por un mínimo de 2 días. Luego se trasladaron a una cámara climática simulando días de 16 h (23°C, 3400 lx) y noches de 8h (18°C, oscuridad), donde se dispusieron en orientación vertical de forma que raíces e hipocotilos puedan crecer sobre la superficie del agar. Las placas para el estudio de hipocótilos

se expusieron a la luz por 6h antes de cubrirse por completo con papel de aluminio para simular el crecimiento en oscuridad.

Tabla 1: Composición de los medios de cultivo empleados para el crecimiento de raíces e hipocotilos en placa. MS se refiere a medio Murashige and Skoog (Duchefa Biochemie) y MES a ácido 2-morfolino etano sulfónico (Sigma-Aldrich).

Descripción	[MS]	[MES]	Suplemento
Estándar	2.2 g/L	0.5 g/L	No
Pobre en nutrientes	0.088 g/L	0.5 g/L	No
Suplementado con sacarosa	2.2 g/L	0.5 g/L	1% de sacarosa

3.3 Extracción del ADN

Hojas jóvenes o plántulas enteras se homogeneizaron brevemente, utilizando puntas de pipeta obturadas, en un tubo Eppendorf de 1,5 mL al que se añadieron 700 µL de buffer de extracción (200 mM de tampón Tris-HCl [pH 8], 250mM de NaCl, 25 mM de EDTA y 0,5% de SDS). Esta mezcla se vorteoó y se centrifugó (1 min a 18000 g). 500 µL del sobrenadante se traspasaron a un nuevo tubo, al que se añadieron 500 µL de isopropanol y se vorteoó de nuevo. Se centrifugó (5 min a 18000 g) y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 µL de etanol 70° y, una vez más, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet de ADN se secó en un SpeedVac (ThermoScientific) y se resuspendió en 30 µL de agua Milli-Q estéril (Élix). Las muestras se conservaron a -20 °C.

En las ocasiones en las que se necesitó una extracción más pura, se empleó el “GeneJET Genomic DNA Purification Kit” (ThermoScientific) según instrucciones de fabricante.

3. 4 Selección de mutantes y líneas de sobreexpresión

Para selección por PCR, se realizaron reacciones a partir de 1 µL de ADN, con la enzima polimerasa “MyTaq Red” (Bioline). Los primers utilizados y los tamaños de sus productos se detallan en la tabla x del Anexo. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en gel de 1% de agarosa en buffer TAE (40mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA), teñido con SYBR Safe (ThermoScientific). Como marcador molecular se usó “GeneRuler 1kb DNA ladder” (ThermoScientific). Los resultados se visualizaron sobre una plataforma de iluminación con luz ultravioleta y se fotografiaron.

Para selección por resistencia antibióticos, semillas esterilizadas se sembraron en placas suplementadas con higromicina y se observó el ratio de supervivencia de las plántulas.

3.5 Secuenciación

3.5.1 Mediante PCR

Los genes fueron amplificados a partir de 1 μ L de ADN en reacciones de PCR con la enzima polimerasa “Phusion Hot Start II” (ThermoScientific). El producto resultante se purificó usando el “GenJet Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit” (ThermoScientific). La concentración final del ADN purificado se cuantificó con un espectrofotómetro “NanoDrop 1000” (ThermoScientific). La secuenciación de este fue llevada a cabo por un laboratorio externo.

3.5.2 Mediante clonación

Productos de reacciones de PCR con la enzima “My Taq Red” (ThermoScientific) fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa. Las bandas de interés fueron extraídas con ayuda de un bisturí estéril y la purificación del ADN se realizó con el “GeneJet Gel Extraction Kit” (ThermoScientific). El ADN se introdujo en el plásmido pCRII-TOPO mediante el “pENTR/D-TOPO Cloning Kit” (ThermoScientific). Células competentes de *Escherichia coli* “ α -Select Silver Competent Cells” (Bioline) se transformaron mediante choque térmico (42°C, 30 s) y se seleccionaron por siembra en medio Luria-Bertani suplementado con kanamicina. Las colonias resistentes se sembraron en tubos de cultivo con el mismo medio, que se incubaron toda la noche a 37°C con agitación (200 rpm). El ADN plasmídico se purificó a partir de los cultivos usando el “GeneJet Plasmid Miniprep Kit” (ThermoScientific). Antes de enviar a secuenciar, se comprobó que los genes se habían insertado correctamente en el plásmido mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI y separación electroforética de los fragmentos resultantes.

3.6 Tinción histoquímica

Se recogieron muestras de plántulas de 14 días, rosetas de 21 días y flores en diferentes estadios del desarrollo, que fueron mantenidas en acetona al 90% en frío (4°C) por un mínimo de media hora. Tras eliminar la acetona, fueron sumergidas en solución de tinción (1 mM de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico [X-gluc], 100 mM de tampón fosfato sódico [pH 7.0], 10 mM de EDTA, 1 mM de ferrocianuro potásico, 1 mM de ferricianuro potásico y 0.1% de Triton X-100) en tubos Eppendorf o viales de vidrio, e incubadas a 37°C

durante toda la noche con agitación suave. La reacción fue parada al día siguiente utilizando etanol al 70%. El material vegetal teñido se conservó en etanol, que fue cambiado al menos una vez. Para la observación de las muestras al microscopio óptico el etanol se sustituyó por ácido láctico con 24h de antelación.

3.7 Fotografía y análisis de imagen

Las tinciones histoquímicas se fotografiaron a la lupa y al microscopio óptico, con aumentos de 5 a 40x. Los diámetros de las rosetas fueron medidos a partir de fotografías tomadas a los 19 días con el programa de análisis de imagen ImageJ. La longitud de raíces e hipocotilos se midió a partir de fotografías tomadas a los 7 y 5 días respectivamente, mediante el mismo programa, utilizando el plug-in SmartRoot.

3.8 Procesado de los datos y estadística

Los valores atípicos en las diferentes medidas se identificaron con el test de Tukey, descartándose aquellos situados a 1,7 veces la distancia intercuartílica. Las diferencias significativas se encontraron comparando medias dos a dos usando la prueba T-Student para muestras independientes, asumiendo varianzas iguales.

4. RESULTADOS

4.1 Líneas promotor-reportero

De entre las líneas promotor-reportero (PrGen::*GUS*) obtenidas por el grupo de investigación para GH9B1, GH9B2, GH9B7, GH9B8, GH9C2 y GH9C3, cuatro representativas fueron seleccionadas y sus descendientes se analizaron en diferentes fases del desarrollo. Para ello, plántulas y rosetas completas crecidas en sustrato (de 14 y 21 días respectivamente), y flores en diferentes grados de madurez fueron recogidas y teñidas.

4.1.1 PrGH9B1::*GUS*

Las plántulas de estas líneas no presentaron tinción en la parte más madura de la raíz (Fig. 1A). En la zona media, el cilindro vascular se tiñó de forma irregular, con puntos de mayor intensidad regularmente espaciados (Fig. 1C). En la parte más joven la tinción vascular desapareció, tiñéndose solo el área del meristemo apical de la raíz (Fig. 1D). En las plántulas, la zona del meristemo apical del tallo y los primordios foliares se tiñó intensamente (Fig. 1A, flecha). En las hojas, la tinción más intensa se encontró en los estomas (Fig. 1E), y también hubo una tinción difusa en el mesófilo, pero no en los haces vasculares. Las hojas se tiñeron

mucho más en fases tempranas del desarrollo y fueron perdiendo color a medida que crecieron. En las rosetas, la tinción en el primer par de hojas ya había desaparecido por completo. Los pares formados por las hojas 3-4 (Fig. 1F), 5-6 (Fig. 1G), 7-8 (Fig. 1H), 9-10 (Fig. 1I) y 11-12 (Fig. 1J) mostraron diferentes patrones característicos.

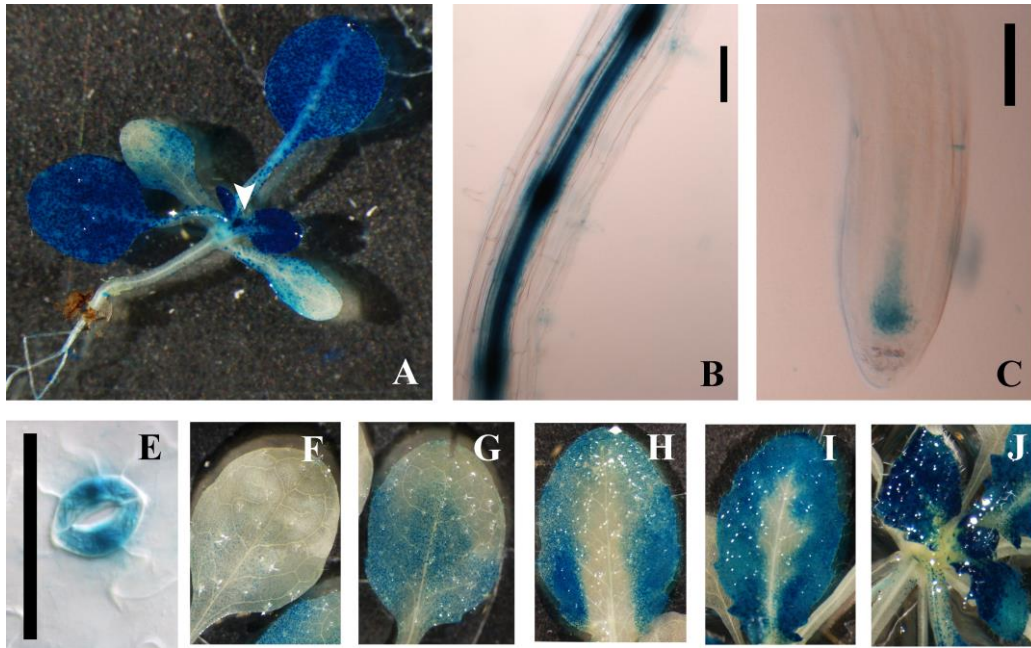


Figura 1. Tinción histoquímica de plántulas y rosetas expresando el gen reportero GUS bajo el promotor de GH9B1 en diferentes tejidos: plántula completa (A); parte media de la raíz (B), parte apical de la raíz (C); estoma (E); hojas n° 4 (F), 6 (G), 8 (H), 10 (I) y 11-12 (J). La flecha blanca señala la zona del meristemo apical del tallo y primordios foliares (A). Barra de escala= 50 μ M.

En las flores, se observó una tinción intensa en la zona de unión al pedicelo (Fig. 2A, flecha), que se hizo más intensa en estadios del desarrollo posteriores. Los estomas se apreciaron claramente teñidos en sépalos, anteras y gineceo (Fig. 2B y C). En el interior del gineceo se tiñó el septum y parte de los óvulos (Fig. 2D). La tinción del septum persistió en las silicuas (Fig. 2E). Finalmente, se tiñó el tallo floral, con puntos más intensos en las axilas (Fig. 2F, flecha).

4.1.2 *PrGH9B2::GUS*

En estas líneas la raíz no se tiñó en absoluto. Tanto en las plántulas como en las rosetas, solo se apreció coloración en la zona del meristemo apical del tallo (Fig. 3A y B). Los botones florales presentaron una tinción muy intensa en las fases más tempranas del desarrollo (Fig. 3C), que se fue atenuando en estadios posteriores (Fig. 3D). El septum y los óvulos aparecieron teñidos en las flores jóvenes (Fig. 3E), pero en las más maduras y en las silicuas la tinción se perdió por completo. El tallo en floración no se tiñó (Fig. 3F).

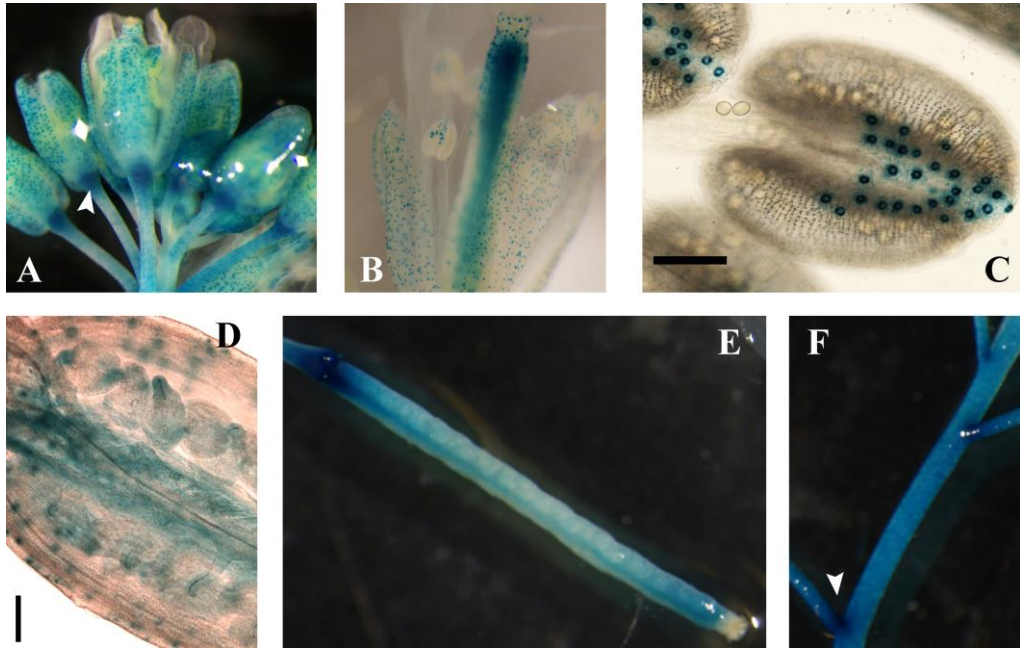


Figura 2. Tinción histoquímica de flores y silicuas de líneas prGH9B1::GUS: ramillete de flores (A); gineceo y estomas teñidos en una flor (B); detalle de estomas en antera(C); interior del gineceo (D); silicua (E) y tallo en floración (F). Las flechas señalan la zona de unión de flores y pedicelo (A) y una axila del tallo (F). Barra de escala=100 μ M.

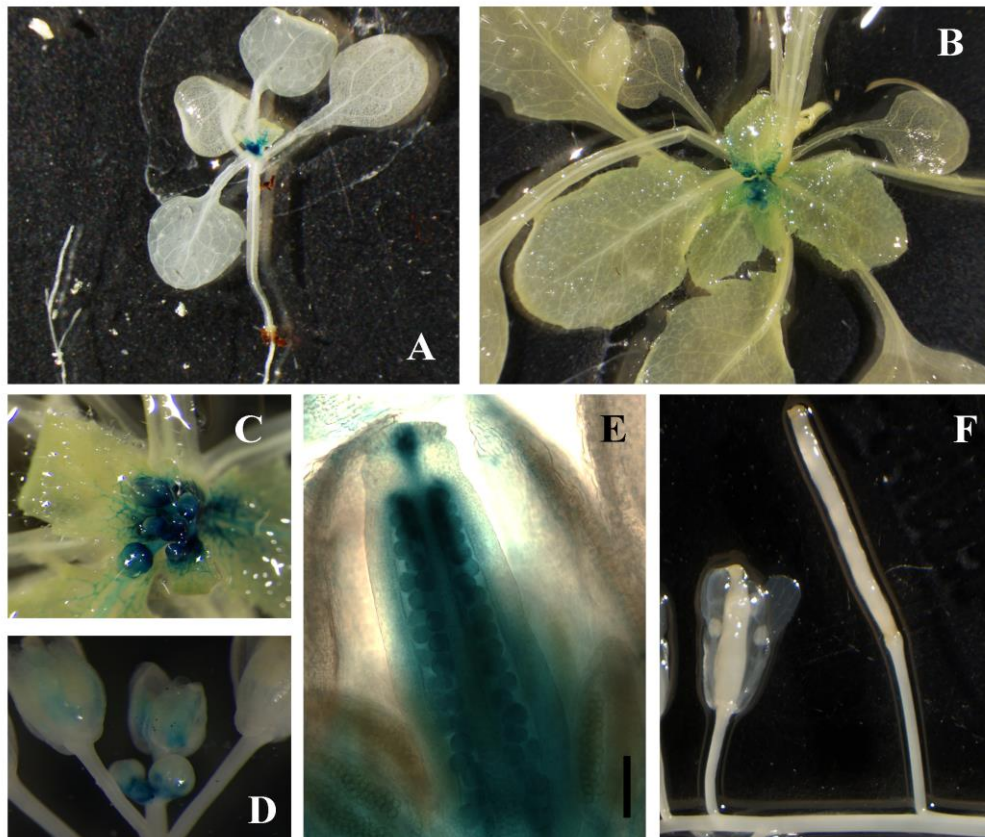


Figura 3. Tinción histoquímica de plántulas, rosetas y flores de expresando el gen reportero GUS bajo el promotor de GH9B2: plántula de 14 días (A); roseta de 21 días (B); primordios florales (C); flores en distintas fases del desarrollo (D); gineceo (E); una flor madura y una silicua (F). Barra de escala=100 μ M.

4.1.3 PrGH9B13::GUS

En las plántulas solo se tiñó el cilindro vascular de la raíz principal (Fig. 4A). No mostraron tinción las raíces laterales (Fig. 4B) ni la zona del meristemo apical de la raíz (Fig. C). En las rosetas, las hojas 1 a 4 no se tiñeron, mientras que el par 5-6 mostró una tinción suave en los hidátodos. El resto de las hojas presentaron la nerviación ligeramente teñida y un color azul intenso en los hidátodos (Fig. 3D). Los botones florales se tiñeron fuertemente, sobre todo en la zona de unión al tallo y pedicelos (Fig. 3D, flechas). En fases del desarrollo posteriores, la tinción se mantuvo en dicha zona de unión y en el interior del gineceo (Fig. 3E). La observación al microscopio mostró el septum teñido (Fig. 3F). El tallo en floración se tiñó de forma uniforme y los pedicelos que parten de él también, pero con un color más suave (Fig. 3G).

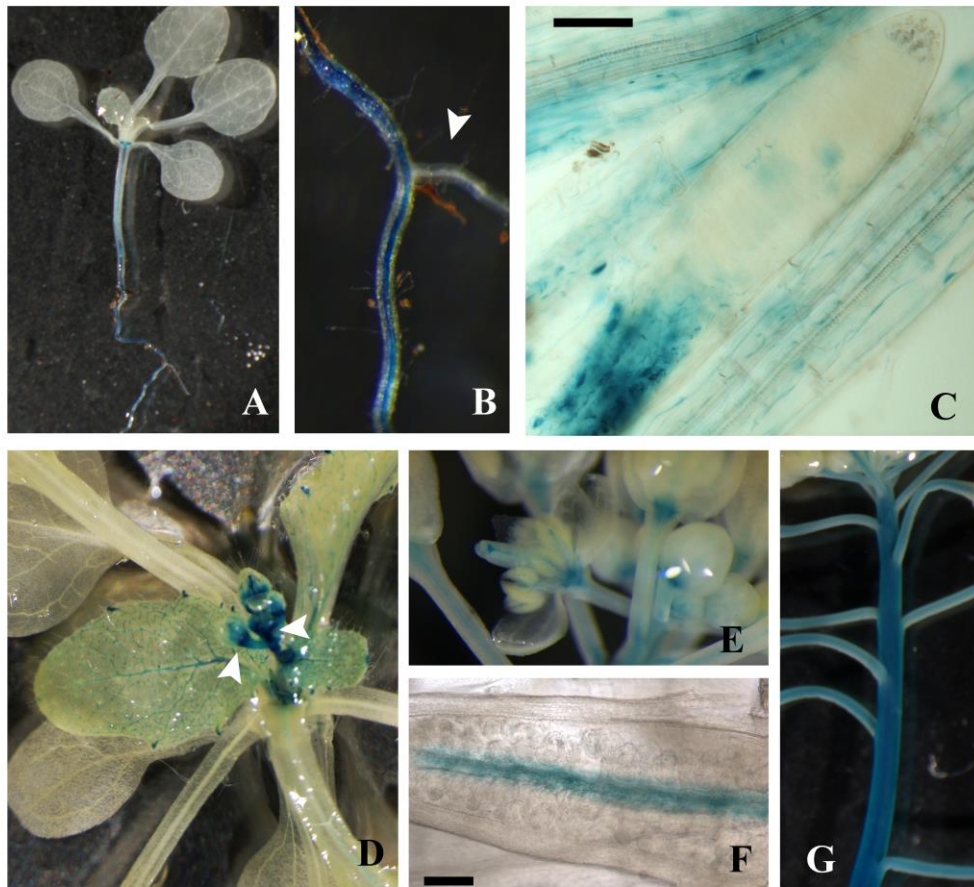


Figura 4. Tinción histoquímica de diferentes tejidos expresando el gen reportero GUS bajo el promotor de GH9B13: plántula de 14 días (A); raíz principal y una lateral (B); zona apical de la raíz (C); roseta y primordios florales (D); base de las flores (E); interior del gineceo (G) y tallo en floración (H). Las flechas señalan una raíz lateral (C) y la zona de unión de los primordios florales al tallo y pedicelos (E). Barra de escala=50µM (D) y 100µM (G).

4.1.4 PrGH9B7::GUS

En estas líneas se tiñó el cilindro vascular de las raíces, tanto en la principal como en las laterales (Fig. 4A). Dicha tinción fue uniforme a excepción de en la parte más joven, donde desapareció a excepción de en la zona del meristemo apical (Fig. 4B y C). La tinción fue intensa en las hojas más jóvenes. Tanto en las plántulas (Fig. 4A) como en las rosetas (Fig. 4E) pudo observarse como la tinción desapareció progresivamente a medida que las hojas crecieron. La expresión más fuerte se concentró en tricomas (Fig. 4E y 4F), peciolo y nervio central, existiendo también una tinción difusa en el mesófilo. En las rosetas, las hojas 1-4 no mostraron tinción (Fig. 4Ga). En el par 5-6 se tiñeron los tricomas, pero no en la parte central (Fig 4Gb). Las demás hojas presentaron todas un aspecto muy similar (Fig. 4Gc).

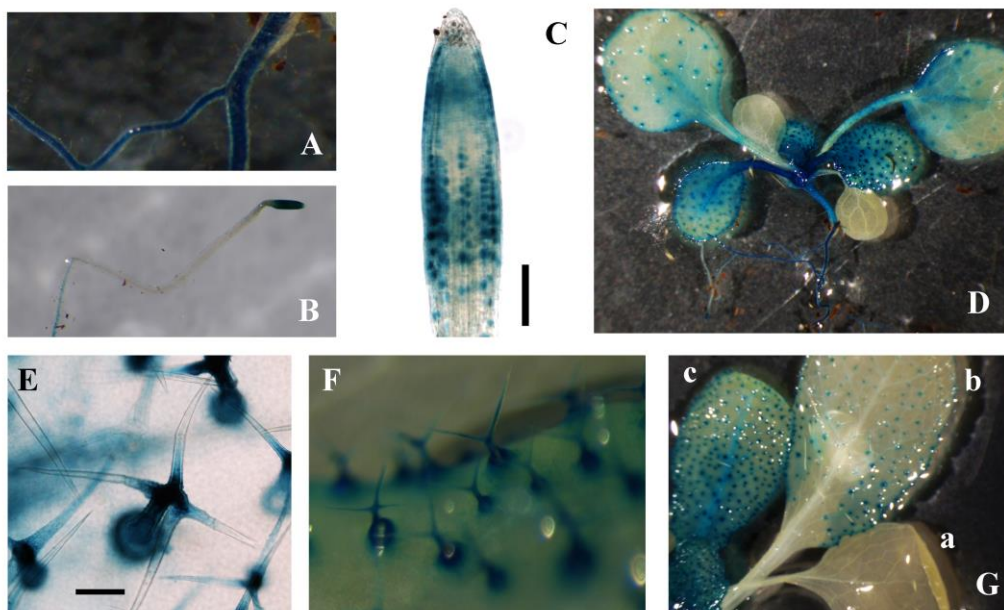


Figura 5. Tinción histoquímica de plántulas y rosetas expresando el gen GUS bajo el promotor de AtGH9B7: raíz principal y una raíz lateral (A), zona apical de la raíz (B y C); plántula de 14 días (D); tricomas (E y F), y comparación del patrón de tinción en hojas 1-4 (a), 5-6 (b) y 7 en adelante (c) (G). Barra de escala=100 μ m.

En las flores jóvenes, destacó una tinción en el área del receptáculo (Fig. 6A, flecha), que desaparece en estadios posteriores del desarrollo. En algunas flores, los pétalos aparecieron teñidos tenuemente, incluyendo la nerviación (Fig. 6A). Los tricomas aparecen teñidos en los sépalos (Fig. 5B). Los filamentos de los estambres se tiñeron, pero no las anteras (Fig. 6C). En los gineceos jóvenes se tiñeron la zona del estilo, el septum y los márgenes internos de las valvas (Fig. 6D). En flores más maduras, esta tinción se limitó a las zonas superior e inferior del gineceo, patrón que se mantuvo en la silicua (Fig. 6E). El tallo en floración se tiñó mucho más que los pedicelos. Las axilas presentan una coloración muy intensa (Fig. 6F).

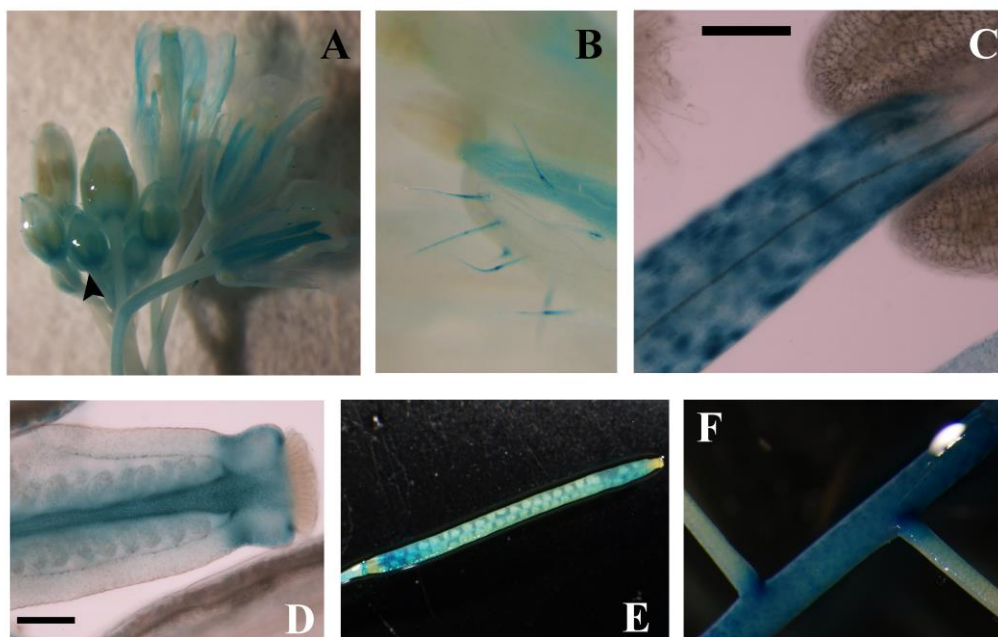


Figura 6. Tinción histoquímica de diferentes órganos expresando el gen GUS bajo el control del promotor de GH9B7: ramillete de flores (A); tricomas en sépalos (B); filamento de un estambre (C); interior del ginoceo (D); silicua (E); tallo en floración (F). La flecha señala la zona del receptáculo floral (A). Barra de escala=100 μ M.

4.1.5 *PrGH9B8::GUS*

En las raíces, el cilindro vascular se tiñó claramente. Dicha tinción fue más intensa en las zonas de emergencia de las raíces laterales (Fig. 7A y B). La tinción vascular no apareció en la zona más joven de las raíces, donde solo se tiñe el área de la cofia (Fig. 7C). En las plántulas, las hojas jóvenes se tiñeron más que las maduras. La tinción se limitó al peciolo y el haz vascular central, pero solo hasta la mitad de la longitud de la hoja (Fig. 7D).

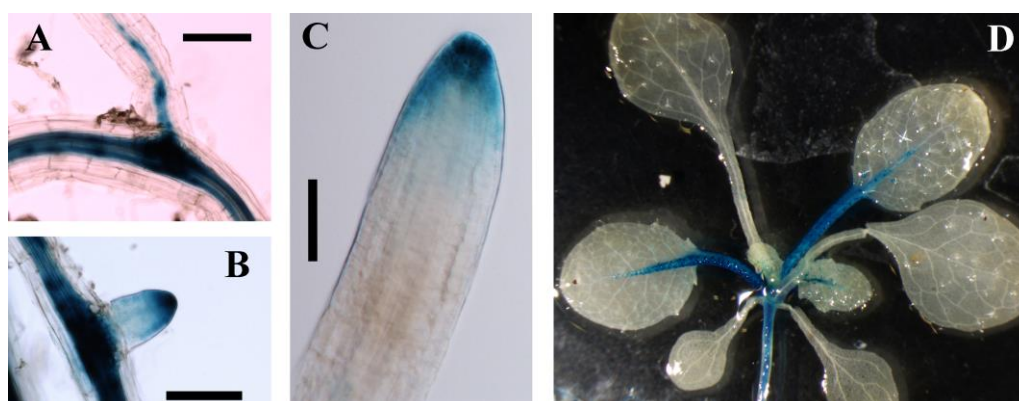


Figura 7. Tinción histoquímica de plántulas expresando el gen GUS unido al promotor de GH9B8: raíz principal y lateral (A); emergencia de una raíz lateral (B); ápice de la raíz principal (C); plántula de 14 días (D). Barra de escala = 50 μ M.

En las rosetas (Fig. 8A) se observó exactamente el mismo patrón, con la adición de que se tiñeron las células de la base de los tricomas (Fig. 8B y C). La tinción de las hojas más maduras desapareció primero del nervio central. Las flores en general no presentaron tinción, ni siquiera en su fase de primordio (Fig. 8D), pero el tallo en floración y los pedicelos si se tiñeron, estos últimos más tenuemente (Fig. 8E). Las flores más antiguas y las silicuas mostraron un color intenso en la zona de abscisión de los órganos florales (Fig. 8F y G, flechas).

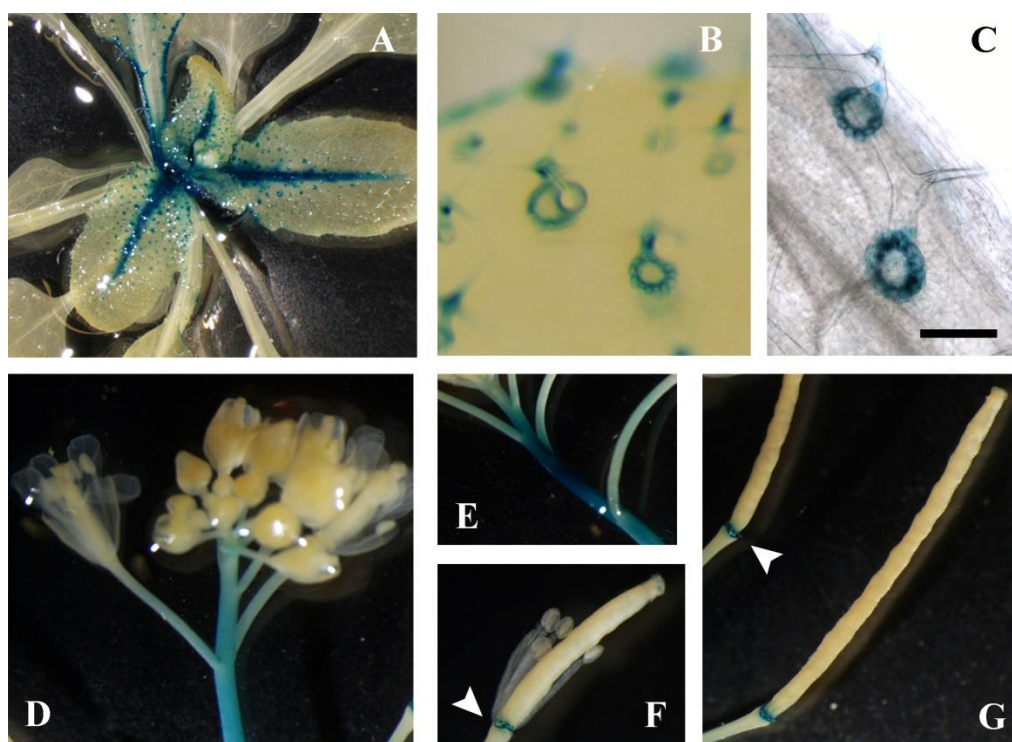


Figura 8. Tinción histoquímica de diferentes órganos expresando el gen reportero GUS bajo el promotor de GH9B8: roseta de 21 días (A); células basales de los tricomas (B y C); ramillete de flores (D); tallo en floración (E) y zonas de abscisión en una flor madura y silicuas (F y G, flechas). Barra de escala = 50 μ M.

4.1.6 *PrGH9C2::GUS*

La raíz presentó una tinción heterogénea en el cilindro vascular, no demasiado intensa a excepción de en los puntos de emergencia de las raíces laterales (Fig. 9A y B). La zona del meristemo apical de la raíz y parte de la cofia también se tiñeron (Fig. 9C). En las hojas la tinción más intensa apareció en los haces vasculares. A medida que las hojas crecieron, la tinción se fue perdiendo, y el primer lugar donde desapareció fue el nervio central (Fig. 9D).

En las hojas de las rosetas se mantuvo el mismo patrón (Fig. 10A). Tanto en las plántulas como en las rosetas también se tiñeron los tricomas (Fig. 10B y C). En las flores se tiñó claramente la nerviación de sépalos y estambres (Fig. 10D). En la mayoría de los estambres, solo se tiñó la parte superior de la nerviación, que penetra en la antera (Fig. 10E). En el gineceo la tinción parece concentrarse en las valvas y lo que podrían ser los tubos polínicos (Fig. 10 F y G).

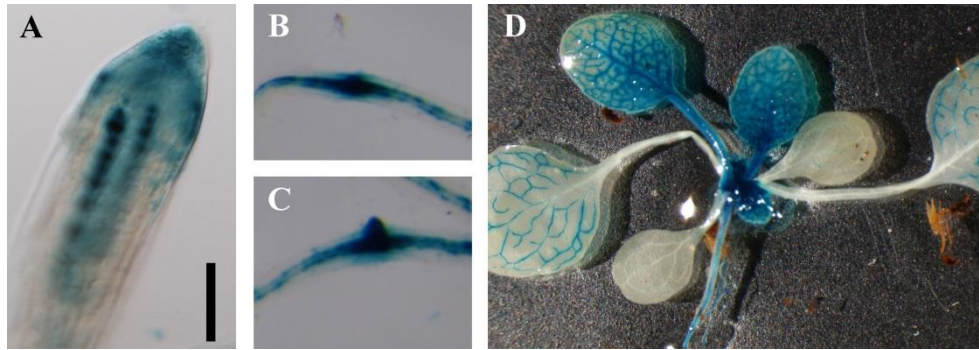


Figura 9. Tinción histoquímica de plántulas expresando el gen GUS unido al promotor de AtGH9C2: ápice de la raíz (A); emergencia de una raíz lateral (B y C); plántula de 14 días (D). Barra de escala= 50 μ M.

También se tiñó la zona de abscisión de las flores, apareciendo más marcada en las silicuas. El tallo principal en floración solo presenta tinción en las axilas, mientras que en los pedicelos se tiñe la vasculatura (Fig. 10H).

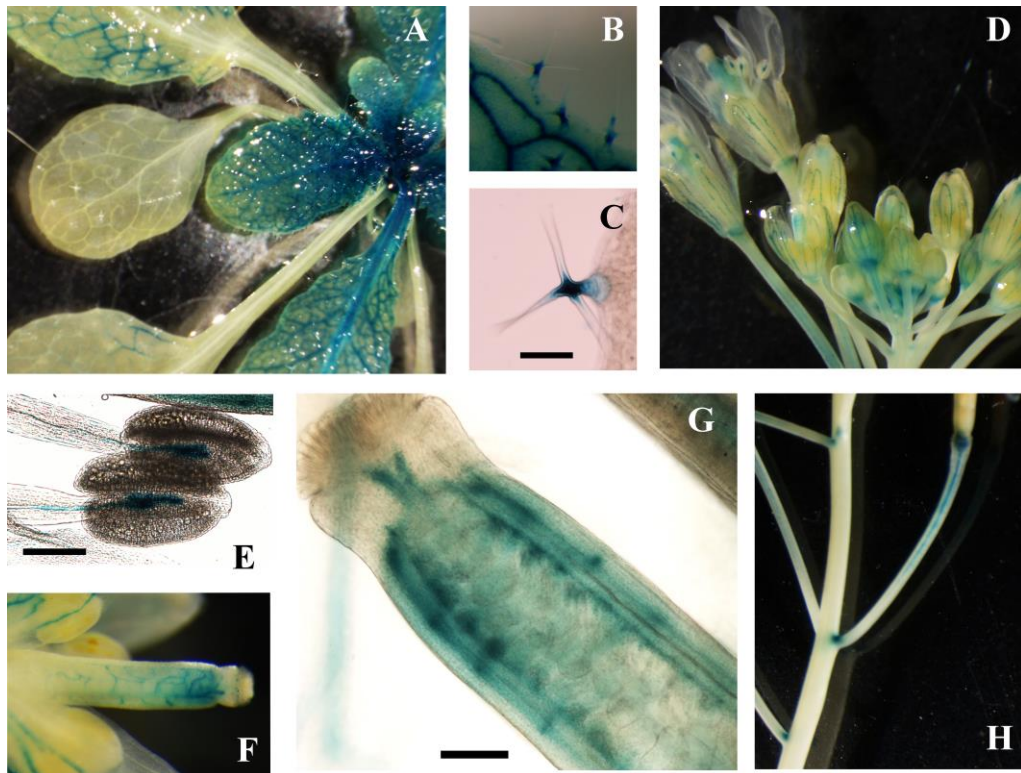


Figura 10: Tinción histoquímica de varios órganos expresando el gen GUS bajo el promotor de GH9C2: roseta de 21 días (A); tricomas (B y C); ramillete de flores (D); anteras (E), gineceo (F y G); tallo en floración (H). Barra de escala = 100 μ M (C y G) y 200 μ M (F).

4.1.7 PrGH9C3::GUS

En estas líneas la raíz solo presentó coloración en la zona meristemática apical, con una tinción muy intensa que parece disminuir en la cofia (Fig. 11A). En las hojas, la tinción se

localizó en peciolo, tricomas (Fig. 11B) e hidátodos (Fig. 11D). Solo las hojas muy jóvenes y el meristemo apical del tallo presentaron tinción, tanto en las plántulas como en las roseteas (Fig. 11D y E). El tallo en floración se tiñó más que los pedicelos, y además presentó zonas de tinción más intensa en las axilas (Fig. 11F). En las flores, solo se apreciaron teñidas las tecas en fases avanzadas del desarrollo (Fig. 11G y H). En las silicuas se puede apreciar una tinción suave en la zona de abscisión de los órganos florales (Fig. 11I, flecha).

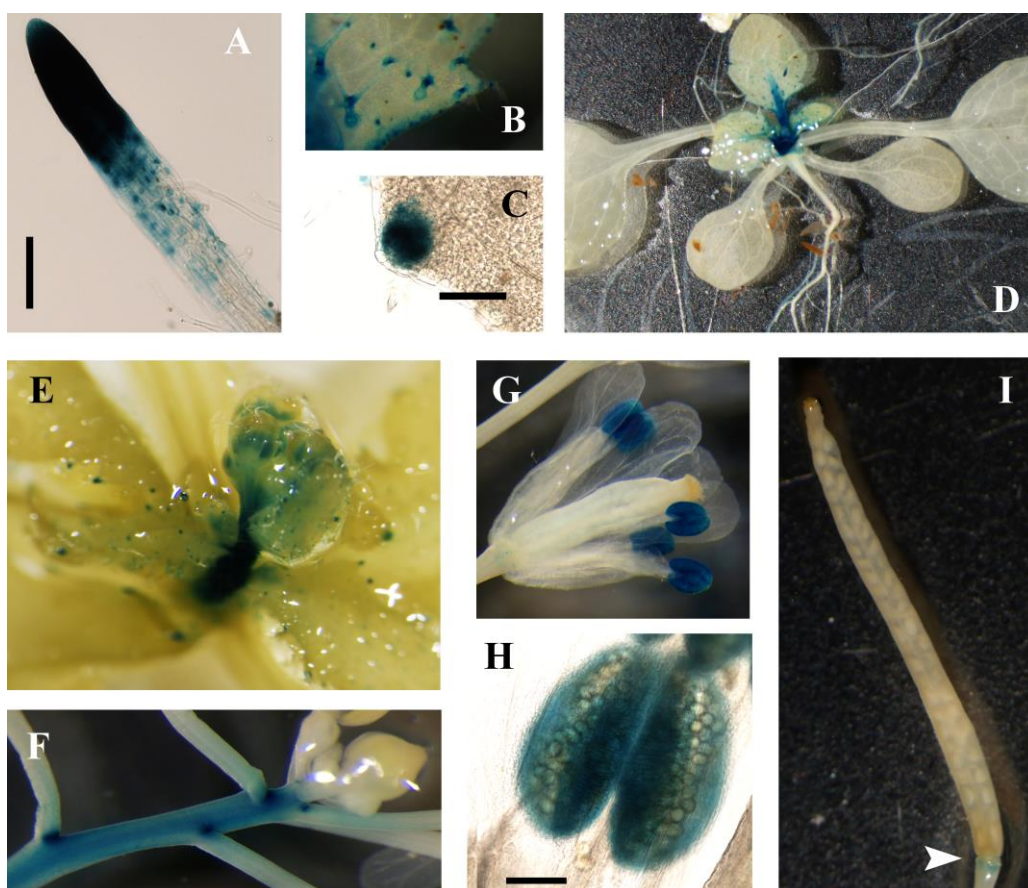


Figura 11. Tinción histoquímica de diferentes tejidos expresando el gen reportero GUS bajo el promotor de GH9C3: ápice de la raíz (A); tricomas (B); hidátodo (C); plántula de 14 días (D); roseta de 21 días (E); tallo en floración (F); tecas teñidas en una flor (G); detalle de las tecas y el polen (H); silicua (I). La flecha señala la zona de abscisión de los órganos florales (I). Barra de escala = 100 μ M.

4.2 Caracterización de líneas de sobreexpresión

Se habían obtenido previamente en el grupo de investigación líneas de *Arabidopsis* modificadas genéticamente para sobreexpresar GH9B1 (SEB1) y GH9C2 (SEC2) bajo el promotor específico de pared primaria CESA3. A partir de ellas, mediante selección por PCR y/o resistencia a antibióticos se identificaron, por un lado, descendientes que presentaban la inserción en homocigosis y por otro, individuos segregantes sin inserción. El efecto de la sobreexpresión fue estudiado por comparación de fenotipos con plantas de fenotipo silvestre

(TS), bien Columbia o bien los segregantes sin inserción. En primer lugar se buscaron alteraciones visibles en raíces e hipocótilos mediante siembra en placas petri con medio MS estándar y pobre en nutrientes; en el caso de encontrarse diferencias significativas, se analizó también el crecimiento en medio suplementado con sacarosa. También se midió el diámetro de rosetas de 19 días crecidas en sustrato y se observó el momento de la floración.

Para las líneas SEB1 no se encontraron cambios en el crecimiento de hipocótilos en medio de crecimiento estándar ni en medio pobre. Lo mismo sucedió con las raíces en medio estándar, mientras que en medio pobre las de SEB1 crecieron mejor que las de tipo silvestre, aunque la diferencia no llegó a ser significativa debido a la gran varianza en la longitud de las raíces TS (Fig. 12A). Las rosetas de SEB1 crecidas en sustrato resultaron ser ligeramente más grandes que las de TS, pero no significativamente, con medias de $4,17\pm 0,37$ cm (TS) y $4,55\pm 0,56$ cm (SEB1). En cuanto a la floración, fue más temprana en SEB1 (Fig. 12B).

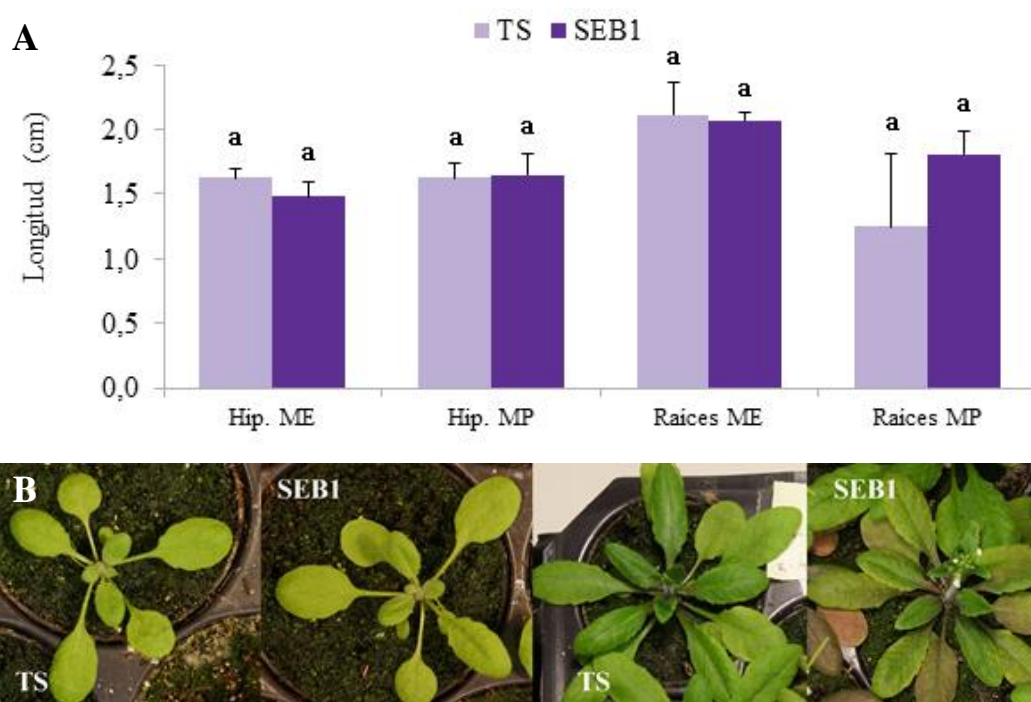


Figura 12. Comparación del crecimiento de líneas de sobreexpresión de GH9B1 (SEB1) y plantas de fenotipo silvestre (TS). A: longitud de hipocótilos (hip.) y raíces crecidos en medio MS estándar (ME) y pobre en nutrientes (MP); las barras de error representan la desviación estándar; las letras iguales sobre las barras indican que no hubo diferencias significativas ($\alpha=0,05$) dentro de cada condición. B: rosetas de 19 días (izquierda) y estado de floración a los 30 días (derecha).

Para las líneas SEC2 no se encontraron diferencias de crecimiento en los hipocótilos, ni en medio estándar ni en medio pobre. En cuanto a las raíces, las de SEC2 crecieron menos que las

de tipo silvestre en medio estándar, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 13A). En medio pobre presentaron una variabilidad de crecimiento demasiado grande dentro de cada línea por lo que los datos se determinaron no válidos y no se midieron. En cuanto al crecimiento en sustrato, las rosetas de ambos tipos de plantas tuvieron un tamaño muy similar, con medias de $4,20\pm 0,35$ cm (TS) y $4,07\pm 0,54$ cm (SEC2) (Fig. 13B). Tampoco hubo diferencias en la floración.

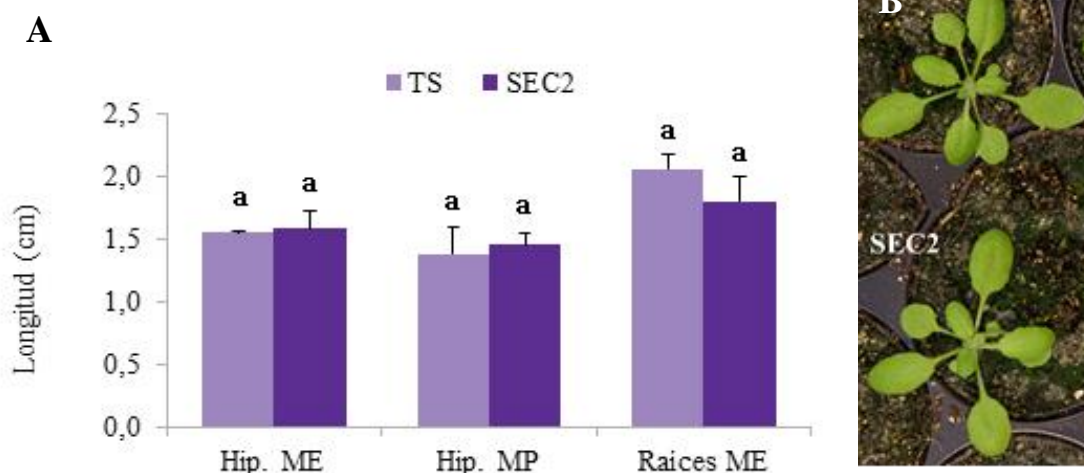


Figura 13. Comparación del crecimiento de líneas de sobreexpresión de GH9C2 (SEC2) y plantas de fenotipo silvestre (TS). A: longitud de hipocótilos (hip.) y raíces crecidos en medio MS estándar (ME) y pobre en nutrientes (MP); las barras de error representan la desviación estándar; las letras iguales sobre las barras indican que no hubo diferencias significativas ($\alpha=0,05$) dentro de cada condición. B: rosetas de 19 días.

4.3 Obtención y caracterización de mutantes

Líneas de mutantes dobles *gh9b1 gh9b13* modificadas mediante CRISPR-Cas para incluir mutaciones en GH9B2 fueron obtenidas previamente por el grupo de investigación. Su secuenciación confirmó que presentaban las mutaciones en el gen diana y que dos de las líneas eran homocigotas. Una de ellas, *gh9b1 gh9b2-1 gh9b13* (abreviada *gh9b1/b2/b13-1*) presentó una inserción de 1 pb y la otra, *gh9b1 gh9b2-2 gh9b13* (*gh9b1/b2/b13-2*) una delección de 4 pbs (Fig. 15).

Para obtener mutantes cuádruples homocigotos *gh9b7 gh9b8 gh9c2 gh9c3* (*gh9b7/b8/c2/c3*) se realizó selección por PCR de los descendientes del cruce entre un mutante triple homocigoto *gh9b7 gh9b8 gh9c2* y un mutante heterocigoto para las cuatro mutaciones, llevado a cabo previamente por el grupo de investigación. Los primers designados para identificar la mutación *gh9c3* dieron una banda diferente a la esperada, por lo que se realizó una clonación a partir de dicha banda y el ADN se envió a secuenciar. Se encontró que la inserción de T-DNA estaba en una localización diferente de la indicada por los creadores, pero igualmente en un exón (Fig. 16). Tras confirmar esto, un individuo homocigoto *gh9b7 gh9b8*

gh9c2 y heterocigoto *gh9c3* fue identificado, y entre los descendientes resultantes de la autopolinización de este se identificó un individuo mutante cuádruple homocigoto (Fig. 2 del Anexo).

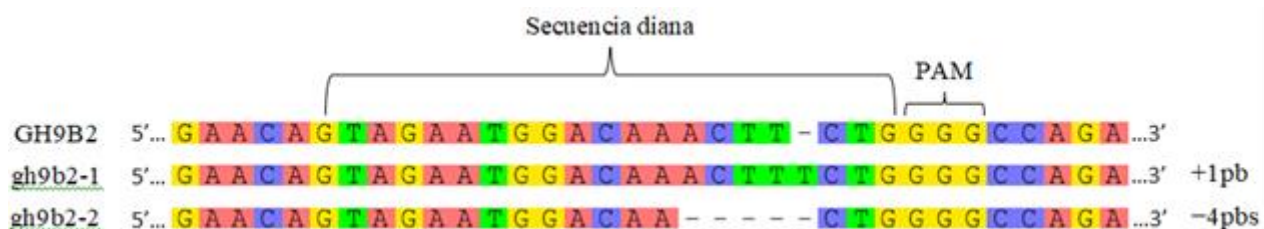


Figura 15. Alineamiento de la secuencia original del gen GH9B2 con el resultado de la secuenciación de las mutaciones *gh9b2-1* y *gh9b2-2*. Los corchetes señalan el motivo adyacente protoespaciador (PAM) y la secuencia diana de CRISPR-Cas. El triángulo negro indica el sitio de corte, 3 nucleótidos corriente arriba de la secuencia PAM.



Figura 16. Localización de la inserción de T-DNA en el mutante *gh9c3*. La línea negra representa el gen GH9C3. Las cajas negras representan los exones a escala. Las cajas grises representan las regiones 5' y 3' UTR. La flecha negra indica la posición del inserto de T-DNA indicada por Alonso *et al.* (2003). La flecha roja representa el lugar real de inserción, determinado por secuenciación de la zona de unión y alineamiento con la secuencia del gen.

Los mutantes fueron estudiados para alteraciones en el fenotipo de la misma forma que las líneas de sobreexpresión. En este caso, además de plantas de fenotipo silvestre el crecimiento se comparó con el de dos líneas de mutantes dobles homocigotos *gh9b1 gh9b13* (*gh9b1/b13*) y triples homocigotos *gh9b7 gh9b8 gh9c2* (*gh9b7/b8/c2*) respectivamente.

4.3.1 Mutantes *gh9b1 gh9b13* y *gh9b1 gh9b2 gh9b13*

No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los hipocótilos para estos mutantes. Con respecto a las raíces, tanto las líneas *gh9b1/b13* como *gh9b1/b2/b13* crecieron significativamente menos que el tipo silvestre en medio de cultivo estándar. En condiciones de escasez de nutrientes se observó una variación muy grande dentro de cada línea, y *gh9b1/b2/b13-1* muestra un crecimiento mucho menor que todas las demás líneas. El experimento de crecimiento se repitió en medio de cultivo suplementado con sacarosa. En

estas condiciones solo las raíces de la otra línea triple, *gh9b1/b2/b13-2* resultaron ser significativamente más pequeñas que el control de tipo silvestre (Fig. 17A).

Para observar si estas diferencias se reflejaban en el crecimiento en sustrato, la línea *gh9b1/b2/b13-2* fue escogida para siembra en paralelo a tipo silvestre. Sus rosetas fueron ligeramente más pequeñas que las de tipo silvestre, siendo la media de sus diámetros $4,67 \pm 0,46$ cm (TS) y $4,36 \pm 0,20$ cm (*gh9b1/b2/b13-2*), diferencia que no llegó a ser significativa (Fig. 17B). No se observaron diferencias importantes en el momento de floración. En general, las plantas mutantes demostraron un estado de salud y alcanzaron una altura muy similar al del control de tipo silvestre.

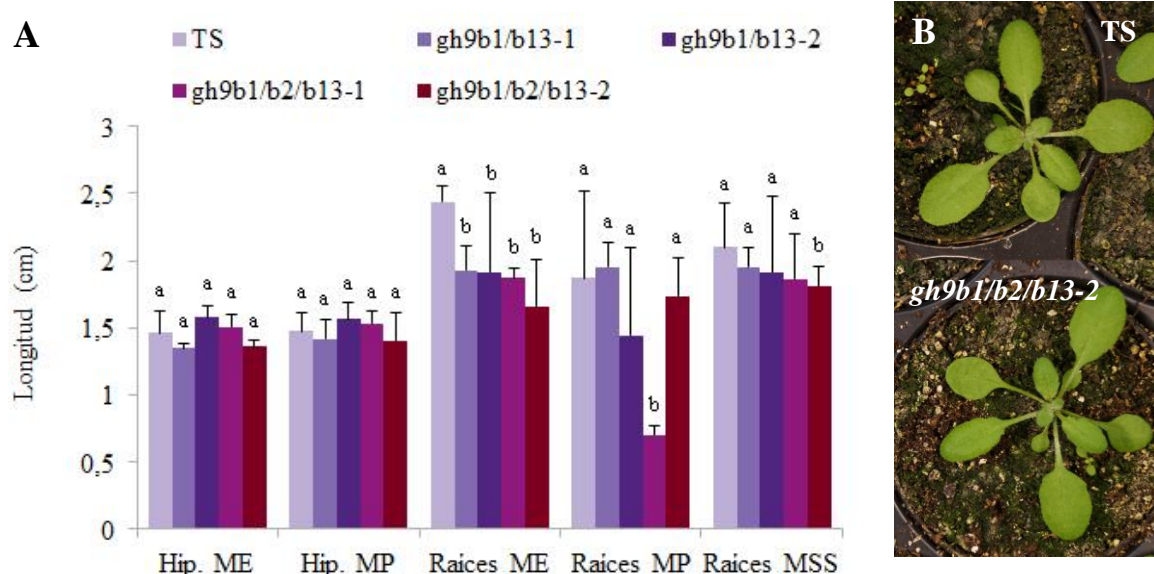


Figura 17. Comparación del crecimiento de mutantes dobles (*gh9b1/b13*) y triples (*gh9b1/b2/b13*) con plantas de fenotipo silvestre (TS). A: longitud de hipocótilos (hip.) y raíces crecidos en medio MS estándar (ME), pobre en nutrientes (MP) y suplementado con sacarosa (MSS); las barras de error representan la desviación estándar; letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$) dentro de cada condición. B: rosetas de 19 días.

4.3.2 Mutantes *gh9b7 gh9b8 gh9c2* y *gh9b7 gh9b8 gh9c2 gh9c3*

En condiciones de oscuridad las semillas de todos los mutantes mostraron problemas para germinar, tanto en medio estándar como en medio pobre en nutrientes (Fig. 18A). En cuanto a las raíces, en medio estándar *gh9b7/b8/c2/c3* creció significativamente menos que el control de tipo silvestre y que los dos mutantes *gh9b7/b8/c2*, a pesar de presentar una gran varianza. En medio pobre en nutrientes, todos los mutantes crecieron significativamente menos que el tipo silvestre, y no presentaron diferencias entre ellos. En medio suplementado con sacarosa, curiosamente, desaparecieron todas las diferencias significativas (Fig. 18C).

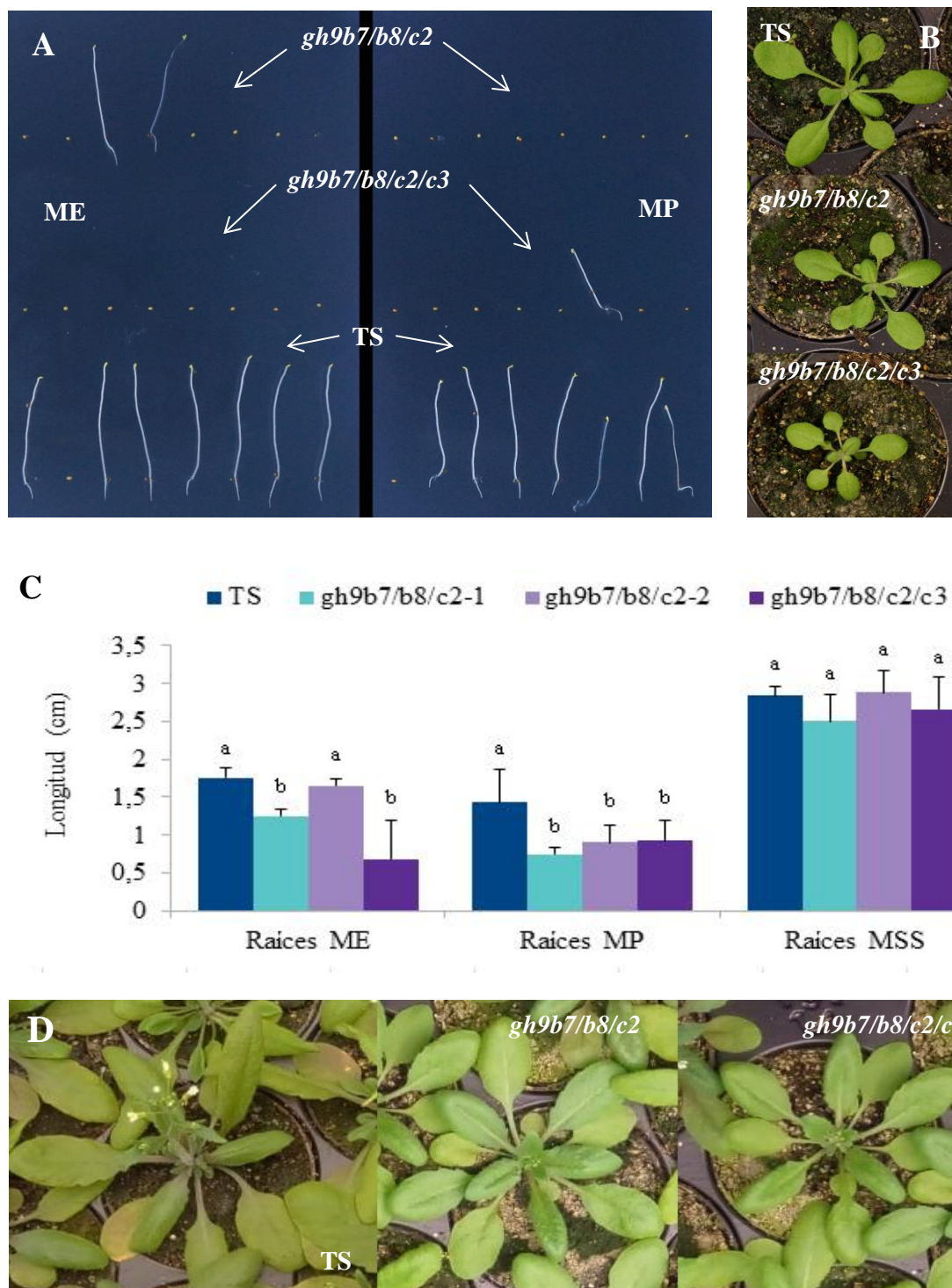


Figura 18. Comparación del crecimiento de mutantes cuádruples (*gh9b7/b8/c2/c3*) y triples (*gh9b7/b8/c2*) con plantas de fenotipo silvestre (TS). A: germinación de hipocótilos en medio MS estándar (ME) y pobre en nutrientes (MP). B: rosetas de 19 días. C: longitud de raíces crecidas en ME, MP y medio suplementado con sacarosa (MSS); las barras de error representan la desviación estándar; distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$) dentro de cada condición. D: estado de floración a los 30 días.

Con respecto al crecimiento en sustrato, tanto el mutante cuádruple como los triples volvieron a mostrar problemas con la germinación, y el diámetro de sus rosetas fue significativamente más pequeño que el de las plantas silvestres. El efecto fue más intenso en el cuádruple, cuyas rosetas son significativamente más pequeñas que las de los triples. Las diferencias se aprecian a simple vista (Fig. 18B), con medias de $4,20\pm 0,35$ (TS), $3,70\pm 0,55$ (*gh9b7/b8/c2*) y $3,08\pm 0,42$ cm (*gh9b7/b8/c2/c3*). La floración sucedió, consecuentemente, más tarde en ambos mutantes (Fig. 18D).

5. DISCUSIÓN

5.1 Tinción histoquímica

En el presente trabajo, los resultados de tinción histoquímica de plantas de *Arabidopsis* expresando el gen reportero GUS unido a los promotores de las siete endoglucanasas seleccionadas corroboraron que estas enzimas se localizan en los tejidos en desarrollo. La zona del meristemo apical y los primordios foliares presentó una tinción intensa en casi todas las líneas, excepto las de GH9B8 y GH9B13 (Fig. 1A, 3A, 5D, 9D y 11D). Los primordios florales también se tiñeron intensamente, menos para GH9B8 y GH9C3 (Fig. 2A, 3C, 4D, 6A y 10D). Además, las siete construcciones presentaron un patrón común en el que, aunque diferentes elementos de las hojas se tiñeron en cada una de ellas, el color es siempre fue más intenso en las hojas más jóvenes y fue desapareciendo a medida que maduraban. Esto se observó tanto en la tinción de plántulas de 14 días (Fig. 1A, 5D, 7D, 9D y 11D) como en las rosetas de 21 días (Fig. 3B, 4D, 5E, 8A, 10A), y se corresponde bien con resultados ya existentes de tinción histoquímica para GH9B1 en *Arabidopsis*, según los cuales las hojas jóvenes exhibieron altos niveles de tinción que disminuyeron a medida que cesó el crecimiento. En el mismo estudio, las raíces de plántulas jóvenes mostraron tinción en el ápice en crecimiento (Shani *et al.*, 2005). En el presente trabajo, la tinción en las raíces fue muy variable. La zona del meristemo apical de la raíz se tiñó efectivamente para GH9B1, y también para GH9B7, GH9C2 y GH9C3 (Fig. 1C, 5D, 9A y 11A), mientras que el cilindro vascular apareció teñido en casi todas, excepcionando GH9B2 y GH9C3 (Fig. 1B, 4B, 5A, 7A y 9B). Esto podría representar actividad en otro tejido meristemático, el procambium, o reorganización durante la deposición de pared secundaria en zonas más maduras de la raíz. GH9B8 y GH9C2 mostraron un patrón muy parecido entre sí, con puntos de mayor intensidad de tinción en las zonas de emergencia de raíces laterales (Fig. 7A y B; Fig. 9B y C). Es posible pensar que estén implicadas en el desarrollo de estas, ya que este tipo de expresión también se ha encontrado asociada a la endoglucanasa GH9B3, cuyos sus mutantes presentan una

reducción en la iniciación de raíces laterales (Lewis *et al.*, 2013). Lo contrario se observa en GH9B13, donde las raíces laterales no se tiñeron en absoluto (Fig. 4B). Finalmente, en la parte apical de la raíz de las líneas para GH9B8 se tiñó solo la cofia (Fig. 7C). La expresión en la cofia es característica de algunas endoglucanasas, en concreto GH9B3 y GH9B4, que parecen participan en el desprendimiento de las células que rodean al ápice de la raíz, en un proceso que facilita su penetración en el suelo (Del Campillo *et al.*, 2004).

Con respecto al patrón de tinción en las hojas jóvenes, la línea de GH9B1 es la más diferente, siendo la única en la que se tiñen los estomas (Fig. 1E). El mayor solapamiento se encuentra entre las líneas de GH9B7, GH9B8, GH9C2 y GH9C3. En todas ellas se tiñen los tricomas (Fig. 5E y F; Fig. 10B y C y Fig. 11B), destacando en GH9B8 las células de la base (Fig. 8B y C). También tienen en común la tinción del haz vascular central en las hojas más jóvenes (Fig. 5D, 7D, 9D y 11D). El resultado es consistente con la relación filogenética, siendo especialmente cercanas GH9C2, GH9C3 y GH9B8 (Fig. 1 del Anexo). Por otra parte, GH9B2 y GH9B13, también filogenéticamente muy cercanas, son en la que más temprano desapareció la tinción en las hojas (Fig. 3A y 4A). En GH9C3 también desapareció bastante pronto, y sus hojas jóvenes presentaron un patrón de tinción muy similar al de GH9B13, siendo las únicas en las que se tiñeron los hidátodos (Fig. 4D y 4E).

La relajación de la pared celular no solo influye en el crecimiento, sino también en otros procesos del desarrollo vegetal como la abscisión de los órganos (Del Campillo y Bennet, 1997; Lashbrook *et al.*, 1994). En el presente estudio, la tinción de las inflorescencias permitió comprobar que todas las construcciones excepto la de GH9B2 se expresan en la zona de abscisión de los órganos florales (Fig. 2A y E; 4E; 6A; 8F y G; 10H y 11I). También aparecieron teñidas las axilas del tallo en GH9B1, GH9B7, GH9B8, GH9C2 y GH9C3 (Fig. 1F, 6F, 10H y 11F), que son zonas de abscisión vestigiales (Stenvik *et al.*, 2006). El tallo de la inflorescencia aparece teñido en GH9B1, GH9B13, GH9B7, GH9B8 y, GH9C3. Los pedicelos que parten de él también presentan tinción, pero mucho más suave (Fig. 2F, 4G, 6F, 8E, 11F). Las zonas del tallo que se tiñen también constituyen tejido en elongación y aparecieron teñidas en el estudio de tinción histoquímica de GH9B1 (Shani *et al.*, 2005).

La tinción en los ramilletes de flores fue muy variable. En este caso apenas hubo apenas solapamiento en el patrón de tinción de los genes filogenéticamente cercanos. En general, los sépalos mostraron una tinción muy similar a las hojas de cada línea. Los pétalos solo se tiñeron en algunas flores para GH9B7 (Fig. 6A). El gineceo es el órgano que apareció teñido con más frecuencia, y su patrón fue diferente para cada gen. En un estudio de tinción inmunohistoquímica, GH9B2 pareció estar relacionado con el crecimiento y la división de células del septum y los óvulos (Yung *et al.*, 1999). El presente trabajo coincidió en que la

estructura que más veces se tiñó fue el septum, no solo en GH9B2 sino también en las filogenéticamente cercanas GH9B1 y GH9B13, y en GH9B7 (Fig. 2D, 3E, 4F y 6D). Además, en GH9B2 también aparecieron teñidos los óvulos (Fig. 3E). Por último, la expresión del reportero se encuentra asociada a los estambres en GH9B7, donde aparece en los filamentos (Fig. 6C), en GH9C2, que aparece en la vasculatura (Fig. 10E) y en GH9C3, que aparece en las tecas y polen (Fig. 11G y H).

5.2 Efecto de sobreexpresión y mutantes

La mayoría de los cambios en el fenotipo observados al comparar las plantas modificadas genéticamente con las de tipo silvestre fueron o bien leves, o bien poco claros. En el primer conjunto de endoglucanasas estudiadas (GH9B1, GH9B2 y GH9B13), una de las diferencias más destacables fue la floración más temprana de las líneas de sobreexpresión de GH9B1 (Fig. 12B). Esto se corresponde bien con la expresión del gen reportero unido a su promotor en el meristemo apical del tallo y los primordios florales, y también con los resultados de un estudio en el que plantas expresando ADN antisentido de esta misma endoglucanasa florecieron de 1 a 2 días más tarde que las de tipo silvestre. En dicho estudio las plantas también presentaron raíces y tallos más cortos y débiles (Tsabary *et al.* 2006). Sin embargo, el retraso en la floración no se repitió en los mutantes de inserción de T-DNA para GH9B1 estudiados por el grupo de investigación, ni en los mutantes dobles *gh9b1/b13* y triples *gh9b1/b2/b13* estudiados en el presente trabajo. En el crecimiento de las raíces sí que hubo leves diferencias, siendo un poco más pequeñas que las de plantas de tipo silvestre. Dichas diferencias fueron significativas en mutantes dobles y triples cuando se sembraron en medio estándar, pero se mantuvieron solo en una de las líneas triples (*gh9b1/b2/b13-2*) cuando se sembraron en medio suplementado con sacarosa. En medio pobre en nutrientes hubo una variación muy grande de resultados dentro de cada línea y, curiosamente, fue la otra línea triple (*gh9b1/b2/b13-1*) la única que presentó raíces significativamente menores en comparación no solo con el tipo silvestre, sino también con los mutantes dobles y la otra triple (Fig. 17A). Estas inconsistencias en los resultados podrían indicar que las diferencias en el crecimiento se debieron a variabilidad en la calidad de las semillas y no a las mutaciones, teniendo en cuenta que en medio pobre en nutrientes dichas diferencias tienden a maximizarse, y lo contrario sucede en el medio suplementado con sacarosa. El hecho de que la línea *gh9b1/b2/b13-2* mantuviese su menor crecimiento significativo en el medio suplementado, podría significar que esta diferencia fue causada por la mutación en GH9B2, cuyo mutante simple no ha sido estudiado. También podría ser que exista cierta redundancia génica de GH9B2 con GH9B13, a la que es filogenéticamente muy cercana, y/o con GH9B1, también relativamente cercana. Sin embargo, si esto fuese cierto sería difícil

de explicar que la línea *gh9b1/b2/b13-1* no presente el mismo efecto en el crecimiento, ya que en ambas se desplaza la pauta de lectura del gen GH9B2. Además, el posterior crecimiento de la línea *gh9b1/b2/b13-2* en sustrato fue prácticamente igual al del control de fenotipo silvestre (Fig. 17B), con lo que diferencias en la calidad de las semillas sigue siendo la explicación más razonable para los resultados obtenidos en placa.

Con respecto al segundo grupo de endoglucanasas estudiadas, la falta de fenotipo en las líneas de sobreexpresión de GH9C2 contradujo los resultados del estudio de Glass *et al.*, (2015) en el que la sobreexpresión de un ortólogo de este gen en *Arabidopsis* produjo plantas más pequeñas. En dicho estudio la sobreexpresión fue heteróloga y controlada por un promotor específico de pared secundaria, lo que en principio podría explicar la diferencia. Sin embargo, en el mismo estudio el silenciamiento mediante ARN interferente de los tres genes que codifican para endoglucanasas de clase C en *Arabidopsis* produjo un mayor crecimiento, con plantas más altas y con rosetas más grandes. El efecto en el presente trabajo de los mutantes triples *gh9b7/b8/c2* y cuádruples *gh9b7/b8/c2/c3*, con insertos de T-DNA en uno y dos de dichos genes respectivamente, fue contrario. El mutante cuádruple tuvo raíces significativamente más cortas que las de tipo silvestre en medio de cultivo estándar. Los mutantes triples dieron resultados inconsistentes, con una de las líneas testadas creciendo igual que el tipo silvestre y la otra igual que el cuádruple. En medio pobre en nutrientes, los resultados fueron más homogéneos, con todos los mutantes presentando un crecimiento significativamente menor que el tipo silvestre, y sin mostrar diferencias entre sí. La siembra en medio suplementado con sacarosa, finalmente, no produjo ninguna diferencia significativa (Fig. 18C). El crecimiento de hipocótilos no pudo examinarse ya que todas las plantas mutantes mostraron problemas para germinar en condiciones de oscuridad (Fig. 18A). Esto unido a los resultados en medio suplementado en sacarosa lleva a pensar de nuevo en un problema de calidad variable de semillas. Sin embargo, en este caso el crecimiento en sustrato sí reflejó, en cierta medida, los resultados de la siembra en placa. Tanto los mutantes *gh9b7/b8/c2* como *gh9b7/b8/c2/c3* presentaron, a los 19 días, rosetas significativamente más pequeñas que las plantas de fenotipo silvestre. La diferencia también fue significativa al comparar ambos mutantes, creciendo el cuádruple menos que el triple (Fig. 18B). Consecuentemente, los dos tuvieron una floración más tardía que las plantas silvestres (Fig. 18D). Estas diferencias no pueden atribuirse solo a la variabilidad entre semillas, ya que este factor tiene mucha más importancia en las fases tempranas observadas en placa. Aunque es cierto que generaciones previas de mutantes triples *gh9b7/b8/c2* fueron estudiadas por el grupo de investigación sin encontrarse un fenotipo claro, no se habían realizado demasiadas pruebas en sustrato. En base a estos resultados, por lo tanto, es probable que el grupo de endoglucanasas GH9B7, GH9B8,

GH9C2 y GH9C3 sea necesario para un óptimo desarrollo de las plantas, pero que presenten cierta redundancia génica entre sí. Esto explicaría que no se hayan encontrado diferencias al estudiar los mutantes simples. Teniendo en cuenta la diferencia significativa entre los mutantes *gh9b7/b8/c2* y *gh9b7/b8/c2/c3*, así como la cercanía filogenética, lo más probable es que GH9C2 y GH9C3 sean parcialmente redundantes. GH9B8 también es bastante cercana a ambas y su redundancia con GH9C2 podría explicar la diferencia que se observa en el mutante triple con respecto a las plantas de tipo silvestre. La redundancia con GH9B7 es menos probable por ser la más diferente, pero no se puede descartar. En todo caso, para confirmar el efecto del conjunto de enzimas estudiadas en el presente trabajo, y su relación de redundancia, es necesario realizar futuros estudios con diferentes combinaciones de mutantes dobles y triples, y, en contraparte, estudios de complementación para comprobar si se recupera el fenotipo normal. También sería interesante, para entender cómo se podría originar este menor crecimiento, estudiar la especificidad de sustrato de estas enzimas. Ortólogos para las de tipo C han mostrado actividad sobre celulosa amorfa, arabinosilanos y glucanos mixtos, pero no xiloglucano, mientras que un ortólogo de GH9B7 es específico de celulosa no cristalina (Yoshida y Komae, 2006; Yu *et al.*, 2013). Si esto se reflejase en *Arabidopsis*, la disminución en el crecimiento en los mutantes *gh9b7/b8/c2* y *gh9b7/b8/c2/c3* podría ser causada por un aumento de la proporción de celulosa no cristalina en las microfibrillas, que propiciaría la formación de más enlaces con otros polisacáridos de la pared, dificultando a su vez la expansión celular. Curiosamente, el silenciamiento de los tres genes de tipo C de *Arabidopsis* realizado en el estudio anteriormente mencionado produjo efectivamente una disminución en la cristalinidad de celulosa, a pesar de su efecto totalmente contrario sobre el crecimiento (Glass *et al.*, 2015). El fenotipo tan distinto, sin embargo, podría explicarse si la construcción de RNA interferente utilizada en dicho estudio afectase también a otros genes, además de a los tres de la clase C.

Cabe destacar que, aunque las alteraciones de algunas enzimas estudiadas en el presente estudio no dieron lugar a un fenotipo detectable, esto no implica que carezcan de importancia en el desarrollo vegetal. En primer lugar, las plantas cuentan con mecanismos de adaptación que les permiten continuar el desarrollo ante alteraciones importantes en sus paredes. Un ejemplo es el caso de mutantes que, a pesar de carecer por completo de xiloglucano, son capaces de desarrollarse y completar el ciclo reproductivo de forma completamente normal, solo presentan un tamaño algo menor que plantas de fenotipo silvestre (Cavalier *et al.*, 2008; Park y Cosgrove, 2012). Tampoco se puede descartar que la falta de fenotipo en los mutantes triples *gh9b1 gh9b2 gh9b13* se deba a la redundancia génica, pues *Arabidopsis* cuenta con numerosos genes de la clase B que no se han estudiado en el presente trabajo.

Por último, hay que tener en cuenta que todos estos experimentos se han realizado en condiciones controladas de laboratorio. Puede que la función de estas enzimas no sea esencial en estas condiciones, pero sí en otras no ensayadas o en el hábitat natural de las plantas.

6. CONCLUSIONES

- La tinción histológica de líneas promotor-reportero para las endo-1,4-β-glucanasas estudiadas se asoció por un lado a tejidos jóvenes en desarrollo, particularmente en hojas, cilindro vascular y gineceo; y por otro a las zonas de abscisión de órganos, mayoritariamente en las flores.
- La sobreexpresión de GH9B1 bajo el promotor de CESA3 aceleró la floración de *Arabidopsis*, pero no su crecimiento; la sobreexpresión de GH9C2 bajo el mismo promotor no produjo ningún fenotipo.
- Los mutantes triples *gh9b1 gh9b2 gh9b13* no produjeron fenotipo, siendo causas posibles la existencia de redundancia génica con otros genes de la clase B y/o de mecanismos de adaptación de la planta.
- Los mutantes triples *gh9b7 gh9b8 gh9c2* mostraron un crecimiento ligeramente menor, pero significativo, de raíces y rosetas; los mutantes cuádruples *gh9b7 gh9b8 gh9c2 gh9c3* mostraron un crecimiento todavía menor, indicando un posible papel importante de este grupo de endoglucanasas en el crecimiento, y la existencia de cierta redundancia génica entre GH9C3 y los otros tres genes. Estudios con más combinaciones de mutaciones y estudios de complementación serían útiles para confirmar el efecto sobre el crecimiento y la relación entre estos genes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. M. *et al.*, (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653-657.
- Aoki, Y., Okamura, Y., Tadaka, S., Kinoshita, K. y Obayashi, T. (2015). ATTED-II in 2016: a plant coexpression database towards lineage-specific coexpression. *Plant Cell Physiol.* 57: e5.
- Azpiroz-Leehan, R., y Feldmann, K. A. (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet.* 13:152-156.
- Brummell D. A., Lashbrook, C.C. y Bennett A.B (1994). Plant endo-1,4-β-d-glucanases: structure, properties and physiological function. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 566:100–129.
- Brummell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Func. Plant Biol.* 33:103-119.
- Chebly, Y. y Geitmann, A. (2017). Cellular growth in plants requires regulation of cell wall biochemistry. *Curr Opin Cell Biol.* 44:28-35.

- Cosgrove, D. J., (1993). How do plant cell walls extend? *Plant Physiol.* 102:1-6.
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407:321-326.
- Cosgrove, D. J. (2014). Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr Opin Plant Biol.* 22:122-131.
- Del Campillo, E. y Bennett, A.B. (1996). Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiol.* 111: 813-20.
- Del Campillo, E. (1999). Multiple Endo-1,4- β -D-glucanase (Cellulase) Genes in Arabidopsis. *Curr Top Dev Biol.* 46: 39-61.
- Del Campillo, E., Abdel-Aziz, A., Crawford, D. y Patterson, S. E. (2004). Root cap specific expression of an endo-beta-1,4-D-glucanase (cellulase): a new marker to study root development in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 56:309-323.
- Del Campillo, E., Gaddam, S., Mattle-Amuah, D. y Heneks, J. (2012) A Tale of Two Tissues: AtGH9C1 is an endo- β -1,4-glucanase involved in root hair and endosperm development in arabidopsis. *PLOS ONE* 7: e49363.
- Glass, M., Barkwill, S., Unda, F. y Mansfield, SD (2015) Endo- β -1,4-glucanases impact plant cell wall development by influencing cellulose crystallization. *J. Integr. Plant Biol.* 57: 396-410.
- Goulao, L. F. Vieira-Silva, S., Jackson, P.A. 2011. Association of hemicellulose and pectin modifying gene expression with *Eucalyptus globulus* secondary growth. *Plant Physiol. Biochem.* 49:873-881.
- Fang, R., Nagy, F., Sivasubramaniam, S. y Chua, N. (1989) Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* 1:141-150.
- Feng, Z. *et al.* (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *PNAS*.
- Hartati, S., Sudarmonowati, E., Park, Y. W., Kaku, T., Kaida, R., Baba, K. y Hayashi, T. (2008). Overexpression of poplar cellulase accelerates growth and disturbs the closing movements of leaves in senescence. *Plant Physiol.* 147: 552-561.
- Hayashi T., Ogawa, K. y Mitsuishi, Y. (1994). Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. *Plant Cell Physiol.* 35:1199-205.
- Hayashi, T., Yoshida, K y Park, YW (2005). Cellulose Metabolism in Plants. *Int Rev Cytol.* 247:1-34.
- Henrissat, B., Hofte, H., McQueen-Mason, SJ, Patterson, SE., Shoseyov, O., Teeri, TT y Rose, JKC (2007). Structural Organization and a Standardized Nomenclature for Plant Endo-1,4- β -Glucanases (Cellulases) of Glycosyl Hydrolase Family 9. *Plant Physiol.* 144: 1693-1696.
- Honys, D. y Twell, D. (2003). Comparative Analysis of the Arabidopsis Pollen Transcriptome. *Plant Physiol.* 132: 640-652.
- Hyun, Y., Kim, J., Cho, S. W., Choi, Y., Kim, J. y Coupland, G. (2015). Site-directed mutagenesis in Arabidopsis thaliana using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta* 241:261-284.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. y Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B. y Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41:e188.

- Jiang, W., Yang, B., Weeks, D.P. (2014) Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PLoS ONE* 9: e99225.
- Lashbrook, C.C., Gonzalez-Boch, C., Bennett, A.B. (1994). Two divergent endo- β -1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell*, 6: 1485-1493.
- Lewis, D. R., Olex, A. L., Lundy, S. R., Turkett, W. H., Fetrow, J. S. y Muday, G. K. (2013). A kinetic analysis of the auxin transcriptome reveals cell wall remodeling proteins that modulate lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:3329-3346.
- Keegstra, K. (2010) Plant cell walls. *Plant Physiol* 154:483-486.
- McFarlane, H. E., Döring, A. y Persson, S. (2014). The cell biology of cellulose synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65:69-94.
- Meyerowitz, E. M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Rev. Gen.* 21:93-111.
- Milioni, D., Sado, P.E., Stacey, N.J., Roberts, K. y McCann, M.C. (2002) Early gene expression associated with the commitment and differentiation of a plant tracheary element is revealed by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis. *Plant Cell* 14:2813–2824.
- Mitchum, MG., Sukno, S., Wang, X., Shani, Z., Tsabary, G., Shoseyov, O. y Davis, EL. (2004) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* Cell endo-1,4- β glucanase gene is differentially expressed in plant feeding cells induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol. Plant Pathol.* 5: 175-181.
- Nelson, C. J., Hegeman, A. D., Harms, A. C. y Sussman, M. R. (2006) A quantitative analysis of *Arabidopsis* plasma membrane using trypsin-catalyzed ^{18}O labeling. *Mol. Cell Proteomics* 5: 1382-1395.
- Ohmiya, Y., Nakai, T., Park, YW., Aoyama, T., Oka, A., Sakai, F. y Hayashi, T. (2003). The role of PopCel1 and PopCel2 in poplar leaf growth and cellulose biosynthesis. *Plant J.* 33: 1087-1097.
- Park, Y.B. y Cosgrove, D.J. (2012) A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. *Plant Physiol.* 158:1933-1943.
- Park, Y.W., Tominaga, R., Sugiyama, J., Furuta, Y., Tanimoto, E., Samejima, M., Sakai, F. y Hayashi, T. (2003). Enhancement of growth by expression of poplar cellulase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 33: 1099-1106.
- Reiter, W. D. (1998) *Arabidopsis thaliana* as a model system to study synthesis, structure, and function of the plant cell wall. *Plant Physiol.* 36:167-176.
- Shani, Z., Dekel, M., Tsabary, G. y Shoseyov, O. (1997). Cloning and characterization of elongation specific endo-1,4- β -glucanase (cel1) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 34: 837-842.
- Shani, Z., Dekel, M., Roiz, L., Horowitz, M., Kolosovski, N., Lapidot, S., Alkan, S., Koltai, h., Tsabary, G., Goren, R. y Shoseyov, O. (2006). Expression of endo-1,4- β -glucanase (cel1) in *Arabidopsis thaliana* is associated with plant growth, xylem development and cell wall thickening. *Plant Cell. Rep.* 25:1067-1074.
- Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:53-78.
- Sukno, S., Shimerling, O., McCuiston, J., Tsabary, G., Shani, Z., Shoseyov., O. y Davis, EL. (2006). Expression and regulation of the *Arabidopsis thaliana* Cell endo-1,4- β -glucanase gene during compatible plant-nematode interactions. *J. Nematol.* 38: 354-361.
- Tsabary, G., Shani, Z., Roiz, L., Levy, I., Riov, J. Y Shoseyov, O. (2003). Abnormal ‘wrinkled’ cell walls and retarded development of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing endo-1,4- β -glucanase (cel1) antisense. *Plant Mol. Biol.* 51: 213-224.

- Urbanowicz, B. R. et al., (2007a). Structural organization and a standardized nomenclature for plant endo-1,4- β -glucanases (cellulases) of glycosyl hydrolase family 9. *Plant Physiol.* 144: 1693-6.
- Urbanowicz, B. R., Catalá, C, Irwin, D., Wilson, DB, Ripoll, DR y Rose, JKC (2007b). A Tomato Endo- β -1,4-glucanase, SlCel9C1, Represents a Distinct Subclass with a New Family of Carbohydrate Binding Modules (CBM49). *J. Biol. Chem.* 282:12066-12074.
- Wang, T., Park, Y. B., Cosgrove, D. J. y Hong, M. (2015). Cellulose-pectin spatial contacts are inherent to never-dried Arabidopsis primary cell walls: evidence from solid-state nuclear magnetic resonance. *Plant Physiol.* 168:871-884.
- Wieczorek, K., Hofmann, J., Blöchl, A., Szakasits, D., Bohlmann, H y Grundler, FMW. (2008) Arabidopsis endo-1,4- β -glucanases are involved in the formation of root syncytia induced by *Heterodera schachtii*. *Plant J.* 53: 336-351.
- Wolf, S., Hématy, K. y Höfte, H. (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:381-407.
- Woolley, LC., James, DJ. y Manning, K. (2001). Purification and properties of an endo- β -1,4-glucanase from Strawberry and down-regulation of the corresponding gene, cell1. *Planta* 214: 11-21.
- Xu, P., Cai, X., Wang, Y., Xing, L., Chen, Q. Y Xiang, C. (2014). HDG11 upregulates cell-wall-loosening protein genes to promote root elongation in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 65: 4285-4295.
- Yoshida, K., Imaizumi, N., Kaneko, S., Kawagoe, Y., Tagiri, A., Tanaka, H., Nishitani, K. y Komae, K. (2006). Carbohydrate-binding module of a rice endo- β -1,4-glycanase, OsCel9A, expressed in auxin-induced lateral root primordia, is post-translationally truncated. *Plant Cell Physiol.* 47: 1555-1571.
- Yoshida, K. y Komae, K. (2006). A rice family 9 glycoside hydrolase isozyme with broad substrate specificity for hemicelluloses in type II cell walls. *Plant Cell Physiol.* 47: 1541-1554.
- Yu, L., Sun, J., y Li, L. (2013). PtrCel9A6, an endo-1,4- β -glucanase, is required for cell wall formation during xylem differentiation in Populus. *Mol. plant* 6: 1904-1917.
- Yung, M., Schaffer, R. y Putterill, J. (1999). Identification of genes expressed during early Arabidopsis carpel development by mRNA differential display: characterisation of ATCEL2, a novel endo-1,4- β -D-glucanase gene. *Plant J.* 17: 203-208.
- Zykwinska, A., Ralet M.C., Garnier, C., Thibault, J.F. (2005). Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol.* 139:396-407

8. ANEXO

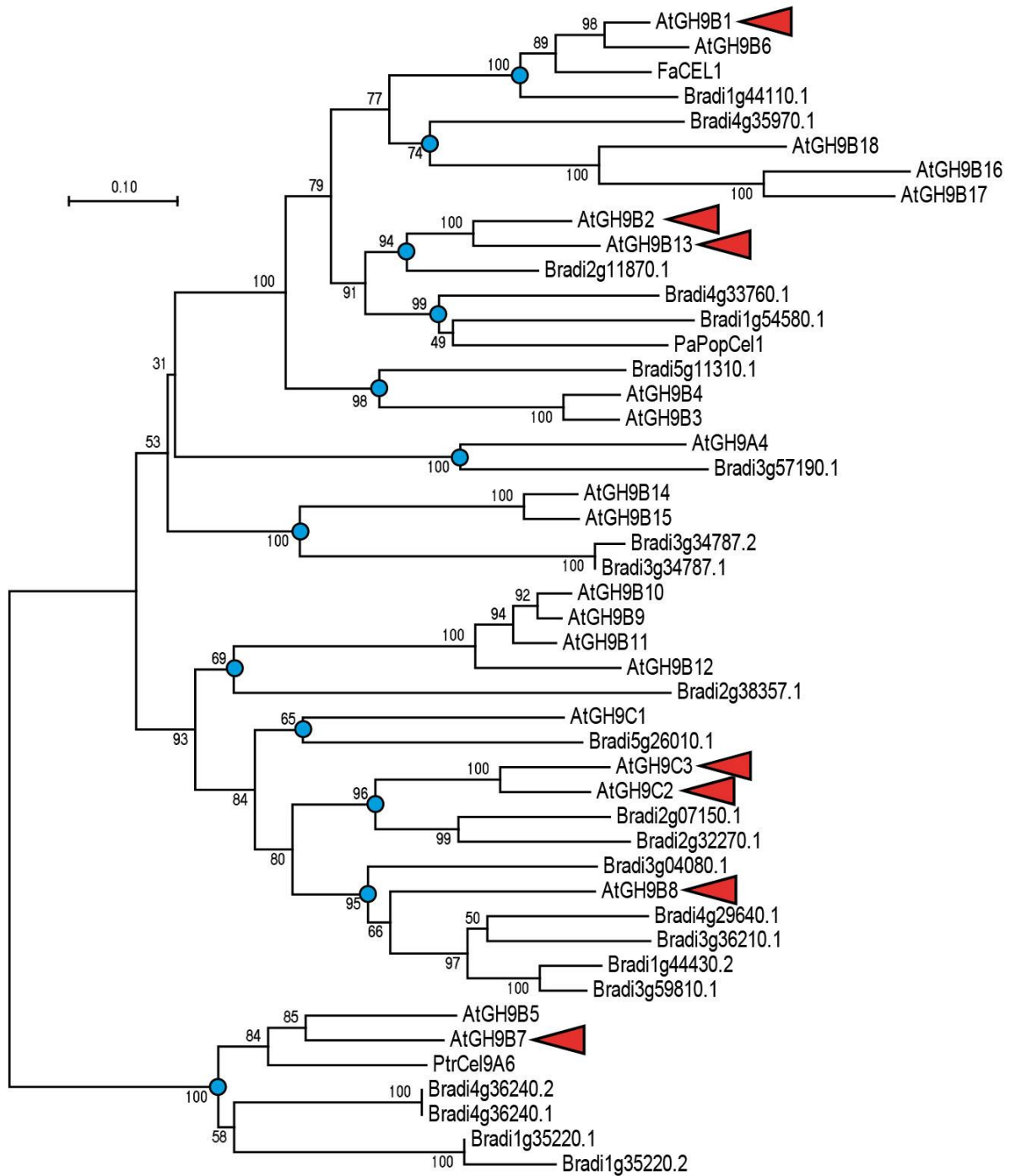


Figura 1. Árbol filogenético que describe la relación entre los genes de endoglucanasas de *Arabidopsis* y otras plantas. Fue creado por el grupo de investigación previamente al presente trabajo. Los triángulos rojos señalan los genes estudiados.

Tabla 1: Lista de todos los primers utilizados. Se especifican secuencias y temperatura de anillamiento (TA).

Nombre	Secuencia (5'-3')	TA (°C)
GH9B1 L1	ATTGCCTGGAATTTCTCACCCC	61
GH9B1 R1	AGAAGTAACCGAGAAGGCCAC	62
GH9B7 L1	GCTCGCTTTGCAGTTCTTCGAT	62
GH9B7 R1	AGCAACCTCTGTCCTGGAGTA	62
GH9B8 L1	TTGGCGTGATCACTCTGGTCTC	62
GH9B8 R1	TGGTGCAAGAGAAGGTGAGAGT	61
GH9C2 L2	CGTCGTCACCAACATTGTTTCGT	62
GH9C2 R1	AGGGTTAGATCGGCGGAAAACA	62
GH9C3 L1	GGTTCAACTTGCAATTCAGGGC	61
GH9C3 R1	ATGGATCAGAGCGACGGAAAAC	61
LBSKA	GATTCGGAACCACCATCAAAC	61
DSLOXLB	CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	61
HYGR L1	CACGGCCTCCAGAAGAAGATGT	65
HYGR R2	AATAGCTGCGCCGATGGTTTCTA	66

Tabla 2: Pares de primers utilizados para selección de mutantes y líneas de sobreexpresión y tamaños que muestran tras electroforesis en gel del producto de PCR.

Gen	Banda	Par de Primers	Tamaño de banda (pbs)
GH9B7	Silvestre	GH9B7 L1/GH9B7 R1	600
	Mutante	GH9B7 L1/LBSKA	500
GH9B8	Silvestre	GH9B8 L1/GH9B8 R1	750
	Mutante	GH9B8 R1/DSLOXLB	300
GH9C2	Silvestre	GH9C2 L2/GH9C2 R1	600
	Mutante	GH9C2 L2/LBSKA	600
GH9C3	Silvestre	GH9C3 L1/ GH9C3 R1	1000
	Mutante	GH9C3 R1/LBSKA	300
GH9B1	Silvestre	GH9B1 L1/ GH9B1 R1	800
	Sobreexpresión	HYGR L1/ HYGR R2	560

Tabla 3: Lista de mutantes de inserción de T-DNA y localización de la mutación dentro de los respectivos genes.

Mutante	Código	Localización
gh9b1	SALK_147379	Exón 7
gh9b7	SALK_148749	Exón 2
gh9b8	WiscDsLox377-380F12	Exón 2
gh9b13	SALK_045908	Exón 4
gh9c2	SALK_063722	Exón 2
gh9c3	SALK_059190	Exón 3

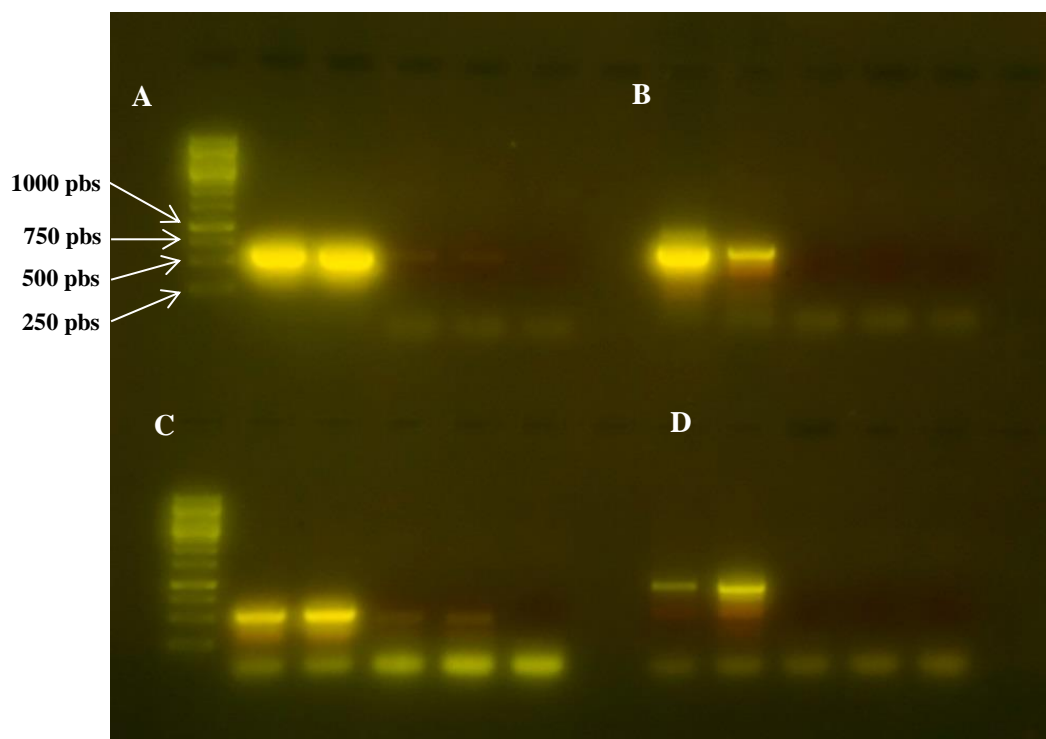


Figura 2. Resultados de la selección por PCR del mutante cuádruple *gh9b7 gh9b8 gh9c2 gh9c3*. Los dos primeros pocillos de cada conjunto contienen ADN procedente de plantas de tipo silvestre, los dos siguientes ADN del cuádruple y el último un control negativo. Se utilizaron los primers para las siguientes bandas: GH9B7 silvestre (A); GH9B8 silvestre (B), GH9C2 silvestre (C) y GH9C3 silvestre (D). A la izquierda se indican los tamaños del marcador molecular.