



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Estudio de la variabilidad genética inducida por el genotipo mutador de cloroplastos de la cebada a través de la técnica de TILLING**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Franco Daniel A. Lencina**

Directores de tesis: Ing. Agr. Ms. Sci. Alberto Raúl Prina

Dr. Ken Kobayashi

Consejero de estudios: Dra. Sara Maldonado

Lugar de trabajo: Instituto de Genética "Ewald A. Favret", CICVyA-CNIA-INTA

Laboratorio de Agrobiotecnología, Grupo Biología Molecular Vegetal Aplicada, Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada, IBBEA-CONICET, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Buenos Aires, 15-11-2018

## Estudio de la variabilidad genética inducida por el genotipo mutador de cloroplastos de la cebada a través de la técnica de TILLING

### RESUMEN

El aislamiento de mutantes inducidas en el plastoma a partir de tratamientos con mutágenos químicos y/o físicos es muy poco exitoso. El genotipo mutador de los cloroplastos de la cebada (*cpm*) es único en monocotiledóneas por inducir un amplio espectro de mutantes clorofílicas de herencia materna. Estas plantas mutantes se producirían por el mal funcionamiento de una proteína codificada por un gen nuclear desconocido involucrado en la reparación del plastoma. Hasta el momento, se pudieron identificar pocos cambios moleculares inducidos por *cpm* mediante el estudio de genes candidatos del plastoma. Así, se identificaron cambios puntuales como sustituciones e indels de una base en intrones y regiones codificantes de proteínas. Para lograr la dilucidación del sistema de reparación y/o del gen nuclear implicado en la inestabilidad genómica existente en *cpm*, se consideró necesaria la identificación de una mayor cantidad de cambios moleculares a nivel del plastoma en las plantas *cpm*. Se implementó una estrategia de genética reversa de búsqueda de mutantes y detección de cambios moleculares en el ADN conocida como TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes). Mediante la adaptación del TILLING al plastoma (cpTILLING), se analizaron 184 plántulas *cpm* pertenecientes a dos grupos con diferente número de generaciones de autofecundación y que presentaban deficiencias clorofílicas y/o cambios morfológicos. Se analizaron 33 genes y algunas regiones intergénicas. Se detectaron principalmente cambios puntuales: sustituciones (mayoritariamente transiciones) e indels de una o dos bases en microsatélites (repeticiones de mononucleótidos) y en menor medida indels de mayor tamaño (indels grandes) que tuvieron repeticiones directas en sus extremos. Estas repeticiones indicarían a la recombinación ilegítima como la causa de producción de los indels grandes. Por otro lado, la variabilidad detectada en uno de los genes analizados, el gen *rp123*, sería mejor explicada por la existencia de recombinación ilegítima aumentada entre este gen y una versión no funcional del mismo, el pseudogen *rp123*, que por la producción de mutaciones. La identificación de cambios puntuales, en especial la presencia de indels en microsatélites, y la identificación de eventos de recombinación ilegítima, conforman un escenario que es concordante con el espectro de cambios esperable por fallas en el sistema de reparación de *mismatch repair* direccionado al cloroplasto. El *cpm* se muestra como una buena herramienta para el estudio de la reparación del ADN del cloroplasto y para la generación de variabilidad en el plastoma de la cebada.

Palabras clave: plastoma, mutaciones inducidas, genotipo mutador de cloroplastos de la cebada (*cpm*), TILLING, recombinación, *mismatch repair*.

## Study of the variability induced by the barley chloroplast mutator genotype through a TILLING assay

### SUMMARY

Isolation of plastome mutants induced by chemical and/or physical agents has not been successful. The barley chloroplast mutator genotype (*cpm*) is the only one in monocots inducing a wide spectrum of chlorophyll mutants with maternal heredity. These mutants would originate from the malfunction of a protein encoded by an unknown nuclear gene involved in chloroplast DNA repair. Until now, the identification of molecular changes induced by *cpm* has been done in a few cases by the postulation of plastid candidate genes. Substitutions and indels of one base were identified in protein coding gene regions and introns. With the aim of knowing the gene involved in the generation of *cpm* genome instability, the identification of more plastome molecular changes in *cpm* plants was considered necessary. The strategy chose for the detection of DNA molecular changes and mutants was TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes). TILLING adapted to the plastome (cpTILLING) was applied on 184 *cpm* seedlings with chlorophyll deficiencies and morphological changes coming from two groups with different number of self-pollination generations. Thirty three genes and some intergenic regions were analyzed. Substitutions (mostly transitions) and indels of one or two bases in microsatellites (mononucleotide repetitions) were mainly identified and to a lesser extent, cases of larger indels (big indels) carrying direct repeats were also identified. The presence of direct repeats would indicate illegitimate recombination as the cause of these big indels. On the other hand, the variability observed in one of the analyzed genes, the *rpl23* gene, would be better explained by illegitimate recombination between this gene and its nonfunctional version, the *rpl23* pseudogene, than by the occurrence of mutations. The identification of point mutations, especially indels in microsatellites, and the identification of illegitimate recombination events constitute a landscape that is coincident with the spectrum produced by the malfunction of the mismatch repair system targeted to the chloroplast. The *cpm* seems to be an interesting tool to study the chloroplast DNA repair and to generate variability in the barley plastome.

Key words: plastome, induced mutations, barley chloroplast mutator genotype (*cpm*), TILLING, recombination, mismatch repair system.

Parte de los resultados presentados en esta tesis se encuentran publicados en el siguiente trabajo:

“Plastome Mutations and Recombination Events in Barley Chloroplast Mutator Seedlings”.  
Landau A., Lencina F., Pacheco M.G., Prina A.R. (2016). J. Hered. 107(3): 266-73. Epub  
2016 Jan 16.

## **AGRADECIMIENTOS**

Muchas son las personas que en diferentes maneras hicieron posible la realización de mi tesis doctoral, personas que contribuyeron con mi crecimiento profesional y personal, y que me acompañaron en esta etapa que está finalizando...

Alberto Prina, Gabriela Pacheco y Alejandra Landau, quienes idearon este proyecto y luego confiaron en mí para realizarlo.

Ken Kobayashi, quien me aconsejó amablemente a lo largo del desarrollo de la tesis.

Mis compañeras de grupo de mutaciones inducidas y mis compañeros del IGCAF, quienes me ofrecieron su ayuda cada vez que la necesité.

Mi familia que siempre me acompaña.

Gracias a todos ustedes por ayudarme a realizar esta tesis doctoral.

Franco

## ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
El cloroplasto: función, estructura y origen	2
Características del genoma de los cloroplastos o plastoma	3
La genética de los cloroplastos	5
Inducción de mutaciones en el plastoma	6
<i>cpm</i> , el genotipo mutador de cloroplastos de la cebada	7
El TILLING como herramienta de la genética reversa	9
Etapas del TILLING y sus variantes	11
cpTILLING en cebada para la identificación de mutaciones en el genoma de los cloroplastos de plantas <i>cpm</i>	13
<u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	15
<u>OBJETIVOS GENERALES</u>	15
<u>CAPÍTULO 1: cpTILLING en plántulas <i>cpm</i></u>	16
INTRODUCCIÓN	17
OBJETIVO PARTICULAR	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Material Vegetal	18
Extracción de ADN	20
Amplificaciones por PCR y búsqueda de mutaciones mediante digestión con CJE: cpTILLING	20
Análisis <i>in silico</i> de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a los amplicones analizados	24
RESULTADOS	25
Identificación de cambios moleculares en el plastoma <i>cpm</i>	25
Análisis <i>in silico</i> de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a los amplicones estudiados	38

DISCUSIÓN	41
cpTILLING como estrategia para la detección de cambios moleculares en el plastoma de cebada	41
El plastoma como genoma molde: Análisis de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a las secuencias de los amplicones analizados	42
Espectro de las mutaciones inducidas por <i>cpm</i> identificadas mediante cpTILLING	42
Posibles causas de los cambios puntuales identificados en los plastomas <i>cpm</i>	44
<i>cpm</i> como herramienta de generación de variabilidad en el plastoma de cebada	46
CONCLUSIONES	47
<u>CAPITULO 2: Análisis del gen y del pseudogen <i>rp123</i></u>	48
INTRODUCCIÓN	49
OBJETIVOS PARTICULARES	49
MATERIALES Y METODOS	50
Material Vegetal	50
Extracción de ADN	50
Análisis del gen y del pseudogen <i>rp123</i> mediante digestiones con CJE	50
Determinación de los polimorfismos respecto de la línea salvaje en el gen y pseudogen <i>rp123</i> mediante secuenciación	52
Extracción de proteínas de cloroplastos y western blot	52
Análisis <i>in silico</i> de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a los amplicones <i>rp123</i> y pseudogen <i>rp123</i>	53
RESULTADOS	54
Análisis de los polimorfismos en el gen <i>rp123</i> de plántulas <i>cpm</i>	54
Búsqueda de cambios moleculares en el pseudogen <i>rp123</i> de plántulas <i>cpm</i>	57
Búsqueda de cambios moleculares en el gen y el pseudogen <i>rp123</i> de plántulas de las poblaciones control	60

Determinación del estado de homoplasma o heteroplasma de las variantes genéticas presentes en el gen y en el pseudogen <i>rpl23</i> de las plántulas <i>cpm</i>	60
Análisis de las consecuencias de los polimorfismos en el gen <i>rpl23</i>	61
Análisis por western blot de la síntesis de las proteínas RbcL y CpRecA en plántulas albinas portadoras de DelG133 en <i>rpl23</i> y plántulas verdes sin la delección	63
Comparación de las secuencias salvajes del gen y el pseudogen <i>rpl23</i> de cebada	64
Coexistencia de polimorfismos en el gen y en el pseudogen <i>rpl23</i> en una misma plántula	65
Análisis <i>in silico</i> de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a los amplicones <i>rpl23</i> y pseudogen <i>rpl23</i>	66
DISCUSIÓN	67
El gen y el pseudogen <i>rpl23</i> son altamente polimórficos en plántulas de cebada <i>cpm</i>	67
Origen de los polimorfismos detectados en el gen y el pseudogen <i>rpl23</i>	68
La diversidad y la frecuencia de las variantes genéticas son diferentes entre el gen y el pseudogen <i>rpl23</i>	69
Las plántulas <i>cpm</i> poseen una tasa de recombinación aumentada que podría explicarse por fallas en la actividad de antirecombinación	74
Posibles efectos sobre la funcionalidad del gen <i>rpl23</i> como consecuencia del mal funcionamiento de la proteína codificada por el gen <i>cpm</i> y de la recombinación alterada	76
<i>cpm</i> como herramienta para el estudio de la recombinación en los cloroplastos y como posible herramienta biotecnológica	77
CONCLUSIONES	78
<u>CAPÍTULO 3: Análisis de indels grandes</u>	79
INTRODUCCIÓN	80
OBJETIVOS PARTICULARES	80

MATERIALES Y MÉTODOS	81
Plántulas <i>cpm</i> portadoras de indels grandes en el plastoma	81
Búsqueda de nuevas deleciones grandes en regiones del plastoma conteniendo repeticiones directas	81
Análisis de secuencias salvajes y secuencias portadoras de indels grandes	81
Análisis de los efectos moleculares y fenotípicos de la deleción en el gen <i>psbA</i>	82
RESULTADOS	84
Detección de plántulas portadoras de indels grandes mediante digestión con CJE	84
Búsqueda de deleciones grandes en regiones del plastoma conteniendo repeticiones directas	88
Análisis de la deleción en el gen <i>rps3</i>	89
Análisis de los efectos moleculares y fenotípicos de la deleción en el gen <i>psbA</i>	90
DISCUSIÓN	95
Características de los indels grandes identificados y su mecanismo de producción	95
Desaparición de los heteroduplexos durante las digestiones con CJE	99
Efectos de las deleciones grandes presentes en los genes <i>psbA</i> y <i>rps3</i>	99
CONCLUSIONES	101
<u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	102
Postulación de fallas en el sistema de reparación de ADN del tipo <i>mismatch repair</i> como la causa de los cambios moleculares identificados en el plastoma de las plántulas <i>cpm</i>	103
Perspectivas: análisis de los genes que forman parte del <i>mismatch repair</i> de cebada como estrategia para la identificación del gen <i>cpm</i>	111
<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	113
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	116
ANEXO I. Plántulas <i>cpm</i> de grupos A y B.	129
ANEXO II. Plántulas de los grupos control.	130

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## **El cloroplasto: función, estructura y origen**

El cloroplasto es la organela subcelular que le permite a las plantas convertir la energía de la luz en energía química mediante la fotosíntesis, proceso fundamental para el flujo de energía de la cadena alimentaria. Además, en el cloroplasto se producen otras actividades metabólicas esenciales como la síntesis de pigmentos, almidón, ácidos grasos, hormonas y aminoácidos (Neuhaus y Emes, 2000).

Los cloroplastos son un tipo especializado de plástido, de la misma manera que lo son los amiloplastos, los cromoplastos y los leucoplastos. Todos los plástidos derivan de los proplástidos que existen en las células indiferenciadas de los meristemas (Waters y Pike, 2005). La capacidad de los cloroplastos para fijar la luz radica en que poseen un sistema de membranas altamente organizado llamado tilacoides, en donde se ubican complejos proteicos y pigmentos fotosintéticos como la clorofila, que le brinda la coloración verde a las plantas. Las membranas tilacoides derivan de la membrana interna, la cual junto con la membrana externa forman la envoltura doble membrana que caracteriza a los cloroplastos. Las tilacoides están compuestas por vesículas chatas que contienen un espacio interno denominado lumen y que pueden estar aisladas (lamela del estroma) o apiladas (en grana) (Pribil et al., 2014). El espacio suborganelar ubicado entre las tilacoides se denomina estroma y es allí en donde ocurren las reacciones de la fotosíntesis que no dependen de la luz, es decir, la fijación del carbono.

Según la teoría endosimbiótica (Kutschera y Niklas, 2005), los cloroplastos derivan de un antecesor procariota con capacidad fotosintética, como las cianobacterias, que fue fagocitado por un huésped pre-eucariota al que se incorporó establemente. Durante el transcurso de la evolución se estableció una relación simbiótica entre estos organismos, en la cual la combinación de las capacidades metabólicas benefició a ambos. Una consecuencia de este proceso de simbiosis fue la transferencia de genes desde el genoma del antecesor del cloroplasto hacia el genoma de la célula huésped, constituyéndose el actual genoma nuclear de la célula vegetal. Debido a esto, muchas de las proteínas que forman parte estructural de los cloroplastos, como por ejemplo los complejos fotosintéticos de las tilacoides, se encuentran codificadas en el núcleo. Esta transferencia de genes también impuso una muy fina regulación de la expresión entre los genes residentes en los cloroplastos y los genes residentes en el núcleo que codifican proteínas direccionadas al cloroplasto (Susek y Chory, 1992; Hess et al., 1994; Vothknecht y Westhoff, 2001; Strand et al., 2003; Woodson y Chory, 2008). Por el contrario, la ganancia de genes por parte del plastoma corresponde a eventos excepcionales durante la evolución de las plantas (Wicke et al., 2011).

## Características del genoma de los cloroplastos o plastoma

Los nucleoides son las regiones en los estromas en donde se ubican entre 10 y 20 moléculas de ADN junto con ARN y proteínas (Sakai et al., 2004; Krupinska et al., 2013). Debido a la existencia de varios cloroplastos por célula y de varios plastomas por cloroplasto, se calcula que una sola célula vegetal puede tener hasta 10.000 copias del plastoma, es decir que el cloroplasto es altamente poliploide. Clásicamente se pensó al plastoma como una molécula circular, pero más recientemente se identificaron estructuras multimericas más complejas tanto circulares como lineales y también ramificadas (Rochaix, 2006; Oldenburg y Bendich, 2015).

Debido a la transferencia de genes al núcleo, el plastoma redujo su tamaño en comparación con los genomas de las cianobacterias. En general, los plastomas poseen un tamaño de entre 120 y 160 kb (Palmer, 1985; Sugiura, 1992) y en la mayoría de las especies de angiospermas consta de tres regiones. Dos de estas regiones son de copia simple, una mayor (LSC) y otra menor (SSC), y la tercera región consta de dos segmentos repetidos que se encuentran invertidos (IR<sub>A</sub> e IR<sub>B</sub>) y que poseen un tamaño promedio de aproximadamente 25 kb.

El plastoma combina características de los genomas procariotas y eucariotas. Son genomas pequeños ricos en AT, con una alta densidad de genes y bajo contenido de secuencias no codificantes. Muchos de estos genes se organizan en operones que producen transcritos policistrónicos. Algunos genes poseen intrones y sus transcritos sufren *splicing*. En ciertos genes el ARN sufre *editing*, proceso por el cual algunos residuos de citosina se convierten en uracilo de manera que la información contenida en ese ARNm es cambiada. La comparación de la secuencia de los plastomas entre diferentes especies de plantas demuestra que son genomas conservados, que presentan una baja tasa de cambios puntuales y con disposición lineal de los genes (sintenia) sobre todo en las angiospermas (fig. I.1). Ciertas regiones del plastoma muestran mayor tendencia a la variación entre especies, como por ejemplo la región de unión entre las IRs y la LSC (Wang et al., 2008) y también la región comprendida entre los genes *psaI* y *rbcL* en la LSC (Ogihara et al., 1991), en donde se producen principalmente mutaciones que se denominan de longitud (inserciones y deleciones). En angiospermas se han encontrado además alteraciones estructurales como inversiones y translocaciones (Ogihara et al., 2002).

Los genes contenidos en el plastoma se pueden clasificar en tres grupos. Dos grupos de genes codifican proteínas del aparato fotosintético o de la maquinaria de traducción de los cloroplastos. En el tercer grupo se ubican los genes que tienen una función que no encaja en los dos primeros grupos, como *cemA* (incorporación de CO<sub>2</sub>), *clpP* (proteasa), *matK* (*splicing*) y *ccsA* (biogénesis del citocromo C).

El genoma del cloroplasto de la cebada cv. *Morex* (NC\_008590; fig. I.2) tiene 136 kb con dos IRs de 21 kb y contiene 113 genes, 79 codificantes de proteínas y 30 codificantes de ARNs de transferencia y 4 de ARNs ribosomales (Saski et al., 2007). De los 113 genes, 89 se ubican en 20 operones policistrónicos, mientras que los 24 restantes se transcriben monocistronicamente (Zhelyazkova et al., 2012).

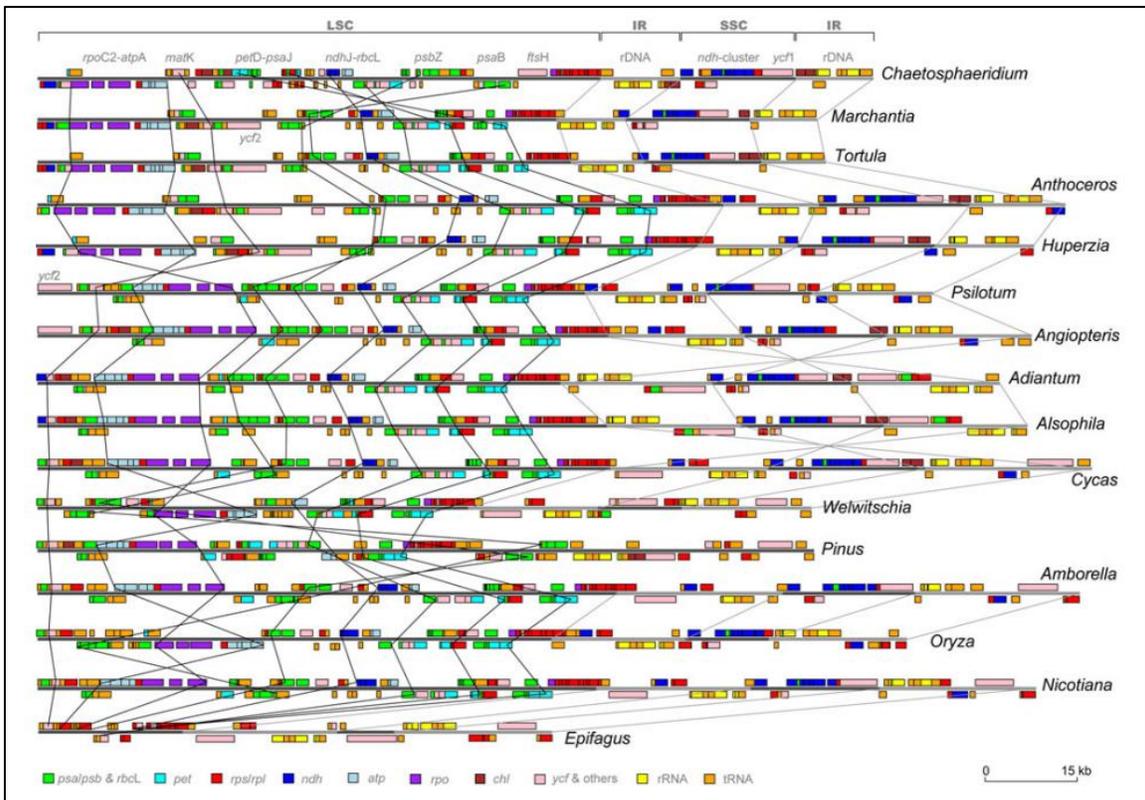


Fig. I.1. Comparación de los plastomas de plantas mostrando sintenia. Se indican las repeticiones invertidas (IRs), la región simple copia grande (LSC) y la región simple copia pequeña (SSC).

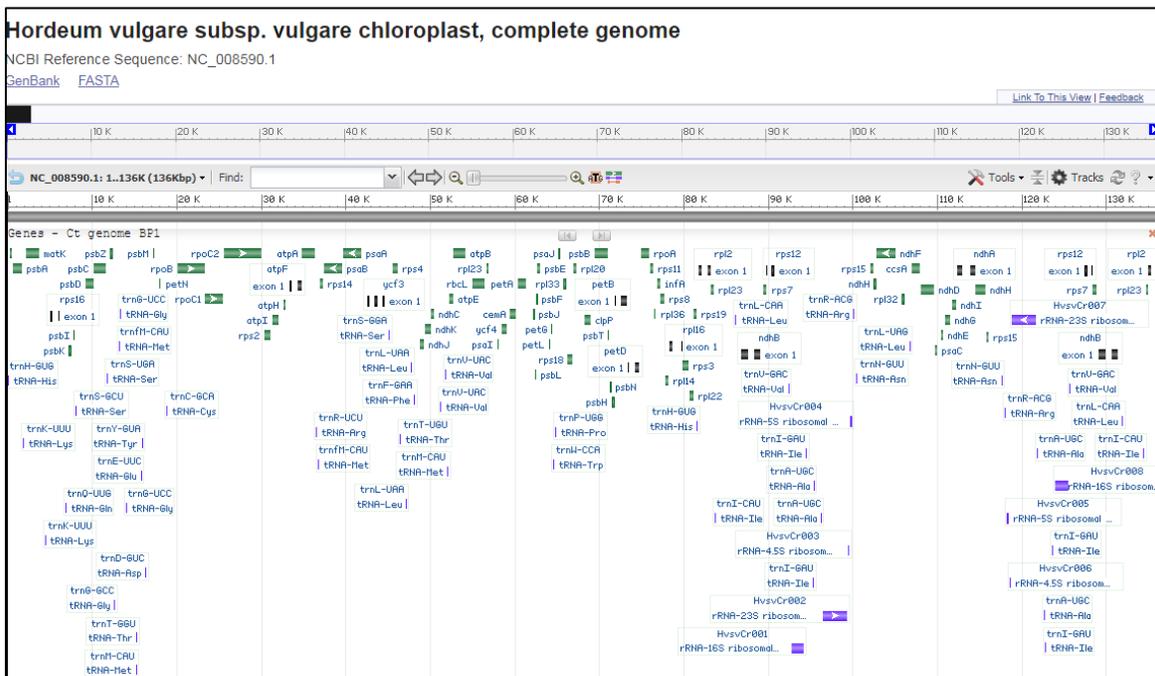


Fig. I.2. Representación gráfica del plastoma de cebada depositado en el NCBI (NC\_008590).

## La genética de los cloroplastos

La existencia de material genético en los cloroplastos y las mitocondrias da origen a una herencia que se conoce como citoplásmica (Correns, 1909; Baur, 1909; Hagemann, 2010) y que corresponde a un caso de herencia no mendeliana (Kuroiwa, 2010).

La herencia citoplásmica se caracteriza por presentar diferencias en las progenies provenientes de los cruzamientos sexuales recíprocos en función del sentido del cruzamiento. En general, la herencia de los cloroplastos y las mitocondrias es uniparental. La proporción de angiospermas con herencia materna de los plástidos es del 80%, teniendo el resto de las especies herencia biparental. En los cloroplastos además, no se pudo demostrar la existencia de recombinación sexual entre los dos plástidos parentales incluso en especies con herencia biparental. Esto es así en parte, por la ausencia de recombinación homóloga de los ADNs ubicados en diferentes cloroplastos debido a que la fusión de los cloroplastos es muy infrecuente (Gillham et al., 1991; Kuroiwa, 1991).

Las mutantes del plastoma fueron las principales herramientas para la determinación de las reglas de la herencia de los plástidos y de la herencia citoplásmica (Greiner, 2012). Estas mutantes se identificaron clásicamente por presentar deficiencias en la síntesis de clorofila (deficiencias clorofilicas). Las mutantes con deficiencias clorofilicas pueden ser sólidas o variegadas. Las mutantes variegadas pueden ser clonales, las cuales poseen sectores con diferentes pigmentaciones debido a las diferencias genéticas existentes entre los clones celulares que dieron origen a los tejidos de la planta. También pueden ser posicionales, que son el resultado de expresión diferencial según la posición que ocupa la célula y a diferencia de las clonales no se deben a diferencias genéticas entre ellas (Prina et al., 2012a). Mutaciones en el genoma nuclear o mitocondrial también pueden causar variegaciones.

La poliploidia de los cloroplastos permite la existencia de plastomas con secuencias diferentes tanto dentro de un mismo cloroplasto como en cloroplastos distintos de una misma célula o de una misma planta. A esta situación se la conoce como heteroplasmia. Durante las divisiones celulares, los cloroplastos se reparten de manera azarosa a las células hijas. Luego de varias generaciones, las células heteroplásmicas tienden a desaparecer. De esta manera, se forman linajes celulares conteniendo plastomas con un único genotipo. A este proceso se lo conoce como *sorting out* (Hagemann, 1964; Kirk y Tilney-Bassett, 1978; Birky, 2001) y esta segregación somática contribuye tanto a la obtención de tejidos homoplásmicos en plantas variegadas, como a la obtención de plantas mutantes sólidas enteramente homoplásmicas desde células que en su principio fueron heteroplásmicas.

En una planta monocotiledónea como la cebada, los patrones de variegación clonal en las hojas corresponden a estrías clorofilicas longitudinales, ya que los diferentes clones celulares crecen en paralelo al eje longitudinal de la hoja (Kirk y Tilney-Bassett, 1978). Por otro lado, en el caso de la cebada la herencia de los plástidos es estrictamente materna (Tsuchiya, 1987; Mogensen, 1996).

## Inducción de mutaciones en el plastoma

Las mutaciones en el plastoma pueden ocurrir espontáneamente o se pueden inducir mediante agentes químicos y/o físicos, aunque en ambos casos ocurren en mucha menor frecuencia que para el genoma nuclear. Se calculó que la tasa de mutación espontánea de los plastomas es dos veces menor que la existente en el genoma nuclear (Wolfe et al., 1987).

La menor tasa de mutación espontánea del plastoma respecto del núcleo y la dificultad para inducir mutaciones en el mismo, podrían ser consecuencia de la existencia de mecanismos muy eficientes de reparación del ADN del cloroplasto, aunque poco se conoce sobre los mecanismos existentes en el cloroplasto en comparación con los del núcleo. En este sentido, se postuló que el principal papel de la recombinación en los cloroplastos sería el de la reparación del ADN y posiblemente intervendría en la replicación del ADN bajo estrés genotóxico más que en la generación de variabilidad (Cerutti et al., 1995). Por otro lado, la obtención de mutantes del plastoma con mutágenos se vio dificultada por la inducción simultánea de mutaciones en el genoma nuclear, es decir, por la falta de metodologías de mutagénesis dirigidas solamente al plastoma.

La dificultad de los agentes químicos para generar variabilidad en el plastoma puede ser superada mediante la inducción de las mutaciones por genes nucleares denominados genes mutadores. Estos genes provocan una tasa de mutaciones mayor que la espontánea y se trataría de genes implicados en el mantenimiento de la integridad del plastoma. Por este motivo, estos genes mutadores permitirían inducir mutaciones específicamente en el plastoma. Por otro lado, la generación de mutantes mediante la transformación de los cloroplastos representa una alternativa a la mutagénesis pero esto es posible en pocas especies. Pese a esto, los mayores avances en genética del plástido se han logrado mediante el noqueo de genes a través de la transformación de los cloroplastos.

Se ha reportado una serie de genes mutadores cuyos espectros de inducción de mutantes con herencia citoplásmica se pueden clasificar como amplios o estrechos (Prina et al., 2012b). Existe un grupo de genes mutadores que afectarían directamente la integridad de los plastomas, aunque esto ha sido probado en pocos casos. Otro grupo de genes mutadores afectarían la funcionalidad de los cloroplastos de manera indirecta, sin afectar el plastoma. Entre los mutadores del primer grupo se destacan *chm* en *Arabidopsis thaliana* que tiene afectado el gen *MSH1* del sistema de reparación de ADN de *mismatch repair* y *plastome mutator* en *Oenothera elata ssp. hookeri*, en donde se comprobó la inducción de mutaciones en el plastoma. Entre los mutadores del segundo grupo se destacan *iojap chloroplast mutator* en *Zea mays* y *albostrians* en *Hordeum vulgare* (Greiner, 2012). Entre las mutantes del plastoma obtenidas se pueden citar ejemplos con funciones génicas alteradas, con tolerancia a antibióticos, con resistencia a herbicidas (Greiner, 2012) y mayor tolerancia a estrés por alta temperatura en girasol (Usatov et al., 2004; Mashkina et al., 2010). Algunas mutantes tuvieron defectos cloróticos, defectos en el desarrollo y sensibilidad al medio ambiente (Kirk y Tilney-Bassett, 1978; Stubbe y Herrmann, 1982; Landau et al., 2007; Colombo et al., 2008; Landau et al., 2009; Hirao et al., 2009).

### ***cpm*, el genotipo mutador de cloroplastos de la cebada**

El genotipo mutador de cloroplastos de la cebada (*cpm*), es el único caso que induce un amplio espectro de mutantes clorofílicos de herencia citoplásmica en monocotiledóneas (Prina, 1992; Prina, 1996; Fig.1.3). En menor medida se observan también cambios morfológicos heredables y variaciones en el desarrollo (fig. 1.4).

El *cpm* se aisló a partir de familias con varias generaciones de autofecundación provenientes de un tratamiento mutagénico combinado de rayos X y azida sódica aplicado sobre semillas. La mutante original se aisló mediante la observación de deficiencias clorofílicas en generaciones  $M_4$ ,  $M_5$  y  $M_6$  (Prina, 1992). Análisis de cruzamientos recíprocos y retrocruzas demostraron que estas deficiencias se heredan citoplásmicamente y que se inducen por un gen nuclear recesivo. Además, una vez que las deficiencias se inducen, estas se expresan independientemente de la constitución nuclear.

La observación de plantas con variegación clonal en sucesivas generaciones avanzadas ( $M_4$ ,  $M_5$  y  $M_6$ ) luego de un tratamiento mutagénico aplicado sobre semillas de cebada, sugirió la existencia de un control ejercido por un gen nuclear de la inestabilidad genética responsable de dicha variegación. Después de un tratamiento mutagénico aplicado sobre semillas, suelen aparecer plantas variegadas clonalmente en la generación  $M_1$  (provenientes de la semilla sobre la que se hizo el tratamiento) como consecuencia de la generación de mutaciones que afectan al desarrollo del cloroplasto. Estas mutaciones se pueden ubicar en genes del núcleo, de los cloroplastos o de las mitocondrias. Luego en la  $M_2$  y en las sucesivas generaciones, de acuerdo a las leyes de la genética mendeliana que rigen los genes nucleares, solamente se esperaría obtener mutantes sólidas genéticamente homogéneas, es decir no quiméricas. Esto es así, debido a que todos los tejidos del soma derivan de un cigoto unicelular, ya sea normal o portando alguna mutación. En  $M_2$  o en posteriores generaciones, la presencia de plantas quiméricas con estrías somáticas longitudinales en monocotiledóneas (de las cuales las más visibles corresponden a sectores deficientes en clorofila) puede tomarse como una indicación de que se produjo un cambio genético que no corresponde a las leyes mendelianas. Estos cambios corresponderían a mutaciones que han ocurrido en las organelas del citoplasma: mitocondrias y cloroplastos, cuyo *sorting out* es más lento y menos predecible que el de mutantes en genes nucleares. También podría deberse a la inducción de mutantes que *per se* inducen nuevas mutaciones.

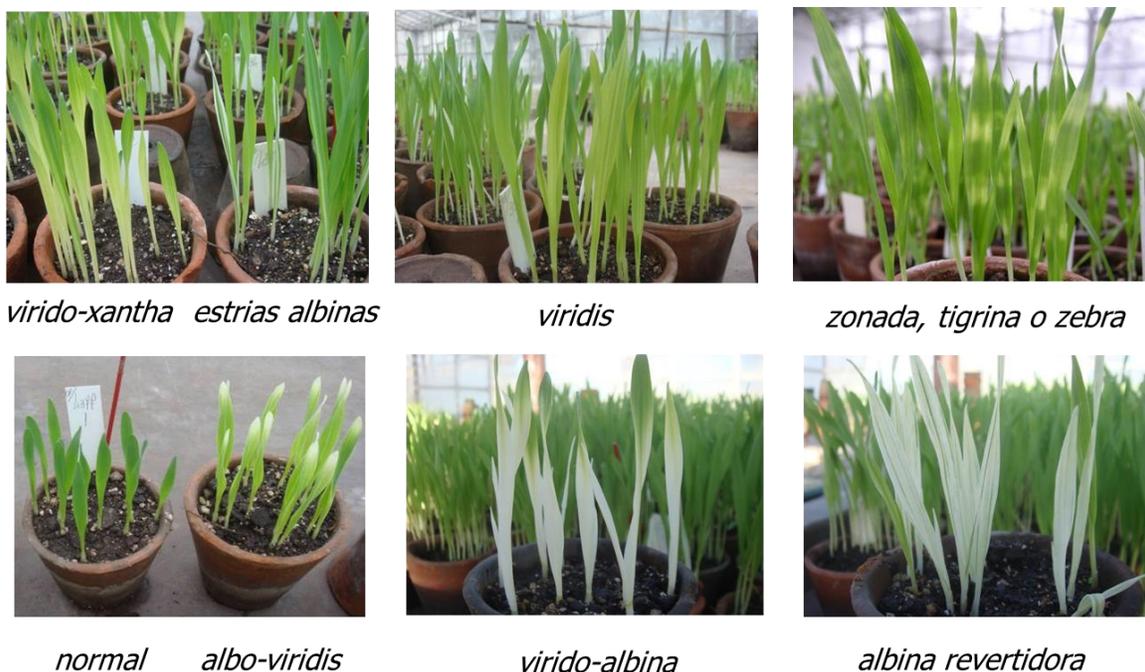
Debido a que la esterilidad es en general una consecuencia de la inestabilidad del genoma de las mitocondrias y en función de que en las plantas *cpm* no se observaba esterilidad, se postuló la existencia de inestabilidad en el genoma de los cloroplastos de las plantas *cpm*.

Varias líneas mutantes con diferentes deficiencias clorofílicas denominadas LCs (líneas citoplásmicas o de color) se aislaron a partir de plántulas *cpm*. Investigaciones sobre algunas de estas líneas permitieron la identificación a nivel molecular de las mutaciones presentes en el plastoma, aunque esto se logró en pocas LCs. Estas líneas fueron obtenidas por autofecundación de plantas *cpm* y luego cruzándolas como madre con plantas salvajes de manera de tener la

segregación del gen *cpm* en la generación F<sub>2</sub>. Esto permitió seleccionar familias en generaciones F<sub>3</sub>-F<sub>4</sub> con fenotipos clorofílicos estables, es decir, libres del genotipo mutador nuclear. Hasta el momento se identificaron los cambios moleculares en los casos de las líneas mutantes LC2 y LC3, en donde se identificaron cambios puntuales, es decir, sustituciones e indels de una base que se ubicaron en una región génica codificante de proteína en el caso de LC2 y en un intrón en el caso de LC3 (Landau et al., 2007; Landau et al., 2009). Por otro lado, otros estudios descartaron la existencia de grandes re-arreglos en el plastoma de varias LCs (Colombo et al. 2006). Es de destacar que también se obtuvo una línea tolerante a atrazina con una sustitución en el gen *psbA* del PSII que le brinda tolerancia a los herbicidas del grupo de las triazinas (Rios et al. 2003).

Debido a que hasta el momento solamente se conoce la base molecular de unas pocas mutaciones inducidas por *cpm*, la identificación de una mayor cantidad de mutaciones producidas por *cpm* sería necesaria para conocer su espectro de inducción de mutaciones con mayor exactitud.

**Deficiencias clorofílicas:** variaciones en la coloración de la hoja respecto del control.



*Virido-xantha*: coloración verde más claro en la punta de la hoja y coloración amarilla en la base. *Estrías albinas*: estrías longitudinales blancas que derivan de un clon celular. *Viridis*: coloración verde más claro que lo normal. *Tigrina*: variegación posicional en bandas transversales verde más claro. *Albo-viridis*: posee la punta de la hoja albina y la base de coloración verde más claro. *Virido-albina*: posee la punta de la hoja de color verde más claro y la base albina. *Albina revertidora*: albina con estrías de coloración verde normal.

Fig. 1.3. Plántulas *cpm* con deficiencias clorofílicas.

**Cambios morfológicos y variaciones en el desarrollo:** variaciones en la forma y en el desarrollo de las plántulas respecto del control.



menor tamaño



germinación retrasada

Las plántulas *cpm* pueden presentar un menor tamaño que las plántulas salvajes, como se puede ver en la fila de macetas de la derecha en la primera foto. Las plántulas *cpm* también pueden presentar variaciones en el desarrollo como la germinación retrasada, tal como puede observarse en el grupo de macetas de la derecha en la segunda foto.

Fig. 1.4. Plántulas *cpm* con cambios morfológicos y variaciones en el desarrollo.

### **El TILLING como herramienta de la genética reversa**

Desde la comprobación experimental de que las mutaciones se pueden inducir artificialmente (Muller, 1930; Stadler, 1930), gran parte del conocimiento de la genética de los organismos superiores se basó en estudios que utilizaron a las mutaciones inducidas en el análisis de las funciones de los genes. La genética reversa dentro de la genómica funcional, se basa en los estudios sobre las consecuencias en los fenotipos de las variaciones en las secuencias de los *loci*. La genética reversa ha constituido una alternativa al clásico estudio de los cambios moleculares que existen en el ADN de un individuo que se selecciona por un determinado fenotipo. En estos tiempos en donde el desarrollo de las plataformas de secuenciación masiva permite la disponibilidad de la secuencia de los genomas en un número cada vez mayor de especies, el desarrollo de las estrategias de genética reversa parece tomar cada vez mayor importancia. Esto es así, ya que se conoce la secuencia de la mayoría de los genes, pero la mayoría de los fenotipos que derivan de los cambios moleculares en los genes se desconocen.

La técnica de *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes* o TILLING tuvo su origen ante las limitaciones que tenía la estudiante de grado Claire McCallum con los métodos de genética reversa disponibles para *A. thaliana* hacia finales de la década de los 90. Las técnicas de RNA de interferencia o RNAi (Waterhouse et al., 1998) y mutagénesis insercional (Altmann et al., 1995; Martienssen, 1998; Speulman et al., 1999) constituían las estrategias más utilizadas para lograr mutaciones de pérdida de función en genes de interés. Sin embargo, estas estrategias resultaban ser laboriosas, poco efectivas, de aplicabilidad en un acotado número de especies y brindaban un espectro de mutaciones limitado.

La estrategia general diseñada por McCallum y colegas contempla una primera etapa de mutagénesis química tradicional, seguida por la búsqueda masiva de mutaciones puntuales mediante técnicas moleculares (McCallum et al., 2000; Henikoff et al., 2004; Tadele, 2016). La estudiante demostró la efectividad del TILLING para descubrir mutaciones en dos genes de cromometilasas durante el desarrollo del trabajo de su tesis (McCallum et al., 2000). El TILLING se puede aplicar a cualquier especie en la que se pueda desarrollar un protocolo de mutagénesis y permite obtener un amplio espectro de variabilidad. Por otra parte, los bajos costos asociados a la técnica y la sencillez del procedimiento permiten su aplicación en grupos de trabajo en donde no se dispone de grandes presupuestos.

El TILLING es una estrategia que se implementó en plantas y que luego se aplicó en animales como *Drosophila* (Cooper et al., 2008 a, b), *Zebrafish* (Moens et al., 2008) y rata (Smits et al., 2004). Las plantas autógamas con semillas son adecuadas para el TILLING debido a la capacidad de autofecundarse y debido a que las semillas se pueden almacenar por períodos largos de tiempo. Esto permite la búsqueda de mutantes en la misma población casi indefinidamente. En un comienzo, el TILLING se desarrolló para *A. thaliana* (McCallum et al., 2000) y luego se transfirió a otras especies de plantas, muchas de las cuales son cultivos económicamente importantes como los cereales (Weil, 2009) y las legumbres (Tadege et al., 2009). En muchos de estos cultivos, se desarrollaron plataformas de generación y búsqueda de mutantes en genes de interés mediante TILLING (Kurowzka et al., 2011; Tadele, 2016).

El proceso de mutagénesis del TILLING produce principalmente alelos con pérdida de función. Estos alelos son de gran importancia en la genómica funcional pero limitan el número de fenotipos producidos y el número de genes en que se puede aplicar la técnica en el mejoramiento de los cultivos (Wang et al., 2012). De todas formas, el número de cultivos en los cuales se ha aplicado TILLING ha ido en aumento desde su aparición en *A. thaliana*, lo que indica su efectiva utilización como una herramienta en el mejoramiento. Como prueba de esto último se pueden dar numerosos ejemplos de mutantes en cultivos con características mejoradas obtenidas mediante TILLING: resistencia a virus en tomate, reducción en la relación amilosa/amilopectina en cebada, alto contenido de amilosa en trigo, reducción en el contenido de alérgenos en maní, bajo contenido de ácido fitico en arroz, soja con alto contenido de ácido oleico y bajo contenido de ácido linoleico (Kurowzka et al., 2011; Tadele, 2016).

## Etapas del TILLING y sus variantes

El principio del TILLING es la detección de mutaciones, que en general son del tipo puntual, en *pools* de ADN provenientes de grandes poblaciones mutagenizadas. Luego de la detección de una mutante putativa en un *pool*, se realiza la apertura del mismo para la identificación del individuo portador de la mutación (Wang et al, 2012). Si bien el primer protocolo de TILLING realizado en *A. thaliana* por McCallum y colegas utilizó el agente alquilante EMS (metano sulfonato de etilo) para la generación de la población mutagenizada y DHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatograph*) para la detección de mutaciones en una región genómica de interés (fig. I.5), existen variantes tanto en el agente mutagénico como en la tecnología para la detección de las mutaciones que dieron origen a diversos protocolos de TILLING.

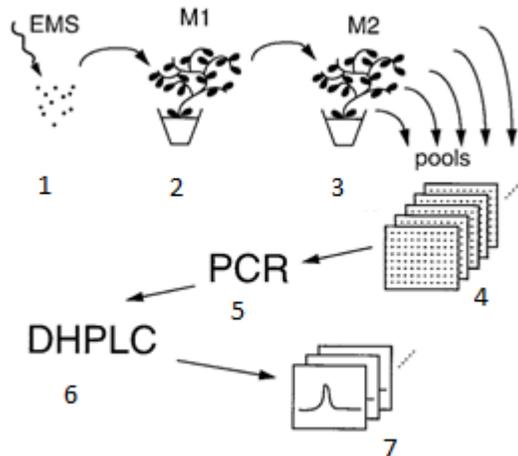


Fig. I.5. Etapas del TILLING.

1. Mutagénesis de las semillas  $M_0$
2. Autofecundación de la  $M_1$
3. Extracción de ADN de la  $M_2$  y obtención de las semillas  $M_3$
4. Armado de los *pools* de ADN
5. PCR sobre el gen en que se desea la variabilidad
6. Identificación de las mutaciones en los *pools* por DHPLC
7. Identificación del individuo portador de la mutación mediante secuenciación

Tomado y adaptado de McCallum et al., 2000.

Según el protocolo original, las mutaciones se buscan en los productos de la amplificación por PCR de las regiones genómicas en la que se desea tener variabilidad y luego se identifican mediante secuenciación. La primera modificación se realizó durante el desarrollo del servicio de TILLING en *A. thaliana* denominado ATP. En este servicio se utilizó EMS como agente mutagénico pero ante el complicado escalado de la metodología de DHPLC para la búsqueda de mutaciones, se implementó la utilización de endonucleasas que detectan y cortan los apareamientos erróneos o *mismatches* presentes en los heteroduplexos (Colbert et al., 2001). Estos *mismatches* se producen luego de forzar el apareamiento de dos cadenas de ADN que portan una variante polimórfica debido a la existencia de una mutación. Esto se logra agregando un paso de desnaturalización y renaturalización lenta al final de la PCR (Till et al., 2003). El servicio ATP empleó la endonucleasa CEL1 extraída de apio para la detección y digestión en los extremos 3' de los *mismatches* de los heteroduplexos formados a partir de los productos de PCR obtenidos con cebadores marcados fluorescentemente. Esto permite la detección de las digestiones en el sistema LI-COR® 4300 de electroforesis vertical de geles de poliacrilamida desnaturalizantes (fig. I.6).

Luego, la CEL1 fue reemplazada por un extracto de jugo de apio denominado CJE (*celery juice extract*) cuya extracción resultó menos laboriosa que la purificación de la CEL1. Se emplearon también geles de poliacrilamida no desnaturizantes teñidos con bromuro de etidio para la detección de las digestiones en lugar de las plataformas más caras como el LI-COR® (Uauy et al., 2009). También se utilizaron exitosamente otras enzimas como ENDO1 (Triques et al., 2008) y otros métodos de detección de mutaciones que no se basan en la digestión de los *mismatches* por endonucleasas como HRM o *High Resolution Melting* (Ririe et al., 1997; Gady et al., 2009; Parry et al., 2009).

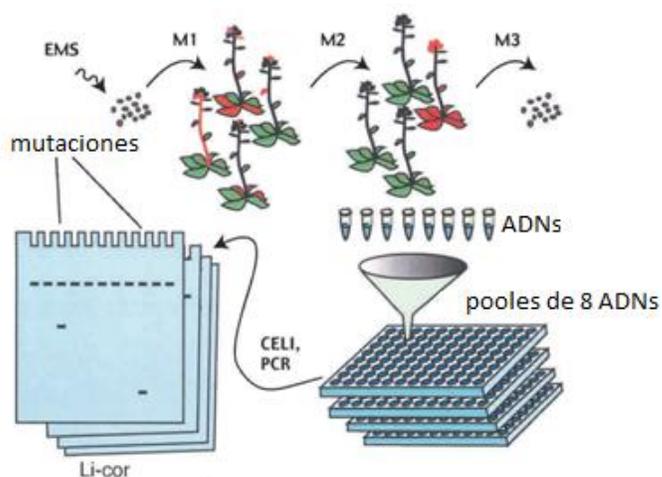


Fig. I.6. Modificaciones del TILLING.

DHPLC se cambió por digestión con CEL1 y electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida en Li-cor como método de detección de las mutaciones en los *pooles* de ADN en la plataforma ATP.

Tomado y adaptado de Till et al., 2003.

Las plataformas de secuenciación masiva también se introdujeron en la detección de mutaciones. El secuenciador de ADN Applied Biosystems™ 3730xl (Life Technologies, Applied Biosystems, Paisley, Escocia) se empleó para la detección de *mismatches* luego de la digestión con CJE de los productos de PCR marcados con fluoróforos provenientes de un población mutagenizada de medicago (Le Signor et al., 2009). Esta técnica luego se adoptó en la plataforma de TILLING denominada *REvGenUK*. En todas las variantes respecto del TILLING original que se mencionaron antes, la identificación a nivel molecular y la posición precisa de la mutación se realiza mediante secuenciación por el método Sanger del fragmento de PCR que porta dicha mutación. Las nuevas tecnologías de secuenciación (NGS o *next generation sequencing*) se han implementado más recientemente en la detección de mutaciones inducidas en las poblaciones de TILLING. Esto permitió el armado de *pooles* para el análisis de un mayor número de individuos que en los proyectos convencionales de TILLING y también el análisis de muchos genes al mismo tiempo. Las mutaciones se identifican directamente por la comparación de la secuencia de los posibles mutantes y de la línea control, evitándose la necesidad de realizar digestión con endonucleasas o el análisis de los productos de PCR por alguna otra técnica. La eficacia del denominado TILLING *by sequencing* (TbyS) en donde se utiliza un secuenciador Illumina® (Illumina Inc., San Diego, CA) se demostró en arroz y trigo (Tsai et al., 2011).

Debido a la disminución progresiva de los costos de la secuenciación masiva, se prevé una adopción cada vez mayor de la secuenciación, tanto de fragmentos como de los genomas completos, de los individuos que forman parte de las poblaciones mutagenizadas en los proyectos de TILLING. Por este motivo, se estima que la detección de las mutaciones en el futuro tenderá a hacerse *in silico*, es decir, por comparación de las secuencias dejando de hacerse como en sus comienzos por análisis de los productos de PCR (Wang et al., 2012).

### **cpTILLING en cebada para la identificación de mutaciones en el genoma de los cloroplastos de plantas *cpm***

Todos los proyectos de TILLING realizados hasta el momento radican en la determinación de la variabilidad inducida en el genoma del núcleo. La detección por TILLING de variabilidad en los genomas de las mitocondrias y de los cloroplastos solo se reportó una vez. Sin embargo, se hizo mediante una variante del TILLING conocida como Eco-TILLING, ya que se utilizó para la detección de variabilidad natural en *Brassica* (ORG-EcoTILLING; Zeng et al., 2012). En este trabajo se analizaron los genes del plastoma *accD*, *matk* y *rbcL* en 96 accesiones de *Brassica* y se identificaron nueve, seis y un polimorfismo, respectivamente.

En parte, la falta de proyectos de TILLING dirigidos al plastoma podría deberse a la dificultad que existe en mutagenizar eficientemente el genoma de las organelas. En este sentido, la mutante *cpm* (Prina, 1992; Prina, 1996) se presenta como una fuente de mutaciones muy promisorias para obtener variabilidad genética localizada en el plastoma debido a su capacidad de inducir mutantes de herencia materna. Esto significa la utilización de un mutágeno biológico en lugar de un mutágeno físico o químico. Las mutaciones que se identificaron hasta el momento en líneas mutantes derivadas de *cpm* (Rios et al., 2003; Landau et al., 2007, 2009, 2011) indican que *cpm* induciría mutaciones puntuales, el tipo de mutaciones indicado para su detección por TILLING.

Por otra parte, la identificación de una mayor cantidad de mutantes inducidas por el *cpm* permitirá conocer mejor el espectro de mutaciones y así postular mecanismos que expliquen la inestabilidad genética producida por el *cpm*.

La conjunción del *cpm* como fuente de variabilidad y de la metodología de detección de mutantes mediante digestiones con CJE de los productos de PCR a través de TILLING, permitirá el desarrollo de una herramienta poderosa para el estudio de la variabilidad potencial del plastoma de la cebada. Esta variabilidad puede luego utilizarse en estudios de genómica funcional o en el mejoramiento del cultivo.

En la figura 1.7 se esquematiza la estrategia general del manejo del material vegetal para el desarrollo del cpTILLING y en la figura 1.8 se esquematiza la forma en que se realiza la detección de las mutantes a nivel molecular.

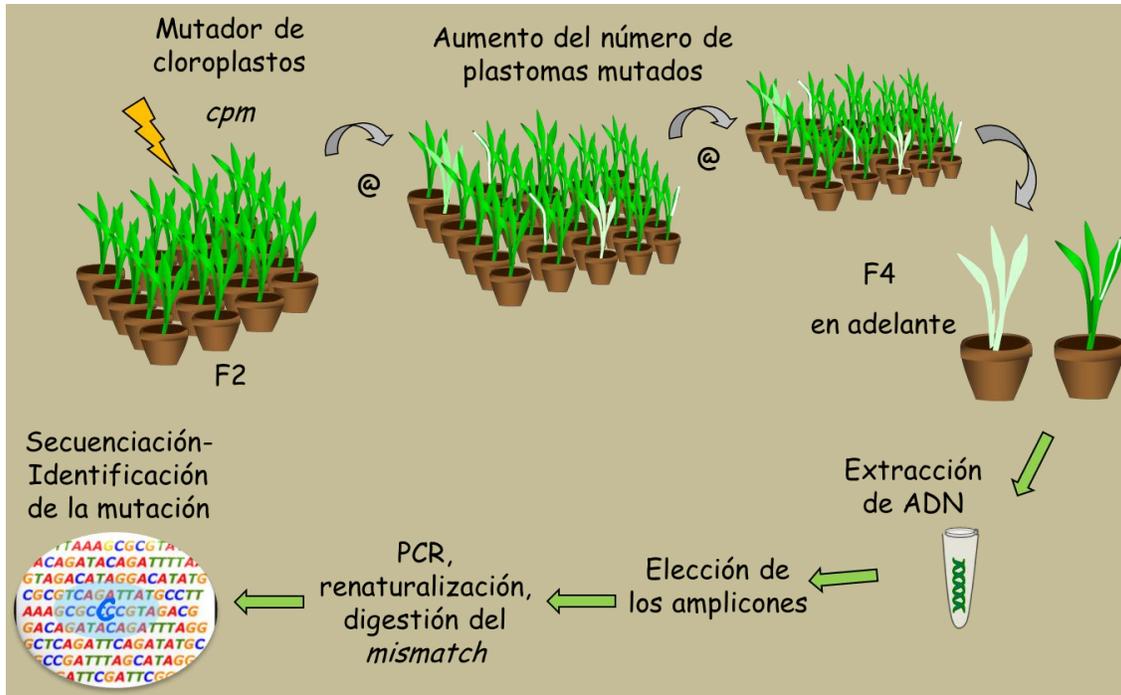


Fig. I.7. Estrategia del manejo del material vegetal en la adaptación de TILLING al genoma de los cloroplastos de las plántulas *cpm* (cpTILLING). Se analiza el ADN de plántulas con varias generaciones de autofecundación para aumentar la probabilidad de la detección de los cambios moleculares.

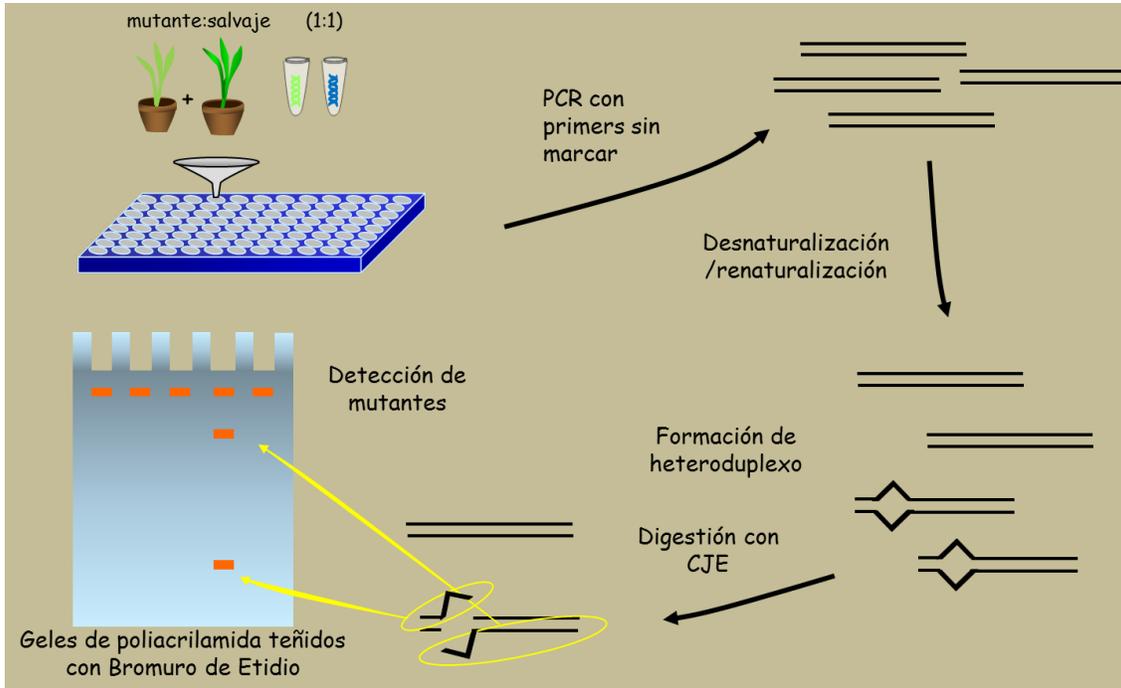


Fig. I.8. La detección de las mutaciones se realiza mediante la digestión con CJE de los productos de PCR obtenidos a partir de la mezcla de ADN de las plántulas *cpm* con ADN salvaje. Los cambios moleculares se identifican por secuenciación del ADN.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La metodología de TILLING adaptada al genoma de los cloroplastos (cpTILLING) permite detectar la ocurrencia de cambios moleculares en el plastoma.

La utilización de plantas *cpm* con muchas generaciones de autofecundación en el análisis por cpTILLING favorece la detección de variantes polimórficas a nivel del plastoma respecto de la línea control, debido a la acumulación de cambios moleculares en homoplasma.

El mejor conocimiento del espectro de cambios moleculares que ocurren en el plastoma de las plantas *cpm* aporta información importante para la postulación de genes nucleares candidatos para el gen *Cpm*.

## **OBJETIVOS GENERALES**

Analizar el plastoma de plántulas *cpm* mediante una adaptación de la metodología de TILLING (cpTILLING) para identificar polimorfismos, y así determinar el espectro de mutaciones inducidas por el mal funcionamiento de la proteína codificada por el gen nuclear afectado en plantas *cpm*.

Postular candidatos para el gen nuclear *Cpm* en función del espectro de los cambios moleculares identificado por cpTILLING.

# **CAPÍTULO 1**

## **CpTILLING en plántulas *cpm***

## INTRODUCCIÓN

La detección de polimorfismos en secuencias de ADN mediante TILLING se convirtió en una herramienta que potenció a la mutagénesis inducida artificialmente (Kurowska et al. 2011; Tadele 2016). El TILLING permite la identificación de mutantes en caracteres de interés y por este motivo se convirtió en una herramienta importante para la genética y el mejoramiento genético vegetal. Los agentes inductores de mutaciones utilizados en los proyectos tradicionales de TILLING del genoma nuclear corresponden principalmente a mutágenos químicos como el EMS (McCallum et al. 2000; Tadele 2016).

En este trabajo de tesis se propone por primera vez la detección mediante TILLING de mutaciones inducidas por un mutágeno biológico, el *cpm*, caracterizado por inducir mutaciones con herencia materna en cebada (Prina 1992; Prina 1996). La adaptación de la técnica de TILLING al genoma de los cloroplastos da origen al denominado cpTILLING (Landau et al., 2016). Varios factores hacen que esta adaptación sea posible: 1) La disponibilidad de la secuencia completa del plastoma de la cebada, lo que permite el análisis de la variabilidad a lo largo de todo el genoma tanto en secuencias no codificantes como codificantes y con diferentes funciones. 2) La disponibilidad de un protocolo de detección de mutaciones sencillo y de bajo costo, como la digestión con CJE de los productos de PCR desnaturalizados y renaturalizados y su posterior electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida. 3) La disponibilidad de familias *cpm* con muchas generaciones de autofecundación, lo que favorecería la acumulación de cambios moleculares en homoplasma en el plastoma.

Esta adaptación entonces permitiría el aislamiento de mutantes y la generación de variantes alélicas inducidas por el *cpm* a nivel del plastoma, un genoma que naturalmente posee poca variabilidad.

## OBJETIVO PARTICULAR

Estudiar mediante cpTILLING el plastoma de plántulas de cebada *cpm* y de esta manera comprobar su efecto mutador y determinar el espectro de las mutaciones inducidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Se analizaron 184 plántulas de cebada *Hordeum vulgare* portadoras del genotipo mutador de cloroplastos o *cpm* (Prina 1992, 1996), además de plántulas de cebada de genotipo salvaje. El genotipo salvaje corresponde al genotipo parental a partir del cual se aisló la mutante *cpm* luego de realizar un tratamiento mutagénico que combinó azida sódica y rayos X. Las plantas *cpm* se caracterizan por presentar principalmente deficiencias clorofílicas y en menor medida cambios morfológicos y variaciones en el desarrollo. Este grupo de 184 plántulas *cpm* constaba mayoritariamente de plántulas con cambios morfológicos como por ejemplo menor tamaño, y en menor proporción, plántulas que mostraban fenotipos con deficiencias clorofílicas (sólidas o variegadas) y fenotipos verde normal (ver fig. 1.1). Entre las plántulas con cambios morfológicos, también se incluyó a plántulas que presentaban otras diferencias respecto del control, como por ejemplo, variaciones en el desarrollo. Algunas de las plántulas presentaban tanto cambios morfológicos como deficiencias clorofílicas a la vez.

Las plántulas correspondieron a dos grupos de progenies, el grupo A compuesto por dos familias que portaron el genotipo mutador *cpm* en homocigosis (*cpmcpm*) durante 12 a 17 generaciones. La familia denominada M<sub>2</sub> se originó desde la misma planta M<sub>2</sub> de genotipo *cpmcpm* que mediante autopolinizaciones produjo las progenies que se usaron para luego aislar la mutante *cpm* en las generaciones M<sub>4</sub>-M<sub>5</sub>. La familia denominada F<sub>2</sub> fue genotipada como una planta *cpmcpm* en F<sub>2</sub> que provenía de la autopolinización de una F<sub>1</sub> obtenida por el cruzamiento de una planta salvaje como hembra y una planta *cpmcpm* como padre (Landau et al., 2016). Se analizaron en total 107 plántulas del grupo A, siendo 97 de la familia F<sub>2</sub> y 10 de la familia M<sub>2</sub>. El grupo B consistió en cuatro familias que portaron el genotipo mutador durante cinco generaciones, cada una derivada de una planta F<sub>2</sub> diferente: F<sub>2</sub>-1, F<sub>2</sub>-2, F<sub>2</sub>-3 y F<sub>2</sub>-4. Estas cuatro familias se obtuvieron de la misma manera que las progenies de la familia A F<sub>2</sub>. Se analizaron en total 77 plántulas en el grupo B, siendo 20 de la familia F<sub>2</sub>-1, siete de la familia F<sub>2</sub>-2, 22 de la familia F<sub>2</sub>-3 y 28 de la familia F<sub>2</sub>-4 (ver figura 1.2). En el ANEXO I se listan las 184 plántulas *cpm* analizadas.



Figura 1.1. Plántulas *cpm* con cambios morfológicos y deficiencias clorofílicas.

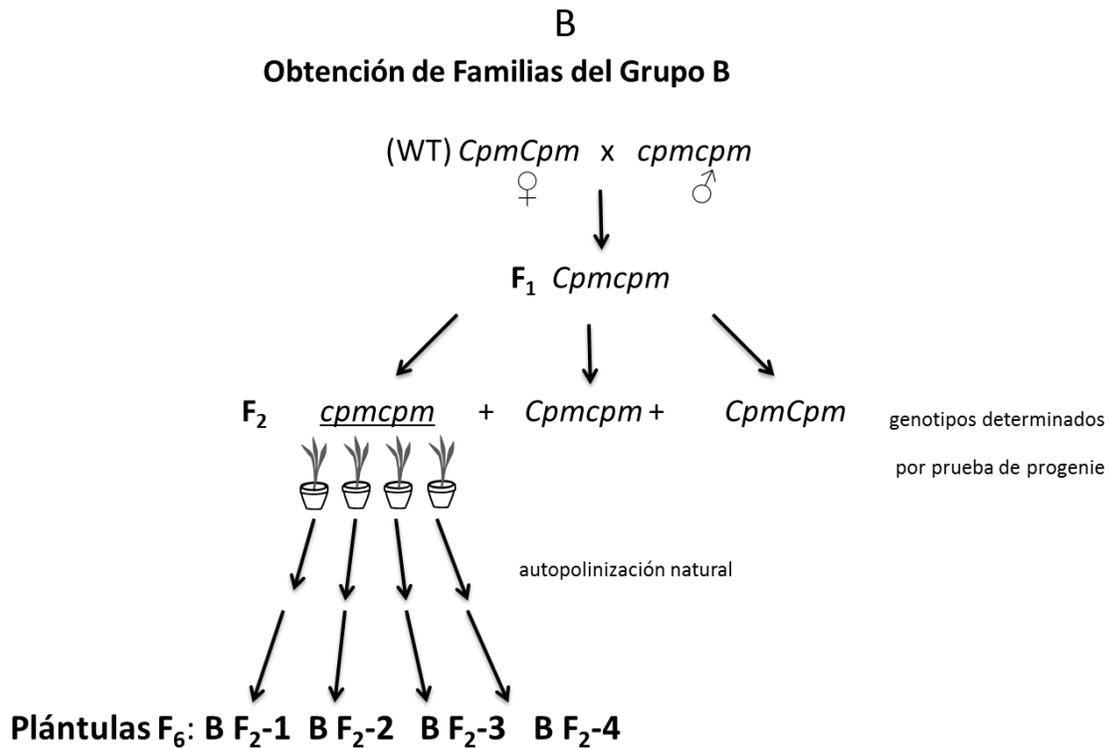
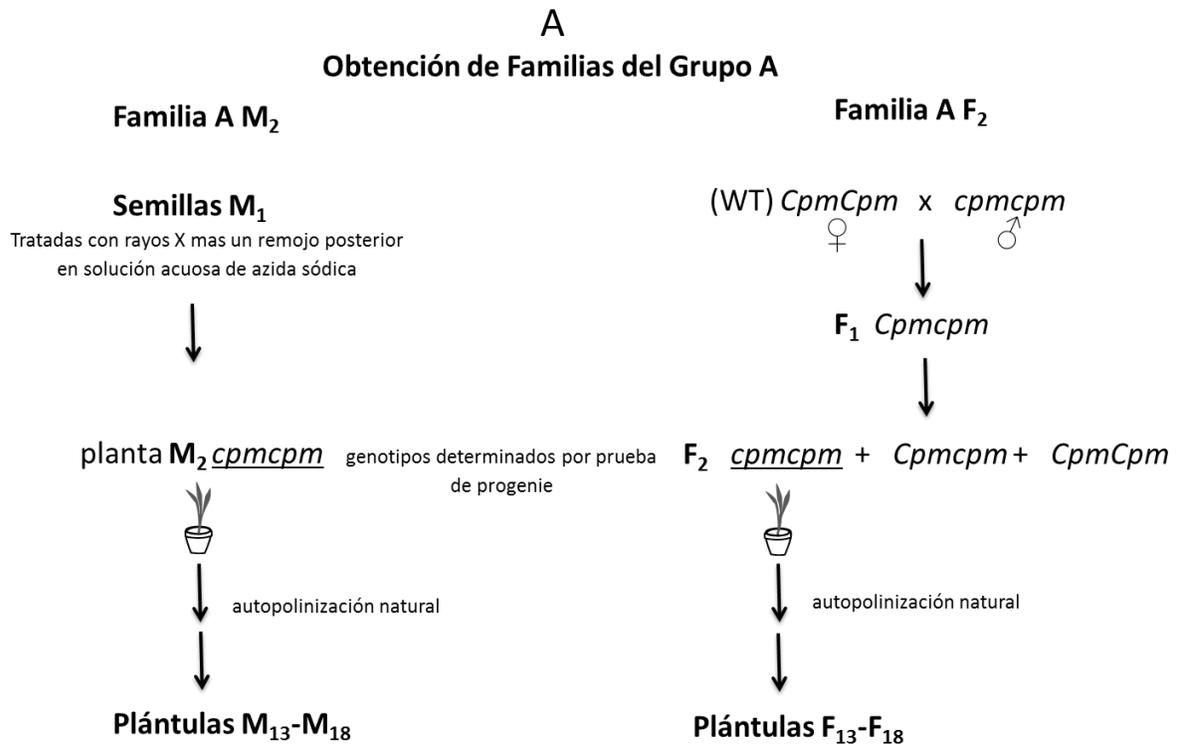


Figura. 1.2. A. Esquema de obtención del grupo A. B. Esquema de obtención del grupo B.

Las muestras del material vegetal se obtuvieron de plántulas crecidas en el invernáculo en la etapa de segunda hoja. Estas plántulas crecieron luego en el campo hasta su madurez y multiplicación.

### **Extracción de ADN**

Se realizaron extracciones de ADN total (nuclear, plastídico y mitocondrial), a partir de una o dos hojas de plántulas *cpm* y salvajes mediante el micrométodo descrito en Dellaporta (1994) con ligeras modificaciones. El tejido en solución de extracción Dellaporta se trituró mediante el empleo del equipo Fast Prep®-24 (MP Biomedicals, USA) y el ADN fue purificado mediante extracciones con cloroformo antes de su precipitación.

Se determinaron las concentraciones de las extracciones de ADN mediante el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) y se armaron soluciones de trabajo de concentración 80 ng/μl.

### **Amplificaciones por PCR y búsqueda de mutaciones mediante digestión con CJE: cpTILLING**

Para la amplificación por PCR de ciertas regiones del plastoma se emplearon cebadores que se diseñaron utilizando la secuencia del genoma de los cloroplastos de cebada *Hordeum vulgare sub. vulgare cv. Morex* depositada en GenBank como referencia (NCBI Reference Sequence: NC\_008590.1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/118430366?report=graph>). Estos cebadores se diseñaron de manera de producir amplicones de un tamaño de entre 1 y 1,5 kb. Dado que muchos genes del cloroplasto tienen un tamaño menor a 1 - 1,5 kb, algunos amplicones contuvieron dos o más genes y en consecuencia a las regiones intergénicas contenidas entre ambos genes. Por otro lado, para la amplificación de los genes *16S rRNA*, *23S rRNA*, *ycf3*, *psaA* y *psaB* se necesitó del diseño de más de un par de cebadores debido a su tamaño superior a 1 - 1.5 kb.

Se analizaron 31 amplicones distribuidos a lo largo de las 3 regiones en que se divide el plastoma (fig. 1.3): la copia simple grande, la copia simple pequeña y las repeticiones invertidas. Los amplicones cubrieron 33 genes que según su función se pueden clasificar de la siguiente manera:

Genes del aparato fotosintético: *psbA*, *psbC* y *psbD* que codifican subunidades del fotosistema II; *psaA* y *psaB* que codifican subunidades del fotosistema I; *rbcL* que codifica la subunidad grande de Rubisco y *ycf3* que codifica una chaperonina involucrada en el ensamble del fotosistema I.

Genes relacionados con la maquinaria de traducción de los cloroplastos: *rps2*, *rps3*, *rps4*, *rps7*, 3' *rps12*, *rps14*, *rps16*, *rps18*, *rps19*, *rpl2*, *rpl16*, *rpl20*, *rpl22*, *rpl23*, *rpl33* que codifican proteínas ribosomales; *infA* que codifica el factor 1 de iniciación de la traducción; *16S rRNA*, *23S rRNA* que codifican ARNs ribosomales; *tRNA His*, *tRNA Arg*, *tRNA Met*, *tRNA Leu* que codifican ARNs de transferencia.

Genes cuya función no está bien entendida y/o que claramente no pertenecen a los grupos anteriores: *matK* que codifica a la maturasa K implicada en el *splicing* de ciertos genes con intrones del plastoma, *ccsA* que codifica una proteína involucrada en la biogénesis del citocromo *c*, *clpP* que codifica la subunidad proteolítica de la proteasa Clp y *cemA* que codifica una proteína de la membrana interna del cloroplasto presuntamente relacionada con el ingreso del CO<sub>2</sub> a la organela.

Para todos los amplicones se corroboró la amplificación de una banda única del tamaño deseado en geles de agarosa antes de su utilización en la etapa de búsqueda de los cambios moleculares mediante *cpTILLING*.

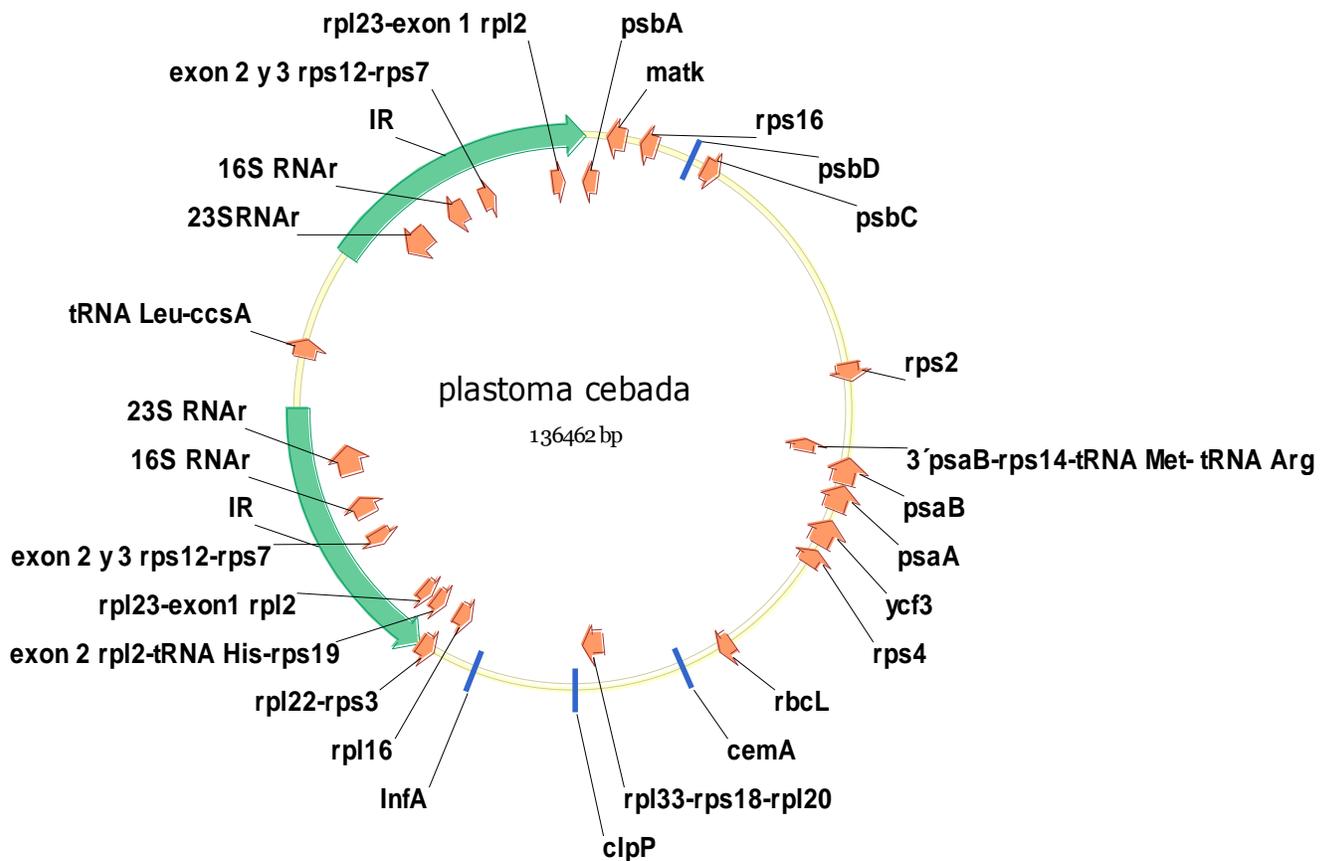


Figura 1.3. Esquema del plastoma de cebada indicando los 31 amplicones analizados.

Amplicon	Cebador forward	Secuencia (5'-3')	Cebador reverse	Secuencia (5'-3')	Genes contenidos	Tamaño (pb)
cemA	cemA F	CAGGGAATGGAATAGAGTCAGC	cemA R	CACGAATTTGTTGGCATTCT	<i>cemA</i>	915
infA	infA F	GAATTCTACCTCGCCCTTCC	infA R	AGAAAACCCACCCGACCTTGT	<i>infA</i>	982
psbA	psbA F	GGGCTGACTTGTTGACATT	psbA R	GGAGAATTCGTGCCTACTCG	<i>psbA</i>	1.391
rbcL	rbcL F	GGCAGCATTCCGAGTAAGTC	rbcL R	CTGCGGCTAGTTCAGGACTC	<i>rbcL</i>	1.262
ycf3 1º	ycf3 1º F	TCCAAGCAGAAGGAAAAGGA	ycf3 1º R	CGGTAAGAAGGGGTTTCGTT	<i>ycf3</i>	1.264
ycf3 2º	ycf3 2º F	AGGGAGGAGCCGTATGAGAT	ycf3 2º R	GCGCTTCGTAATCTTCAACC	<i>ycf3</i>	1.176
psaA 1º	psaA 1º F	TGGAACCTACATGCTGATGC	psaA 1º R	TTAGAAATCCGCCAATCCAC	<i>psaA</i>	1.057
psaA 2º	psaA 2º F	GTGGATTGGCGGATTCTAA	psaA 2º R	GCAATTCACCCAGAAGGTA	<i>psaA</i>	1.032
psaB 1º	psaB 1º F	GGACCCACTACTCGTCGTA	psaB 1º R	AAGCCCCAAGGTATGGAATC	<i>psaB</i>	1.267
psaB 2º	psaB 2º F	TTCATCATGACAGGGGCTTT	psaB 2º R	TAACCCACGGAAAAGTGAGC	<i>psaB</i>	1.010
16S 1º	16S 1º F	ACCTTGACGTGGTGGAAAGTC	16S 1º R	CGCACAGCACCTAGTATCCA	<i>16S rRNA</i>	1.062
16S 2º	16S 2º F	GCGTCTGTAGGTGGCTTTTC	16S 2º R	CGTAGCTGCCTTCTTTTTGG	<i>16S rRNA</i>	1.046
matK	matK F	TGGA AAAATTCGAAGGGTATTC	matK R	CCAAATACGCTCAGTGTGTA	<i>matK</i>	1.487
clpP	clpP F	ATTGGCTGTCTTGCGTTTCT	clpP R	AGCATTGCAATCACCATTCC	<i>clpP</i>	1.077
psbC	psbC F	TCCCTGAGGAGGTTCTACCA	psbC R	TCACGATCGATTCCCTTTTC	<i>psbC</i>	1.370
psbD	psbD F	GGTTACGAAGGGACCGTTTC	psbD R	TCCACGTGGTAGAACCTCCT	<i>psbD</i>	986
23S 1º	23S 1º F	CGGGGAGTTGAAAATAAGCA	23S 1º R	GGTCATTTAGGGGCCTTAGC	<i>23S rRNA</i>	977
23S 2º	23S 2º F	GCTAAGGCCCTAAATGACC	23S 2º R	TTACCCGACAAGGAATTCG	<i>23S rRNA</i>	1.014
23S 3º	23S 3º F	GGCAAAATAGCCCGTAACT	23S 3º R	TACCCAGCGTTTACCGTAGG	<i>23S rRNA</i>	1.031
rps16	rps16 F	CTTATGTTGGATTGGCACGA	rps16 R	GGAGGCTTCCCGATAAATA	<i>rps16</i>	1.347
rps2	rps2 F	ATCTATTCGCGTCGGAAATG	rps2 R	CCCCTTGAGTGTTTAATGGA	<i>rps2</i>	1.435
rps14	rps14 F	CAAGCGGAAATCCTTTTGAA	rps14 R	GCAAGCAAGATTGGTTGGAT	<i>rps14, tRNA Arg, tRNA Met, 3' psaB</i>	1.207
rps4	rps4 F	CAAGGCGTAGCATTGGAACCT	rps4 R	CATTTGTAATGCGAGGGTCA	<i>rps4</i>	1.326
rpl33	rpl33 F	AGGCCTCAGAAATCAGAGCA	rpl33 R	GGGCTTGAAATTGTTTTTCG	<i>rpl33, 5' rps18</i>	1.085
rps18	rps18 F	CCGGGAGATCGAATTGATTA	rps18 R	CACCGTTTAAAAGGGAACCA	<i>3' rps18, rpl20</i>	1.118
rpl16	rpl16 F	TTTTACTGGCCGCTATGGAG	rpl16 R	CCTGAAATCCCTGCAAAGA	<i>rpl16</i>	1.521
rps3	rps3 F	TCTTTTGACGGGATTCAGG	rps3 R	AAAGGTAGGCGGGGAATAAA	<i>rps3, rpl22</i>	1.334
rps19	rps19 F	TCCCCGCCTACCTTTACTTT	rps19 R	ATAAGCCAGATGACGGAACG	<i>rps19, tRNA His, exon 2 rpl2</i>	1.274
rpl2	rpl2 F	CACTTGCTGCCGTTACTCAA	rpl2 R	TCGAGGATCCAGAGAGGTGT	<i>exón 1 rpl2, rpl23</i>	1.216
rps7	rps7 F	AGTCGCTTCTTTTTCGTA	rps7 R	GGAGCCGTATGAGGTGAAAA	<i>rps7, exón 2 y 3 rps12</i>	1.356
ccsA	ccsA F	TTCCCAATATCGACGATTCC	ccsA R	GGATTCTGGACCACGAGAAC	<i>ccsA, tRNA Leu</i>	1.492

Tabla 1.1. Secuencia de los cebadores y los genes que contiene cada uno de los 31 amplicones.

El ADN de cada una de las 184 plántulas *cpm* se mezcló en relación 1:1 con ADN de plántulas de la línea salvaje para su posterior análisis.

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen final de 12  $\mu$ l usando 40 ng de la mezcla de ADNs, solución buffer de la Taq 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0.1% Triton X-100), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6  $\mu$ M de cada cebador, 0,6 mM de la solución mezcla de dNTPs y 1,25 unidades de la Taq ADN polimerasa T-plus 5 U/ $\mu$ l (Inbio Highway, Tandil, Argentina). El programa de ciclado consistió en una primera etapa de desnaturalización a 94°C durante 3 min., seguido por 35 ciclos a 94°C durante 30 seg., 60°C durante 1 min. y 72°C durante 2 min. A continuación se agregó una etapa de elongación final a 72°C durante 10 min.

Luego de la amplificación se llevó a cabo una etapa de desnaturalización y renaturalización lenta de los productos de la PCR para favorecer la formación de los heteroduplexos en el caso de que existieran polimorfismos en los fragmentos de amplificación. Esto se hizo calentando a 99°C durante 10 min. seguido por 70 etapas de renaturalización del ADN de 20 seg. cada una, en donde en cada etapa se disminuyó la temperatura en 0.3 °C respecto de la anterior. La etapa de renaturalización comenzó a los 70 °C.

A continuación las amplificaciones renaturalizadas se digirieron con CJE obtenido según el protocolo descrito en Till et al., 2006. Las electroforesis se realizaron según Uauy et al., 2009. Las muestras de ADN se corrieron en geles de poliacrilamida 3% (19:1 Acrilamida: Bisacrilamda) en solución de corrida TBE 0,5X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio una vez finalizada la corrida electroforética. Se utilizó la cuba de electroforesis vertical Protean II xi (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) a 350 V durante 75 min. Las imágenes de los geles se obtuvieron con el sistema de documentación G:BOX Chemi Gel (Syngene, Cambridge, UK).

Se buscaron bandas de digestión cuyos tamaños sumados aproximaran el tamaño del amplicón analizado. Las digestiones se corroboraron mediante la realización de una segunda ronda de amplificación por PCR y digestión con CJE, para minimizar los posibles falsos positivos debido a la identificación de *mismatches* generados por los errores de la Taq polimerasa durante la amplificación. Luego, mediante la secuenciación del ADN de los amplicones que produjeron digestiones se identificaron los cambios moleculares presentes en las plántulas *cpm* por comparación con la correspondiente secuencia del ADN en la línea salvaje. Los alineamientos para la comparación de las secuencias se realizaron con los amplicones de las posibles mutantes, los amplicones de la línea salvaje y con la secuencia de la región correspondiente en el plastoma de cebada del NCBI usado como referencia (NC\_008590.1).

Para el análisis de las secuencias de ADN se utilizaron las herramientas de ensamble, alineamiento y generación de gráficos del paquete Vector NTI 10.0 (Life Technologies, USA).

### **Análisis *in silico* de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a los amplicones analizados**

Mediante blastn se investigó la existencia de la versión completa de cada uno de los 31 amplicones que se mencionaron antes, en las secuencias de ADN de los 7 cromosomas de cebada (*Hordeum vulgare sub. vulgare cv. Morex*) depositadas en EnsemblPlants ([ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-35/fasta/hordeum\\_vulgare/dna/](ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-35/fasta/hordeum_vulgare/dna/)). Mediante esta misma metodología, se investigó la presencia de los amplicones completos en la secuencia de ADN del genoma de la mitocondria de cebada (*Hordeum vulgare sub. vulgare cv. HarunaNijo*) que se encuentra depositada en la base de datos Genbank del NCBI (GenBank: AP017301.1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP017301.1>). En todos los casos, se utilizó la secuencia de los 31 amplicones como *query* y las secuencias genómicas de cebada como base de datos.

## RESULTADOS

### Identificación de cambios moleculares en el plastoma *cpm*

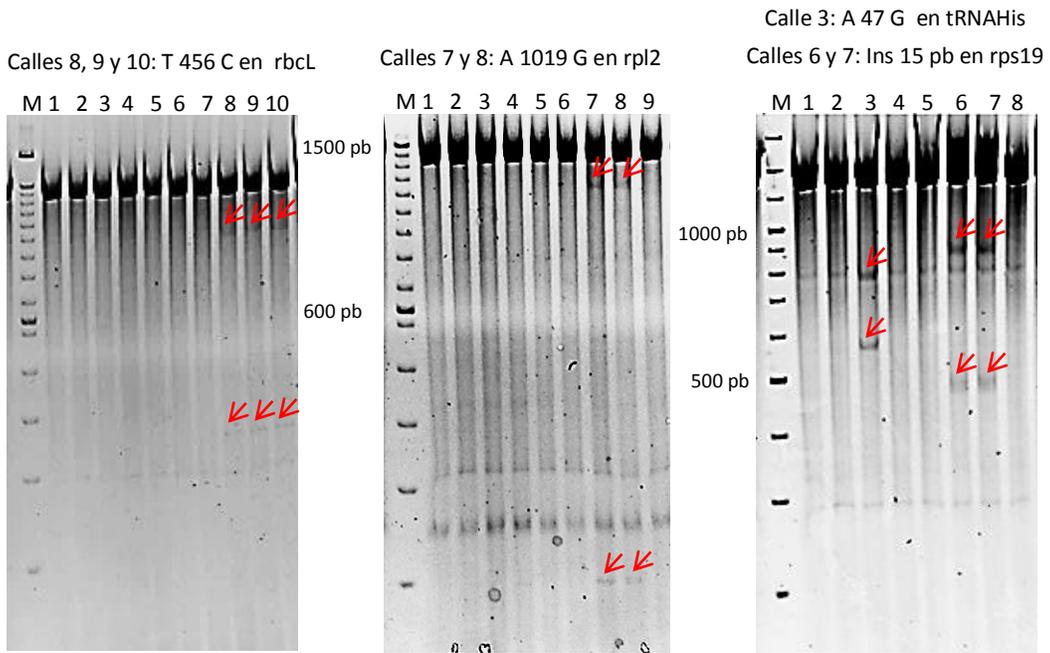
Los amplicones analizados cubrieron 43.030 pb del plastoma, lo que representa aproximadamente el 31.5% de ese genoma. De este porcentaje, 27.694 pb se ubicaron en las LSC y SSC y 15.336 pb en las IRs. Ocho amplicones se ubicaron en las IRs, 22 en la LSC y uno se ubicó en la SSC. Siete de los ocho amplicones que se ubicaron en las IRs amplificaron ambas repeticiones a la vez, mientras que el amplicón *rps19* solo amplificó la región de unión entre la IR<sub>B</sub> y la LSC debido a que uno de los cebadores utilizados para la amplificación se ubicó en la región LSC.

La digestión con CJE de los amplicones analizados indicó la existencia de polimorfismos entre la secuencia del ADN del plastoma de las plántulas *cpm* y la secuencia en la línea salvaje. La amplificación y posterior digestión de la mezcla de los ADN permitió la identificación de polimorfismos que se encontraban tanto en homoplasmia como en heteroplasmia. Los productos de digestión se identificaron mediante la observación en geles de poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio, de pares de bandas cuyos tamaños sumaron el tamaño del amplicón que se estaba analizando.

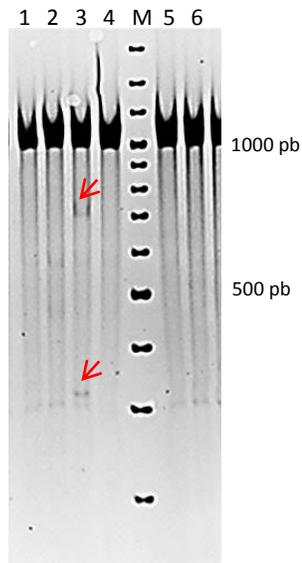
Se obtuvieron digestiones indicando la existencia de polimorfismos, en 22 de los 31 amplicones analizados. Seis de los nueve amplicones que no dieron digestión se ubican en la LSC: *rpl16*, *clpP*, *cemA*, *psaA* 1°, *psaB* 1° e *ycf3* 1° y tres se ubican en las IRs: 23S 1°, 23S 2° y 16S 1°.

Mediante la secuenciación de los amplicones que produjeron digestiones y su comparación con la secuencia en la línea salvaje se identificaron 50 cambios moleculares diferentes, 15 ubicados en las IRs y 35 en las regiones LSC y SSC. Treinta y nueve cambios moleculares se ubicaron en regiones génicas y 11 en intergénicas. Treinta y dos de los cambios moleculares ubicados en las regiones génicas se ubicaron en la porción exónica codificante de proteínas o en la región codificante de ARNs ribosomales o de transferencia y siete se ubicaron en intrones. En cinco de estos siete casos el cambio molecular se ubicó en el intrón del gen *rps16*. El gen *rpl23* con cinco cambios moleculares, fue el que presentó la mayor cantidad de cambios en región codificante de proteínas. Cabe aclarar que en función de la particularidad de las digestiones obtenidas para los cambios moleculares identificados en el gen *rpl23*, estos resultados se presentan por separado en este capítulo y su estudio se profundizará en el capítulo dos. El análisis realizado en este capítulo se basa entonces en 45 cambios moleculares.

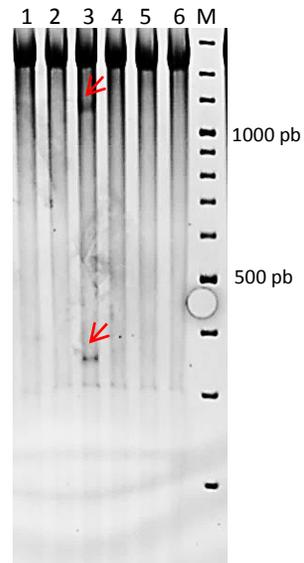
Se observaron digestiones en cinco de las seis familias *cpm* pertenecientes a los dos grupos (A y B) con diferente número de generaciones de autofecundación, tal como se describió en Materiales y Métodos. Diecisiete amplicones dieron digestión en la familia A F<sub>2</sub>, ninguno en la familia A M<sub>2</sub>, cinco en la familia B F<sub>2</sub>-1, tres en la familia B F<sub>2</sub>-2, tres en la familia B F<sub>2</sub>-3 y siete en la familia B F<sub>2</sub>-4. En la figura 1.4 se muestran a modo de ejemplo algunas de las digestiones con CJE obtenidas en geles de poliacrilamida y reveladas por tinción con bromuro de etidio.



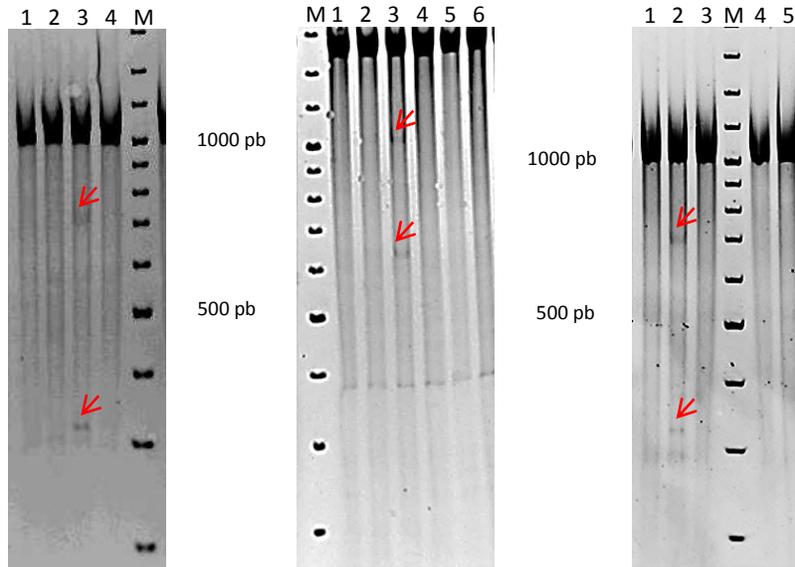
Calle 3: Del de 45 pb en *rps3*



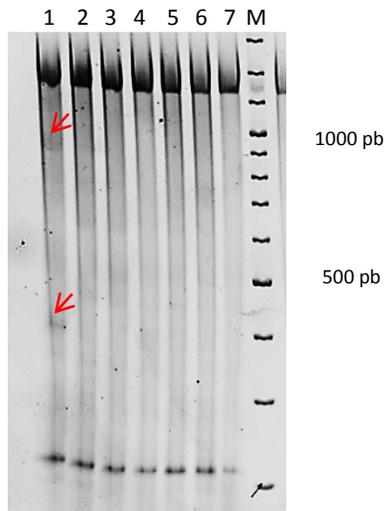
Calle 3: G 86 A en *rps7*



Calle 3: G 2502 A en 23S rRNA    Calle 3: Ins 2T pos. 891 en matK    Calle 2: A 644 G en psbD



Calle 1: A 1183 G en ycf3



Calles 6 y 7: Ins G pos. 805 en rps16

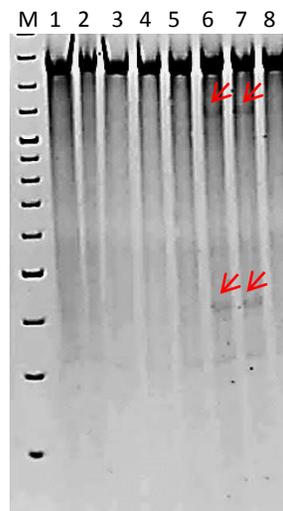


Figura 1.4. Digestiones con CJE de amplicones provenientes de plántulas *cpm* reveladas en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes 3% teñidos con bromuro de etidio. Las bandas de digestión se indican con flechas. Las muestras corren más lento que el marcador de peso molecular (M) probablemente debido a componentes de la mezcla para la digestión con CJE.

De los 45 cambios moleculares identificados, 26 se ubicaron en plántulas del grupo A (fig. 1.5) y 19 en plántulas del grupo B (fig. 1.6). En las tablas 1.2 y 1.3 se muestran los detalles de los cambios moleculares identificados en las diferentes familias de los grupos A y B, respectivamente.

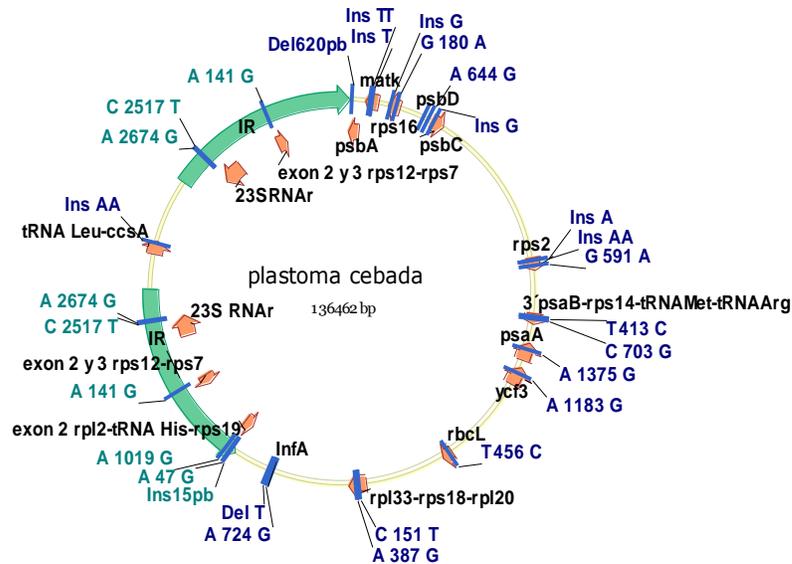


Figura 1.5. Ubicación en el plastoma de los cambios moleculares identificados en las plántulas *cpm* del grupo A. En azul se marcan los cambios ubicados en las LSC y SSC y en verde los cambios ubicados en las IRs. Los amplicones que portan cambios moleculares se muestran en negro.

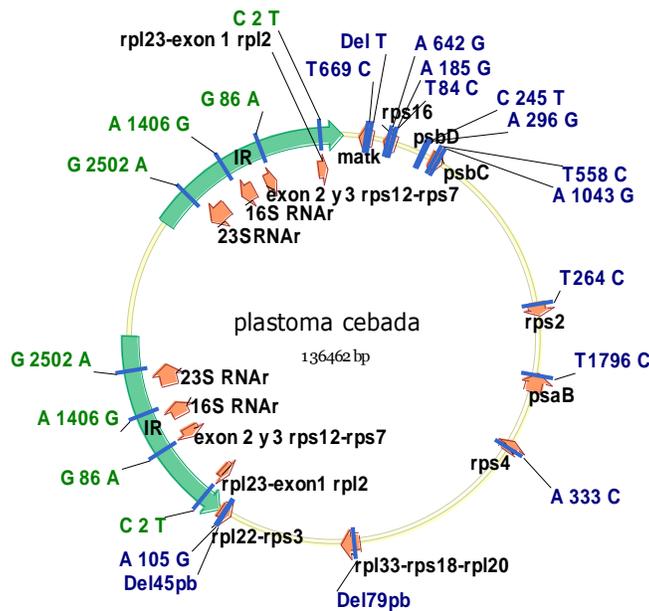


Figura 1.6. Ubicación en el plastoma de los cambios moleculares identificados en las plántulas *cpm* del grupo B. En azul se marcan los cambios ubicados en las LSC y SSC y en verde los cambios ubicados en las IRs. Los amplicones que portan cambios moleculares se muestran en negro.

Familia A F <sub>2</sub>					
Gen/amplícón	Cambio molecular	Estado	Región	Plántula	Fenotipo
rps2	Ins 1 A, posición 406 del amplicón (x2) <sup>a</sup>	Heteroplasmia	Intergénica	07/4218-5	Normal
		Heteroplasmia		07/4218-6	
	Ins 2 A, posición 406 del amplicón (x1) G 591 A (x1)	Heteroplasmia	Exón (Silenciosa)	07/4059-3	Clorofílica
		Heteroplasmia		07/4063-1	
3'-rps12	A 141 G (x1)	Homoplasmia	Exón (silenciosa)	07/4070-3	Clorofílica
rps14	C 703 G en el amplicón (x1) T 413 C en el amplicón (x2)	Homoplasmia	Intergénica	07/4068-2	Clorofílica
		Homoplasmia		07/4081-5	
	Homoplasmia		07/4191-3	Clorofílica y Morfológica	
rps16	Ins 1 G, posición 805 (x2)	Homoplasmia	Intrón	07/4067-3	Clorofílica y Morfológica
		Homoplasmia		07/4193-2	
	G 180 A (x1)	Homoplasmia	Intrón	07/4156-3	Clorofílica
rps18	C 151 T (x1) A 387 G (x1)	Homoplasmia	Exón ( <i>missense</i> )	07/4258-2	Morfológica
		Homoplasmia	Exón (silenciosa)	07/4085-3	Morfológica
rps19	Inserción de 15 nucleótidos, posición 846 del amplicón (x2)	Homoplasmia	Intergénica	07/4068-2	Clorofílica
		Homoplasmia		07/4068-4	
rpl2	A 1019 G (x2)	Homoplasmia	Intrón	07/4055-2	Clorofílica
		Homoplasmia		07/4058-2	
psaA	A 1375 G (x1)	Homoplasmia	Exón ( <i>missense</i> )	07/4200-2	Clorofílica
psbA	Deleción de 620 nucleótidos, posición 217 (x1)	Heteroplasmia	Exón ( <i>frameshift</i> y perdida de 281 aa)	07/4062-4	Morfológica
psbC	Ins 1 G, posición 311 (x1)	Homoplasmia	Exón ( <i>frameshift</i> )	07/4200-2	Clorofílica
psbD	A 644 G (x1)	Homoplasmia	Exón ( <i>missense</i> )	07/4165-2	Clorofílica
matK	Ins 2 T, posición 891 (x1) Ins 1 T, posición 613 (x2)	Homoplasmia	Exón ( <i>frameshift</i> )	07/4070-2	Morfológica
		Homoplasmia	Exón ( <i>frameshift</i> )	07/4083-5	Morfológica
		Homoplasmia		07/4084-3	Morfológica
rbcL	T 456 C (x4)	Homoplasmia	Exón (silenciosa)	07/4053-1	Morfológica
		Homoplasmia		07/4053-6	
		Homoplasmia		07/4055-2	
		Homoplasmia		07/4058-2	
ycf3	A 1183 G (x1)	Homoplasmia	Intrón 2	07/4226-2	Morfológica
ccsA	Ins 2 A, posición 1203 del amplicón (x3)	Heteroplasmia	Intergénica	07/4082-13	Morfológica
		Heteroplasmia		07/4083-1	
		Heteroplasmia		07/4071-1	
infA	Del 1 T, posición 418 del amplicón (x1) A 724 G en el amplicón (x1)	Heteroplasmia	Intergénica	07/4258-2	Morfológica
		Homoplasmia	Intergénica	07/4258-2	Morfológica
23S rRNA	C 2517 T (x1) A 2674 G (x1)	Homoplasmia		07/4068-2	Clorofílica
		Homoplasmia		07/4055-2	Clorofílica
tRNAHis	A 47 G (x1)	Heteroplasmia		07/4071-1	Morfológica

Tabla 1.2. Cambios moleculares identificados en plántulas *cpm* de las familias del grupo A.

<sup>a</sup>Entre paréntesis se indica el número de plántulas en que se identificó el cambio molecular.

Los amplicones / genes 3'-rps12, rps19, rpl2, 23SrRNA y tRNAHis se ubican en las IRs. rps19 amplifica una sola IR. Silenciosa indica que el cambio molecular en el ADN no produce un cambio de aminoácido en la proteína correspondiente, *missense* indica que el cambio molecular produce un cambio de aminoácido y *frameshift*, que el cambio molecular produce un corrimiento del marco de lectura. Clorofílica indica una plántula con deficiencia clorofílica y morfológica indica una plántula con cambio morfológico o variación en el desarrollo.

Familia B F <sub>2</sub> -1					
Gen/amplicón	Cambio molecular	Estado	Región	Plántula	Fenotipo
rps2	T 264 C en el amplicón (x1) <sup>a</sup>	Heteroplasmia	Intergénica	08/1929-4	Morfológica
psbC	A 1043 G (x1)	Homoplasmia	Exón ( <i>missense</i> )	08/1933-3	Clorofílica y Morfológica
psbD	A 296 G (x1)	Heteroplasmia	Exón ( <i>missense</i> )	08/1932-5	Morfológica
matK	Del 1 T, posición 271 (x1)	Heteroplasmia	Exón ( <i>frameshift</i> )	08/1929-4	Morfológica
23S rRNA	G 2502 A (x1)	Homoplasmia		08/2146-12	Clorofílica y Morfológica
Familia B F <sub>2</sub> -2					
Gen/amplicón	Cambio molecular	Estado	Región	Plántula	Fenotipo
rps16	A 185 G (x1)	Homoplasmia	Intrón	08/1937-1	Clorofílica y Morfológica
rpl2	C 2 T (x1)	Homoplasmia	Exón ( <i>missense</i> )	08/2156-4	Normal
psbD	C 245 T (x1)	Heteroplasmia	Exón ( <i>missense</i> )	08/1937-1	Clorofílica y Morfológica
Familia B F <sub>2</sub> -3					
Gen/amplicón	Cambio molecular	Estado	Región	Plántula	Fenotipo
rps4	A 333 C en el amplicón (x1)	Homoplasmia	Intergénica	08/2162-13	Normal
rps16	A 642 G (x1)	Homoplasmia	Intrón	08/2168-4	Normal
rpl33	Delección de 79 nucleótidos, posición 505 del amplicón (x1)	Heteroplasmia	Intergénica	08/2163-1	Normal
Familia B F <sub>2</sub> -4					
Gen/amplicón	Cambio molecular	Estado	Región	Plántula	Fenotipo
rps3	Delección de 45 nucleótidos, posición 211 (x1)	Homoplasmia	Exón (perdida de 15 aa)	08/1954-2	Morfológica
	A 105 G (x2)	Homoplasmia Homoplasmia	Exón (silenciosa)	08/2172-2 08/2172-5	Normal Morfológica
rps7	G 86 A (x1)	Homoplasmia	Exón ( <i>missense</i> )	08/2180-9	Normal
rps16	T 84 C (x1)	Homoplasmia	Intrón	08/2176-2	Normal
16S rRNA	A 1406 G (x2)	Homoplasmia		08/2178-2	Morfológica
		Homoplasmia		08/2178-7	Normal
matK	T 669 C (x1)	Heteroplasmia	Exón (silenciosa)	08/2180-9	Normal
psaB	T 1796 C (x1)	Homoplasmia	Exón ( <i>missense</i> )	08/2172-5	Morfológica
psbC	T 558 C (x1)	Heteroplasmia	Exón (silenciosa)	08/2172-5	Morfológica

Tabla 1.3. Cambios moleculares identificados en plántulas *cpm* de las familias del grupo B.

<sup>a</sup>Entre paréntesis se indica el número de plántulas en que se identificó el cambio molecular.

Los amplicones / genes rpl2, rps7, 23SrRNA y 16SrRNA se ubican en las IRs. rps19 amplifica una sola IR. Silenciosa indica que el cambio molecular en el ADN no produce un cambio de aminoácido en la proteína correspondiente, *missense* indica que el cambio molecular produce un cambio de aminoácido y *frameshift*, que el cambio molecular produce un corrimiento del marco de lectura. Clorofílica indica una plántula con deficiencia clorofílica y morfológica indica una plántula con cambio morfológico o variación en el desarrollo.

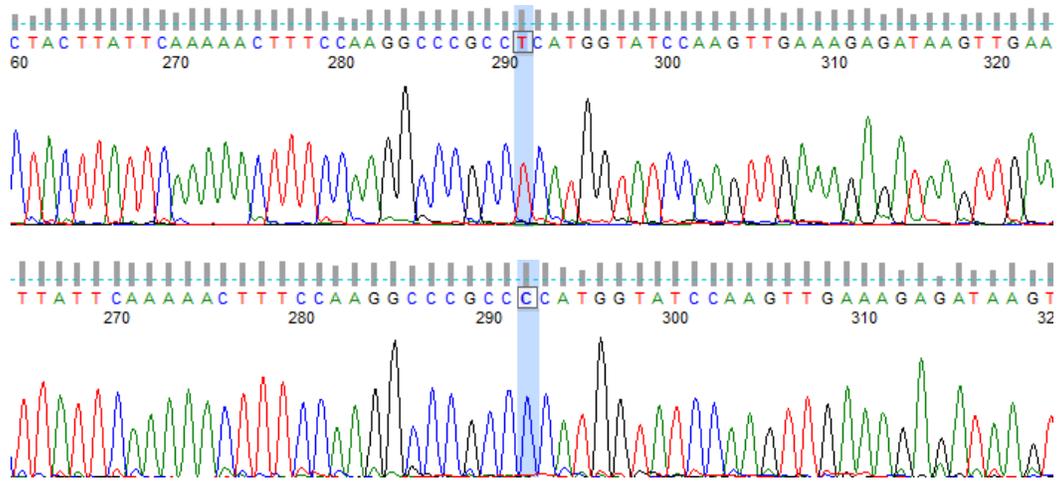
El estado de homoplasma o heteroplasma de los cambios moleculares se estimó mediante la observación en los electroferogramas de la presencia de picos simples o dobles, respectivamente. De esta manera, se determinó que la mayor parte de los cambios moleculares identificados en ambos grupos se encontraron en homoplasma, siendo 32 los cambios en homoplasma y 13 en heteroplasma. Se observaron en heteroplasma seis de los 26 cambios totales en el grupo A y siete de los 19 cambios totales en el grupo B. En la figura 1.7 se muestran a modo de ejemplo, electroferogramas presentando cambios puntuales, es decir, sustituciones e indels de una base en homoplasma y en la figura 1.8 se muestran electroferogramas con cambios en heteroplasma. Los cambios moleculares en heteroplasma se corroboraron mediante la observación de picos dobles al menos en dos secuenciaciones independientes.

En ciertos casos, el mismo cambio molecular se obtuvo en más de una plántula pero esto siempre se observó en plántulas pertenecientes a la misma familia (ver Tablas 1.2 y 1.3). El número máximo de plántulas con el mismo cambio fue de cuatro y se observó en el gen *rbcl*. En relación a esto es importante mencionar que la independencia de los eventos mutacionales solo se puede asegurar entre plántulas que pertenecen a familias diferentes. Por este motivo se consideraron como generados por los mismos eventos mutacionales a aquellos cambios moleculares que se repitieron dentro de la misma familia. De esta manera, los cambios moleculares obtenidos se debieron, al menos, a 45 eventos mutacionales distintos. Los detalles de los tipos de cambios moleculares y de los eventos mutacionales para cada familia se resumen en la tabla 1.4.

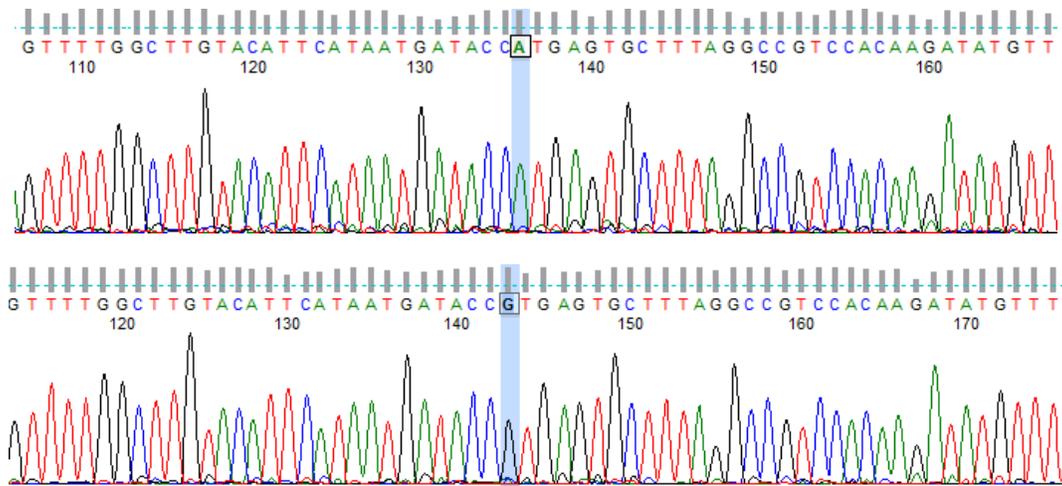
La mayoría de los cambios moleculares correspondió a cambios puntuales (41 de 45) siendo 32 sustituciones y nueve indels de una o dos bases que se ubicaron en repeticiones de mononucleótidos (microsatélites). También se identificaron cuatro indels de un tamaño superior a uno o dos bases (ver Tablas 1.2 y 1.3) que fueron una inserción de 15 pb y tres deleciones de 45, 79 y 620 pb. El estudio de estos indels denominados grandes se profundizará en el capítulo tres. El análisis particular de los cambios moleculares que afectaron a genes (sin tener en cuenta el gen *rpl23*) se presenta en la Tabla 1.5. Se detectaron cambios moleculares en 18 genes. El gen más afectado fue *rps16* con cinco polimorfismos diferentes respecto de la secuencia en la línea salvaje, todos ubicados en su intrón. Luego se ubicó el gen *matK* con cuatro polimorfismos que corresponden a tres indels en microsatélites y a una sustitución respecto de la secuencia salvaje. A continuación se ubicaron los genes *23S rRNA*, *psbC* y *psbD* con tres polimorfismos cada uno.

Se identificaron 58 plántulas con cambios moleculares diferentes, 37 pertenecientes al grupo A y 21 al grupo B. Dieciséis de estas 58 plántulas presentaron deficiencias clorofílicas, 25 presentaron cambios morfológicos, siete tuvieron tanto cambios morfológicos como deficiencias clorofílicas y 10 plántulas presentaron fenotipos normales. Se debe aclarar que no necesariamente los cambios moleculares detectados en estas plántulas son los responsables de los fenotipos observados. Se requieren muchos otros estudios para corroborar esta relación. Once plántulas fueron portadoras de más de un cambio molecular en su plastoma, cuatro plántulas tuvieron tres polimorfismos respecto de la secuencia salvaje (07/4055-2, 07/4068-2, 07/4258-2 y 08/2172-5) y siete plántulas tuvieron dos polimorfismos (07/4058-2, 07/4068-2, 07/4071-1, 07/4200-2, 08/1929-4, 08/1937-1, 08/2180-9).

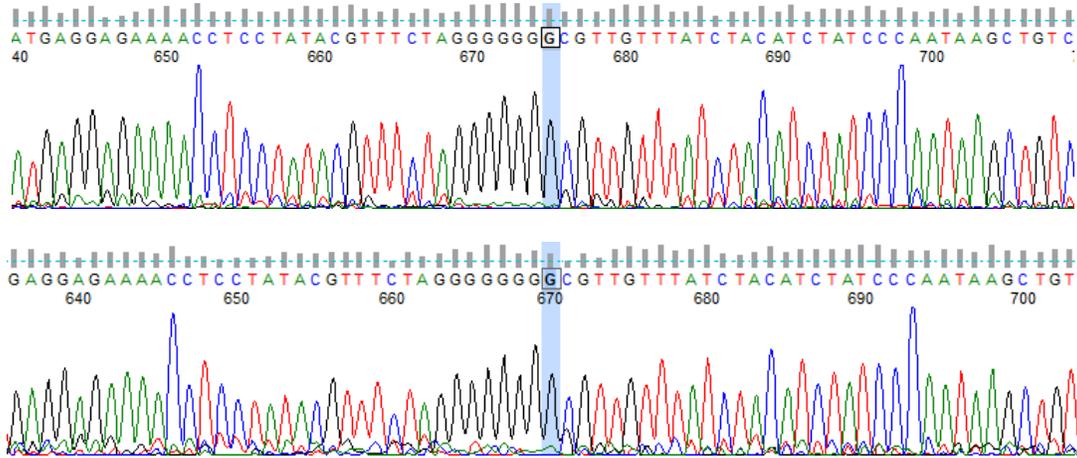
T 456 C en *rbcL* de 07/4053-6



A 1375 G in *psaA* de 07/4200-2



Ins G posición 805 en *rps16* de 07/4067-3



A 185 G en *rps16* de 08/1937-1

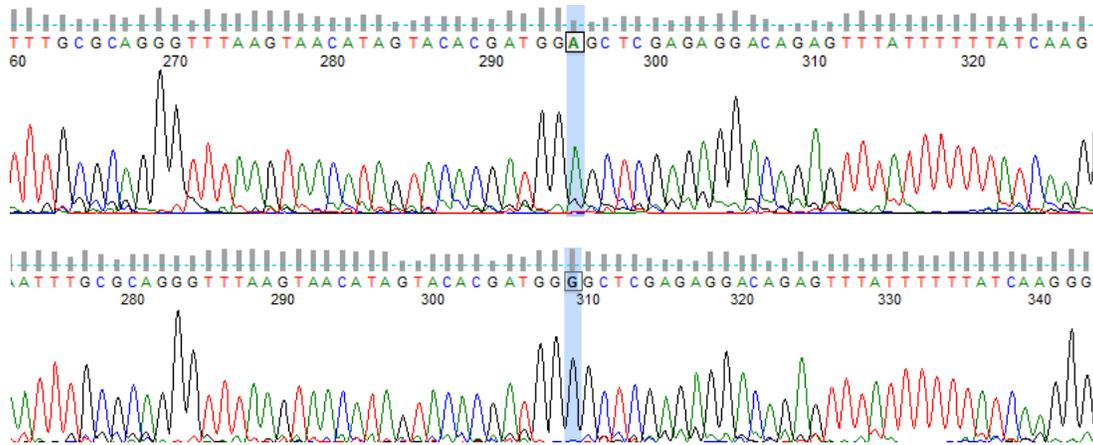
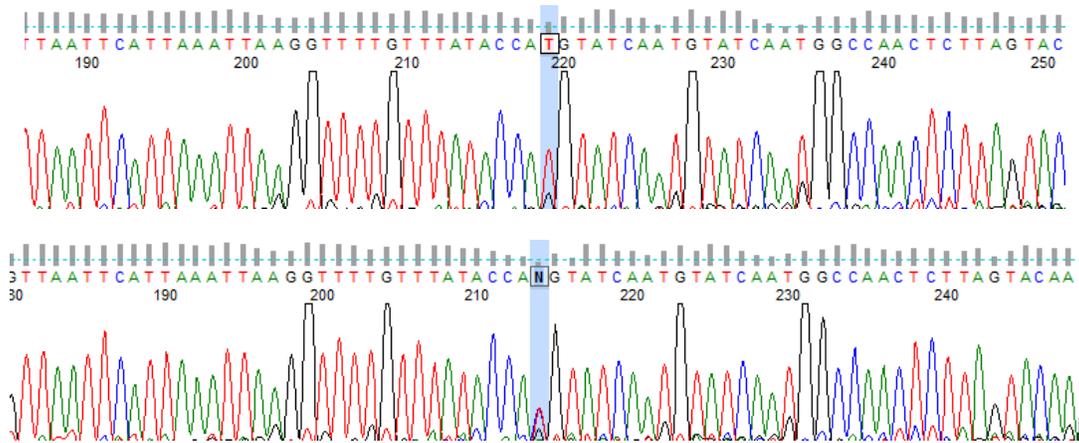
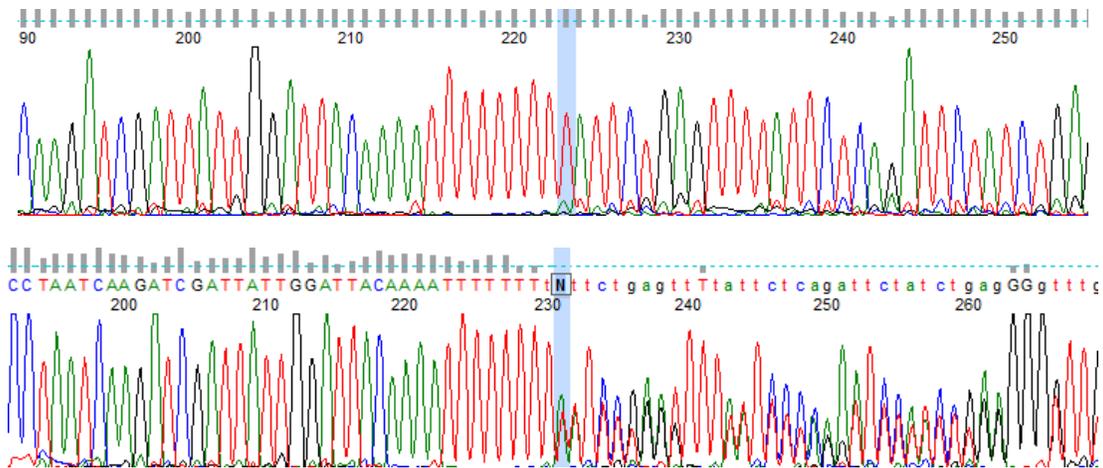


Figura 1.7. Electroferogramas mostrando cambios moleculares en homoplasma. El electroferograma superior de cada par corresponde a la secuencia de la línea salvaje y el inferior a la secuencia de la plántula *cpm* mutante. En azul se resaltan las posiciones polimórficas.

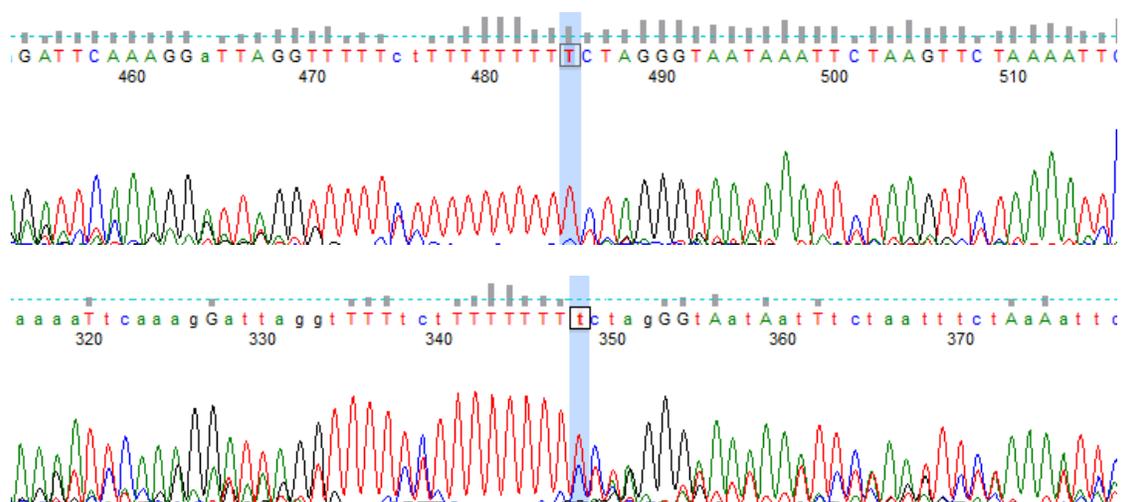
T 264 C en el amplicón rps2 de 08/1929-4



Del T posición 271 en *matk* de 08/1929-4



Del T en posición 418 del amplicón *infA* en 07/4258-2



C 245 T en *psbD* de 08/1937-1

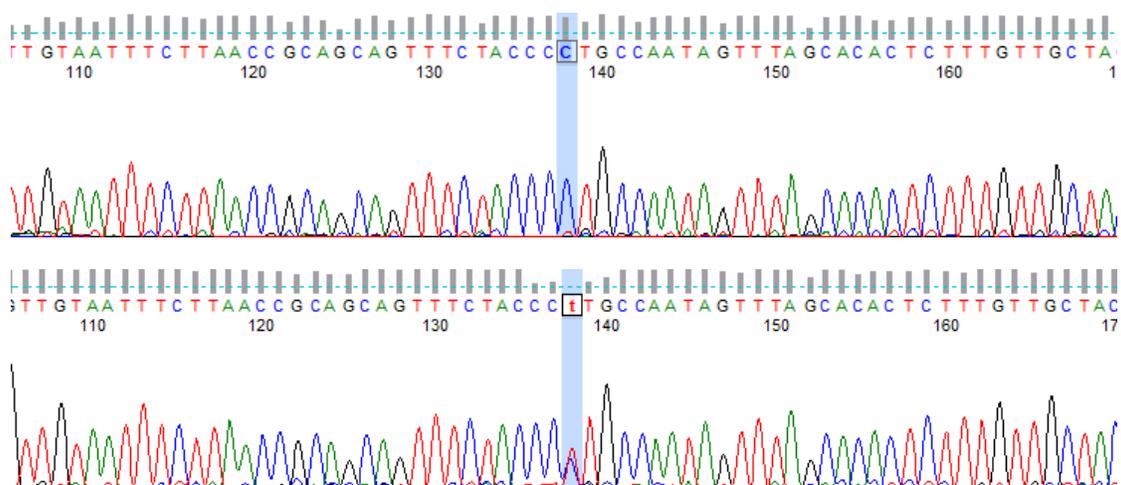


Figura 1.8. Electroferogramas mostrando cambios moleculares en heteroplasmia. El electroferograma superior de cada par corresponde a la secuencia de la línea salvaje y el inferior a la secuencia de la plántula *cpm* mutante. En azul se resaltan las posiciones polimórficas.

	Número de plántulas	Número de eventos mutacionales	Indels de 1 o 2 pb	Indels grandes	Transiciones	Transversiones
<b>Grupo A</b>						
F <sub>2</sub>	97	26	8	2	15	1
M <sub>2</sub>	10	0	0	0	0	0
<b>Subtotal</b>	<b>107</b>	<b>26</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>15</b>	<b>1</b>
<b>Grupo B</b>						
F <sub>2</sub> -1	20	5	1	0	4	0
F <sub>2</sub> -2	7	3	0	0	3	0
F <sub>2</sub> -3	22	3	0	1	1	1
F <sub>2</sub> -4	28	8	0	1	7	0
<b>Subtotal</b>	<b>77</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>15</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>184</b>	<b>45</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>30</b>	<b>2</b>

Tabla 1.4. Cambios moleculares y eventos mutacionales por familia *cpm*.

Genes	Grupo A		Grupo B				Total
	F <sub>2</sub>	M <sub>2</sub>	F <sub>2</sub> -1	F <sub>2</sub> -2	F <sub>2</sub> -3	F <sub>2</sub> -4	
<i>rps2</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>rps3</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>rps7</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>3' rps12</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>rps16</i>	2	0	0	1	1	1	5
<i>rps18</i>	2	0	0	0	0	0	2
<i>rpl2</i>	1	0	0	1	0	0	2
<i>psaA</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>psaB</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>psbA</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>psbC</i>	1	0	1	0	0	1	3
<i>psbD</i>	1	0	1	1	0	0	3
<i>ycf3</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>rbcl</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>matK</i>	2	0	1	0	0	1	4
<i>16S RNA</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>23S RNA</i>	2	0	1	0	0	0	3
<i>tRNA His</i>	1	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>34</b>

Tabla 1.5. Cambios moleculares en regiones génicas por familia *cpm*.

Teniendo en cuenta que se analizaron 42.466 pb y que se identificaron 16 sustituciones luego de analizar 107 plántulas del grupo A, en las cuales actuó el *cpm* en promedio durante 14.5 generaciones, se determinó que la tasa de sustitución por base y generación para el grupo A es  $2.45 \times 10^{-7}$ . De igual manera, se analizaron 77 plántulas del grupo B que estuvo bajo el accionar del *cpm* durante 5 generaciones y se identificaron 16 sustituciones, por lo tanto, la tasa de sustitución por base y generación para el grupo B es de  $9.79 \times 10^{-7}$ . La tasa de sustitución por base y generación se calculó aplicando la siguiente fórmula: número de sustituciones / (número de plántulas x 42.466 x número de generaciones bajo el accionar de *cpm*).

Como se mencionó anteriormente, se decidió realizar el análisis de los resultados del gen *rpl23* por separado debido a la particularidad de sus digestiones. Se obtuvieron digestiones indicando la existencia de cambios moleculares en 62 plántulas *cpm*, una cantidad muy superior a la observada para el resto de los amplicones y/o genes. Fue el único gen que presentó digestiones en plántulas pertenecientes a las 6 familias. Fue el único gen en brindar digestiones con tres pares de bandas que se presentaron en diferentes combinaciones para diferentes plántulas (fig. 1.9). La secuenciación del amplicón *rpl2* en una plántula *cpm* que daba los tres pares de bandas de digestión, determinó la existencia de cinco polimorfismos en el gen *rpl23* respecto de la secuencia salvaje. Esto representa una cantidad de polimorfismos superior a lo que en general se obtuvo para el resto de los genes, solo siendo comparable con los cinco polimorfismos del gen *rps16* que se encontraron en cinco plántulas diferentes. Los cambios moleculares en el gen *rpl23* fueron cuatro sustituciones y una deleción: G115T, G118A, T132A, Del1G 133 y A203G. En el capítulo dos se desarrollará de manera particular el análisis de la variabilidad encontrada en el gen *rpl23* para cada una de estas 62 plántulas *cpm*.

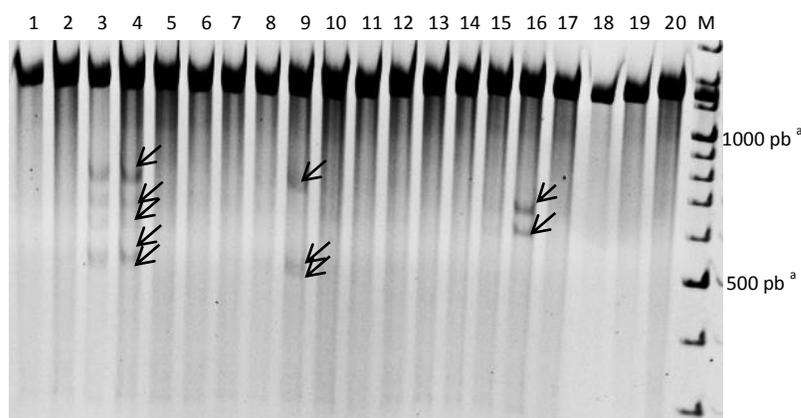


Figura 1.9. Digestiones con CJE del amplicón *rpl2* en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 3%. Las bandas de digestión se indican con flechas. Diferentes plántulas *cpm* muestran diferentes patrones de digestión porque portan diferentes combinaciones de polimorfismos en el gen *rpl23*: las plántulas de las calles 15 y 16 portan el cambio A203G. La plántula de la calle 9 porta los cambios G115T, G118A, T132A y Del1G 133. Las plántulas de las calles 3 y 4 portan el cambio de las plántulas de las calles 15 y 16 junto con los cuatro cambios de la plántula de la calle 9. <sup>a</sup>Las muestras corren más lento que el marcador de peso molecular (M) probablemente debido a componentes de la mezcla para la digestión con CJE.

## **Análisis *in silico* de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a los amplicones estudiados**

Debido a la existencia de porciones del plastoma insertadas en los genomas del núcleo (nupts) y de las mitocondrias (mipts), se analizó la probabilidad de que estos genomas actuaran como molde durante la PCR del cpTILLING en lugar del plastoma. Esto generaría resultados erróneos al detectar polimorfismos que no estarían originados por el *cpm*. Para esto se realizó mediante blastn, la búsqueda de la secuencia completa de cada uno de los amplicones en los cromosomas de cebada y en su genoma mitocondrial.

El análisis de las secuencias de ADN de los siete cromosomas de cebada mediante blastn identificó la presencia de secuencias homólogas (nupts) a las del plastoma. Sin embargo, la longitud de estos nupts siempre fue menor que el tamaño de los amplicones. En la tabla 1.6 se muestran los datos de los alineamientos con longitudes superiores a 500 pb entre secuencias de los amplicones y los nupts de cebada.

El análisis de la secuencia del genoma de la mitocondria de cebada también demostró la presencia de secuencias homólogas (mipts) a las secuencias de los amplicones del plastoma y al igual que sucedió con los nupts, los alineamientos tuvieron una longitud inferior al tamaño de los amplicones en la mayoría de los casos. Se identificaron cuatro amplicones, *psaA* 2°, *psaB* 1°, *psaB* 2° y *rps14*, en donde la longitud de los alineamientos fue igual al tamaño de los amplicones. En la tabla 1.7 se muestran los datos de estos alineamientos. Por un lado, se debe decir que no se detectaron cambios moleculares en el amplicon *psaB* 1° por cpTILLING. Por otro lado, mediante la secuenciación de los otros tres amplicones se determinó que estas secuencias coinciden exactamente con la versión del amplicón contenida en el plastoma. Como se puede apreciar en las columnas *mismatches* y *gaps* de la tabla 1.7, existirían polimorfismos entre la secuencia contenida en el genoma de la mitocondria y la secuencia contenida en el plastoma que permitirían diferenciarlas e identificar su origen.

Cromosoma	Amplicon	Tamaño del amplicon (pb)	Longitud del alineamiento (pb)	% Matches	Mismatches	Gaps	Posicion de comienzo de alineamiento en amplicon	Posicion de fin de alineamiento en amplicon	Posicion de comienzo de alineamiento en cromosoma	Posicion de fin de alineamiento en cromosoma	e-value
1	psbD	986	738	92.28	51	5	1	736	149955905	149955172	0.0
2	rps19	1274	521	95.20	24	1	584	1104	478318827	478318308	0.0
3	rps7	1356	721	92.65	50	3	67	786	447111455	447110737	0.0
			532	87.41	57	7	255	780	369426124	369426651	2,00E-170
4	infA	982	575	89.22	51	8	1	569	253322110	253321541	0.0
	23S 1°	977	663	89.44	66	3	313	975	263819965	263819307	0.0
	rps7	1356	549	87.98	32	20	756	1299	415858944	415858425	7,00E-175
5	rpl33	1085	844	100.00	0	0	242	1085	10222755	10223598	0.0
	rps18	1118	821	99.88	1	0	1	821	10223403	10224223	0.0
	ccsA	1492	803	99.88	1	0	224	1026	10226498	10227300	0.0
6	infA	982	627	92.03	40	7	1	627	335193309	335192693	0.0
	16S 1°	1062	711	90.44	67	1	110	820	358054625	358055334	0.0
	clpP	1077	534	91.01	45	3	1	532	210943674	210944206	0.0
	psbC	1370	833	94.24	47	1	501	1333	290807286	290806455	0.0
	23S 3°	1031	563	95.03	26	1	219	779	173604534	173605096	0.0
	rpl16	1521	610	95.57	20	5	145	753	264876189	264875586	0.0
7	ycf3 1°	1264	563	93.25	27	6	423	979	330047255	330047812	0.0
			506	94.47	21	4	241	740	169724072	169723568	0.0
	ycf3 2°	1176	1024	91.41	80	7	78	1099	298005090	298004073	0.0
	psaA 2°	1032	578	94.64	29	2	249	825	284597248	284597824	0.0
	psaB 2°	1010	608	94.74	30	2	403	1010	281636944	281636339	0.0
	psbC	1370	585	91.79	45	3	787	1370	146958924	146958342	0.0
	rps14	1207	842	89.90	39	22	1	810	273662406	273663233	0.0
	rps4	1326	534	88.58	41	10	772	1304	425946193	425946707	0.0

Tabla 1.6. Datos de los alineamientos con longitudes superiores a 500 pb de las secuencias de los amplicones ensayados en el cpTILLING y las secuencias de los cromosomas de cebada. En la mayoría de los casos, el alineamiento no comienza en la posición uno del amplicón (su primera base), ni termina en la última posición (su última base) y en los pocos casos en que esto sí ocurre, la longitud del alineamiento es menor que el tamaño del amplicón.

Amplicon	Tamaño del amplicon (pb)	Longitud del alineamiento (pb)	% Matches	Mismatches	Gaps	Posicion de comienzo de alineamiento en amplicon	Posicion de fin de alineamiento en amplicon	Posicion de comienzo de alineamiento en genoma mitocondrial	Posicion de fin de alineamiento en genoma mitocondrial	e-value
psaA 2°	1032	1032	99.42	6	0	1	1032	135018	136049	0.0
		1032	99.42	6	0	1	1032	304485	305516	0.0
psaB 1°	1267	1267	99.53	6	0	1	1267	133639	134905	0.0
		1267	99.53	6	0	1	1267	303106	304372	0.0
psaB 2°	1010	1010	99.31	7	0	1	1010	132797	133806	0.0
		1010	99.31	7	0	1	1010	302264	303273	0.0
rps14	1207	1239	94.59	22	22	1	1207	131613	132838	0.0
		1239	94.59	22	22	1	1207	301080	302305	0.0

Tabla 1.7. Datos de los alineamientos de las secuencias de los cuatro amplicones del cpTILLING con secuencias de la mitocondria de cebada en donde la longitud de los alineamientos fue igual al tamaño de los amplicones.

## DISCUSIÓN

### cpTILLING como estrategia para la detección de cambios moleculares en el plastoma de cebada

La implementación de una metodología de genética reversa del tipo TILLING (McCallum et al., 2000) adaptada al genoma de los cloroplastos permitió la identificación de cambios moleculares a nivel del plastoma de plántulas que portaron el mutador *cpm* en estado activo durante diferente número de generaciones. La identificación de los cambios moleculares permitió corroborar la actividad mutagénica del *cpm* y conocer mejor el espectro de las mutaciones que este mutador induce. Por otro lado, en esta tesis se presenta por primera vez el uso de este tipo de estrategia de genética reversa para la detección de cambios moleculares provenientes del accionar de un gen mutador del plastoma.

Debido a que el TILLING puede llevarse a cabo con pequeñas muestras de tejido, el cpTILLING permitió el análisis de las hojas de las plántulas de unas pocas semanas que se utilizaron en esta tesis. Se consideró que el análisis de poblaciones con muchas generaciones de autofecundación portando el gen *cpm*, aumentaría la probabilidad de detectar a los cambios moleculares inducidos por *cpm*. Por un lado, un mayor número de generaciones bajo el accionar del *cpm* aseguraría una mayor acumulación de mutaciones inducidas. Por otro lado, la elección de poblaciones *cpm* que atravesaron muchas generaciones de autofecundación favorecería que aquellos cambios moleculares que se generaron en las primeras generaciones, se encuentren en homoplasma o en una situación cercana a la de un polimorfismo en homoplasma. Esto entonces permitiría que al mezclar en partes iguales cada uno de estos ADNs con el ADN salvaje para su posterior amplificación y digestión, los cambios moleculares se encuentren en una relación cercana a la ideal de partes iguales para su correcta detección. Además, también se identificarían aquellos cambios en heteroplasma que aún luego de mezclar sus ADNs con el ADN salvaje, se encuentren en una relación tal que su digestión se siga detectando en los geles de poliacrilamida. De todas formas, debido a que una vez que una mutación ocurre el crecimiento del sector mutante es lento y menos predecible que en el caso de una mutación ubicada en el núcleo (Kirk and Tilney-Bassett, 1978; Birky, 2001; Prina et al., 2012a, 2012b), no se puede asegurar la detección de todas las variantes polimórficas presentes en los plastomas de las plántulas *cpm* analizadas.

En relación a la aparición de mutaciones espontáneas en el plastoma, es de destacar que todos los polimorfismos que se identificaron en este estudio de cpTILLING se ubicaron en ADNs de plántulas *cpm*, ninguno en el ADN de la línea salvaje. Las plántulas pertenecientes a la línea salvaje atravesaron muchas más generaciones de autofecundación que las plántulas *cpm*. De hecho, estas plántulas provienen de un genotipo que ya había atravesado muchas generaciones de autofecundación cuando fue mutagenizado para luego aislar la mutante *cpm*. Luego, este genotipo madre fue multiplicado por autopolinización en paralelo con las familias *cpm* analizadas. Por otro lado, en este material salvaje tampoco se observaron evidencias fenotípicas de cambios mutacionales en el plastoma, tal como la presencia de deficiencias clorofílicas y/o de cambios morfológicos conspicuos.

## **El plastoma como genoma molde: Análisis de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a las secuencias de los amplicones analizados**

El estudio mediante *blastn* de las secuencias de los cromosomas del genoma nuclear y del genoma mitocondrial de *H. vulgare* permitió el análisis de la existencia de la secuencia de los amplicones ensayados en el cpTILLING en dichos genomas. Esto permitió el análisis de la factibilidad de que la amplificación se haya realizado usando al genoma de los cloroplastos como único genoma molde. El hecho de que al alinear la secuencia de los amplicones con las secuencias de los siete cromosomas del genoma nuclear, solamente se hayan obtenidos longitudes de alineamientos inferiores a los tamaños de todos los amplicones, indicaría la ausencia de amplificación de las porciones del genoma del cloroplasto que existen en el genoma nuclear, las llamadas *nupts*.

Por otra parte, si bien al analizar el genoma de las mitocondrias se detectaron alineamientos con longitudes iguales al tamaño de cuatro de los amplicones ensayados, cabe destacar que la secuencia de estos cuatro amplicones coincidió exactamente con la secuencia presente en el plastoma. Esto indicaría, la ausencia de la amplificación de las versiones de los amplicones contenidas en el genoma de las mitocondrias y por lo tanto, que la variabilidad detectada en estos amplicones sería la existente en el plastoma de las plántulas *cpm* y no la que pudiera existir en la versión ubicada en el genoma de las mitocondrias, las llamadas *mipts*.

## **Espectro de las mutaciones inducidas por *cpm* identificadas mediante cpTILLING**

En coincidencia con los resultados previos obtenidos mediante el estudio de mutantes clorofílicas derivadas de *cpm* (Rios et al., 2003; Landau et al., 2007, 2009, 2011), los cambios moleculares identificados en el análisis de las plántulas *cpm* mediante cpTILLING fueron principalmente del tipo puntual. Cuarenta y uno de los 45 cambios moleculares fueron sustituciones o indels de una o dos bases y solo cuatro cambios excedieron las dos bases (Tabla 1.4). Si bien la técnica de TILLING permite la detección de cambios puntuales y no de grandes rearrreglos en las secuencias del ADN como la haría southern blot, en este análisis la digestión con CJE permitió también la detección de cuatro indels de un tamaño de las decenas de pares de bases y en tres de estos casos se superó el tamaño del indel más largo detectado en ensayos de TILLING realizados sobre genomas nucleares (Comai et al., 2004). El análisis y la discusión sobre los indels grandes identificados se desarrollarán por separado en el capítulo tres.

Los polimorfismos respecto de la línea salvaje se ubicaron en varias de las regiones analizadas en el plastoma de plántulas *cpm*, tanto de las LSC y SSC como de las IRs. Por otro lado, se encontraron polimorfismos tanto en regiones génicas codificantes de proteínas, de ARNs ribosomales y de transferencia, como así también en regiones intergénicas.

Sin considerar los polimorfismos en el gen *rpl23*, se identificaron polimorfismos en 18 genes (Tabla 1.5). Estos genes tienen funciones variadas pertenecientes a los tres grupos de funciones en que se clasificaron a los genes del plastoma que se analizaron (ver materiales y métodos). Algunos genes como *rbcL*, *rpl23* y *23sRNA* son de suma importancia para la supervivencia de las plantas. El gen más frecuentemente afectado fue *rps16* con cinco polimorfismos diferentes respecto del gen salvaje. Todos los polimorfismos se ubicaron en su intrón, un resultado que es consistente con el hecho de que este intrón es utilizado en estudios filogenéticos dado su potencial para la variabilidad (Downie y Katz-Downie, 1999).

Debido a la particular situación obtenida para los polimorfismos identificados en el gen *rpl23* en relación a la cantidad de plántulas afectadas y a las combinaciones en que estos fueron hallados, es difícil explicar su origen en términos de mutaciones puntuales y se considera más probable que esta variabilidad se deba a otro mecanismo como por ejemplo, la recombinación del ADN. La recombinación es un mecanismo de conservación de la integridad del genoma muy activo en los cloroplastos (Marechal y Brisson, 2010). Por este motivo, los polimorfismos en el gen *rpl23* se analizaron independientemente del resto de los polimorfismos detallados en este capítulo y la discusión sobre esta variabilidad se realizará en el capítulo dos.

En relación al espectro de los cambios puntuales inducidos en los plastomas de las plántulas *cpm* se puede concluir que la mayoría (32) corresponde a sustituciones principalmente del tipo transiciones y en menor medida (nueve) a indels de una o dos bases en microsatélites. Los nueve indels de una o dos bases se ubicaron en repeticiones de nueve o 10 mononucleótidos, las cuales representan el tipo predominante de microsatélites en el genoma de los cloroplastos (Rajendrakumar et al., 2002). La producción de indels en microsatélites constituye lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites. Por otra parte, 11 de las 32 sustituciones se ubicaron también en repeticiones de mononucleótidos de tamaño inferior a las nueve o 10 bases de longitud. Estos resultados muestran que las repeticiones de mononucleótidos son sitios de inestabilidad en los plastomas *cpm* y sugieren que la proteína cuyo funcionamiento se encuentra afectado en esta línea, está altamente especializada en corregir este tipo de mutaciones.

El número de cambios moleculares puntuales en las regiones LSC y SSC casi cuadruplicó al número de cambios en las IRs, sin embargo se debe tener en cuenta que se analizó casi el doble de pares de bases en las regiones LSC y SSC que en las IRs. Las sustituciones se ubicaron tanto en regiones génicas como intergénicas, ya sea de las IRs como de las regiones de simple copia en ambos grupos de plántulas A y B. La frecuencia de sustituciones en regiones génicas considerando la totalidad de las bases analizadas (bases de los amplicones multiplicado por el número de plantas de cada grupo), fue similar entre las regiones de copia simple (LSC y SSC) y las regiones IRs en ambos grupos A y B. Por otro lado, no se detectaron indels de una o dos bases ni sustituciones en las regiones intergénicas de las IRs en ninguno de los grupos A y B. Tampoco se identificaron indels de una o dos bases en las regiones génicas de las IRs en ninguno de los dos grupos. Estos resultados coinciden con la determinación de una menor frecuencia de sustituciones e indels en regiones intergénicas ubicadas en las IRs respecto de las ubicadas en regiones de copia simple,

obtenida en estudios evolutivos mediante la comparación de plastomas completos de azúcar, maíz y arroz (Yamane et al., 2006).

Mediante la estimación del estado de homoplasia o heteroplasia de los polimorfismos identificados en función de la observación de los picos en los electroferogramas se determinó que la mayoría de los cambios moleculares en ambos grupos se encuentran en homoplasia. Este resultado es de esperar si se considera que se están analizando poblaciones que poseen muchas generaciones de autofecundación, lo que permite la segregación de los plastomas mutantes. Es importante aclarar que si bien la determinación del estado de homoplasia o heteroplasia de los polimorfismos mediante la observación de picos simples o dobles en los electroferogramas no brinda seguridad absoluta de dichos estados, se lo consideró como una buena aproximación y de fácil aplicación en el gran número de plántulas portadoras de polimorfismos que se identificaron en este ensayo. Cabe recordar que siempre se comparó con el electroferograma de la línea salvaje, considerándose como polimórficas las posiciones que mostraron picos diferentes únicos o dobles solamente en el electroferograma de la plántula mutante. Por otro lado, las reacciones de secuenciación se realizaron siempre con los cebadores *forward* y *reverse* buscando confirmar el cambio en la secuencia desde los dos extremos. Por último, se debe destacar que en los casos de sustituciones en heteroplasia, la secuenciación se realizó al menos dos veces para confirmar este resultado.

Como un ejemplo del uso de la secuenciación en la determinación del estado de homoplasia o heteroplasia, se puede citar el trabajo realizado por Massouh y colaboradores (2016) sobre mutaciones de longitud (indels) de pocas bases en el plastoma. En este trabajo se determinó el estado homoplásmico de las mutaciones espontáneas que se identificaron en los tejidos de *Oenothera* mediante secuenciación masiva (NGS). Si bien en la secuenciación masiva, una misma posición en la secuencia del ADN es leída un mayor número de veces que mediante la secuenciación de Sanger, esta última implica también el análisis de muchas moléculas de ADN derivadas de los plastomas existentes en las plántulas analizadas. Por este motivo, se cree que también serviría para identificar a los cambios presentes en heteroplasia. Este hecho es bien evidente en el caso de un indel en heteroplasia, en donde la repetición de picos dobles desde la posición en que se produce la inserción o la delección, identifica inequívocamente la existencia del indel. La identificación de las sustituciones de una base en heteroplasia es menos segura, por este motivo, se decidió secuenciar dos veces a los amplicones que tuvieron sustituciones en heteroplasia.

### **Posibles causas de los cambios puntuales identificados en los plastomas *cpm***

Los resultados obtenidos soportan la hipótesis original sobre el mal funcionamiento de una proteína codificada en el núcleo responsable del mantenimiento de la integridad del ADN del cloroplasto (Prina, 1992). La naturaleza recesiva del fenotipo *cpm* indica que el gen afectado corresponde a alguno relacionado con la reparación del ADN (Hasting et al., 1976). La mayoría de

los cambios moleculares identificados por cpTILLING fueron puntuales y correspondieron a sustituciones e indels en microsatélites. Estos cambios puntuales podrían ser el producto de los errores cometidos por la ADN polimerasa durante la replicación del plastoma y de la ausencia de la reparación de los apareamientos incorrectos que esto produciría en el ADN del cloroplasto. De esta manera, el espectro mutacional de los cambios moleculares puntuales identificados en esta tesis sugiere fuertemente que el gen afectado en las plántulas *cpm* se encontraría involucrado en el sistema de reparación del ADN del tipo *mismatch repair* del cloroplasto. Esto se cree así ya que según estudios realizados sobre el mantenimiento del genoma de bacterias y del genoma nuclear en eucariotas se sabe que el sistema de *mismatch repair* actúa durante la replicación del ADN para remover los errores cometidos por la polimerasa debido a la incorporación equivocada de nucleótidos (Chakraborty y Alani, 2016). La falla en este sistema de reparación se traduce en un aumento de las sustituciones, tal como se determinó que ocurre en el plastoma *cpm*. Por otro lado, está ampliamente aceptado que un incremento en los indels ubicados en repeticiones de mononucleótidos o inestabilidad de microsatélites, es un indicador típico de la falla en el funcionamiento del sistema de reparación del ADN del tipo *mismatch repair* (Thibodeau et al., 1993; Vaish y Mittal, 2002) y como se dijo antes, se detectaron varios casos de inestabilidad de microsatélites en el plastoma de las plántulas *cpm*.

Pocos son los casos en la bibliografía de mutadores que originan mutantes de herencia citoplásmica y en donde se conocen los cambios moleculares que se producen a nivel del plastoma. Uno de ellos corresponde al mutador del plastoma de *Oenothera*, en donde aún se desconoce el gen nuclear afectado. Esta mutante corresponde a uno de los pocos genotipos mutadores reportados como inductores de un amplio espectro de mutantes de herencia citoplásmica en dicotiledóneas (Epp, 1973). Si bien, tal como se observó en *cpm*, en esta mutante se reportó la existencia de algunos cambios puntuales en el plastoma, los principales cambios reportados corresponden al incremento de indels en regiones del plastoma con repeticiones en tándem (Stoike y Sears, 1998).

Existe un mutador inductor de un amplio espectro de mutantes de herencia citoplásmica en *A. thaliana*. El gen nuclear afectado en esta mutante resultó ser homólogo del gen *MUTS* de *E. coli*, el cual está involucrado en el sistema de reparación de *mismatch repair* y por lo tanto, fue renombrado como *MSH1* (Abdelnoor et al., 2003). Se determinó que fallas en el funcionamiento de la proteína codificada por *msh1* causan variaciones en el genoma mitocondrial (Martinez-Zapater et al., 1992; Sakamoto et al., 1996; Abdelnoor et al., 2003). Luego se determinó en esta mutante, una baja frecuencia de re-arreglos del ADN del plastoma que estarían mediados por recombinación (Xu et al., 2011). La mutante *msh1* de *A. thaliana* se diferencia de *cpm* por el rápido *sorting out* o segregación de los clones mutantes que fue inferido basado en la variegación de las hojas y la usual presencia de plantas con hojas deformadas y altos niveles de esterilidad (Redei, 1973; Sakamoto et al., 1996).

En función de que el gen *MSH1* pertenece al sistema de reparación de *mismatch repair* y que actúa en cloroplastos y mitocondrias, el gen *MSH1* de cebada parecería ser un buen candidato a ser el gen afectado en *cpm*. El análisis realizado mediante el cpTILLING en *cpm* sugiere el mal

funcionamiento de alguna proteína involucrada en el sistema *mismatch repair* que actúa sobre el plastoma. Es necesario realizar un estudio sobre las consecuencias de las fallas en este gen sobre la integridad del genoma de las mitocondrias y así determinar si la proteína CPM también tiene doble direccionamiento y por lo tanto también afecta al genoma de las mitocondrias, tal como ocurre con la proteína codificada por el gen *MSH1* de *A. thaliana*.

### ***cpm* como herramienta de generación de variabilidad en el plastoma de cebada**

A través de una estrategia de TILLING dirigido al plastoma fue posible demostrar que las plántulas *cpm* portan numerosos cambios moleculares en el plastoma, principalmente mutaciones puntuales y que estuvieron distribuidas a lo largo de la mayor parte de las secuencias analizadas. La naturaleza sutil del impacto a nivel molecular de la mayoría de las mutaciones inducidas por el *cpm* podrían ser de gran utilidad para obtener series alélicas que pudieran incluir alelos vitales y constituye una alternativa a los clásicos *knock-outs* utilizados en el estudio de la funcionalidad de los genes. En este sentido, se debe decir que los avances en el estudio de la funcionalidad de los genes del plastoma basados en mutaciones son escasos (Greiner, 2012), mientras que la mayor parte del conocimiento sobre funciones de los genes del plastoma provienen de estudios de genética reversa basados en *knock-outs* de genes (Rochaix, 1997; Rochaix, 2003; Leister, 2003; Day 2012). Es importante remarcar la detección en las plántulas *cpm* de mutaciones en genes esenciales como *matK* y genes de proteínas ribosomales para los cuales no existe ningún *knock-out* (Scharff y Bock, 2014). Genotipos genéticamente inestables como el *cpm* pueden ser una alternativa de mayor eficiencia que la mutagénesis artificial para expandir la tan escasa variabilidad natural e incluso inducida del plastoma (Kirk and Tilney-Basset 1978; Börner y Sears 1986; Gressel y Levy, 2010; Greiner, 2012; Prina et al., 2012b). En el caso particular del *cpm*, este genotipo mutador se puede utilizar para la inducción de mutaciones y luego es posible eliminar la inestabilidad genética que este genera mediante el cruzamiento con una planta salvaje. De esta manera se pueden obtener líneas mutantes estabilizadas con nueva variabilidad. Esta variabilidad puede luego ser utilizada tanto en investigación como en mejoramiento genético clásico y/o en biotecnología y puede ser utilizada tanto en experimentos de selección directa (Rios et al., 2003) como aplicando una adecuada estrategia de genética reversa como la del TILLING o la de secuenciación masiva.

Por otro lado, la investigación del *cpm* puede contribuir a aumentar el limitado conocimiento sobre mecanismos de reparación del ADN que mantienen la integridad del genoma de las organelas de las plantas (Rowan et al., 2010; Ruhlman y Jansen, 2014). Por último, es de destacar que mutadores de genomas de las organelas como el *cpm* podrían jugar un importante rol en la evolución de las plantas (Gressel y Levy, 2010), especialmente en lo que se refiere a las estrategias que las plantas desarrollan para su adaptación a los ambientes estresantes.

## CONCLUSIONES

La adaptación de la técnica de TILLING al estudio del genoma de los cloroplastos resultó ser efectiva para la identificación de cambios moleculares en el plastoma en poblaciones *cpm* con varias generaciones de autofecundación.

Los cambios moleculares estuvieron distribuidos a lo largo de las diferentes regiones del plastoma y afectaron tanto a regiones génicas codificantes de proteínas, proteínas ribosomales y ARNs ribosomales y de transferencia, como así también a regiones intergénicas.

Los cambios moleculares fueron principalmente transiciones y también indels de una o dos bases en repeticiones de mononucleótidos (inestabilidad de microsatélites) y en menor medida indels de mayor tamaño.

Tanto la inestabilidad de microsatélites como la aparición de sustituciones en el plastoma *cpm* sugerirían el mal funcionamiento de una proteína codificada por un gen involucrado en el sistema de reparación del ADN del tipo *mismatch repair* direccionada al cloroplasto. Debido a la falla en este sistema no se corregirían los nucleótidos incorporados incorrectamente por la ADN polimerasa durante la replicación del ADN del plastoma.

La naturaleza sutil de la mayoría de los cambios moleculares que causa el *cpm* en el plastoma, permitiría la generación de variantes alélicas con funcionalidad residual de aplicación en genómica funcional y/o en mejoramiento genético.

**CAPÍTULO 2**

**Análisis del gen**  
**y del pseudogen *rpl23***

## INTRODUCCIÓN

El gen *rpl23* tiene un tamaño de 283 pb y codifica a la proteína ortóloga a la proteína ribosomal L23 de *E. coli*. En cebada Rpl23 forma parte estructural de los ribosomas de los cloroplastos. Este gen se localiza en las repeticiones invertidas del plastoma de la cebada, por lo tanto, se encuentra como doble copia en ese genoma. En el genoma de las gramíneas también existe una versión no funcional de este gen, es decir un pseudogen, ubicado en la región de la copia simple grande (LSC) comprendida entre los genes *psal* y *rbcl*. La región que contiene al pseudogen se definió como un *hotspot* de variabilidad (Ogihara et al., 1988; Ogihara et al., 1991; Ogihara y Osawa, 2002) por la alta frecuencia de mutaciones de longitud entre las diferentes especies dentro de las gramíneas. Por otro lado, debido a que se determinó una menor tasa de cambios moleculares en la región de este *hotspot* en la que se ubica el pseudogen *rpl23* respecto de la región que lo rodea, se postuló el posible mantenimiento de la secuencia del pseudogen mediante recombinación con la secuencia del gen *rpl23* en trigo y en maíz (Bowman et al., 1988; Ogihara et al., 1991; Morton y Clegg, 1993).

Debido a que la variabilidad que se identificó en el gen *rpl23* presenta características que la distinguen de la variabilidad identificada en el resto de las regiones del plastoma, tanto por el número de plantas afectadas como por el número de polimorfismos involucrados, y debido a que en otras especies de gramíneas el pseudogen *rpl23* podría mantener su secuencia por recombinación con la secuencia del gen, se decidió hacer el análisis de estos dos *loci* de manera independiente en este capítulo de tesis. Esto se hizo con el objeto de identificar el mecanismo existente detrás de esta variabilidad tan particular. En este capítulo se profundiza el análisis en cada una de las 62 plántulas con combinaciones de polimorfismos en el gen *rpl23* y se analiza la existencia de cambios moleculares en el pseudogen *rpl23* de las plántulas *cpm*. Por otro lado, se analizan también el gen y el pseudogen *rpl23* en una población control.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Profundizar el análisis de la variabilidad en el gen *rpl23* de las plántulas *cpm*. Analizar el gen *rpl23* en una población control.

Analizar la existencia de variabilidad en el pseudogen *rpl23* de las plántulas *cpm* y de plántulas control.

Analizar las posibles consecuencias de los cambios moleculares en el gen *rpl23*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

El material experimental consistió de las 184 plántulas *cpm* analizadas en el capítulo uno y entre las que se encuentran las 62 plántulas en las que se observaron cambios moleculares en el gen *rpl23* contenido en el amplicón *rpl2*.

Por otro lado, se analizaron plántulas salvajes pertenecientes a dos grupos control diferentes. El grupo uno consistió en 20 plántulas que provienen de diferentes familias derivadas del mismo genotipo parental a partir del cual la mutante *cpm* se aisló luego de un tratamiento mutagénico. El grupo dos consistió en 20 plántulas que representan una amplia gama de genotipos de cebada, que incluyen cultivares comerciales, tanto para maltería como forrajeros, y también genotipos no comerciales. En el ANEXO II se listan las 40 plántulas control analizadas.

Por último, se analizaron algunas progenies de plántulas *cpm* pertenecientes a familias que además de segregar polimorfismos en *rpl23*, segregaron plántulas albinas o *striata-albina* conjuntamente con fenotipos verdes normales.

Todas las plántulas crecieron en el invernáculo para su observación en la etapa de segunda hoja y para la toma de muestra de hojas, y luego se trasplantaron a jaula de cría para observación hasta su madurez y obtención de semillas que se cosecharon por planta individual.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó tal como se describió en el capítulo uno.

### **Análisis del gen y del pseudogen *rpl23* mediante digestiones con CJE**

Sobre todas aquellas plántulas que dieron digestión del amplicón *rpl2*, se realizó la amplificación y digestión con CJE del amplicón *rpl23*. Los cebadores utilizados para obtener el amplicón *rpl23* fueron: *rpl23F* 5'-ATGGATGGAATCAAATACGCA-3' y *rpl2F* 5'-CACTTGCTGCCGTTACTCAA-3'. El amplicón *rpl23* también contiene al gen *rpl23*. El cebador *rpl23F* se ubica al comienzo del gen *rpl23* y en combinación con el cebador *rpl2F* permite la amplificación de las dos copias del gen ubicadas una en cada IR. El amplicón *rpl23* posee un tamaño de 831 pb. El análisis del amplicón *rpl23* se realizó a partir de la amplificación tanto de la mezcla del ADN de cada una de las plántulas *cpm* con ADN de la línea salvaje, como de la amplificación proveniente del ADN de cada muestra *cpm* sin mezclar con ADN salvaje. Este análisis se realizó a modo de investigar el estado de homoplasma o heteroplasma de los cambios moleculares en el gen mediante las digestiones con CJE.

La búsqueda de cambios moleculares en el pseudogen *rpl23* se hizo sobre las mismas 184 plántulas *cpm* en que se analizó el gen *rpl23*. Se realizó por digestión con CJE del amplicón pseudogen *rpl23* obtenido a partir de la mezcla en partes iguales de los ADN de cada una de las plántulas *cpm* con el ADN de la línea salvaje. Los cebadores usados para la obtención del amplicón pseudogen *rpl23* fueron: *rpl23F* 5'-ATGGATGGAATCAAATACGCA-3' y *hotspotR* 5'-CATCCTCATGGCCTTTCTATCT-3'. El cebador *rpl23F* se ubica al comienzo del pseudogen *rpl23*. El amplicón pseudogen *rpl23* posee un tamaño de 1126 pb.

Los amplicones *rpl23* y pseudogen *rpl23* también se utilizaron para analizar la existencia de cambios moleculares en el gen y el pseudogen *rpl23* de las plántulas pertenecientes a los grupos control. Luego de corroborar la amplificación de estas dos regiones en todas las plántulas de los grupos control, se realizó el análisis mediante la amplificación de las mezclas de ADN de cada una de las plántulas control con los mismos ADNs salvaje que se utilizaron para realizar la mezcla de ADNs en las plántulas *cpm* y mediante la posterior digestión de los amplicones con CJE.

Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3 ([v. 4.0.0, http://primer3.ut.ee/](http://primer3.ut.ee/)) usando la secuencia del genoma del cloroplasto de la cebada *H. vulgare* de Genbank (NC\_008590.1) como referencia (fig. 2.1). Las condiciones de la amplificación por PCR, de las etapas de desnaturalización, renaturalización lenta y digestión de los amplicones y las condiciones de la electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron tal como se detalló en el capítulo anterior y como están descritas en Landau et al., (2016).

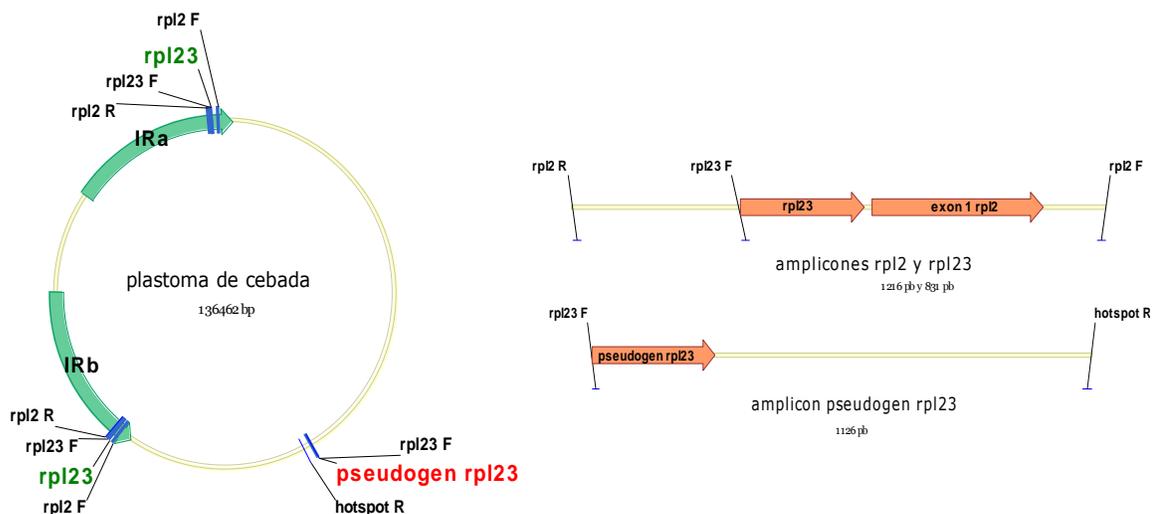


Figura 2. 1. A la izquierda se esquematiza el plástoma de cebada indicando la ubicación de los genes *rpl23* (en verde) y del pseudogen *rpl23* (en rojo) junto con los cebadores usados para sus amplificaciones. A la derecha se esquematizan los amplicones *rpl2*, *rpl23* y pseudogen *rpl23*.

## **Determinación de los polimorfismos respecto de la línea salvaje en el gen y pseudogen *rpl23* mediante secuenciación**

Para la identificación de los polimorfismos respecto de la secuencia en la línea salvaje, se secuenciaron los amplicones gen y pseudogen *rpl23* obtenidos a partir del ADN de las plántulas *cpm* que dieron digestión con CJE de dichos amplicones. Por otro lado, mediante la observación de un pico único en las posiciones de los electroferogramas con cambios moleculares se estimó el estado de homoplasia de los cambios.

Los ensamblajes, alineamientos y gráficos de las secuencias se realizaron con el programa Vector NTI 10.0 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA).

## **Extracción de proteínas de cloroplastos y western blot**

### Obtención de las fracciones proteicas solubles y asociadas a membranas a partir de un protocolo de aislamiento de membranas tilacoides

El método de aislamiento de tilacoides se basó en el descrito por Guiamet et al., (2002) con algunas modificaciones. Las láminas de la primera hoja de varias plántulas se cortaron con tijera en pequeños trozos y luego se machacaron en mortero con 2 ml de buffer de homogenización frío (50 mM HEPES pH 7,4, 0,3 M sacarosa, 1 mM EDTA disódico, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% BSA). Luego se filtró el homogenato a través de una capa de Miracloth (Calbiochem) y el contenido se dispuso en tubos en hielo. Se centrifugó a 3.000g durante 5 minutos a 4°C. Se separó y guardó el sobrenadante conteniendo la fracción proteica soluble a -70°C y se resuspendieron los precipitados conteniendo la fracción proteica asociada a membranas tilacoides con 750 µl de buffer de lavado (10 mM HEPES pH 7,4, 5 mM sacarosa, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Se centrifugó a 3.000g durante 5 minutos a 4°C. Se volcó el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados en 100 µl de buffer de almacenamiento (10 mM HEPES pH 7,4, 5 mM sacarosa, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol). Los tubos luego recibieron un shock de nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C.

### Cuantificación del contenido proteico de la fracción soluble

La concentración de proteínas solubles se obtuvo mediante el kit microBCA protein assay (Thermo Fisher Scientific Inc, USA).

### Minigeles de SDS-PAGE

Se sembraron 20 µg de proteínas por cada muestra en geles de poliacrilamida 13% de 0,75 mm. Los geles de concentración ("stacking") y de separación se prepararon según Scopes y Smith (1998). La electroforesis se realizó en una Miniprotean II (Bio-Rad) a 15 mA constantes por gel en buffer de corrida 1x (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS). Se usó como marcador molecular el *Precision Plus Protein Standards All Blue* (Bio-Rad).

### Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa

Los geles se pusieron en contacto con la membrana de nitrocelulosa y rodeados con papel Whatman. Tanto el gel como la membrana y el papel Whatman fueron previamente colocados en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, 20% metanol). La transferencia se realizó en buffer de transferencia en la Miniprotean II (Bio-Rad) durante 1 h 20 min a 100 V constantes.

### Western blot en plántulas *cpm* con polimorfismos en el gen *rpl23*

Luego de la transferencia a membrana de nitrocelulosa de la fracción proteica soluble de tilacoides de hojas de plántulas *cpm*, se inmunodetectaron la subunidad grande de rubisco RbcL y la proteína homóloga de RecA de *E. coli* direccionada al cloroplasto (CpRecA) con antisuero de conejo anti RbcL (Agrisera, Sweden) y antisuero de conejo anti *E. coli* RecA (Abcam, UK), respectivamente. Luego del bloqueo de la membrana con leche en polvo descremada durante 1 h, se incubó toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios, se lavó la membrana con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo secundario (conjugado con HRP) de cabra anti conejo durante 1 h. La inmunodetección se realizó con el sustrato quimio-luminiscente del kit *Supersignal west dura extended duration* (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) de acuerdo a la descripción del fabricante.

### **Análisis *in silico* de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a los amplicones *rpl23* y pseudogen *rpl23***

Se investigó mediante blastn la existencia de la versión completa de los amplicones *rpl23* y pseudogen *rpl23* en los genomas nuclear y mitocondrial. Se utilizó la secuencia de ambos amplicones como *query* y como base de datos se utilizaron las secuencia de cada uno de los 7 cromosomas de cebada *H. vulgare sub. vulgare cv. Morex* depositada en EnsemblPlants ([ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-35/fasta/hordeum\\_vulgare/dna/](ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-35/fasta/hordeum_vulgare/dna/)) y la secuencia del genoma mitocondrial de cebada *H. vulgare sub. vulgare cv. HarunaNijo* depositada en Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP017301.1>).

## RESULTADOS

### Análisis de los polimorfismos en el gen *rpl23* de plántulas *cpm*

Como se describió en el capítulo uno, mediante el análisis del amplicón *rpl2* en 184 plántulas *cpm* se identificaron 62 plántulas que portaban cambios moleculares en el gen *rpl23*. Esto representó el 34% de las plántulas analizadas. Los cambios moleculares fueron: G115T, G118A, T132A, Del1G133 y A203G, que se encontraron en diferentes combinaciones y dieron diferentes patrones de digestión con CJE.

Mediante el análisis del amplicón *rpl23* (fig. 2.2) en estas 62 plántulas *cpm*, se realizó la corroboración de las combinaciones de los polimorfismos o variantes genéticas previamente detectadas con el amplicón *rpl2*. El uso de este nuevo amplicón *rpl23* permitió que las diferentes bandas de digestión se separaran mejor durante la electroforesis en los geles de poliacrilamida y por lo tanto, fueron diferenciadas más fácilmente respecto de la digestión del amplicón *rpl2* (ver figura 2.3). Además, el tamaño de las bandas de digestión correspondía con la posición de los polimorfismos dentro del gen, lo que facilitó la interpretación de los patrones de digestión y el análisis de la existencia de cada polimorfismo. Por otro lado, tal como se detalla más adelante, la digestión con CJE también se utilizó para el análisis del estado de homoplasma y heteroplasma de los polimorfismos. Los cambios moleculares estuvieron siempre en combinaciones de tres grupos de polimorfismos respecto de la secuencia salvaje y se observaron como tres pares de bandas de digestión. Los cambios moleculares se ubicaron entonces ligados en tres bloques. Estos se designaron como bloque **A**: G115T y G118A, bloque **B**: T132A y DelG133 y bloque **C**: A203G. Estos tres bloques se pueden presentar en siete posibles combinaciones o variantes genéticas respecto de la secuencia salvaje. Dichas combinaciones se muestran en la figura 2.4.

Los resultados de la identificación de los cambios moleculares en el gen *rpl23* de las 62 plántulas *cpm* se muestran en la tabla 2.1, en donde se puede ver que ciertas variantes genéticas fueron más frecuentemente observadas que otras. Las variantes genéticas se representaron como combinaciones de los bloques **A**, **B** y **C** y la secuencia salvaje en dichas posiciones se representó con **+**. De esta manera, la variante genética **++C** se observó en un total de 36 plántulas pertenecientes a las seis familias *cpm* que ya fueron descritas en el capítulo uno. A continuación se observó la variante genética **ABC** que se encontró en cuatro familias y en nueve plántulas. Luego se observaron **AB+** en dos familias y ocho plántulas, **+B+** en tres familias y cinco plántulas, **+BC** en dos familias y tres plántulas y **A++** en una familia y una plántula. No se identificaron plántulas portando la variante genética **A+C**.

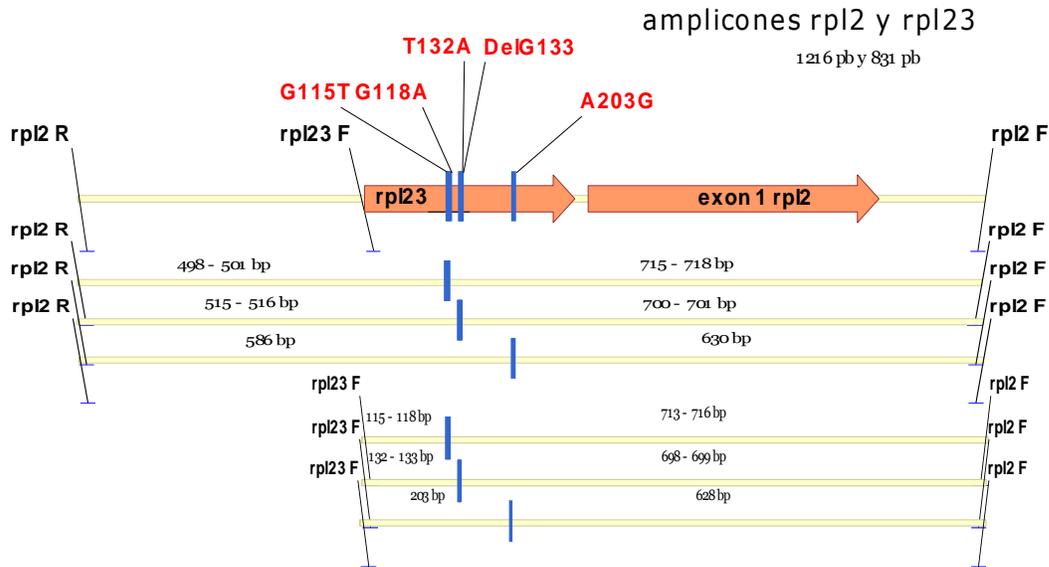


Figura 2.2. Amplicones rpl2 y rpl23 y los cambios moleculares identificados en el gen *rpl23*.

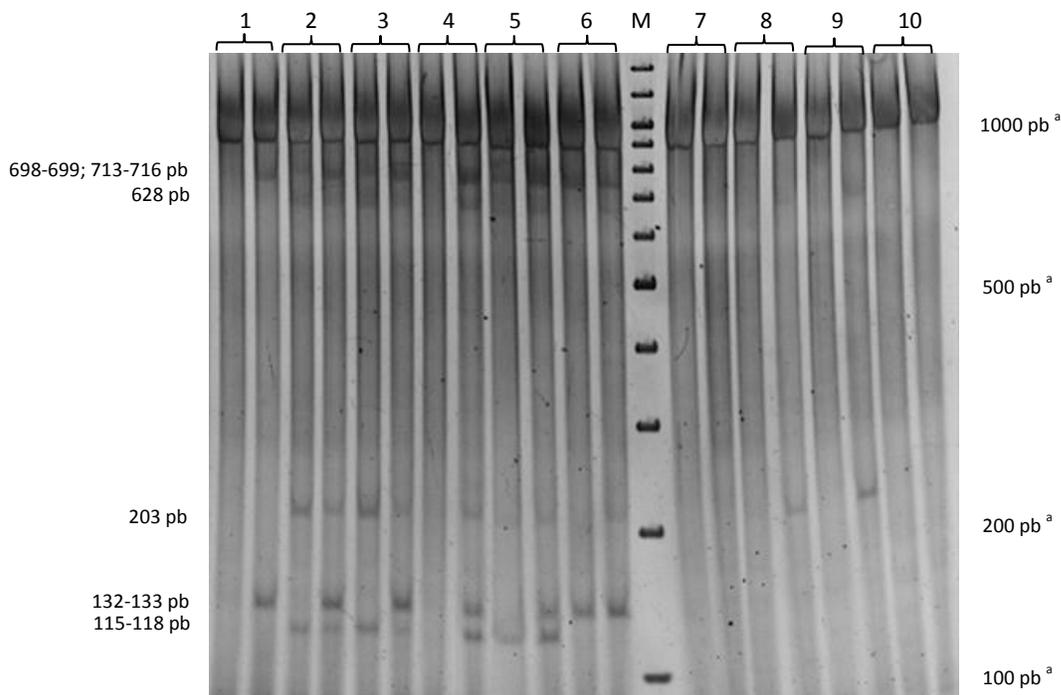


Figura 2.3. Digestiones con CJE del amplicón rpl23 de 10 plántulas *cpm* corridas en geles de poliacrilamida 3% no desnaturalizantes. La primera y segunda calle para cada plántula corresponde a la digestión del amplicón proveniente del ADN de la misma plántula sola y mezclada con ADN salvaje en relación 1:1, respectivamente. Las plántulas tienen diferentes patrones de digestión porque portan diferentes combinaciones de polimorfismos en diferentes estados de homoplasmia y heteroplasmia. Las bandas de 115-118 pb y 713-716 pb corresponden al bloque A (G115T, G118A). Las bandas de 132-133 pb y 698-699 pb corresponden al bloque B (T132A, DelG133). Las bandas de 203 pb y 628 pb corresponden al bloque C (A203G).<sup>a</sup>Las muestras corren más lento que el marcador de peso molecular (M) probablemente debido a los componentes de la mezcla de digestión.

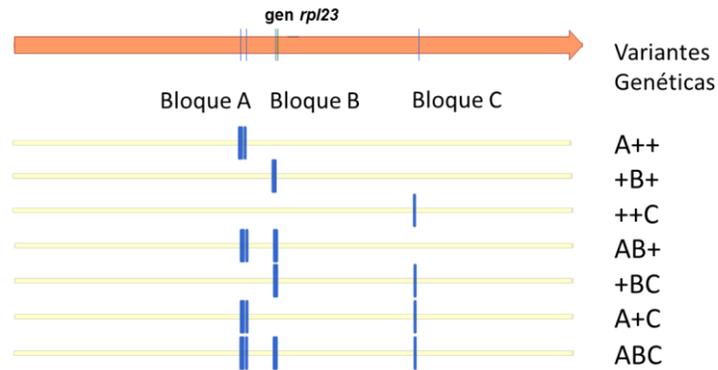


Figura 2.4. Representación de las variantes genéticas potenciales en el gen *rpl23*. + corresponde a la secuencia que normalmente existe en la versión salvaje del gen.

Variantes genéticas en el gen <i>rpl23</i>	A++	+B+	++C	AB+	+BC	A+C	ABC
<b>Grupo A</b>							
<b>Familia</b>							
F <sub>2</sub>	0	1 (1)	25 (23)	4 (0)	2 (0)	0	6 (1)
M <sub>2</sub>	0	0	5 (5)	0	0	0	1 (0)
<b>Subtotal</b>	<b>0</b>	<b>1 (1)</b>	<b>30 (28)</b>	<b>4 (0)</b>	<b>2 (0)</b>	<b>0</b>	<b>7 (1)</b>
<b>Grupo B</b>							
<b>Familia</b>							
F <sub>2</sub> -1	0	0	2 (2)	0	0	0	0
F <sub>2</sub> -2	0	0	0 (0)	0	1 (1)	0	0
F <sub>2</sub> -3	0	1 (0)	1 (0)	4 (0)	0	0	1 (0)
F <sub>2</sub> -4	1 (0)	3 (0)	3 (1)	0	0	0	1 (0)
<b>Subtotal</b>	<b>1 (0)</b>	<b>4 (0)</b>	<b>6 (3)</b>	<b>4 (0)</b>	<b>1 (1)</b>	<b>0</b>	<b>2 (0)</b>
<b>Total</b>	<b>1 (0)</b>	<b>5 (1)</b>	<b>36 (31)</b>	<b>8 (0)</b>	<b>3 (1)</b>	<b>0</b>	<b>9 (1)</b>

Tabla 2.1. Número de plántulas con cada una de las variantes genéticas en el gen *rpl23* en las seis familias *cpm* analizadas. Entre paréntesis se indica el número de plántulas homoplásmicas.

### **Búsqueda de cambios moleculares en el pseudogen *rpl23* de plántulas *cpm***

Se analizó el pseudogen *rpl23* mediante la digestión con CJE del amplicón pseudogen *rpl23* en las mismas 184 plántulas *cpm* en las que se había analizado el gen *rpl23* (fig. 2.5). Mediante este análisis se identificaron tres pares de bandas de digestión que se combinaron de diferentes maneras en diferentes plántulas (fig. 2.6), algo similar a lo hallado para el gen *rpl23*. La secuenciación de los amplicones que dieron origen a las diferentes combinaciones de bandas de digestión corroboró la amplificación de la región *hotspot* del plasmoma que contiene al pseudogen *rpl23* y reveló la existencia de cinco cambios moleculares en el pseudogen, lo que también coincide con lo observado para el gen *rpl23*. Los tamaños de las bandas de digestión fueron similares a los obtenidos en las digestiones del gen *rpl23* indicando que las distancias entre los cambios moleculares y el cebador *rpl23F* son similares entre el gen y el pseudogen.

Los cambios moleculares fueron: T112G, A115G, A129T, InsG130 y G199A. Al igual que para el gen *rpl23*, los cambios moleculares se agruparon ligados en tres bloques. Estos se denominaron como, bloque **D**: T112G y A115G, bloque **E**: A129T y InsG130 y bloque **F**: G199A. Las potenciales combinaciones de estos bloques dan lugar a siete variantes genéticas respecto de la secuencia salvaje. Estas combinaciones se muestran en la figura 2.7.

Mediante el análisis de 184 plántulas *cpm* se identificaron 125 plántulas con variantes genéticas en el pseudogen *rpl23*. Esto representa el 68% de las plántulas analizadas. La mayoría de las plántulas (84 de 125) que mostraron tener polimorfismos respecto del pseudogen salvaje portaron la variante genética **DEF**. Esta variante estuvo presente en las seis familias *cpm*. Luego, la variante genética que se observó con mayor frecuencia fue **DE+**, que estuvo presente en 39 plántulas. Esto indica que casi todas las plántulas con cambios moleculares en el pseudogen (123 de 125) tuvieron solo dos variantes genéticas. Por otro lado, solamente se observaron dos plántulas con la combinación **D+F**. No se observaron plántulas con el resto de las variantes genéticas. El número de plántulas portando las diferentes variantes genéticas en el pseudogen para las diferentes familias *cpm* se muestra en la tabla 2.2.

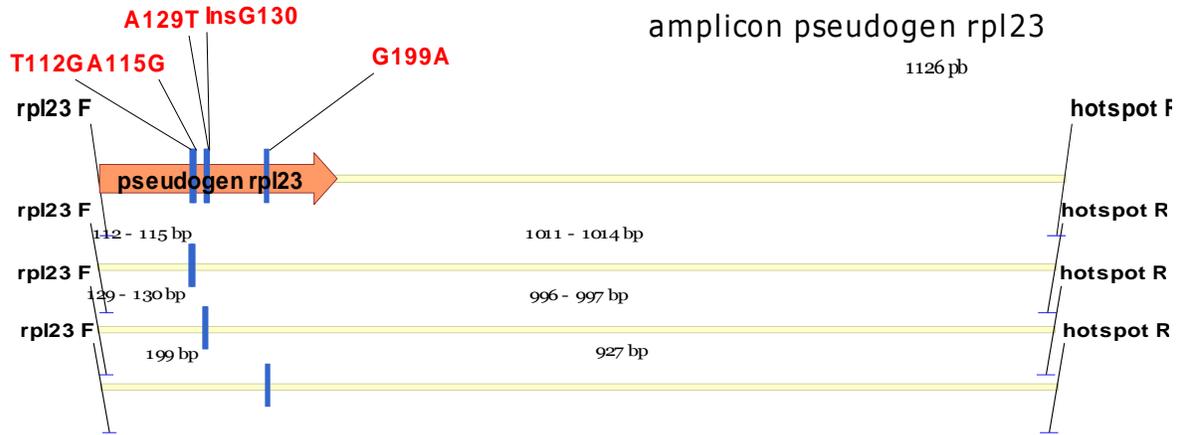


Figura 2.5. Amplicón pseudogen rpl23 y los cambios moleculares identificados en las plantas *cpm*.

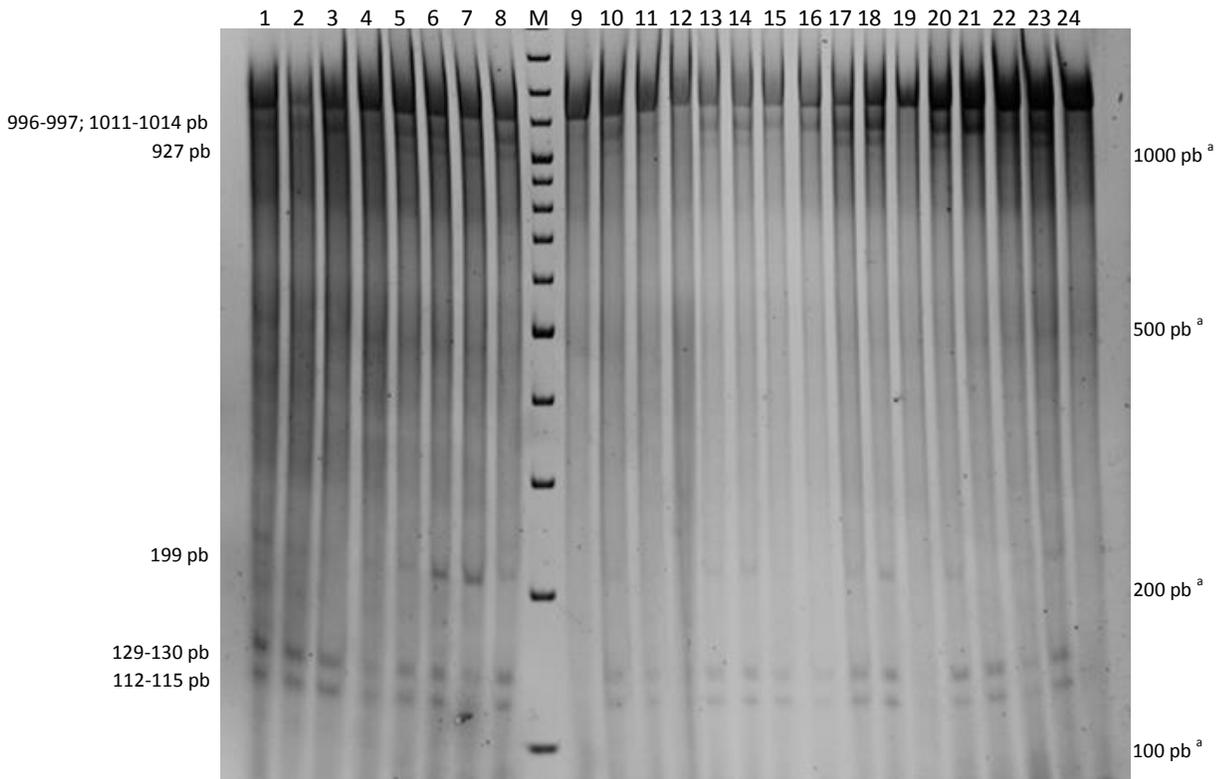


Figura 2.6. Digestiones con CJE del amplicón pseudogen rpl23 de 24 plántulas *cpm* corridas en geles de poliacrilamida al 3% no desnaturalizantes. Las plántulas muestran diferentes patrones de digestión porque portan diferentes combinaciones de polimorfismos. Las bandas de 112-115 pb y 1011-1014 pb corresponden al bloque D (T112G, A115G). Las bandas de 129-130 pb y 996-997 pb corresponden al bloque E (A129T, InsG130). Las bandas de 199 pb y 927 pb corresponden al bloque F (G199A). Las plántulas de las calles 9, 12, 19 y 24 no tienen cambios moleculares. <sup>a</sup>Las muestras corren más lento que el marcador de peso molecular (M) probablemente debido a componentes de la mezcla de digestión.

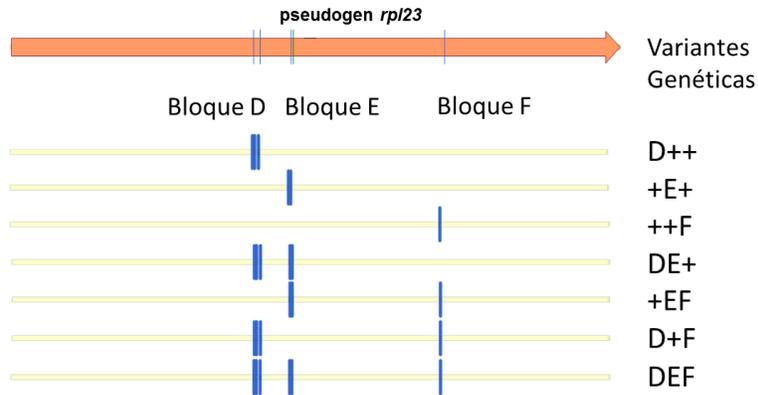


Figure 2.7. Representación de las variantes genéticas potenciales en el pseudogen *rpl23*.  
+ corresponde a la secuencia que existe en el pseudogen salvaje.

Variantes genéticas en el pseudogen <i>rpl23</i>	D++	+E+	++F	DE+	+EF	D+F	DEF
<b>Grupo A</b>							
<b>Familia</b>							
F <sub>2</sub>	0	0	0	21 (13)	0	2 (2)	39 (28)
M <sub>2</sub>	0	0	0	6 (4)	0	0	1 (1)
<b>Subtotal</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>27 (17)</b>	<b>0</b>	<b>2 (2)</b>	<b>40 (29)</b>
<b>Grupo B</b>							
<b>Familia</b>							
F <sub>2</sub> -1	0	0	0	7 (4)	0	0	7 (3)
F <sub>2</sub> -2	0	0	0	0	0	0	5 (1)
F <sub>2</sub> -3	0	0	0	1 (0)	0	0	13 (7)
F <sub>2</sub> -4	0	0	0	4 (3)	0	0	19 (9)
<b>Subtotal</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12 (7)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>44 (20)</b>
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>39 (24)</b>	<b>0</b>	<b>2 (2)</b>	<b>84 (49)</b>

Tabla 2.2. Número de plántulas con cada una de las variantes genéticas en el pseudogen *rpl23* por familia *cpm*. Ente paréntesis se indican las plántulas homoplásmicas.

## Búsqueda de cambios moleculares en el gen y el pseudogen *rpl23* de plántulas de las poblaciones control

No se detectaron digestiones en los amplicones *rpl23* y pseudogen *rpl23* para ninguna de las 40 plántulas analizadas de los dos grupos control, por lo tanto, no habría cambios moleculares en el gen ni en el pseudogen *rpl23* de las plántulas control. La ausencia de polimorfismos en estas secuencias respecto de las secuencias salvajes se corroboró por la secuenciación de ambos amplicones en algunas plántulas control seleccionadas al azar. En la figura 2.8 se muestran las digestiones con CJE de ambos amplicones para 16 plántulas del grupo dos de la población control.

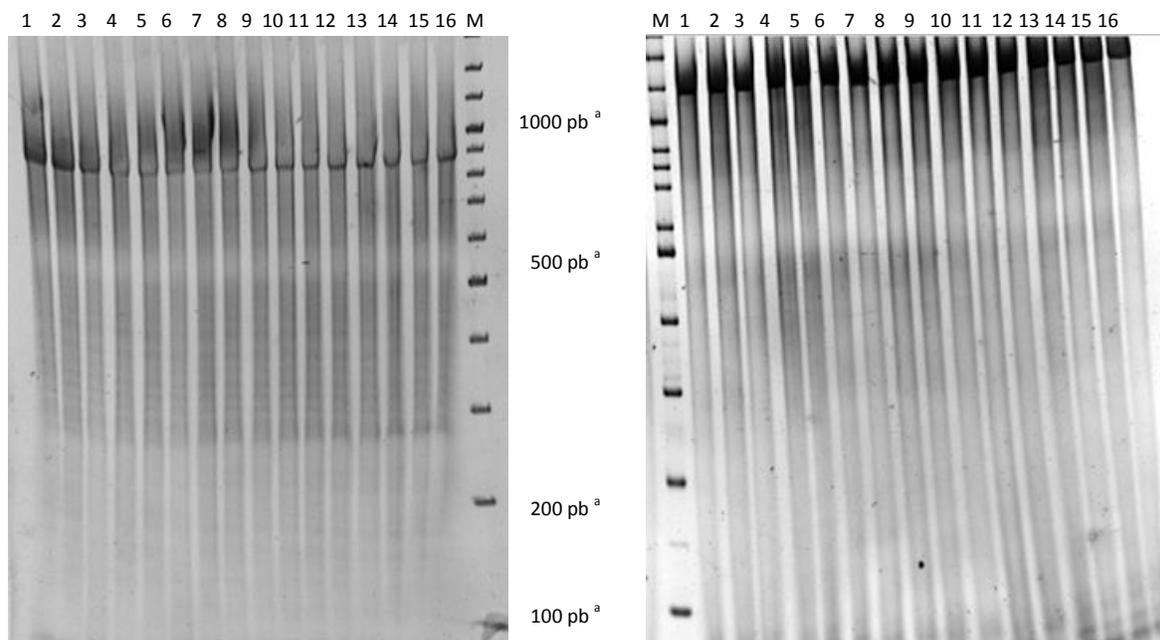


Figura 2.8. Digestiones con CJE del amplicón *rpl23* (izquierda) y del amplicón pseudogen *rpl23* (derecha) de plántulas del grupo dos de la población control corridas en geles de poliacrilamida 3% no desnaturalizantes mostrando la ausencia de bandas de digestión. <sup>a</sup>Las muestras corren más lento que el marcador de peso molecular (M) probablemente debido a componentes de la mezcla de digestión.

## Determinación del estado de homoplasma o heteroplasma de las variantes genéticas presentes en el gen y en el pseudogen *rpl23* de las plántulas *cpm*

El estado de homoplasma o heteroplasma de las variantes genéticas en el gen se estimó mediante la observación en los electroferogramas de uno o dos picos en las posiciones polimórficas luego de la secuenciación del amplicon *rpl23*, respectivamente. Por otro lado, como otra estrategia para la determinación de estos estados, se utilizó también la digestión con CJE para el análisis del estado de homoplasma o heteroplasma de los cambios moleculares.

Estos estados se determinaron mediante la digestión tanto del amplicón *rpl23* obtenido desde el ADN de cada plántula sin mezclar con ADN salvaje, como la digestión del amplicón obtenido desde la mezcla del ADN de cada plántula con el ADN salvaje en partes iguales. Aquellos cambios moleculares que produjeron bandas de digestión solo cuando se empleó la mezcla de ADNs, se consideraron en homoplasma. Aquellos cambios que produjeron bandas de digestión tanto con la mezcla de ADN como con el ADN de cada plántula solamente, se consideraron en heteroplasma (ver figura 2.3). De esta manera, 34 de las 62 plántulas *cpm* con variantes genéticas en el gen *rpl23*, tuvieron todos los bloques que componen dicha variante genética en homoplasma según las dos formas de determinación antes mencionadas. La mayoría de estas plántulas homoplásmicas (31 de 34) tuvieron la variante genética **++C**. Las variantes genéticas restantes fueron **ABC**, **+BC** y **+B+** que se encontraron cada una en una única plántula (ver tabla 2.1).

Mediante la observación de picos simples en los electroferogramas de los amplicones pseudogen *rpl23* pertenecientes a plántulas con cambios moleculares en el pseudogen, se estimó el estado homoplásmico de los cambios. Este análisis determinó que la mayoría de las plántulas (75 de 125) fueron homoplásmicas. En relación a las variantes genéticas, se determinó que 49 plántulas tuvieron **DEF**, 24 plántulas tuvieron **+DE** y dos plántulas tuvieron **D+F** (ver tabla 2.2).

El número de cambios en homoplasma o en heteroplasma fue homogéneo entre el gen y el pseudogen ( $\chi^2_{0.05;1}$ ). Por el contrario, el número de cambios en homoplasma o en heteroplasma no fue homogéneo entre grupos A y B ( $\chi^2_{0.05;1}$ ), tanto en el caso del gen como del pseudogen.

### **Análisis de las consecuencias de los polimorfismos en el gen *rpl23***

Tal como se indicó en Materiales y Métodos, muchas de las plántulas *cpm* poseían fenotipos deficientes en clorofila, ya sea sólidos o variegados. En las plántulas *cpm* portadoras de polimorfismos en el gen *rpl23* también se observó una segregación de fenotipos clorofílicos, como por ejemplo plántulas *viridis*, virido-albinas y albinas. Entre las 184 plántulas analizadas hubo ocho plántulas albinas, cinco de las cuales tuvieron polimorfismos en el gen *rpl23*. Estas cinco plántulas albinas fueron portadoras de la DelG133 contenida en el bloque **B**. Tres de estas cinco plántulas fueron homoplásmicas: una tuvo la variante genética **ABC** (ver digestión de la plántula 4 en la figura 2.3), otra tuvo la variante genética **+BC** y en otra se detectó la variante genética **+B+** (ver digestión de la plántula 1 en la figura 2.3 y los electroferogramas en la figura 2.9). Las dos plántulas restantes fueron heteroplásmicas para los bloques **A** y **C** pero tuvieron el bloque **B** en homoplasma (ver digestiones de plántulas 2 y 3 en la figura 2.3). Por otro lado, también se determinó que ninguna de las plántulas portadoras de polimorfismos en el gen *rpl23* con fenotipo verde normal tuvo el bloque **B** en homoplasma.

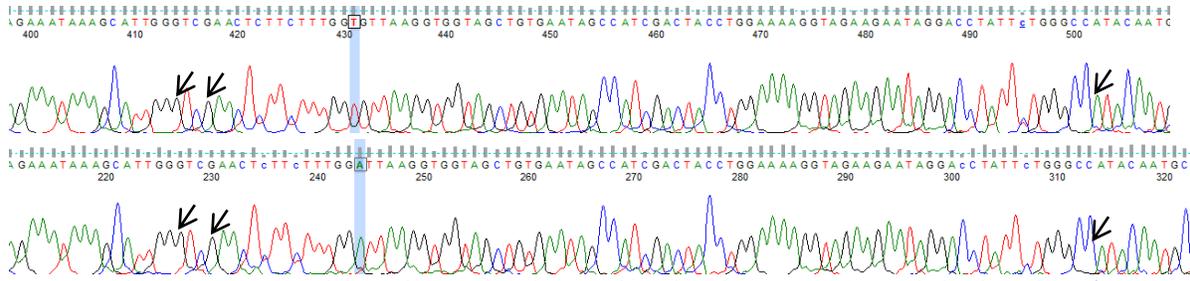


Fig. 2.9. Electroferogramas del amplicón *rpl23* de una plántula salvaje (superior) y de la plántula 07/4250-1 (inferior) portadora de la variante genética +B+ (T132 A y DelG133) en homoplasmia. En azul se marca la posición del bloque B y con flechas las posiciones en donde se ubicarían los bloques A y C si estuvieran presentes.

Por otra parte, se estudiaron tres plántulas *striata-albina* (con estrías blancas y verdes, fig. 2.10) hijas de las plántulas con cambios en el gen *rpl23* analizadas por cpTILLING. Sobre estas plántulas *striata-albina* se procedió a la separación por corte del tejido albino y del tejido verde normal. Se realizó luego la extracción del ADN, la digestión con CJE y la secuenciación del amplicón *rpl23* por separado para las porciones albinas y las porciones de fenotipo verde normal. En este ensayo se observó siempre la presencia del bloque B en estado homoplásmico en las porciones albinas, mientras que en las porciones verdes se encontró la versión salvaje del gen *rpl23* o de estar presente el bloque B, siempre se lo encontró en estado heteroplásmico.

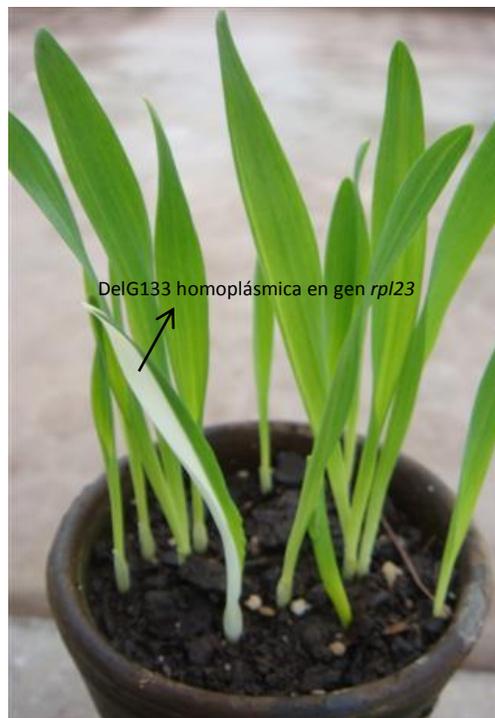


Figura 2.10. Plántula *striata-albina* portadora del bloque B (DelG133) del gen *rpl23* en homoplasmia en el tejido albino.

## Análisis por western blot de la síntesis de las proteínas RbcL y CpRecA en plántulas albinas portadoras de DelG133 en *rpl23* y plántulas verdes sin la delección

La delección en la posición 133 del gen *rpl23* origina un cambio en el marco de lectura a partir de la mitad del gen. Este cambio produciría un codón de terminación de la traducción prematuro y una proteína truncada de tan solo 47 aminoácidos (fig. 2.11). Esto motivó el análisis mediante western blot de la presencia de la subunidad grande de rubisco (RbcL) en plántulas albinas portadoras de la delección, para analizar fácilmente si la traducción de proteínas codificadas en el cloroplasto se encontraba afectada por la posible ausencia de la proteína Rpl23. Además, se analizó la presencia de la proteína CpRecA que se encuentra codificada en el núcleo y se traduce en el citoplasma antes de ser direccionada al cloroplasto, como control de síntesis de proteínas del citoplasma. Esto se realizó en la descendencia de plántulas *cpm* pertenecientes a dos familias diferentes, portadoras de polimorfismos en el gen *rpl23* y que presentaban fenotipos albinos y verde normal. Mediante la digestión con CJE y posterior secuenciación del amplicón *rpl23* se determinó la presencia del bloque **B** en homoplasma solamente en las plántulas albinas. Se consideró apropiado el análisis de plántulas *cpm* de fenotipos verde normal sin el bloque **B** en *rpl23*, ya que éstas tendrían una constitución genética más cercana a la mutante portadora de la delección que una plántula salvaje. Los ensayos de western blot demostraron que las plántulas albinas carecían de la subunidad grande de rubisco (RbcL) mientras que las plántulas verdes la tuvieron. Por otra parte, la proteína CpRecA estuvo presente en todas las plántulas, tanto albinas como verdes normal (fig. 2.12).

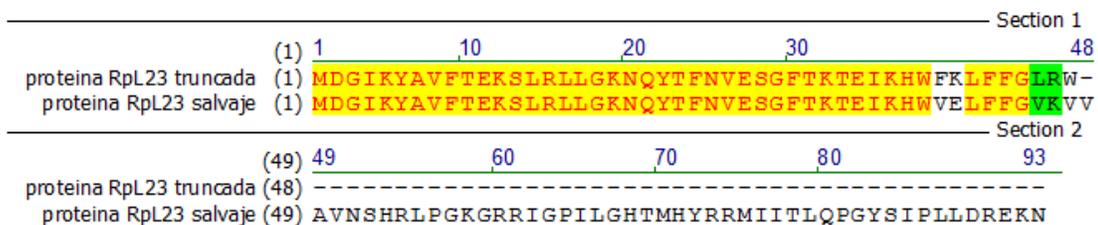


Figura 2.11. Alineamiento de secuencias de las versiones truncada y salvaje de la proteína Rpl23.

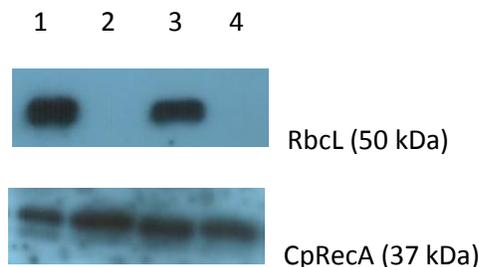


Figura 2.12. Análisis por western blot del efecto de la DelG133 en el gen *rpl23* sobre la síntesis de las proteínas RbcL y CpRecA en la fracción soluble del extracto de membranas tilacoides de hojas de plántulas *cpm*; Se sembraron 20 µg de proteínas por calle. Calles 1 y 2: plántulas hermanas, 1 sin la DelG133 en homoplasma de color verde normal y 2, plántula portadora de la DelG133 en homoplasma con fenotipo albino. Calles 3 y 4: Idem calles 1 y 2 para dos plántulas hermanas de otra familia diferente.

## Comparación de las secuencias salvajes del gen y el pseudogen *rpl23* de cebada

El alineamiento de la secuencia salvaje del gen y de la secuencia salvaje del pseudogen *rpl23* muestra cinco posiciones polimórficas además de la ausencia de ATG en el comienzo del pseudogen. Los polimorfismos identificados en el gen y en el pseudogen de las plántulas *cpm* coinciden exactamente con los polimorfismos que normalmente existen entre las versiones salvajes del gen y del pseudogen *rpl23* en cebada (fig. 2.13). Por ejemplo, el gen salvaje presenta los cambios G115T y G118A respecto de la secuencia salvaje del pseudogen y estos son los mismos cambios que se identificaron en el gen con el bloque **A** en las plántulas *cpm*. La misma situación se observó con los polimorfismos de los bloques **B** y **C**.

Cabe destacar que ningún otro polimorfismo diferente de los detallados en las variantes genéticas antes mencionadas fue detectado en el gen o en el pseudogen *rpl23* en las 184 plántulas *cpm* analizadas. Sin embargo, se detectaron dos polimorfismos diferentes en los amplicones *rpl23* y pseudogen *rpl23*, pero estos se ubicaron fuera de las regiones del gen y del pseudogen. Uno de estos polimorfismos fue un cambio C302T en el amplicón *rpl23* en una sola plántula *cpm* y el otro fue un cambio T856C en el amplicón pseudogen *rpl23* también en una sola plántula *cpm*.

		Section 1					
		(1) 1	10	20	30	47	
gen <i>rpl23</i> salvaje	(1)	ATGG	ATGG	AATCAA	AATACG	CAGTATTTACAGAAAAAAGTCTTCGTTT	
gen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(1)	ATGG	ATGG	AATCAA	AATACG	CAGTATTTACAGAAAAAAGTCTTCGTTT	
pseudogen <i>rpl23</i> salvaje	(1)	---	AATGG	AATCAA	AATACG	CAGTATTTACAGAAAAAAGTCTTCGTTT	
pseudogen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(1)	---	AATGG	AATCAA	AATACG	CAGTATTTACAGAAAAAAGTCTTCGTTT	
		Section 2					
		(48) 48	60	70	80	94	
gen <i>rpl23</i> salvaje	(48)	ATTGGG	AAAGAATCA	AATACTTTT	TAATGTCGA	ATCGGGATTCACTA	
gen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(48)	ATTGGG	AAAGAATCA	AATACTTTT	TAATGTCGA	ATCGGGATTCACTA	
pseudogen <i>rpl23</i> salvaje	(45)	ATTGGG	AAAGAATCA	AATACTTTT	TAATGTCGA	ATCGGGATTCACTA	
pseudogen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(45)	ATTGGG	AAAGAATCA	AATACTTTT	TAATGTCGA	ATCGGGATTCACTA	
		Section 3					
		(95) 95	100	110	120	130	141
gen <i>rpl23</i> salvaje	(95)	AGACAG	AAATAA	AGCATTGG	GTCGA	AACTCTTCTTTGG	ATTAAGGTG
gen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(95)	AGACAG	AAATAA	AGCATTGG	GTCGA	AACTCTTCTTTGG	ATTAAGGTG
pseudogen <i>rpl23</i> salvaje	(92)	AGACAG	AAATAA	AGCATTGG	GTCGA	AACTCTTCTTTGG	ATTAAGGTG
pseudogen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(92)	AGACAG	AAATAA	AGCATTGG	GTCGA	AACTCTTCTTTGG	ATTAAGGTG
		Section 4					
		(142) 142	150	160	170	188	
gen <i>rpl23</i> salvaje	(142)	GTAGCT	GTGAATAG	CCATCG	ACTACCTG	GAAAAGGTAGAAGAATAGG	
gen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(141)	GTAGCT	GTGAATAG	CCATCG	ACTACCTG	GAAAAGGTAGAAGAATAGG	
pseudogen <i>rpl23</i> salvaje	(138)	GTAGCT	GTGAATAG	CCATCG	ACTACCTG	GAAAAGGTAGAAGAATAGG	
pseudogen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(139)	GTAGCT	GTGAATAG	CCATCG	ACTACCTG	GAAAAGGTAGAAGAATAGG	
		Section 5					
		(189) 189	200	210	220	235	
gen <i>rpl23</i> salvaje	(189)	ACCTATT	CTGGGCCA	TACAAT	GCATTAC	AGACGTATGATCATTACCC	
gen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(188)	ACCTATT	CTGGGCCG	TACAAT	GCATTAC	AGACGTATGATCATTACCC	
pseudogen <i>rpl23</i> salvaje	(185)	ACCTATT	CTGGGCCG	TACAAT	GCATTAC	AGACGTATGATCATTACCC	
pseudogen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(186)	ACCTATT	CTGGGCCA	TACAAT	GCATTAC	AGACGTATGATCATTACCC	
		Section 6					
		(236) 236	250	260	270	282	
gen <i>rpl23</i> salvaje	(236)	TTCAACC	GGGTTATT	TCTATT	TCCACTT	TCTAGATAGAGAAAAAACTAA	
gen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(235)	TTCAACC	GGGTTATT	TCTATT	TCCACTT	TCTAGATAGAGAAAAAACTAA	
pseudogen <i>rpl23</i> salvaje	(232)	TTCAACC	GGGTTATT	TCTATT	TCCACTT	TCTAGATAGAGAAAAAACTAA	
pseudogen <i>rpl23</i> <i>cpm</i>	(233)	TTCAACC	GGGTTATT	TCTATT	TCCACTT	TCTAGATAGAGAAAAAACTAA	

Figura 2.13. Alineamientos de las secuencias del gen y del pseudogen *rpl23* salvajes y portadores de los cambios moleculares identificados en las plántulas *cpm*.

### Coexistencia de polimorfismos en el gen y en el pseudogen *rpl23* en una misma plántula

En la tabla 2.3 se muestra el análisis de la coexistencia de polimorfismos en el gen y el pseudogen *rpl23* en una misma plántula *cpm*. Estos datos se informan sin tener en cuenta la variante genética ni el estado de homoplasma o heteroplasma en cada plántula. Allí se presentan los números de plántulas que muestran polimorfismos en el gen o en el pseudogen o en ambos *loci* a la vez, así como el número de plántulas con genotipo salvaje en ambos *loci*. Estos resultados no difirieron significativamente de lo esperable para la ocurrencia de cambios en forma independiente en cada uno de los *loci* ( $\chi^2_{0.05;1}$ ). Puede observarse que la mayor proporción de plántulas posee polimorfismos en el pseudogen únicamente.

<i>rpl23</i>	pseudogen <i>rpl23</i>	Número de plántulas
polimórfico	polimórfico	40 (22%)
polimórfico	salvaje	22 (12%)
salvaje	polimórfico	85 (46%)
salvaje	salvaje	37 (20%)

Tabla 2.3. Número de plántulas *cpm* polimórficas para el gen y/o el pseudogen *rpl23*.

Las variantes genéticas en el gen y en el pseudogen de plántulas homoplásmicas para ambos *loci* se detallan en la tabla 2.4. Esta tabla muestra las combinaciones de variantes genéticas presentes en el gen y en el pseudogen en una misma plántula *cpm* y además se indica el número de plántulas que poseen cada combinación. La mayoría de las plántulas homoplásmicas en ambos *loci*, es decir 41 de 76 plántulas, poseen la secuencia salvaje +++ en el gen y la variante genética DEF en el pseudogen. Si se considera que secuencias en el gen con los bloques A, B o C son idénticas a secuencias salvajes en el pseudogen (ver figura 2.13) y que secuencias con los bloques D, E o F en el pseudogen son iguales a secuencias salvajes en el gen (ver figura 2.13), se debe remarcar que en 55 de las 76 plántulas homoplásmicas para ambos *loci*, las secuencias del gen y del pseudogen fueron idénticas.

Número de plántulas	<i>rpl23</i>	pseudogen <i>rpl23</i>	¿Secuencias Idénticas?
41	+++	D E F	sí
8	+++	D E +	no
12	++ C	D E +	sí
11	++ C	+++	no
1	A B C	+++	sí
1	+ B C	+++	no
1	+ B +	D + F	sí
1	+++	D + F	no

Tabla 2.4. Variantes genéticas en el gen *rpl23* y en el pseudogen *rpl23* en plántulas *cpm* homoplásmicas. A, B y C representan las posiciones polimórficas en el gen *rpl23* (bloques A, B y C). D, E y F representan las posiciones polimórficas en el pseudogen *rpl23* (bloques D, E y F). + representa la secuencia salvaje en el gen y en el pseudogen *rpl23* para cada bloque.

### **Análisis *in silico* de la existencia en los genomas nuclear y mitocondrial de cebada de secuencias homólogas a los amplicones rpl23 y pseudogen rpl23**

De la misma forma en que se analizó la existencia de nupts y mipts conteniendo secuencias homólogas a los amplicones del cpTILLING, se analizó la existencia de secuencias homólogas a los amplicones rpl23 y pseudogen rpl23 en los cromosomas y el genoma de la mitocondria de cebada mediante blastn. Todos los alineamientos que se obtuvieron entre la secuencia del amplicón rpl23 y del amplicón pseudogen rpl23 con secuencias de los siete cromosomas del genoma nuclear de *H. vulgare* tuvieron longitudes que fueron menores al tamaño de la versión completa de ambos amplicones (833 pb y 1127 pb, respectivamente). Los alineamientos más largos tuvieron 385 pb y 327 pb para el amplicón rpl23 y para el amplicón pseudogen rpl23, respectivamente. No se detectaron alineamientos de ninguno de los dos amplicones con secuencias del genoma mitocondrial de *H. vulgare*.

## DISCUSIÓN

### **El gen y el pseudogen *rpl23* son altamente polimórficos en plántulas de cebada *cpm***

Los resultados de las tablas 2.1 y 2.2 demuestran que el gen y el pseudogen *rpl23* del plastoma de la cebada presentaron una alta frecuencia de cambios moleculares en plántulas *cpm* (62 de 184 plántulas y 125 de 184 plántulas, respectivamente). Estas frecuencias fueron muy superiores a las observadas en otros *loci* del plastoma (5 de 184 plántulas en el gen *rps16* y 4 de 184 plántulas en el gen *rbcl*, como dos ejemplos de los valores máximos informados en el capítulo uno). El gen y el pseudogen *rpl23* fueron polimórficos en todas las familias *cpm* analizadas. Por el contrario, no se detectaron cambios moleculares en ninguno de estos *loci* en las plántulas de los grupos control de genotipo salvaje, ya sea, en las del grupo control que poseen el mismo fondo genético en el cual se obtuvo la mutante *cpm* o en las del grupo control compuesto por variedades de cebadas con fondos genéticos de muy diverso origen. Las altas frecuencias de polimorfismos observadas en el gen y en el pseudogen *rpl23* son contrastantes con la información bibliográfica respecto de las bajas tasas de cambios moleculares, habitualmente interpretados como mutaciones espontáneas, calculadas para genes del plastoma (Clegg et al., 1984; Wolfe et al., 1987; Clegg et al., 1994).

Cabe destacar que no se identificaron alineamientos con secuencias del genoma nuclear y mitocondrial de cebada del tamaño de los amplicones *rpl23* y pseudogen *rpl23*. Esto indica que en estos genomas las secuencias de estos amplicones no se encuentran completas (desde la ubicación del cebador *forward* hasta la ubicación del cebador *reverse*). En función de esto, es razonable pensar que el molde para la amplificación de los mismos fue el genoma de los cloroplastos y no las secuencias de origen plastómico que puedan estar diseminadas en el genoma del núcleo (*nupts*) o en el genoma de las mitocondrias (*mipts*). Por lo tanto, los polimorfismos detectados corresponderían exclusivamente a la variabilidad existente en el gen y el pseudogen *rpl23* del plastoma *cpm*.

La cantidad de plántulas *cpm* portando cambios moleculares en el pseudogen *rpl23* aproximadamente duplicó aquella observada para el gen *rpl23*. También se observó una mayor proporción de plántulas homoplásmicas en el caso del pseudogen (tablas 2.1 y 2.2), aunque se determinó que el número de plántulas homoplásmicas o heteroplásmicas es homogéneo entre gen y pseudogen. Se debe recordar que el pseudogen se encuentra en copia única ubicándose en la LSC, mientras que el gen se encuentra en doble copia ubicándose una copia en cada una de las IRs. En relación a esto, se debe recordar también que los amplicones utilizados para el análisis de la variabilidad en el gen *rpl23* amplifican ambas copias del gen ubicadas en las dos IRs y que por lo tanto los cambios moleculares determinados en homoplasmia indican la existencia de esos cambios en ambas copias.

## Origen de los polimorfismos detectados en el gen y en el pseudogen *rpl23*

### a) La recombinación como causa de los polimorfismos en el gen y pseudogen *rpl23* de plántulas *cpm*

Las variantes genéticas detectadas en el gen y en el pseudogen *rpl23* tuvieron varias características distintivas: 1) la existencia de cinco cambios moleculares tanto en el gen como en el pseudogen *rpl23*; en ambos casos algunos cambios se comportaron como ligados y segregaron en tres bloques y además los bloques se combinaron dando variantes genéticas. 2) los cambios moleculares estuvieron ubicados en posiciones equivalentes en el gen y el pseudogen y correspondieron a cambios en sentidos inversos, es decir, si en una determinada posición el gen tenía un cambio AxG, en esa misma posición el pseudogen tenía un cambio GxA (ver fig.2.13). 3) los polimorfismos identificados en el gen y en el pseudogen de las plántulas *cpm* coinciden exactamente con los polimorfismos que normalmente existen entre las versiones salvajes del gen y el pseudogen *rpl23* en cebada. Esta similitud de polimorfismos y la idea de que la secuencia del pseudogen podría ser la fuente de la variabilidad observada en el gen, fue lo que alentó el estudio del pseudogen luego del estudio del gen *rpl23* en las plántulas *cpm*.

Las características antes enumeradas sugieren fuertemente que los cinco polimorfismos observados en el gen y en el pseudogen *rpl23* de las plántulas *cpm* no se originaron por mutaciones puntuales y apoyan la idea de que estos cambios moleculares se originaron por el intercambio genético entre ambas regiones del plastoma, es decir, el mecanismo responsable sería la recombinación. La recombinación permitiría la generación de variantes alélicas tales como las variantes genéticas que se identificaron en el gen y en el pseudogen *rpl23*. Es de destacar el hecho de que en el análisis de los amplicones *rpl23* y pseudogen *rpl23* solamente se hayan identificado en el gen y el pseudogen los cinco polimorfismos que existen entre el gen y el pseudogen *rpl23* salvajes. Esto sería otro indicio de que la fuente de variabilidad que prima en estos dos *loci* sería la recombinación entre estas secuencias y que la ocurrencia de mutaciones puntuales, tal como ocurre en el resto de las regiones del plastoma analizadas y que se describieron en el capítulo uno, sería de muy baja frecuencia. Es interesante recalcar que estos resultados dan soporte experimental a postulaciones previas sobre la existencia de recombinación entre el gen y el pseudogen *rpl23* en trigo y maíz (Bowman et al., 1988; Morton y Clegg, 1993), postulaciones que debido al limitado muestreo en que se basaron fueron consideradas como altamente especulativas por algunos autores (Ruhlman y Jansen, 2014).

**b) La recombinación entre el gen y el pseudogen *rpl23* sería del tipo no recíproca por el proceso de conversión génica**

Cuando se analiza en cada plántula la ocurrencia simultánea de variantes genéticas en el gen y el pseudogen *rpl23*, se observa que la existencia de cambios moleculares en el gen no implica la existencia de cambios en el pseudogen y viceversa. Esto soporta la idea de que es poco probable que los cambios moleculares se produzcan por un intercambio recíproco de secuencias entre el gen y el pseudogen, dado que esto favorecería la proporción de plántulas con o sin cambios en ambos *loci* respecto de las plántulas que solamente tienen cambios en uno de estos *loci*. Por el contrario, parece más probable que la variabilidad observada se deba a un intercambio no recíproco de secuencias de ADN entre el gen y el pseudogen, es decir, que se deba a un proceso de conversión génica que explicaría la producción de cambios en un solo *locus* (Marechal y Brisson, 2009). El hecho de que en la mayoría de las plántulas *cpm* homoplásmicas (tabla 2.4), las secuencias del gen y del pseudogen fueron idénticas entre sí salvo por la ausencia de ATG en el comienzo del pseudogen, constituye una fuerte evidencia de la existencia de conversión génica entre el gen y el pseudogen *rpl23*. En relación a esto, es apropiado mencionar que Bowman et al., (1988) propusieron la ocurrencia de recombinación homóloga no recíproca entre el gen y el pseudogen *rpl23* en maíz y trigo, basados en que la longitud del pseudogen y su grado de homología con el gen son consistentes con su involucramiento en conversión génica.

En el proceso de conversión génica, la información de secuencia es transferida desde una hélice de ADN que permanece sin cambios (secuencia donora) a otra hélice de ADN cuya secuencia se modifica (secuencia aceptora). Se reportaron casos de conversión génica durante la meiosis en levaduras y se determinó que necesita de un evento de recombinación que superponga las hélices de ADN con secuencias homólogas seguido de una síntesis de ADN localizada, necesaria para crear una copia extra de la secuencia donora. El proceso de conversión génica puede ocurrir sin *cross-over*, ya que solo requiere que una cadena simple de ADN invada una doble hélice para formar una región corta de heteroduplexo. Por otro lado, se ha demostrado que el proceso de conversión génica es un mecanismo eficiente de corrección de mutaciones en los plástidos de las plantas superiores (Khakhlova y Bock, 2006).

**La diversidad y la frecuencia de las variantes genéticas son diferentes entre el gen y el pseudogen *rpl23***

El pseudogen *rpl23* presentó una mayor frecuencia de plántulas con polimorfismos que el gen, sin embargo, mostró una menor diversidad de variantes genéticas que el gen. En el gen se observaron seis de las siete variantes genéticas que es posible obtener por combinación de los tres bloques, mientras que en el pseudogen solamente se observaron tres, con prevalencia de dos de ellas (**DE+** y **DEF**) y en donde la más frecuente fue la que incluyó a los tres bloques juntos. El intercambio de información genética por recombinación entre los segmentos del gen y del pseudogen sería el

paso inicial para la generación de las variantes genéticas observadas y como se dijo antes, esta recombinación sería no recíproca, es decir, se trataría del proceso de conversión génica.

Debido a que la presión de selección no actúa sobre las variantes genéticas portadas por el pseudogen, se puede considerar que la distribución de las frecuencias observadas en el pseudogen es más cercana a la distribución de las frecuencias originadas por la recombinación que en el caso del gen. En función de esto es interesante señalar que la variante genética **DEF** (84/125) es la más frecuente en homoplasma en el pseudogen y a continuación se ubica la variante **DE+** (39/125). La variante **DEF** sería el producto de la conversión completa de la secuencia del pseudogen en la secuencia salvaje del gen y la variante **DE+** se podría pensar como el producto de la conversión incompleta de la secuencia del pseudogen en la secuencia salvaje del gen. Al comparar las frecuencias de las variantes **DEF** y **DE+** con la observada para la variante genética **+EF** (0/125), es tentador especular que el sentido en el cual se produciría la conversión en el pseudogen sería desde el extremo 5' al extremo 3'. En relación a esto, los escasos datos de la bibliografía no son del todo coincidentes. En Bowman et al. (1988) se observó que la divergencia del pseudogen en trigo respecto del gen fue mayor hacia el extremo 5', indicando la existencia de una mayor conversión en el extremo 3' que divergió levemente. Mientras que en el caso del maíz, la región 5' divergió menos que la región 3'. De todas formas, en el caso del pseudogen en las plántulas *cpm* se observa que la variante más frecuente es la que posee los tres bloques juntos, lo que sugiere que la conversión más frecuente en el pseudogen es la que cambia toda su secuencia y no solo principalmente la región 3' como se expusiera en Bowman et al. (1988) para el trigo.

En el caso del gen, se debe considerar que las frecuencias observadas para las variantes genéticas no solo dependerán de las tasas en que se produjeron originalmente, sino que también aquellas variantes genéticas que puedan afectar la funcionalidad de la proteína Rpl23 podrían verse desfavorecidas por selección. La variante genética que se observó más frecuentemente en el gen *rpl23* no fue la que contiene los tres bloques juntos **ABC** (9/62) tal como se observó en el pseudogen, sino que fue **++C** (36/62), que se observó a mayor frecuencia que las variantes **A++** (1/62) y **AB+** (8/62). La variante genética **ABC** sería el producto de la conversión completa de la secuencia del gen en la secuencia salvaje del pseudogen y las variantes genéticas **A++**, **AB+** y **++C**, podrían pensarse como el producto de la conversión incompleta de la secuencia del gen en la secuencia salvaje del pseudogen. La mayor frecuencia en que se observó a la variante **++C** respecto de **A++** y **AB+**, podría explicarse por más de un motivo. Por un lado, podría estar indicando que el sentido más factible de la conversión en el gen es desde el extremo 3' al 5', contrario al sentido en que se propuso que podría ocurrir la conversión en el pseudogen. Por otro lado, la facilidad de obtención en homoplasma de la variante genética **++C** también podría estar reflejando la neutralidad de esta variante sobre la funcionalidad de la proteína Rpl23. La existencia de la variante genética **ABC**, indica que el gen también habría reemplazado su secuencia de manera completa por la secuencia existente en el pseudogen, aunque es probable que esta variante se encuentre reducida por la falta de funcionalidad de la proteína Rpl23.

En la figura 2.14. se esquematiza un evento de recombinación no recíproca que origina una plántula homoplásmica que contiene la variante genética **DEF** en el pseudogen *rpl23* y **+++** en los genes *rpl23*. Esta combinación de variantes para el gen y el pseudogen *rpl23* fue la que se obtuvo en mayor proporción, es decir, la que se produciría con mayor facilidad.

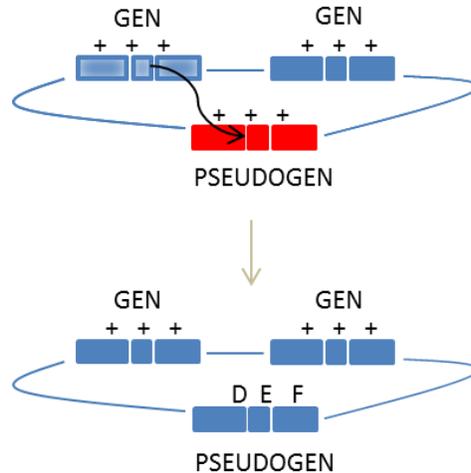


Fig. 2.14. Esquema de un plastoma en donde se muestra un evento de recombinación no recíproca que produce una plántula homoplásmica con la variante genética **+++** en el gen y la variante genética **DEF** en el pseudogen *rpl23*. En azul se representa la secuencia salvaje del gen *rpl23* (uno en cada IR) y en rojo la secuencia salvaje del pseudogen *rpl23*. Gen y pseudogen se componen de tres cajas en donde se ubican las posiciones polimórficas de los bloques A, B y C para el gen y D, E y F para el pseudogen en las plántulas *cpm*.

Con + se indica la secuencia salvaje para gen y pseudogen. Se indica el sentido del proceso de la recombinación con una flecha negra y las cajas que se transfieren se encuentran sombreadas. Notar que al cambiar la secuencia completa del pseudogen por la del gen, ambas secuencias se hacen iguales y ya no se pueden producir secuencias recombinantes entre el gen y el pseudogen.

Las variantes genéticas detectadas se pueden pensar no solamente como el producto de conversiones incompletas del gen y del pseudogen, sino también como el fruto de conversiones completas del gen y pseudogen en secuencias que portan variantes genéticas distintas de la salvaje. A modo de ejemplo se puede citar el caso de la generación de la segunda variante más encontrada en el pseudogen **DE+**. La existencia de esta variante genética en el pseudogen, se podría pensar como una consecuencia de la existencia de la variante más encontrada en el gen, es decir, la que posee el último bloque **++C** y no necesariamente como la consecuencia de la conversión del extremo 5' del pseudogen. Este razonamiento va en coincidencia con lo postulado por Bowman et al., (1988) acerca de que el patrón de conservación del pseudogen *rpl23* en maíz y trigo se debe a la presión de selección sobre los cambios en la secuencia codificante del gen. Este hecho también se propuso en Morton y Clegg, (1993) debido a que la alta relación de sustituciones/transversiones para el pseudogen en gramíneas podría reflejar las mutaciones en el gen funcional.

Es bueno tener en mente que es posible que las conversiones incompletas puedan ocurrir no solamente entre el gen y el pseudogen, sino que también podrían producirse entre ambas copias del gen, luego de que una de ellas adquiera la secuencia del pseudogen. En la figura 2.15 se muestran dos posibles series de etapas de recombinación entre el gen y el pseudogen que terminan por producir la variante genética **++C** en el gen y la variante genética **DE+** en el pseudogen, una comenzando con el cambio de la secuencia del gen y la otra comenzando con el cambio de la secuencia del pseudogen. En la figura 2.16 se muestra una posible serie de etapas de recombinación entre las dos copias del gen luego de que una copia adquiere la secuencia del pseudogen y en donde también se termina por producir la variante genética **++C** en el gen y la variante genética **DE+** en el pseudogen.

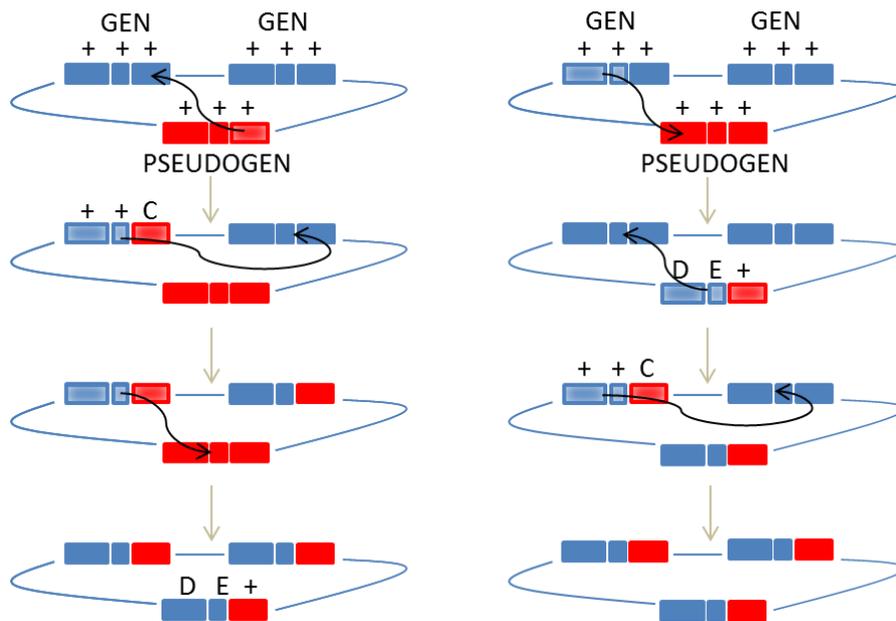


Fig. 2.15. Esquema de plasmomas en donde se muestran dos posibles series de etapas de recombinación no recíproca que producen una plántula homoplásmica con la misma secuencia en el gen y el pseudogen *rp123*. En azul se representa la secuencia salvaje del gen *rp123* (uno en cada IR) y en rojo la secuencia salvaje del pseudogen *rp123*. Gen y pseudogen se componen de tres cajas en donde se ubican las posiciones polimórficas de los bloques A, B y C para el gen y D, E y F para el pseudogen en las plántulas *cpm*. Con + se indica la secuencia salvaje para gen y pseudogen. Las combinaciones de cajas rojas y azules representan eventos de recombinación de porciones del gen y del pseudogen *rp123*. Se indica en cada etapa el sentido del proceso de la recombinación con flechas negras y las cajas que se transfieren se encuentran sombreadas. En el esquema de la izquierda, el gen cambia su secuencia 3' por recombinación con la secuencia del pseudogen adquiriendo la variante genética ++C. Luego, la segunda copia del gen *rp123* adquiere también la variante genética ++C por recombinación con la otra copia del gen. Finalmente el pseudogen adquiere la variante genética DE+ por recombinación con alguna de las copias del gen *rp123*, lo que finalmente hace que gen y pseudogen tengan secuencias idénticas. En el esquema de la derecha, el pseudogen adquiere la secuencia 5' del gen originándose la variante genética DE+. Luego el gen recombina con el pseudogen y adquiere la variante genética ++C. A continuación la otra copia del gen ubicada en la otra IR, obtiene también la variante genética ++C por recombinación con la otra copia del gen, produciéndose finalmente la identidad de secuencias entre gen y pseudogen.

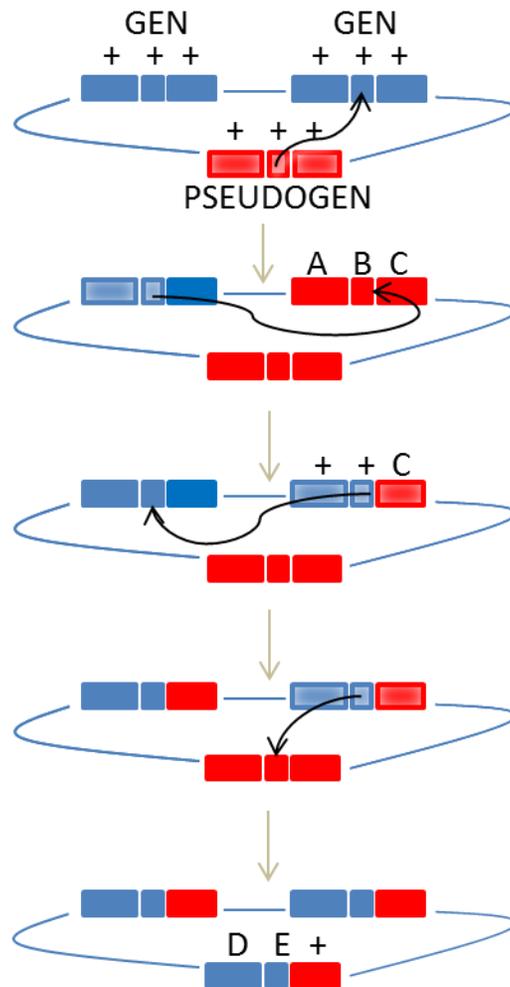


Fig. 2.16. Esquema de plastomas en donde se muestra una posible serie de etapas de recombinación no recíproca que produce una plántula homoplásmica con la misma secuencia en el gen y el pseudogen *rpl23*. En azul se representa la secuencia salvaje del gen *rpl23* (uno en cada IR) y en rojo la secuencia salvaje del pseudogen *rpl23*. Gen y pseudogen se componen de tres cajas en donde se ubican las posiciones polimórficas de los bloques A, B y C para el gen y D, E y F para el pseudogen en las plántulas *cpm*. Con + se indica la secuencia salvaje para gen y pseudogen. Las combinaciones de cajas rojas y azules representan eventos de recombinación de porciones del gen y del pseudogen *rpl23*. Se indica en cada etapa el sentido del proceso de la recombinación con flechas negras y las cajas que se transfieren se encuentran sombreadas. Una de las copias del gen cambia su secuencia completa por recombinación con la secuencia del pseudogen adquiriendo la variante genética ABC. Luego, por recombinación con el extremo 5' de la segunda copia del gen *rpl23* adquiere la variante genética ++C. Esta segunda copia del gen adquiere también la variante genética ++C por recombinación con la secuencia completa de la otra copia del gen. Finalmente el pseudogen adquiere la variante genética DE+ por recombinación con alguna de las copias del gen *rpl23*, lo que finalmente hace que gen y pseudogen tengan secuencias idénticas.

Es probable que debido a su ubicación en las IRs, la recombinación entre las dos copias del gen (fig. 2.16) se produzca en mayor frecuencia que la recombinación entre estas y el pseudogen (fig. 2.15). La existencia de una mayor frecuencia de recombinaciones entre porciones de las copias del gen podría ser la causa de la mayor diversidad de variantes genéticas observadas en el gen respecto del pseudogen. La mayor recombinación entre las copias del gen, retrasaría la fijación de los cambios en el gen respecto del pseudogen. Este efecto de retardo en la fijación de cambios moleculares debido a un mayor número de copias, se utilizó como argumento para explicar la menor tasa de mutación que ha sido repetidamente estimada para los genes localizados en las IRs respecto de aquellos ubicados en las LSC y SSC (Clegg et al., 1984; Wolfe et al., 1987; Gaut, 1998; Perry y Wolfe, 2002).

Por último, la distancia entre los polimorfismos parece explicar las diferentes frecuencias de las variantes genéticas en donde no se encuentran los tres bloques juntos, además de dar sustento a la idea de que los cinco polimorfismos se encuentran ligados en tres bloques. Por ejemplo, la distancia entre el primer y el segundo bloque del gen y del pseudogen es de tan solo 14 pb mientras que la distancia entre el segundo y el tercer bloque es de 70 pb. Si se pensara a la recombinación actuante entre secuencias del gen y del pseudogen de una manera similar a la que se produce en los cromosomas del núcleo durante la meiosis, sería lógico pensar que existe una mayor probabilidad de ocurrencia de un evento de recombinación entre el segundo y tercer bloque que entre el primero y segundo bloque, hecho que concuerda con los resultados obtenidos. Por otro lado, debido a que se obtuvieron variantes genéticas en las cuales se encuentran separados el primer y el segundo bloque, se puede pensar que la recombinación estaría actuando entre secuencias separadas por tan solo 14 pb. Esto representa un valor inferior al de 50 pb, reportado como valor mínimo para que se produzca recombinación homóloga en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* (Dauvillee et al., 2004) y se acerca más a los valores reportados para casos de recombinación ilegítima entre secuencias menores a 20 pb en algas y plantas (Hiratsuka et al., 1989; Staub y Maliga, 1994). Por otro lado, la escasa distancia entre los dos polimorfismos que componen el bloque **A** y el bloque **B** en el gen y los dos polimorfismos que componen el bloque **D** y el bloque **E** en el pseudogen explicaría el ligamiento de los mismos.

### **Las plántulas *cpm* poseen una tasa de recombinación aumentada que podría explicarse por fallas en la actividad de antirecombinación**

La ausencia de cambios moleculares en el gen y en el pseudogen *rpl23* en las poblaciones control indicaría que la recombinación entre estas secuencias sería nula o sumamente escasa en la naturaleza y que la alta tasa de cambios moleculares observada en las plántulas *cpm*, sería una característica propia de estas plántulas. La recombinación entre el gen y el pseudogen *rpl23* se ha postulado en varias especies de gramíneas (Bowman et al., 1988; Morton y Clegg, 1993). Como estos análisis implican la evolución de las secuencias en plazos largos de tiempo, se puede inferir que la tasa a la cual normalmente ocurriría esta recombinación es baja o que en el caso de haberse producido a tasas altas, esto ocurrió solamente durante periodos breves de tiempo.

Debido a que la recombinación que produjo las variantes genéticas en el gen y el pseudogen *rpl23 cpm* ocurrió en un gran número de plántulas en periodos cortos de tiempo (entre cinco y 17 generaciones), se infiere que esta recombinación ocurrió a una tasa sumamente alta. El mal funcionamiento de la proteína codificada por el gen afectado en las plántulas *cpm* sería entonces responsable del aumento de la tasa de recombinación entre el gen y el pseudogen *rpl23* respecto de lo que normalmente ocurre. Por este motivo, se cree que el gen afectado en las plántulas *cpm* actuaría, directa o indirectamente, inhibiendo la recombinación entre estas dos regiones del plastoma, es decir, tendría una función de antirecombinación entre estos segmentos.

La actividad de antirecombinación es una función atribuida a proteínas de *mismatch repair* y esto concuerda con las conclusiones obtenidas en el capítulo uno acerca de la posible naturaleza del gen afectado en *cpm*. Las proteínas del *mismatch repair* juegan un rol crucial en mantener la fidelidad de la recombinación entre secuencias idénticas y previene que secuencias divergentes recombinen, mediante el proceso conocido como antirecombinación (Chakraborty y Alani, 2016). El control de la recombinación es necesario para conservar la integridad del plastoma y en este sentido, la regulación de la recombinación ilegítima entre secuencias divergentes, es decir, secuencias no perfectamente idénticas y/o con microhomologías, se encuentra finamente regulada. De lo contrario, este tipo de recombinación podría tener efectos negativos sobre la funcionalidad de los cloroplastos (Marechal y Brisson, 2010). Por otro lado, la recombinación homóloga es una herramienta habitual de la que dispone el cloroplasto para reparar el plastoma. Esta recombinación actúa entre secuencias idénticas, como por ejemplo las que se ubican en las repeticiones invertidas y es extremadamente rara entre secuencias de longitudes menores a 50 – 100 pb (Iamtham y Day, 2000; Dauvillee et al., 2004).

Respecto de la tasa a la cual normalmente ocurren estas recombinaciones, se ha reportado una baja frecuencia de recombinación entre regiones de microhomología en los genomas de los cloroplastos y de las mitocondrias (Ogihara et al., 1988; Kanno et al., 1993; Hartmann et al., 1994; Moeykens et al., 1995; Marechal y Brisson, 2010), por lo cual, la recombinación que normalmente ocurre en plástidos y mitocondrias parece estar limitada a repeticiones grandes mayores a los 100 – 200 pb. Los eventos raros que involucran repeticiones con microhomología se han detectado solamente a escala evolutiva (Marechal y Brisson, 2010).

## **Posibles efectos sobre la funcionalidad del gen *rpl23* como consecuencia del mal funcionamiento de la proteína codificada por el gen *cpm* y de la recombinación alterada**

Dado que todas las plántulas que tuvieron el bloque **B** portador de la DelG133 en el gen *rpl23* en homoplasma resultaron albinas y que dicho bloque no estuvo presente en homoplasma en las plántulas verdes, y que además se observó la ausencia de la proteína RbcL en las plántulas albinas portadoras de la DelG133 en homoplasma, se deduce que el fenotipo albino podría deberse a la ausencia de síntesis de las proteínas codificadas en el plastoma, debido a la falta de ribosomas funcionales en el cloroplasto por la ausencia de la proteína ribosomal Rpl23. Además, también se determinó que el gen *rpl23* es esencial en tabaco incluso en condiciones heterotróficas (Fleischmann et al., 2011). Si bien el fenotipo albino puede deberse a mutaciones en una gran cantidad de genes, tanto nucleares como del cloroplasto y estos genes pueden estar implicados tanto en la traducción como en otras funciones, se cree que podría existir una relación entre la DelG133 en homoplasma y el fenotipo albino en las plántulas *cpm*. En general, en una planta albina muchos genes del cloroplasto se expresan en menor medida que en una planta verde normal. Esto ha sido observado en Shmakov et al. (2016) mediante el análisis de la expresión por RNA-seq de genes cloroplásticos en la mutante albina del gen *Alm* en cebada (línea i:BwAlm). Estos resultados demostraron que a pesar de que el gen *rbcL* se expresa menos que en el control verde normal, este gen se ubica entre los de mayor expresión en la mutante. Esto indicaría que en el caso de que el albinismo en las plántulas *cpm* no se produjera por la DelG133 en *rpl23* en homoplasma sino por otra causa, la proteína RbcL debería verse en el western blot.

Por otro lado, en una mutante de arroz con fenotipo albino (*al1*) se determinó la existencia de un cambio CxT en el gen nuclear que codifica la proteína PRPL12 que forma parte de los ribosomas del cloroplasto. En ese trabajo se determinó que la mutación afecta la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis, disminuyendo los niveles de los transcritos de *rbcL* y los niveles de proteínas codificadas por genes como *psbA* y *psaB* respecto del control salvaje (Zhao et al., 2016). Este caso, constituye al igual que la mutante albina con DelG133 identificada en *cpm*, otro ejemplo de una mutante en un gen de una proteína ribosomal del cloroplasto que origina un fenotipo albino debido al mal funcionamiento de los ribosomas de los cloroplastos. Como otro ejemplo, se puede citar a la mutante de cebada *albostrians* que carece de ribosomas del cloroplasto y en donde las plantas afectadas poseen fenotipo albino y también carecen de la subunidad grande de rubisco RbcL (Börner et al., 1976; Reichenbacher et al., 1978).

## ***cpm* como herramienta para el estudio de la recombinación en los cloroplastos y como posible herramienta biotecnológica**

Los resultados expuestos en este capítulo corroboran lo postulado por Bowman et al., (1988) y luego por Morton y Clegg, (1993) sobre la existencia de conversión génica de las secuencias del pseudogen *rpl23* con secuencias del gen *rpl23* y demuestran que las secuencias del gen también pueden sufrir conversión génica con las secuencias del pseudogen. Estos resultados respaldan entonces los pocos reportes existentes que postulan la conversión génica de genes ubicados en las regiones de copia simple del plastoma en la naturaleza y que, al basarse únicamente en examinación de secuencias, podrían considerarse como altamente especulativos (Ruhlman y Jansen, 2014). Por otro lado, los resultados demuestran que las plántulas *cpm* tendrían afectada la regulación de la recombinación en el plastoma. La conversión génica entre el gen y el pseudogen *rpl23*, dos segmentos divergentes debido a la existencia de cinco polimorfismos entre ellos, constituye un ejemplo que demuestra que al menos la recombinación ilegítima, se encontraría alterada.

El mal funcionamiento de la proteína codificada por el gen nuclear afectado en *cpm* no solo provocaría cambios puntuales como las sustituciones y los indels de una o dos pares de bases en microsatélites del plastoma, sino también cambios moleculares que involucran secuencias del tamaño de un gen como *rpl23* mediante recombinación alterada. De esta manera, el *cpm* se posiciona como una herramienta para el estudio de los mecanismos de mantenimiento de la integridad del genoma de los cloroplastos y de la influencia de la regulación de la recombinación en el proceso de mantenimiento del plastoma. Además de la utilidad de *cpm* en la generación de conocimiento básico de un proceso tan importante para el funcionamiento de los cloroplastos, el hecho de que la recombinación entre el gen y el pseudogen *rpl23* se encuentre aumentada respecto de la tasa en que normalmente se produce, convierte al *cpm* en una posible herramienta para la introducción de genes en el plastoma y la obtención de líneas transplastómicas. Esto cobra principal importancia por el hecho de que la eficiencia de obtención de líneas transplastómicas en gramíneas es baja y es necesario el desarrollo de estrategias que permitan mejorar la eficiencia (Li et al., 2009; Rigano et al., 2012). En este sentido, el pseudogen *rpl23* se convierte en una región candidata para la introducción de transgenes, debido a que no codifica producto proteico y debido a que presenta una mayor tendencia a fijar las nuevas variantes genéticas que el gen. Es importante aclarar que la tasa aumentada de recombinación facilitaría la introducción del transgén en el plastoma, pero para la obtención de una línea estable con el transgén se necesitaría la estabilización de la línea transplastómica mediante el cruzamiento con una planta salvaje, de modo de eliminar la inestabilidad del plastoma que produce la presencia del alelo *cpm* en homocigosis y evitar la pérdida del transgén por la misma recombinación que facilitó su introducción.

## CONCLUSIONES

La variabilidad identificada en el gen y el pseudogen *rpl23* de las plántulas *cpm* se produce por recombinación y no por mutaciones inducidas por el *cpm*.

La recombinación entre el gen y el pseudogen *rpl23* de las plántulas *cpm* es ilegítima y no recíproca, es decir, se trataría de conversión génica.

El *cpm* tiene una tasa de recombinación aumentada entre *rpl23* y pseudogen *rpl23* respecto de la línea salvaje.

La proteína codificada por el gen nuclear afectado en *cpm* normalmente estaría inhibiendo la recombinación ilegítima entre segmentos divergentes, como por ejemplo el gen y el pseudogen *rpl23*, y contribuiría al mantenimiento de la integridad del plastoma. Por el contrario, su mal funcionamiento facilitaría la recombinación entre segmentos divergentes y por lo tanto contribuiría a la desestabilización del plastoma.

La recombinación entre el gen y el pseudogen *rpl23* sugiere fallas en la función de antirecombinación de una proteína involucrada en el mecanismo de reparación del ADN de *mismatch repair* direccionada al cloroplasto.

El *cpm* puede ser de utilidad para el estudio de la regulación de la recombinación como parte del mantenimiento de la integridad del plastoma y podría ser utilizado como una herramienta para obtención de plantas de cebada transplastómicas.

## **CAPÍTULO 3**

### **Análisis de indels grandes**

## INTRODUCCIÓN

El plastoma es un genoma altamente conservado en comparación con el genoma nuclear. Las variaciones mayoritarias que se identifican al comparar plastomas de diferentes especies corresponden a las denominadas variaciones de longitud, es decir, indels de varias bases. Estos indels se ubican, por lo general, en ciertas regiones del plastoma que se conocen como *hotspots* de variabilidad. Entre estas regiones se destaca la zona de unión de las LSC y SSC con las IRs (Ogihara y Ohsawa, 2002). También se identificó este tipo de indels en otras regiones del plastoma, en donde se ha postulado al *slippage* de la polimerasa durante la replicación del ADN (Massouh et al., 2016) y a la recombinación intramolecular, es decir, la recombinación entre regiones de un mismo plastoma como la causa de su producción (Ogihara y Osawa, 2002). La recombinación desregulada produce eventos de recombinación ilegítima que podrían ocasionar la pérdida de porciones del plastoma que incluyen genes y por lo tanto, tener consecuencias negativas sobre el funcionamiento de los cloroplastos y el desarrollo de las plantas. Las principales perturbaciones en la estabilidad del plastoma surgen como consecuencia de eventos de recombinación ilegítima entre secuencias cortas o repeticiones con microhomología (Marechal y Brisson, 2010).

En este capítulo, se profundiza el análisis de las digestiones con CJE de los cuatro indels grandes identificados en el capítulo uno, con el objeto de postular un mecanismo molecular responsable de la producción de dichos indels. Por otro lado, se analizan las consecuencias moleculares de las deleciones grandes identificadas en regiones génicas y la posible relación con los fenotipos observados.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar los productos de las digestiones con CJE de los amplicones que portan indels grandes.

Analizar en detalle las secuencias de los amplicones que portan los indels grandes.

Identificar *in silico* regiones del plastoma que puedan actuar como sitios de producción de deleciones grandes y analizar la existencia de dichas deleciones en las 184 plántulas *cpm* que se analizaron en el capítulo uno.

Analizar las proteínas de los fotosistemas en la mutante con deleción de 620 pb en el gen *psbA* que se identificó en el capítulo uno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Plántulas *cpm* portadoras de indels grandes en el plastoma

Las plántulas *cpm* portadoras de indels grandes que se analizan en este capítulo se detectaron mediante el ensayo de TILLING dirigido al plastoma tal como se indicó en el capítulo uno. A su vez, para analizar la digestión de los heteroduplexos generados por los indels grandes se corrieron también en geles de poliacrilamida 3% los amplicones sin digerir con CJE.

Las plántulas analizadas corresponden a: 07/4068-2 portadora de deficiencias clorofílicas (coloración *viridis* en los bordes de la hoja) y de una inserción de 15 pb en la región intergénica *tRNAHis-rps19*; 07/4062-4 portadora de cambios morfológicos (es una plántula de menor tamaño que lo normal) y de una deleción de 620 pb en el gen *psbA*; 08/2163-1 con fenotipo normal y portadora de una deleción de 79 pb en la región intergénica *rpl33-rps18*; 08/1954-2 portadora de cambios morfológicos (hoja larga y angosta) y de una deleción de 45 pb en el gen *rps3*.

A su vez, se analizó la descendencia de plántulas pertenecientes a la subfamilia en la que se identificó a la mutante con la deleción en el gen *psbA* y también se analizó una plántula con fenotipo *viridis* perteneciente a otra subfamilia *cpm* distinta (11/1037).

### Búsqueda de nuevas deleciones grandes en regiones del plastoma conteniendo repeticiones directas

Mediante el software REPuter se buscaron regiones del plastoma de cebada conteniendo secuencias con repeticiones directas de entre 20 y 40 pb de longitud y separadas por una distancia de hasta 200 pb. Se diseñaron cebadores para la amplificación de estas regiones mediante PCR de la mezcla del ADN de cada una de las 184 plántulas *cpm* que se describen en el capítulo uno con ADN de la línea salvaje. Se analizó la existencia de deleciones grandes en estas regiones mediante digestión de los amplicones con CJE según el protocolo de TILLING descrito en el capítulo uno.

### Análisis de secuencias salvajes y secuencias portadoras de indels grandes

Se empleó el programa de alineamiento del paquete Vector NTI 10.0 para la comparación de las secuencias salvajes y portadoras de indels grandes y también para la comparación de las proteínas que derivan de genes con secuencias salvajes y portadoras de indels.

Por otro lado, también se realizó el alineamiento de las secuencias del gen *rps3* del plastoma de diferentes especies de gramíneas y se comparó con la versión portadora de la deleción de 45 pb en el gen *rps3* de cebada *cpm*.

## **Análisis de los efectos moleculares y fenotípicos de la delección en el gen *psbA***

### Identificación de plántulas homoplásmicas para la delección en el gen *psbA*

Se buscaron plántulas portadoras de la delección en homoplasma en la descendencia de plántulas de la misma subfamilia a la cual pertenecía la plántula portadora de la delección en el gen *psbA* en heteroplasma. Para esto, se realizó la extracción de ADN de 12 plántulas *cpm* crecidas en el invernáculo durante una semana. Luego se analizó el gen *psbA* mediante la observación del tamaño de los productos de PCR en geles de agarosa 1% y secuenciación del amplicón *psbA*.

### Obtención de las fracciones proteicas solubles y asociadas a membranas a partir de un protocolo de aislamiento de membranas tilacoides

Se realizó tal como se describió en el capítulo dos.

### Medición de clorofila y solubilización de las tilacoides

Se tomaron 10 µl de la preparación de tilacoides y se colocaron en un ml de dimetilformamida. Las muestras se centrifugaron brevemente y se midió absorbancia a 750 nm, 647 nm y 664,5 nm. Para calcular la cantidad de clorofila en las tilacoides se utilizó la siguiente fórmula (Inskeep y Bloom, 1985):  $Chl (\mu g/\mu l) = (17,9 \times A_{647} + 8,08 \times A_{664,5}) / 10$

Para la solubilización se tomaron 10 volúmenes de tilacoides junto con nueve volúmenes de buffer de solubilización (133 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 4,3% SDS) y un volumen de 2-mercaptoetanol. Se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos como mínimo antes de sembrar los geles de SDS-PAGE.

### Minigeles de SDS-PAGE y transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa

Se realizó tal como se describió en el capítulo dos.

### Western blot contra proteínas de los fotosistemas

Luego de la transferencia a membrana de nitrocelulosa de la fracción proteica asociada a membranas obtenida siguiendo el protocolo de aislamiento de tilacoides desde hojas de plántulas *cpm*, se inmunodetectaron las siguientes proteínas: 1) D1 y D2 codificadas por los genes del plastoma *psbA* y *psbC*, respectivamente; 2) PSI-A/B, D, E/L que forman parte del fotosistema I (PSI) y están codificadas en el plastoma (PSI A/B) y en el genoma nuclear (PSI D, E/L); 3) LHCb1, la proteína 1 del complejo de la antena extrínseca o *light harvesting complex* del fotosistema II codificada en el genoma nuclear.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-D1 y anti-D2 (PSII) gentilmente donados por Alice Barkan, Universidad de Oregon, USA; anti-LHCII gentilmente donado por J. J. Guimmet, INFIVE, Universidad de La Plata y anti-PSI (reconoce PSI-A/B, -D, -E, -L, -H, -C) gentilmente donado por H. V. Scheller, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dinamarca.

Luego del bloqueo de la membrana durante una hora, se incubó toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios, se lavó la membrana con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo secundario de cabra anti conejo durante una hora. La inmunodetección se realizó con el sustrato quimioluminiscente *supersignal west dura extended duration* (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) de acuerdo a la descripción del fabricante.

#### Análisis de los genes *psbC*, *psbD* y *psbA* en una mutante *viridis* perteneciente a la subfamilia 11/1037

En la subfamilia *cpm* 11/1037, una subfamilia diferente a la que pertenecía la mutante con deleción en *psbA*, se identificó una mutante *viridis* que comenzó a deteriorarse al cabo de dos semanas de crecimiento en una cámara de cría a una temperatura de 20°C y fotoperíodo de 16 hs de luz / 8 hs de oscuridad. Se analizó en esta mutante la existencia de cambios moleculares en los genes del PSII. Se realizó la extracción de ADN al momento que se detectó el comienzo del deterioro. Luego se analizó mediante digestión con CJE y secuenciación la existencia de cambios moleculares en los amplicones *psbA*, *psbC* y *psbD*.

## RESULTADOS

### Detección de plántulas portadoras de indels grandes mediante digestión con CJE

Como se indicó en el capítulo uno se identificaron cuatro casos de indels que tuvieron tamaños mayores a una o dos pares de bases. Estos indels correspondieron a una inserción y tres deleciones. La inserción fue de 15 pb y se ubicó entre los genes *tRNAHis* y *rps19* contenidos en el amplicón *rps19* que amplifica una sola de las IRs. Las tres deleciones se ubicaron en la LSC. Una deleción se ubicó en el gen *rps3* contenido en el amplicón *rps3* y fue de 45 pb, otra se ubicó entre los genes *rpl33* y *rps18* contenidos en el amplicón *rpl33* y fue de 79 pb, y la tercera deleción se ubicó en el gen *psbA* contenido en el amplicón *psbA* y fue de 620 pb. En la figura 3.1 se muestran las digestiones con CJE para cada caso.

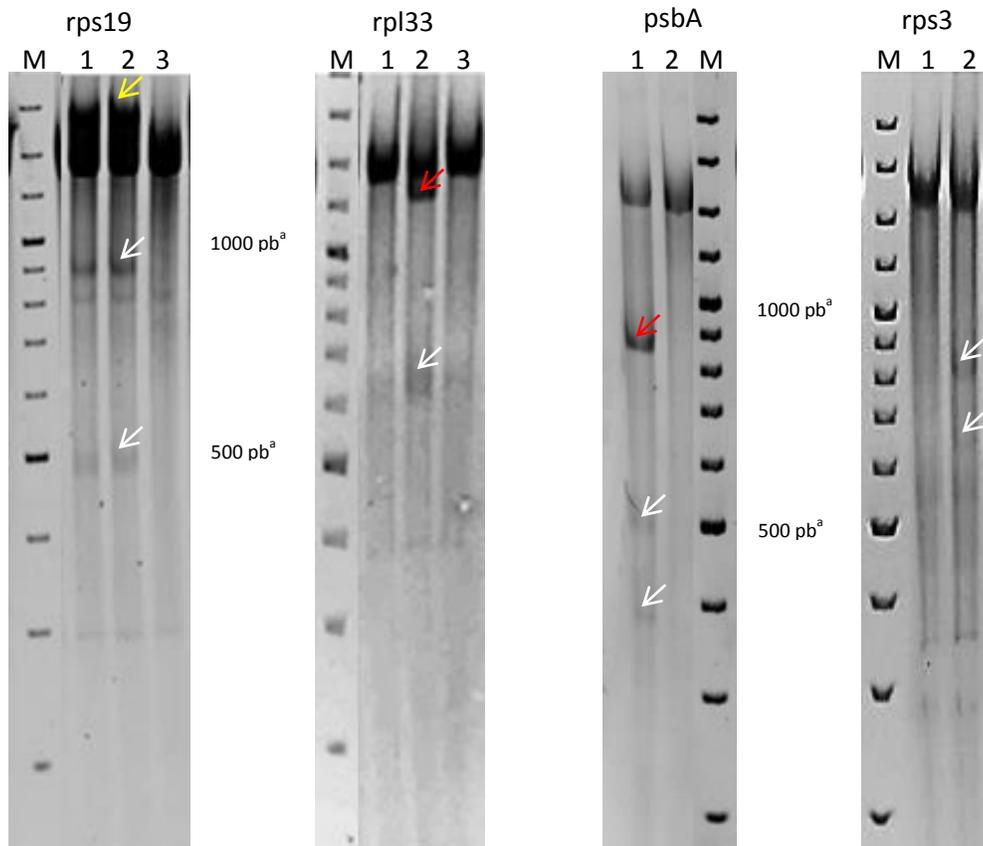


Figura 3.1. Digestiones con CJE de los amplicones *rps19*, *rpl33*, *psbA* y *rps3* portadores de indels grandes. Se marca con flechas blancas las bandas de digestión. Se marca con flechas rojas y amarillas las bandas de amplificación de tamaño menor y mayor que el tamaño normal de los amplicones, respectivamente. En el gel del amplicón *rps19*, las calles 1 y 2 muestran digestión y dos bandas de amplificación. En el gel del amplicón *rpl33*, la calle 2 muestra digestión y dos bandas de amplificación. En el gel del amplicón *psbA*, la calle 1 muestra digestión y dos bandas de amplificación. En el gel del amplicón *rps3*, la calle 2 muestra digestión. <sup>a</sup>Las muestras corren más lento que el marcador de peso molecular (M) probablemente debido a componentes de la mezcla de digestión.

En la figura 3.1 se observa que además de las bandas de digestión, se produjeron dos bandas de amplificación, una del tamaño del amplicón y otra de tamaño inferior en los casos de los amplicones *rpl33* y *psbA*. En ambos casos, las bandas de tamaño inferior coinciden con el tamaño calculado para el fragmento portando la deleción. En el caso del amplicón *rps19* también se obtuvieron dos bandas de amplificación, pero una del tamaño del amplicón *rps19* y la otra de tamaño superior.

La secuenciación de los amplicones reveló la existencia de segmentos cortos con secuencias similares que se podrían considerar como repeticiones directas, en cada extremo de los indels. En dos casos, las repeticiones fueron idénticas y tuvieron el mismo tamaño. Esto se observó en el caso de la deleción localizada en la región intergénica *rpl33-rps18*, en donde las repeticiones fueron de siete pb y en el caso de la deleción en el gen *rps3*, en donde las repeticiones fueron de 19 pb. Para el caso de la deleción en el gen *psbA*, las repeticiones no fueron idénticas; una de las repeticiones tuvo un tamaño de 10 pb mientras que la otra tuvo un tamaño de 17 pb. Las repeticiones tampoco fueron idénticas en el caso de la inserción en la región intergénica *tRNAHis-rps19*, en donde, una repetición tuvo un tamaño de 10 pb mientras que la otra tuvo un tamaño de nueve pb. Por otro lado, también se observó que el propio fragmento de la inserción tiene un tamaño de 15 pb y se encuentra duplicado en tándem.

En las tablas 3.1 y 3.2 se resume las características de los cambios moleculares identificados en los amplicones que portan la inserción y las tres deleciones, respectivamente.

Indel grande	Plántula	Repetición directa	Unidad duplicada	Longitud
Inserción en <i>tRNAHis - rps19</i>	07/4068-2	1: TCAGAATAAA 2: TAGAATAAT	TAGAATAATGATCAA	15 pb

Tabla 3.1. Detalles de la inserción en la región intergénica *tRNAHis – rps19*. 1: corresponde a la repetición ubicada en el extremo 5' de la inserción y 2: corresponde a la repetición ubicada en el extremo 3' de la inserción.

Indel grande	Plántula	Repetición directa	Longitud
Deleción en <i>rpl33 –rps18</i>	08/2163-1	TTCATAT	79 pb
Deleción en <i>rps3</i>	08/1954-2	CAAGTCCGAAGTAATTAC	45 pb (207-251)
Deleción en <i>psbA</i>	07/4062-4	1:TTCTTACTT 2:TTCTGGCTGCTGGCC	620 pb (217-836)

Tabla 3.2. Detalles de las deleciones en la región intergénica *rpl33-rps18*, en el gen *rps3* y en el gen *psbA*. En el caso de la deleción en *psbA*, 1: corresponde a la repetición ubicada en el extremo 5' de la deleción y 2: corresponde a la repetición ubicada en el extremo 3' de la deleción. Entre paréntesis se informan las posiciones en los genes del comienzo y el fin del fragmento delecionado.

En la figura 3.2 se muestra la secuencia que rodea a la inserción en la región intergénica *tRNAHis-rps19*, en donde se marca en recuadros rojos las secuencias similares que se pueden considerar como repeticiones directas y la duplicación se marca con recuadros negros.

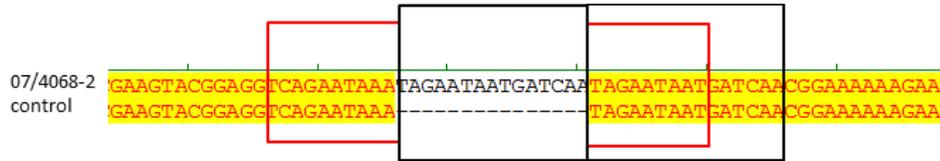


Figura 3.2. Alineamiento de la secuencia que rodea a la inserción en la región intergénica *tRNAHis-rps19*.

Las secuencias que rodean a las tres deleciones se muestran en la figura 3.3, en donde se marca con recuadros rojos las secuencias idénticas o similares que se pueden considerar como repeticiones directas.

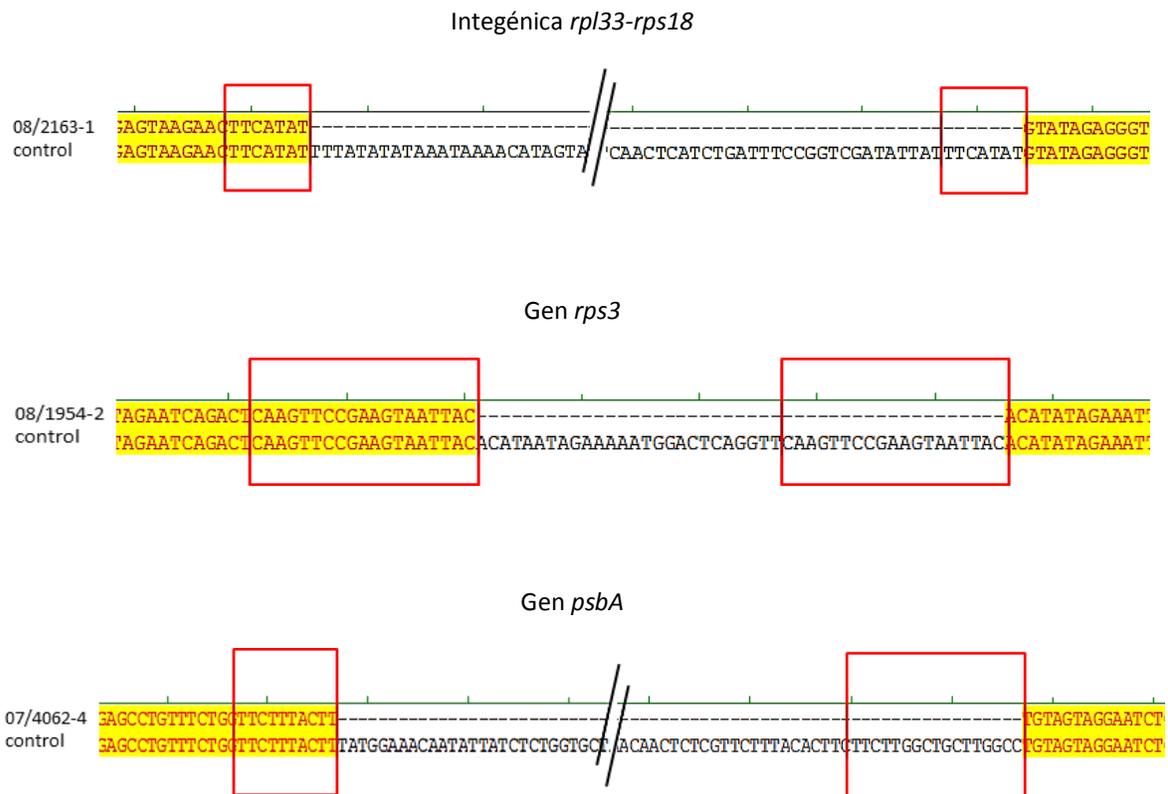


Figura 3.3. Alineamiento de la secuencia que rodea a las deleciones en la región intergénica *rpl33-rps18*, en el gen *rps3* y en el gen *psbA*.

Debido a que se consideró que la banda de tamaño superior al tamaño del amplicón *rps19* no se podía deber al homoduplexo portador de la inserción, ya que una diferencia de 15 pb en un amplicón del tamaño de *rps19* no se observaría como dos bandas diferentes en el gel de poliacrilamida, se decidió investigar si esta banda de tamaño superior desaparecía ante la digestión con CJE y si este tipo de banda también se producía en los otros indels. Para esto, se realizaron digestiones con CJE del ADN de las muestras portadoras de los indels solas y mezcladas con ADN control. En ambos casos se ensayaron también los amplicones sin digerir. En la figura 3.4 se muestran estas digestiones corridas en geles de poliacrilamida.

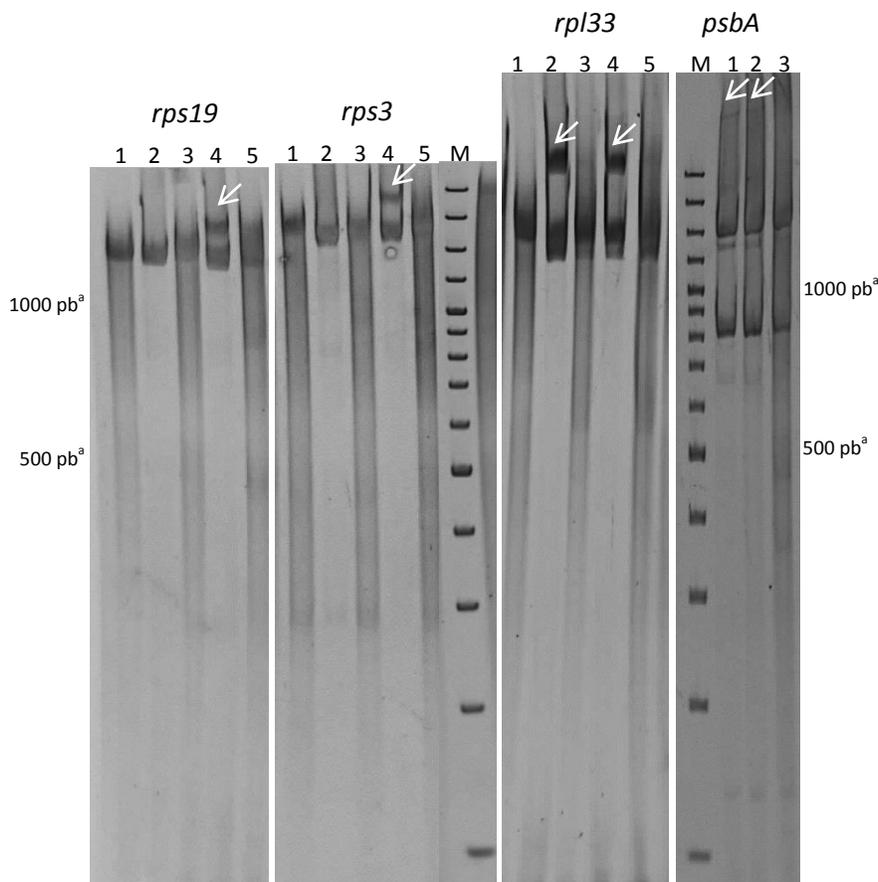


Figura 3.4. Digestión con CJE de los amplicones *rps19*, *rps3*, *rpl33* y *psbA* de las mutantes con indels grandes. Geles de los amplicones *rps19*, *rps3* y *rpl33*: calle 1, amplificación del ADN salvaje digerido con CJE; calle 2, amplificación del ADN de la mutante sin digerir; calle 3, amplificación del ADN de la mutante digerida; calle 4, amplificación de la mezcla de ADN salvaje y mutante sin digerir; calle 5, amplificación de la mezcla de ADN salvaje y mutante digerida. Gel de amplicón *psbA*: calle 1, amplificación del ADN de la mutante sin la desnaturalización - renaturalización y sin digestión, calle 2, amplificación del ADN de la mutante seguido por la desnaturalización - renaturalización y sin digestión, calle 3 es la amplificación del ADN de la mutante seguido de la desnaturalización y renaturalización y digerido con CJE. Se indican con flechas las bandas de amplificación de tamaño superior al tamaño de los amplicones. <sup>a</sup>Las muestras corren más lento que el marcador de peso molecular (M) probablemente debido a componentes de la mezcla de digestión.

En los cuatro casos se observó la presencia de una banda de tamaño superior al tamaño del amplicón cuando no se digirió con CJE (fig. 3.2). Esta banda desapareció ante la digestión con CJE, salvo en el caso del amplicón *rps19* en donde dicha digestión fue incompleta. Esta banda se observó incluso sin realizar la etapa de desnaturalización - renaturalización del protocolo de TILLING para el caso del amplicón *psbA*. En los casos del amplicón *rpl33* y *psbA*, la banda de tamaño superior al tamaño del amplicón se observó tanto para la amplificación desde el ADN de la muestra sin mezclar con el ADN salvaje como para la mezcla de ADNs, lo que indica el carácter heteroplásmico de los indels. En los casos de los amplicones *rps19* y *rps3*, la banda de tamaño superior se observó solamente en la amplificación de las mezclas de ADNs, lo que indica el carácter homoplásmico de los indels.

### **Búsqueda de deleciones grandes en regiones del plastoma conteniendo repeticiones directas**

La existencia de repeticiones directas en los extremos de las deleciones grandes identificadas motivó la búsqueda de este tipo de repeticiones en otras regiones del plastoma diferentes de las analizadas mediante cpTILLING (diferentes de las regiones analizadas en el capítulo uno), de manera de postular sitios de producción de deleciones grandes en las plántulas *cpm*. La observación de bandas dobles de amplificación, además de las bandas de digestión con CJE, identificarían a las plántulas portadoras de este tipo de deleciones.

Mediante la utilización del software REPuter se identificaron varias regiones en el plastoma de cebada portadoras de repeticiones directas, es decir, secuencias de ADN que leídas en el mismo sentido poseen alta identidad. El software buscó regiones con este tipo de secuencias de entre 20 y 40 pb de longitud y separadas por hasta 200 pb. La mayoría de las regiones tuvo repeticiones con uno o dos *mismatches* entre ellas. Solo las regiones en la que se ubica el gen *rpoC2* y la que contiene una de las copias del gen *trnfM* presentaron repeticiones directas sin *mismatches* y por este motivo fueron seleccionadas para su análisis. Las repeticiones directas ubicadas en el gen *rpoC2* tienen un tamaño de 21 pb y se encuentran separadas por 189 pb. Las repeticiones directas ubicadas en la región intergénica que rodea al gen *trnfM* tienen un tamaño de 21 pb y están separadas por 168 pb.

El análisis de las regiones *rpoC2* y *trnfM* contenidas en los amplicones *rpoC2* y *trnfM* mediante la digestión con CJE en las 184 plántulas *cpm* que se analizaron en el capítulo uno, no reveló la existencia de bandas dobles de amplificación que indicaran la presencia de indels grandes, pero se identificaron digestiones en dos plántulas *cpm* que tuvieron otros tipos de cambios moleculares en estas regiones. Mediante la secuenciación de estos amplicones se determinó la existencia de una sustitución A 867 G en el amplicón *rpoC2* en homoplasma. Esta sustitución no cambia el aminoácido en la proteína codificada por *rpoC2*. También se identificó una sustitución A 662 G en el amplicón *trnfM* en homoplasma, que se ubica en la región intergénica contenida en el amplicón *trnfM*.

## Análisis de la delección en el gen *rps3*

Como se puede observar en la figura 3.5, la delección de 45 pb en el gen *rps3* no cambia el marco de lectura y solo provoca la pérdida de 15 aminoácidos en la proteína ribosomal RpS3. La plántula portadora de esta delección en homoplasma presentaba un fenotipo con cambios morfológicos, con hojas de láminas más largas y más angostas que las plántulas salvajes y de coloración verde normal. En necesario aclarar que para la corroboración de la relación entre el cambio molecular detectado y el fenotipo observado en la plántula, se requiere de la realización de más estudios.

El alineamiento de la secuencia de la proteína ribosomal RpS3 de cebada salvaje con la secuencia de RpS3 de maíz salvaje revela que la versión del maíz carece de los mismos 15 aminoácidos que se eliminaron en la versión de RpS3 de la mutante *cpm* (fig. 3.6). El análisis de la secuencia dentro de las gramíneas mostró que la proteína RpS3 de trigo, cebada y arroz contiene este dominio, mientras que la proteína de maíz y sorgo no lo contiene.

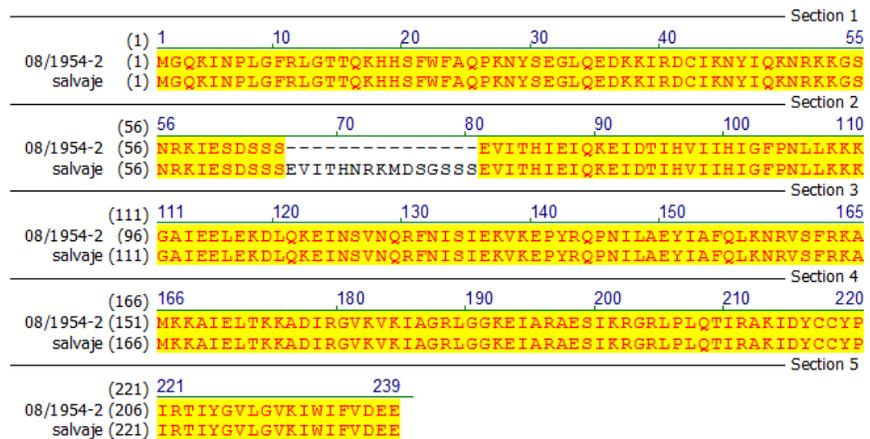


Figura 3.5. Alineamiento de las secuencias de la proteína RpS3 en la línea salvaje y en la mutante *cpm* con delección de 45 pb en el gen *rps3* (plántula 08/1954-2).



Fig. 3.6. Alineamiento de las secuencias salvajes de la proteína RpS3 en cebada y maíz.

## Análisis de los efectos moleculares y fenotípicos de la delección en el gen *psbA*

### Identificación de plántulas homoplásmicas para la delección en el gen *psbA*

Se analizó el tamaño del amplicón *psbA* en 12 plántulas *cpm* de la descendencia de plántulas pertenecientes a la misma subfamilia en la cual se identificó la plántula portadora de la delección de 620 pb en el gen *psbA*. Tal como se muestra en la figura 3.7, el amplicón de la plántula de la calle 3 tuvo un tamaño de aproximadamente 800 pb, lo que indicó que esta plántula era portadora de la delección en homoplasmia. Esto se corroboró luego mediante la secuenciación del amplicón. La plántula portadora de la delección presentaba un fenotipo *viridis* y murió luego de realizada la toma de muestra al cabo de dos semanas desde la siembra.

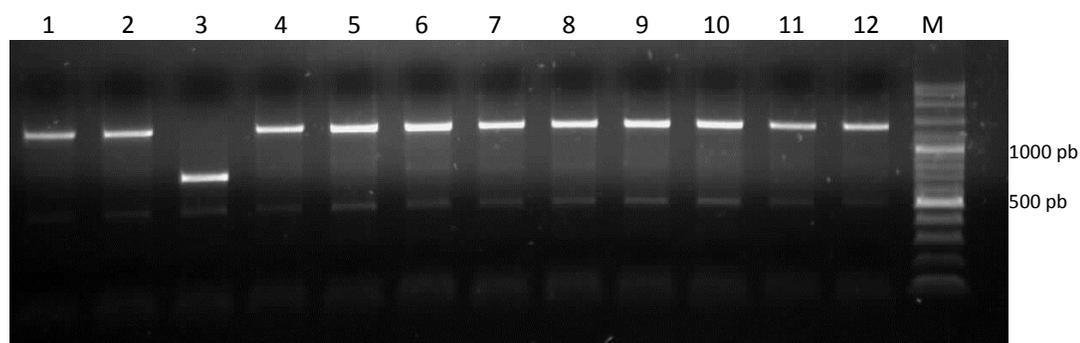


Figura 3.7. Identificación de una mutante homoplásmica portadora de la delección de 620 pb en el gen *psbA* (calle 3). M: marcador de peso molecular.

En la figura 3.8 se muestra el amplicón *psbA* de las plántulas mutantes portadoras de la delección en el gen *psbA* en heteroplasmia, en homoplasmia y en una plántula salvaje sin la delección.

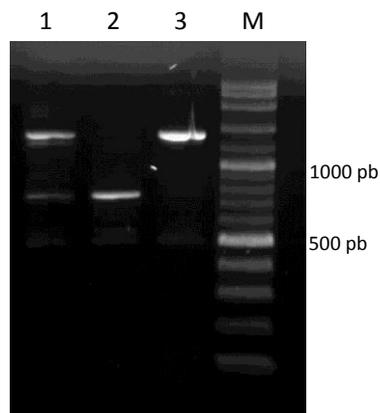


Figura 3.8. Plántulas portadoras de la delección en *psbA* en heteroplasmia (calle 1), homoplasmia (calle 2) y sin la delección (calle 3). M: marcador de peso molecular.

### Efecto de la delección de 620 pb en el gen *psbA* sobre la secuencia aminoacídica de la proteína D1

La delección de 620 pb en el gen *psbA* provocaría un corrimiento del marco de lectura desde la base 837 del gen y originaría un codón de terminación prematuro 33 bases más adelante. Esto produciría una proteína de 83 aminoácidos, en donde los primeros 72 serían los mismos que la versión salvaje de la proteína D1 y los últimos 11 serían distintos. En la figura 3.9 se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína D1 que derivan de las versiones salvajes y portadoras de la delección de 620 pb en el gen *psbA*.



Figura 3.9. Alineamiento de las secuencias de la proteína D1 que derivan de la versión salvaje y de la versión portadora de la delección de 620 pb en el gen *psbA* (plántula 07/4062-4).

### Western blot contra proteínas de los fotosistemas en la mutante *viridis* con la delección en el gen *psbA* en homoplasma

Se analizó mediante western blot la presencia de proteínas de los fotosistemas en la mutante *viridis* portadora de la delección en *psbA* y en plántulas *cpm* verdes normales sin la delección. Se consideró apropiado el análisis de plántulas *cpm* de fenotipos verde normal sin la delección, ya que éstas tendrían una constitución genética más cercana a la mutante portadora de la delección que una plántula salvaje. Estos ensayos determinaron la ausencia de las proteínas D1 y D2 y la presencia tanto de las proteínas del PSI como de la proteína LHcb1 en la mutante *viridis* portadora de la delección. Todas estas proteínas estuvieron presentes en las plántulas que no poseían la delección (fig. 3.10).

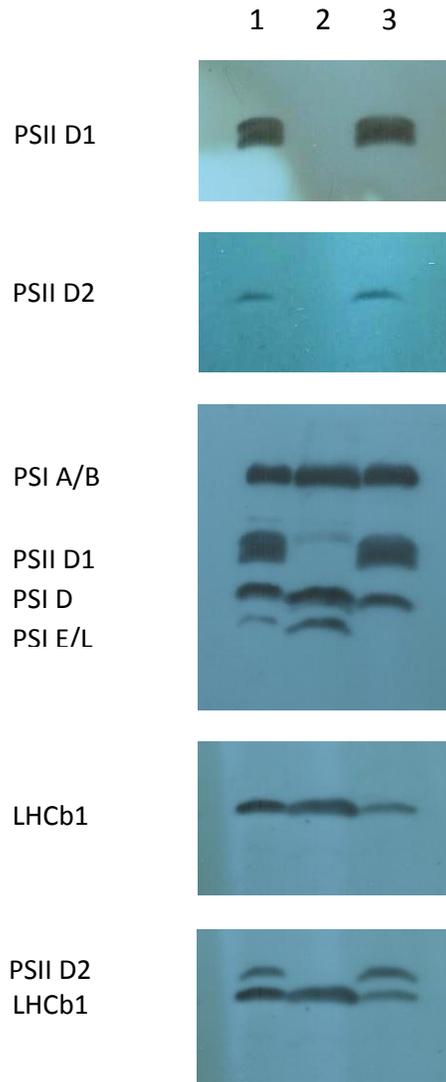


Figura 3.10. Western blot contra proteínas de los fotosistemas.  
 Calles 1 y 3: plántulas *cpm* verde normal que no portan la deleción de 620 pb en *psbA*.  
 Calle 2: mutante homoplásmica para la deleción de 620 pb en *psbA*.  
 PSI: fotosistema I, PSII: fotosistema II. LHCb: *light harvesting complex* del fotosistema II.

### Análisis de los genes *psbC*, *psbD* y *psbA* en la mutante *viridis* de la subfamilia 11/1037

Mediante la observación visual de plántulas *cpm* pertenecientes a la subfamilia 11/1037, se identificó una plántula *viridis* que comenzó con su deterioro en el plazo de dos semanas de crecida en la cámara de cría (fig. 3. 11), tal como lo hizo la plántula *viridis* portadora de la delección de 620 pb en el gen *psbA*. Por este motivo se decidió analizar en esta plántula, los genes *psbA*, *psbC* y *psbD*.

El análisis por digestión con CJE del amplicón *psbA* en esta mutante no indicó la presencia de cambios moleculares en el gen *psbA*. Se analizaron luego los amplicones *psbC* y *psbD* que contienen a los genes del fotosistema II, *psbC* y *psbD* respectivamente. Tal como se muestra en la figura 3.12, se observó digestión del amplicón *psbC* cuando este se obtuvo a partir de la mezcla de ADN de esta mutante *viridis* con ADN salvaje, resultado que indica el carácter homoplásmico del cambio molecular. Mediante la secuenciación del amplicón *psbC* se determinó la existencia de una inserción en homoplasmia de dos bases (TA) luego de la base 699 del gen *psbC* en una región de repeticiones TA en tándem. Esta inserción introduce un codón de terminación prematuro TAA en esta posición ubicada en la porción central del gen que produciría una proteína truncada de 233 aminoácidos (fig. 3.13). Esto representa una proteína de aproximadamente la mitad del tamaño de la proteína CP43 normal.

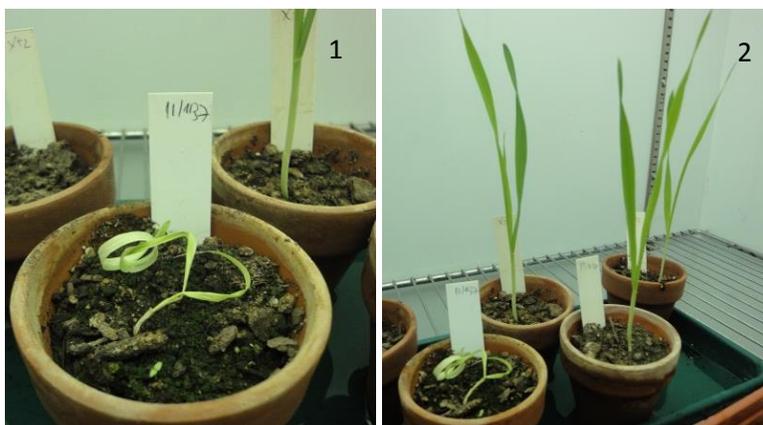


Figura 3.11. 1: Plántula *viridis* en proceso de deterioro observada en la subfamilia *cpm* 11/1037.  
2: La misma plántula *viridis* de la foto 1 (izquierda) y tres plántulas normales (derecha).

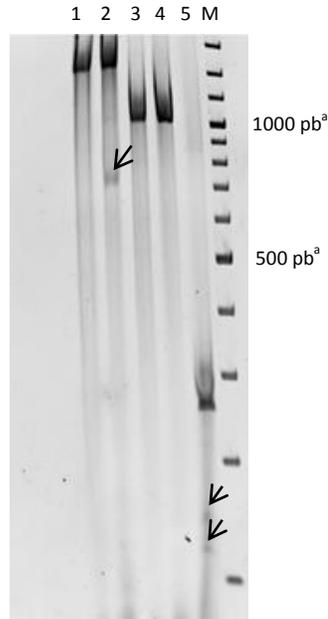


Figura 3.12. Digestión con CJE de los amplicones psbC (calles 1 y 2) y psbD (calles 3 y 4) en la mutante *viridis* de la subfamilia 11/1037. Las calles 1 y 3 contienen la amplificación a partir del ADN de la mutante solamente. Las calles 2 y 4 contienen la amplificación a partir de la mezcla del ADN de la mutante *viridis* con el ADN salvaje. La calle 5 es un control positivo de la digestión con CJE. Las bandas de digestión se muestran con flechas negras. <sup>a</sup>Las muestras corren más lento que el marcador de peso molecular (M) probablemente debido a componentes de la mezcla de digestión.

		Section 1					
	(1)	1	10	20	30	40	55
11/1037	(1)	MKILYSLRRFYHVETLFNNGTFFVLAGRDQETTGFPAWWAGNARLINLSGKLLGAHVA					
salvaje	(1)	MKILYSLRRFYHVETLFNNGTFFVLAGRDQETTGFPAWWAGNARLINLSGKLLGAHVA					
		Section 2					
	(56)	56	70	80	90	100	110
11/1037	(56)	HAGLIVFWAGAMNLFVVAHFVPEKPMYEQGLILLPHLATLGWGVGGGEVLDTFP					
salvaje	(56)	HAGLIVFWAGAMNLFVVAHFVPEKPMYEQGLILLPHLATLGWGVGGGEVLDTFP					
		Section 3					
	(111)	111	120	130	140	150	165
11/1037	(111)	YFVSGVLHLISSAVLGFGGIYHALLGPETLEESFPFFGYVWKRDRKMTTILGIHL					
salvaje	(111)	YFVSGVLHLISSAVLGFGGIYHALLGPETLEESFPFFGYVWKRDRKMTTILGIHL					
		Section 4					
	(166)	166	180	190	200	210	220
11/1037	(166)	ILLGLGAFLLVLRKALYFGGVYDTWAPGGGDVRKITNLTLSPSVIFGYLLKSPFPG					
salvaje	(166)	ILLGLGAFLLVLRKALYFGGVYDTWAPGGGDVRKITNLTLSPSVIFGYLLKSPFPG					
		Section 5					
	(221)	221	230	240	250	260	275
11/1037	(221)	EGWIVSVDDLED					
salvaje	(221)	EGWIVSVDDLED I IGGHVWLGFI CVFGGIWHILTRPFAWARRAFVWSGEAYLSYS					
		Section 6					
	(276)	276	290	300	310	320	330
11/1037	(233)	-----					
salvaje	(276)	LAALS VFGFIACCFVWFNNTAYPSEFYGPTGPEASQAQAF TFLVRDQRLGANVGS					
		Section 7					
	(331)	331	340	350	360	370	385
11/1037	(233)	-----					
salvaje	(331)	AQQPTGLGKYL MRSPTGEVIFGGETMRPFDLRAPWLEPLRGPNGLDLSRLK KDIQ					
		Section 8					
	(386)	386	400	410	420	430	440
11/1037	(233)	-----					
salvaje	(386)	PWQERRSAEYMT HAPLGSLSVGGVATEINAVNYVS PRSWLSTSHFVLGFFFFVVG					
		Section 9					
	(441)	441	450	460	473		
11/1037	(233)	-----					
salvaje	(441)	HLWHAGRARAAAAGFEKGI DRDLEPVL YMNPLN					

Figura 3.13. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína CP43 en línea salvaje y la mutante de la subfamilia 11/1037 con inserción de TA en el gen *psbC*.

## DISCUSIÓN

### Características de los indels grandes identificados y su mecanismo de producción

Debido al tamaño superior a una o dos pares de bases, los cuatro indels descritos en este capítulo se denominaron indels grandes. La presencia de repeticiones directas, es decir, segmentos de ADN con secuencias iguales o similares en los extremos de los cuatro indels grandes puede dar un indicio del mecanismo responsable de la producción de los mismos.

Este tipo de repeticiones se ha observado en indels producidos por *slippage* de la ADN polimerasa en bacterias (Bzymek y Lovett, 2001). El *slippage* o deslizamiento de la lectura de la polimerasa puede producir alteraciones en el número de bases en repeticiones de mononucleótidos y por lo tanto generar inserciones o deleciones de unas pocas bases, es decir, generar inestabilidad de microsatélites como la descrita en el capítulo uno de la tesis. El *slippage* puede producir también la alteración en el número de repeticiones directas en una región de repeticiones en tándem como consecuencia de apareamientos erróneos de las cadenas de ADN durante la replicación y puede constituir una causa de producción tanto de inserciones como de deleciones de fragmentos de ADN de tamaño superior al que produce la inestabilidad de microsatélites de mononucleótidos (Lovett, 2004; Fig. 3.14).

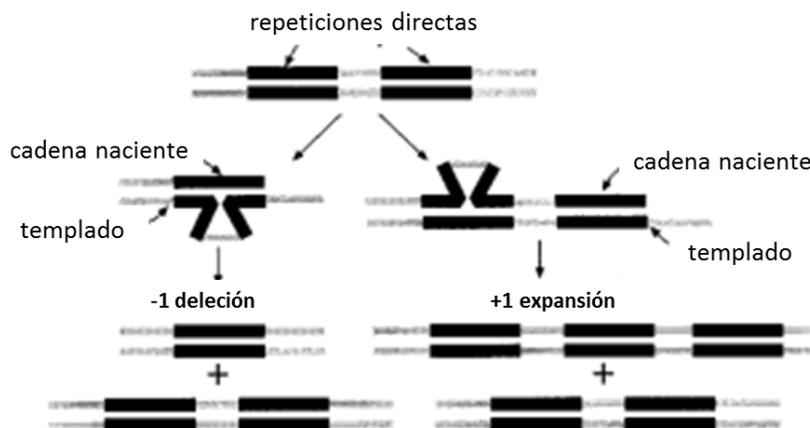


Fig. 3.14. Alineamientos erróneos durante la replicación del ADN o *slippage* como causa de inserciones y deleciones. Las líneas gruesas representan las repeticiones directas. Tomado y adaptado de Bzymek y Lovett, 2001.

El *slippage* en bacterias produce re-arreglos entre secuencias cortas e idénticas ubicadas a distancias cortas en una misma molécula de ADN (Bzymek y Lovett, 2001). Se demostró en *E. coli* que existe una disminución exponencial en la tasa de deleción en función de la distancia entre las secuencias repetidas (Lovett et al., 1994; Chedin et al., 1994). También se determinó en *E. coli* que el *mismatch repair* evita que se produzcan deleciones por *slippage* entre repeticiones divergentes que no poseen secuencias idénticas debido a su capacidad de detectar las bases mal apareadas en el heteroduplexo formado por el apareamiento de las repeticiones divergentes e iniciar el proceso

de reparación de ADN (Lovett y Feschenco, 1996). El *slippage* se ha observado también en regiones del plasmoma con repeticiones en tándem (microsatélites) y se cree responsable del aumento o la disminución en el número de esas repeticiones (Wolfson et al., 1991; Massouh et al., 2016).

Por otra parte, también se ha postulado a la recombinación entre repeticiones directas como un mecanismo de producción de inserciones y deleciones (Ogihara et al., 1988). Es probable que tanto la longitud de la repetición como la distancia a la que se encuentran ambas repeticiones influyan en la frecuencia de la recombinación. Las diferencias de secuencia entre las repeticiones también afectarían las tasas de recombinación (Fischer et al., 1996). Por ejemplo, en *E. coli* una reducción del 10% en la identidad de secuencia de las repeticiones reduce 40 veces la frecuencia de la recombinación (Shen y Huang, 1986). Al igual que como ocurre con los indels por *slippage* entre repeticiones divergentes, el sistema de *mismatch repair* evita la producción de indels por recombinación entre repeticiones divergentes. En este caso mediante la actividad de antirecombinación, actuaría detectando las bases mal apareadas en el heteroduplexo formado por las repeticiones divergentes e inhibiendo esta recombinación (Bzymek y Lovett, 2001; Surtees et al., 2004).

Si bien no se ha realizado hasta el momento ningún estudio que analice todas las variables antes mencionadas al mismo tiempo, la transformación de los plasmomas permite estudiar las longitudes necesarias para que se produzca recombinación entre fragmentos de ADN con secuencias similares. La integración de transgenes en el plasmoma se realiza mediante recombinación homóloga entre secuencias del vector de transformación y secuencias del plasmoma. Secuencias con longitudes de 400 - 500 pb parecen ser suficientes para tener transformación de plasmomas a una frecuencia razonable en el caso de las plantas (Bock, 2001; Bock, 2015) y secuencias de 50 pb permiten la transformación del plasmoma en el caso de las algas (Dauvillee et al., 2004). Mediante la transformación del plasmoma de tabaco también ha sido posible estimar las longitudes mínimas necesarias para la existencia de recombinación entre repeticiones directas presentes en el cassette de transformación. A través de estos estudios se ha reportado la escisión espontánea de una secuencia de 868 pb mediante una aparente recombinación entre repeticiones directas divergentes de 16 pb (Staub y Maliga, 1994). Por otro lado, en otro trabajo en donde se analizó una región invertida en el ADN plasmídico del arroz respecto del plasmoma de *N. tabacum*, se planteó la existencia de eventos de recombinación entre secuencias tan cortas como 16 pb de longitud (Hiratsuka et al., 1989). Estos resultados sugieren que en algunas ocasiones, secuencias plasmídicas menores a 20 pb pueden actuar como sustratos efectivos para la recombinación.

Todas las deleciones grandes se ubicaron en la LSC y en todos los casos una de las repeticiones directas se conservó mientras que la otra se eliminó junto con la porción delecionada. Esto podría ser fácilmente explicado mediante la existencia de recombinación entre las repeticiones directas. Se ha reportado que esta recombinación produciría la pérdida del fragmento de ADN contenido entre ambas repeticiones incluyendo la pérdida de solo una de las repeticiones (Ogihara et al., 1988, Ogihara et al., 1991; Ogihara y Osawa, 2002). La única inserción grande detectada mediante el cpTILLING correspondió a una duplicación ubicada en las IRs y en donde también se

identificaron repeticiones directas. Este hecho coincide con la postulación de la recombinación entre repeticiones directas como una causa de producción de inserciones en el plastoma (Ogihara et al., 1988). Las repeticiones directas indicarían que los indels grandes identificados podrían en principio producirse tanto por el mecanismo de *slippage* durante la replicación del ADN del plastoma, como por la recombinación entre las repeticiones directas. El mecanismo de *slippage* fue observado en regiones del plastoma con repeticiones en tándem (microsatélites) y los indels producidos modificaron el número de esas repeticiones (Stoike y Sears, 1998). En el caso de la mutante *cpm*, las repeticiones directas no se ubicaron en regiones del plastoma con estas características. En función de esta observación, se postula a la recombinación como el mecanismo responsable de la producción de los indels grandes identificados en el plastoma *cpm*. Además, esto concuerda con la existencia de recombinación alterada mencionada anteriormente. Esta recombinación alterada produciría un incremento de la recombinación ilegítima entre segmentos cortos de ADN del plastoma con secuencias iguales o divergentes, tal como son las repeticiones directas presentes en los indels grandes identificados.

Es interesante mencionar que en un estudio sobre mutaciones que modifican la longitud de secuencias del plastoma en los generos *Triticum* y *Aegilops* (Ogihara y Ohsawa, 2002) se determinó la existencia de inserciones y deleciones. En este estudio se postuló al *slippage* como la causa de las duplicaciones que dieron origen a las inserciones y a la recombinación ilegítima entre las repeticiones directas ubicadas en los extremos de las deleciones como las causa de las mismas (fig. 3.15).

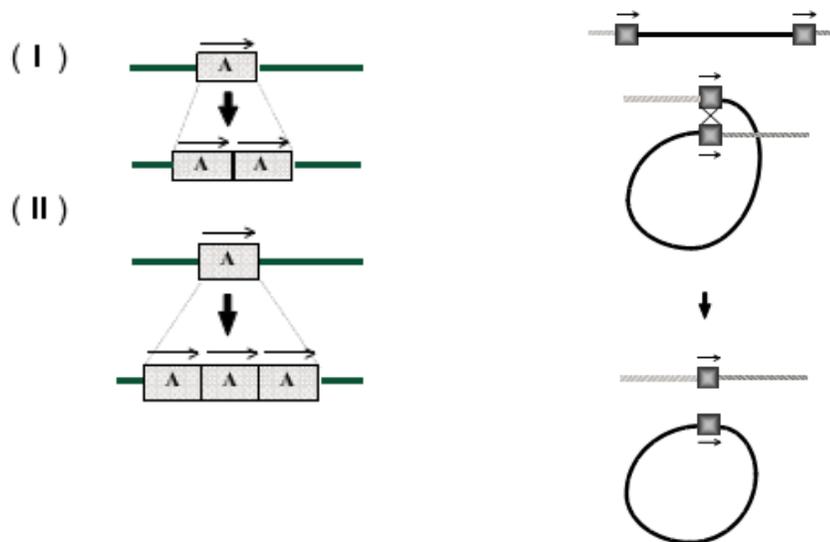


Fig. 3.15. Producción de inserciones y deleciones en regiones con repeticiones directas. Izquierda: representación esquemática de eventos de duplicación (I) y triplicación (II) de la secuencia A debido al *slippage* de la ADN polimerasa. Derecha: representación esquemática de la producción de una deleción debido a recombinación ilegítima entre repeticiones directas (cajas con flechas indicando el sentido de las repeticiones). Tomado de Ogihara y Ohsawa, 2002.

Por otro lado, se postuló al *slippage* como el mecanismo responsable de los indels identificados en las mutantes de *Oenothera*, tanto las obtenidas espontáneamente (Massouh et al., 2016) como las inducidas por el genotipo mutador de los cloroplastos identificado en esa especie (Stoike y Sears, 1998). Es importante destacar que en la mutante *msh1* de *A. thaliana*, también se identificaron arreglos de *loci* del cloroplasto que contienen numerosas repeticiones cortas de 10 – 15 bp (Xu et al., 2011). Esta mutante tiene afectado un gen del sistema de *mismatch repair* cuya proteína se encuentra en el nucleóide del cloroplasto y afectaría al plastoma mediante la recombinación ilegítima entre repeticiones cortas, tal como se propone estaría ocurriendo en *cpm*.

En relación a la postulación de repeticiones directas del plastoma como sitios de producción de deleciones, es importante mencionar que las repeticiones presentes en las regiones *trnfM* y *rpoC2* tienen una identidad del 100%, un tamaño superior a 16 pb y están separadas por una distancia que fue inferior a los 620 pb, valor que corresponde a la distancia entre las repeticiones identificadas en la deleción en el gen *psbA*. Todas estas características coinciden con las que presentaron las repeticiones directas entre las que se observó recombinación ilegítima según la bibliografía y sin embargo, no se detectaron deleciones grandes en estas regiones en las 184 plántulas *cpm* analizadas. Por otro lado, la detección de una sustitución en cada una de estas dos regiones confirmó la acción inductora de cambios puntuales en el plastoma por parte del gen mutador *cpm*, tal como se informó anteriormente en el capítulo uno de la tesis.

El control de la recombinación entre segmentos de microhomología como lo son las repeticiones de longitudes cortas, el tipo de repetición más abundante en el plastoma, es fundamental para el mantenimiento de la integridad del genoma del cloroplasto. Las principales perturbaciones que afectan la estabilidad del plastoma surgen como consecuencia de eventos de recombinación ilegítima entre secuencias cortas o repeticiones de microhomología (Marechal y Brisson, 2010). Estos eventos son raros y se pueden detectar solo en una escala de tiempos evolutivos (Marechal y Brisson, 2010), hecho que indica la existencia de mecanismos eficientes de control de este tipo de recombinación. En este sentido, se postula que la recombinación ilegítima entre las repeticiones directas que originaría los indels grandes sería consecuencia de la falta de actividad de antirecombinación del gen afectado en *cpm*. Como se señaló anteriormente, esta actividad de antirecombinación ha sido atribuida a las proteínas del sistema de reparación de *mismatch repair*. De este modo, estos indels constituyen otra evidencia de la recombinación alterada en *cpm* en concordancia con lo concluido en el capítulo dos en base a los polimorfismos observados en el gen y en el pseudogen *rpl23*.

## Desaparición de los heteroduplexos durante las digestiones con CJE

La observación de una banda de tamaño superior al tamaño del amplicón en la corrida electroforética de los cuatro amplicones con indels grandes cuando no se digirió con CJE y el hecho de que esta banda desapareció completamente ante la digestión en tres de estos casos, lleva a la idea de que esta banda correspondería al heteroduplexo compuesto por una cadena de ADN portadora del indel y la otra sin el indel. Esto indica que la banda correspondiente al heteroduplexo se pudo distinguir en el gel como una banda de diferente tamaño a la que corresponde a los homoduplexos con y sin el indel. Esto podría deberse a una cuestión de conformación diferencial del heteroduplexo respecto de los homoduplexos. Es probable que se genere una estructura secundaria en esta molécula de ADN con alguna estructura de horquilla que le dificultaría la movilidad en el gel y que haría que se desplace más lento que los homoduplexos que no poseen esta estructura secundaria.

## Efectos de las deleciones grandes presentes en los genes *psbA* y *rps3*

La deleción de 620 pb presente en el gen *psbA* en homoplasma produjo la ausencia de las dos proteínas del core del PSII, lo que provocaría la falta de un PSII funcional y la incapacidad de la plántula mutante de realizar fotosíntesis activa. Por otro lado, la identificación de un codón *stop* prematuro en el gen *psbC* en otra plántula *viridis* que se deterioró hasta su muerte de la misma manera que la mutante con deleción en el gen *psbA*, constituye otra evidencia de la ausencia de un PSII funcional en estas mutantes.

El ensamble de las subunidades proteicas que componen el PSII se estudió en la cianobacteria *Synechocystis sp.* (Nickelsen y Rengstl, 2013). Estos estudios demostraron que para que la proteína D1 se pueda integrar como componente del fotosistema, se debe haber ensamblado previamente en la membrana la proteína D2. Esto permite luego la incorporación de las proteínas de la antena intrínseca CP47 y CP43 y finalmente la asociación de la antena extrínseca da lugar al PSII. El orden de ensamble de los componentes del PSII en cloroplastos es el mismo que en cianobacterias (Aro et al., 2005). Por otra parte, existe un mecanismo de regulación de la traducción de las proteínas que forman parte de un mismo complejo proteico denominado CES en los cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* (Choquet y Wollman, 2002). En función de este mecanismo, se sabe que la falta de expresión de D1 provoca una síntesis reducida de CP47 y de PsbH pero no de D2 (Bennoun et al., 1986; Jensen et al., 1986; de Vitry et al., 1989), y que la falta de D2 provoca una síntesis reducida de D1, CP47 y PsbH (Bennoun et al., 1986; Erickson et al., 1986). Aunque no está claro si el mecanismo CES existe en los cloroplastos de las plantas, se demostró que en el caso de la mutante de cebada *Vir<sup>115</sup>*, en la cual la expresión de D1 estaría impedida, la expresión de CP47 está reducida (Gamble y Mullet, 1989; Kim et al., 1994). En el caso de la mutante con deleción en el gen *psbA* en homoplasma, la falta de D1 provocaría la ausencia de D2, resultado que no coincide con lo observado para el mecanismo CES en *C. reinhardtii*.

La delección de 45 pb en el gen *rps3* no resultó letal para la plántula que la portaba. Sin embargo, sería interesante realizar el análisis de la traducción a nivel de los cloroplastos para confirmar la neutralidad del cambio. A diferencia de las delecciones que fueron detectadas en los genes *psbA* y *rpl23*, la delección en el gen *rps3* no genera un corrimiento del marco de lectura sino que se elimina un dominio de 15 aminoácidos en la proteína RpS3. La ausencia de un dominio sin relevancia en la funcionalidad de la proteína podría explicar el hecho de que la delección no resulte letal para la plántula y que su fenotipo sea similar al normal. En este sentido, la ausencia de este mismo dominio en la versión normal de la proteína RpS3 codificada en los cloroplastos de varias especies dentro de las gramíneas, como maíz y sorgo, es un claro indicio de que el mismo no es indispensable para la correcta funcionalidad de la proteína ribosomal RpS3. Este hecho permitiría plantear la hipótesis de que originalmente en el antepasado del maíz, esta proteína poseía este dominio y que luego en algún momento de la historia evolutiva del mismo, se pudo haber perdido por algún mecanismo similar al producido por el *cpm* en la mutante portadora de la delección de 45 pb en el gen *rps3* de cebada.

## CONCLUSIONES

El cpTILLING permitió identificar inserciones y deleciones grandes de tamaños variables, superiores a una o dos pb, ubicadas tanto en la LSC como en las IRs.

CJE es capaz de detectar y digerir los heteroduplexos originados por indels de tamaño tan grande como 620 pb.

La presencia de repeticiones directas en los indels grandes identificados y el hecho de que estos indels no se ubicaron en regiones del plastoma con repeticiones en tándem, sugiere que estos indels se produjeron por recombinación ilegítima entre las repeticiones directas.

La deleción de 45 pb en el gen *rps3* elimina un dominio en la proteína RpS3 de cebada que no sería relevante para el normal funcionamiento de dicha proteína.

La deleción de 620 pb en el gen *psbA* provocaría la ausencia de un PSII funcional.

El mecanismo de producción de indels grandes mediante recombinación de repeticiones directas constituye otra evidencia de la existencia de recombinación alterada en *cpm*.

La recombinación ilegítima entre las repeticiones directas que produjeron los indels, sugiere fallas en la función de antirecombinación de una proteína involucrada en el mecanismo de reparación del ADN de *mismatch repair* direccionada al cloroplasto.

# **DISCUSIÓN GENERAL**

## **Postulación de fallas en el sistema de reparación de ADN del tipo *mismatch repair* como la causa de los cambios moleculares identificados en el plastoma de las plántulas *cpm***

La conservación de la integridad de los genomas depende de la existencia de sistemas de reparación del ADN. Estos sistemas están presentes en todos los organismos y se estudiaron tanto en procariotas como en eucariotas. El estudio en organismos con células eucariotas se centró en los sistemas que mantienen la integridad del ADN nuclear y por este motivo poco se conoce sobre los sistemas de reparación del ADN responsables de la conservación de los genomas de las organelas.

El mecanismo BER (*base excision repair*) es el más estudiado a nivel de las organelas. Se comprobó su existencia tanto en mitocondrias como en cloroplastos. Este mecanismo se encarga de la eliminación de las bases alteradas en los nucleótidos a través de las glicosilasas. Se identificaron varias glicosilasas distintas, cada una responsable de la reparación de un tipo de alteración diferente de las bases (Boesch et al., 2011). En este sentido, este sistema de reparación tiene una alta especificidad y la alteración de cada glicosidasa produciría una sustitución de bases particular. Por este motivo, se cree que la alteración en BER no explicaría el conjunto de los cambios puntuales identificados en el plastoma *cpm*, ni tampoco los casos de recombinación identificados. Por otro lado, en relación a otros sistemas de reparación es bueno aclarar que no se ha podido comprobar la existencia en los cloroplastos del mecanismo NER (*nucleotide excision repair*), ni del mecanismo NHEJ (*non-homologous end joining*) de reparación de las ruptura de doble cadena del ADN (Boesch et al., 2011; Ruhlman y Jansen, 2014).

Según el estudio de los sistemas de reparación del ADN en procariotas y del ADN nuclear en eucariotas se sabe que las ADN polimerasas pueden introducir nucleótidos incorrectos en la cadena de ADN que se está sintetizando durante la replicación del ADN. Esto origina el apareamiento erróneo de bases que no son complementarias (*mismatches*), que normalmente se corrige por la actividad de *proofreading* exonucleasa de la ADN polimerasa. Las fallas en esta actividad exonucleasa llevarían a la producción de mutaciones. Existen diversos sistemas de reparación del ADN que permiten corregir los errores cometidos por la ADN polimerasa y mantener tanto la integridad de los genomas como la fidelidad de la transmisión del material genético entre generaciones. Por el contrario, el funcionamiento inadecuado de los sistemas de reparación del ADN produce inestabilidad del genoma y la aparición de mutaciones. En el caso específico del apareamiento de bases que no son complementarias, la ausencia del sistema apropiado de corrección puede llevar a la producción de sustituciones. El sistema de *mismatch repair*, es el encargado de la identificación de los *mismatches* presentes en los heteroduplexos de ADN y de su corrección mediante la re-síntesis del ADN. El sistema de *mismatch repair* también reconoce y corrige las bases que no se encuentran apareadas tanto en la cadena que actúa como molde como en la cadena de ADN que se está sintetizando durante la replicación del ADN. Estas bases no apareadas se pueden producir por el apareamiento incorrecto de secuencias repetidas como las repeticiones de mononucleótidos debido a un deslizamiento de la lectura o *slippage* cometido por la ADN polimerasa. La falta de corrección de estas bases no apareadas genera inserciones y deleciones de unas pocas bases. Por otro lado, el *slippage* también puede ocurrir en

regiones del ADN con secuencias repetidas en tándem. En este caso se puede producir la variación en el número de esas repeticiones, asociado a inserciones y deleciones de las porciones comprendidas entre las repeticiones. El sistema de *mismatch repair* puede evitar la producción de estos indels cuando las repeticiones involucradas son divergentes, es decir, no tiene identidad de secuencia del 100%.

Se estima que en *E. coli* el sistema de *mismatch repair* reduce los errores de la replicación del ADN entre 100 a 1000 veces, manteniendo las tasas de mutación a un nivel de un error por cada  $10^{10}$  nucleótidos incorporados (Schofield et al., 2003; Iyer et al., 2006). En la figura DG.1 se esquematiza el mecanismo propuesto en *E. coli* mediante el cual, el sistema de *mismatch repair* evita la producción de indels por *slippage* en regiones con repeticiones en tándem que son divergentes.

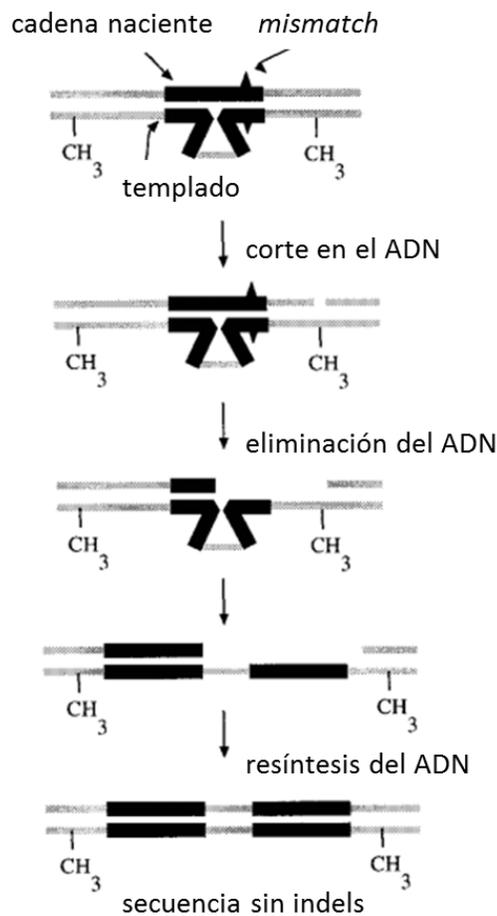


Figura DG.1. El sistema de *mismatch repair* evita la producción de indels por *slippage* entre repeticiones divergentes en tándem en *E. coli*. Las líneas gruesas representan las repeticiones en tándem que poseen un *mismatch* entre ellas. La metilación del ADN permite la identificación de la cadena de ADN que se está sintetizando. La proteína MutH realiza el corte en la cadena de ADN que posee la base incorrecta y de esta manera se inicia el proceso de reparación del ADN que evita la producción de una deleción en la cadena naciente. Tomado y adaptado de Bzymek y Lovett, 2001.

Por otro lado, debido a su capacidad de identificación de los *mismatches* presentes en los heteroduplexos de ADN, el sistema de *mismatch repair* también regula al proceso de recombinación. Se ha demostrado en levaduras que la existencia de un solo *mismatch* es suficiente para que el sistema de *mismatch repair* inhiba la recombinación, observándose un efecto acumulativo negativo de la presencia de más *mismatches* sobre las tasas de recombinación (Chen y Jinks-Robertson, 1998). Este sistema reconoce a los intermediarios con *mismatches* que se generan por la recombinación entre segmentos de ADN con secuencias divergentes e inhibe el proceso de recombinación entre este tipo de secuencias (Rayssiguier et al., 1989; Hunter et al., 1996; Surtees et al., 2004). Los intermediarios con *mismatches* se originan durante el proceso de apareamiento y migración de las cadenas de ADN que recombinan (figura DG.2). Una vez que los *mismatches* son reconocidos, el sistema de *mismatch repair* puede tanto inhibir el proceso de recombinación como reparar los *mismatches* presentes en los intermediarios. Este sistema de reparación tiene entonces un efecto de antirecombinación y de esta manera, la recombinación entre fragmentos de ADN que no poseen identidad de secuencia se mantiene controlada para evitar la inestabilidad que podría generar este tipo de recombinación ilegítima.

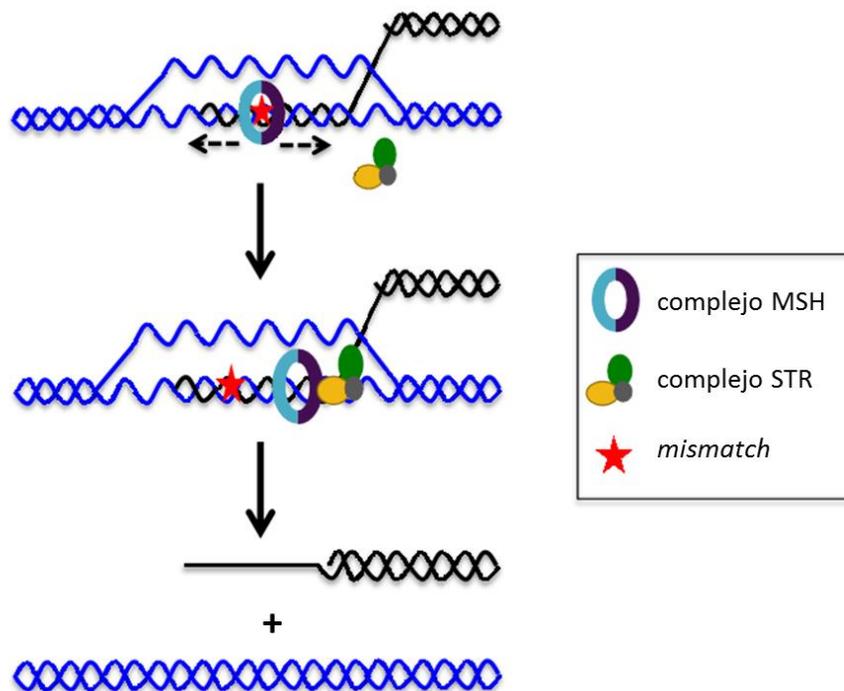


Fig. DG.2. Antirecombinación del sistema de *mismatch repair*. Las proteínas MSH identifican el *mismatch* en el heteroduplexo intermediario formado por el apareamiento de las secuencias divergentes. Estas proteínas luego reclutan el complejo STR compuesto por la helicasa Sgs1 y las topoisomerasas Top3 y Rmi1, para iniciar el desenrollamiento del heteroduplexo e inhibir la recombinación. Tomado y adaptado de Chakraborty y Alani, 2016.

Estudios en levaduras demostraron que la recombinación entre secuencias con menos del 10% de variación aumentó hasta 70 veces luego de la inactivación del sistema de *mismatch repair* (Datta et al., 1996). La supresión de la recombinación entre secuencias divergentes por parte del sistema de *mismatch repair* también se demostró en eucariotas superiores como plantas y animales (Trouiller et al., 2006). La pérdida de la actividad del sistema de *mismatch repair* en *A. thaliana* produjo un aumento de dos a nueve veces de la recombinación entre fragmentos divergentes en el núcleo, demostrando que el sistema de *mismatch repair* reduce la frecuencia de recombinación de secuencias divergentes en plantas (Li et al., 2006).

Los procesos de replicación, recombinación y reparación están íntimamente relacionados y los tres procesos actúan de manera conjunta para la conservación de la información genética y el mantenimiento de la estabilidad de los genomas (Singh et al., 2010; Marechal y Brisson, 2010).

En eucariotas el sistema de *mismatch repair* depende de los genes *MSH* (*MUTS Homologue*) y *MLH* (*MUTL Homologue*) que son ortólogos de *MUTS* y *MUTL* de *E. coli*, respectivamente. Los polipéptidos MSH y MLH forman complejos diméricos que actúan de forma conjunta para unir los heteroduplexos de ADN con *mismatches* e iniciar el proceso de reparación. La mayoría de los eucariotas tienen genes que codifican seis proteínas MSH, aunque se identificó una séptima (MSH7) en plantas (Culligan y Hays, 2000). Se demostró que todas las proteínas MSH, a excepción de la MSH1, actúan en la reparación y/o en la recombinación del ADN durante la meiosis (Sia y Kirkpatrick, 2005), en donde cada proteína tiene un rol específico y en ciertas ocasiones estos roles se solapan. Se reportó que el heterodímero MSH4–MSH5 está únicamente involucrado en la recombinación meiótica (Novak et al., 2001), mientras que los otros tres heterodímeros que actúan sobre el genoma del núcleo están involucrados tanto en recombinación como en *mismatch repair*. Estudios de asociación de los heterodímeros MSH a segmentos de ADN con *mismatches* revelaron que el heterodímero MSH2–MSH3 (MUTS $\beta$ ) se asocia a horquillas originadas por inserciones y deleciones, el heterodímero MSH2–MSH6 (MUTS $\alpha$ ) se asocia a bases mal apareadas y pequeñas horquillas originadas por inserciones y deleciones (Acharya et al., 1996; Marsischky et al., 1996), mientras que el heterodímero MSH2–MSH7 (MUTS $\gamma$ ) se asocia a bases mal apareadas pero no a horquillas originadas por inserciones y deleciones (Wu et al., 2003). El estudio de la mutante por inserción de T-DNA en el gen *MSH2* de *A. thaliana* (Hoffman et al., 2004) indicó la presencia de altos niveles de mutaciones en el genoma nuclear y reducida fertilidad. Por otro lado, el homodímero formado por MSH1 actúa sobre los genomas de las mitocondrias y de los cloroplastos, aunque el detalle molecular de sus funciones aún no está del todo claro. Los dímeros MSH luego reclutan a los heterodímeros formados por las proteínas MLH asociadas con las proteínas PMS para iniciar la reparación del ADN. Se reportó que una mutante de *A. thaliana* del gen *MLH1* tiene afectada la recombinación mitótica, ya que se detectó un aumento en la recombinación entre segmentos divergentes (Dion et al., 2007). Además, esta mutante presentó defectos reproductivos observándose una disminución de la fertilidad, un defecto que también se reportó en algunos casos de mutantes de genes *MSH* que afectan la recombinación meiótica (Hoffman et al., 2004; Lloyd et al., 2007).

En la figura DG.3 se resumen las etapas involucradas en el sistema de reparación del ADN de *mismatch repair* y los principales genes que actúan en cada etapa tanto en procariontas como en eucariotas.

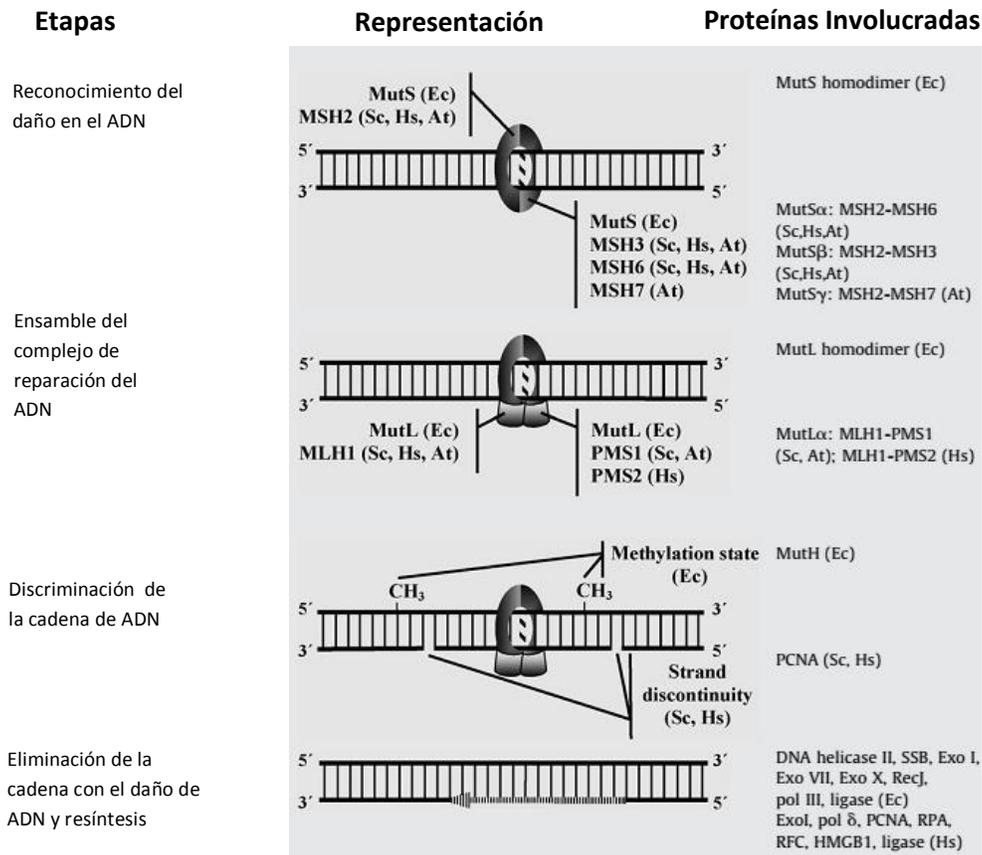


Figura DG.3. Esquema de las etapas involucradas en el sistema de reparación del ADN de *mismatch repair* en organismos procariontas y en organismos eucariotas. Los dímeros MutS, MSH2-MSH6, MSH2-MSH3 y MSH2-MSH7 reconocen los *mismatches* y las horquillas originadas por inserciones y deleciones, cada dímero lo hace con una especificidad determinada. Los dímeros MutL, MLH1-PMS1 y MLH1-PMS2 se asocian a los dímeros MSH y al ADN e inician el proceso de reparación. MutH y PCNA reconocen la cadena molde del ADN y la cadena que está siendo sintetizada. ADN Helicasa II, SSB, Exo I, Exo VI, Exo X, RecJ, pol III, ligasa, ExoI, PCNA, RPA, RFC, HMGB1 están involucrados en la eliminación de la porción de ADN que contiene el *mismatch* y/o la horquilla originada por los indels, la resíntesis y la ligación del ADN. Ec: *E. Coli*, Sc: *S. cerevisiae*, Hs: *H. sapiens* y At: *A. thaliana*. Tomado y adaptado de Spampinato et al., 2009.

La estabilidad de los genomas de las organelas se ha atribuido también a otros genes que no pertenecen al sistema de *mismatch repair*, como por ejemplo, los genes *WHY1* y *cpRECA*. Las proteínas codificadas por estos genes participan en la regulación de la recombinación ilegítima entre repeticiones cortas (secuencias idénticas o divergentes) o segmentos de microhomología del plastoma (Maréchal y Brisson, 2009).

*CpRECA* o *RECA1* es el ortólogo en eucariotas del gen *RECA* que codifica la recombinasa RECA que actúa sobre el plastoma. Estas proteínas aseguran el apareamiento de regiones del ADN que poseen una alta identidad de secuencia y luego promueven la invasión y la migración de las cadenas del ADN durante el proceso de recombinación. De esta manera, estas proteínas son cruciales para la reparación del ADN dependiente de homología (entre secuencias con alta identidad) y tienen roles importantes en la prevención de la recombinación entre secuencias repetidas cortas (Cox et al., 2000). Mutaciones en el gen *RECA3* de *A. thaliana* que codifica la proteína direccionada a la mitocondria produce re-arreglos en el condrioma por recombinación entre secuencias repetidas de tamaño mayor a 150 pb. De todas formas, no se puede descartar la existencia de recombinación entre repeticiones de menor tamaño, ya que no se ha estudiado en esta mutante la recombinación entre repeticiones de tamaño inferior a 150 pb. Las características de la recombinación del condrioma de mutantes en el gen *RECA3* son diferentes de las observadas en las mutantes *msh1* de *A. thaliana*. De hecho, las repeticiones afectadas parecen ser un subgrupo de aquellas afectadas en las mutantes *msh1* (Shedge et al., 2007; Arrieta-Montiel et al., 2009). Líneas mutantes homocigotas de *A. thaliana* con inserción de T-DNA en el gen *cpRECA* tuvieron plantas variegadas a una frecuencia de 1,1% a 4,2% a partir de la cuarta generación. Estas mutantes tuvieron sus moléculas de ADN plastídico con estructuras alteradas junto con una cantidad inferior de ADN plastídico que el control (Rowan et al., 2010). No se analizó aún en estas mutantes la existencia de cambios moleculares en la secuencia del ADN del plastoma.

El gen *WHY1* de *A. thaliana* codifica junto con el gen *WHY3*, las proteínas WHY (whirly) direccionadas al cloroplasto. Estas proteínas se unen al ADN simple cadena y se propuso que contribuyen a mantener la estabilidad del plastoma evitando la producción de eventos de recombinación ilegítima (Maréchal et al., 2009). Mutantes dobles y simples en los genes *WHY1* y *WHY3* de *A. thaliana* inducen diferentes tipos de variegación en el 4.6% de la progenie. Este fenotipo variegado es el resultado de la inestabilidad incrementada del genoma plastídico. Los plastomas acumulan deleciones, duplicaciones y/o eventos de circularización que son producto de eventos de recombinación ilegítima entre repeticiones directas cortas (10-18 pb), es decir, segmentos que poseen microhomologías. Las líneas mutantes en solo uno de los dos genes *WHY* presentaron re-arreglos en menor frecuencia que las mutantes dobles. Estos re-arreglos en el plastoma se observaron también en mutantes *why* de maíz (Maréchal et al., 2009).

Fallas en el funcionamiento de las proteínas que derivan de los genes *WHY1-3* y *cpRECA* no permiten explicar la producción de sustituciones como si lo hacen las fallas en el sistema de *mismatch repair*. En función de lo expuesto anteriormente, se deduce que mutaciones en estos genes explicarían únicamente los re-arreglos en regiones del plastoma con repeticiones cortas por recombinación ilegítima entre esas repeticiones. Por este motivo, no se considera a los genes

*WHY1* y *cpRECA* como candidatos a producir el espectro de los cambios moleculares que se identificaron en *cpm*. Además, la proteína direccionada al cloroplasto que se encuentra codificada por el gen *WHY1* de cebada, también tiene localización en el núcleo. Por lo cual, se podría especular que fallas en el funcionamiento de esta proteína también podrían originar inestabilidad en el genoma nuclear. De todas formas, no se puede descartar que la interacción de las proteínas del *mismatch repair* con las proteínas *WHY1* y *cpRECA* que evitan la recombinación entre repeticiones cortas, también sea una forma indirecta mediante la cual las proteínas del *mismatch repair* regulan este tipo de recombinación ilegítima. En relación a esto, es importante mencionar que ensayos *in vitro* demostraron que la actividad de antirecombinación del gen *MUTS* del *mismatch repair* de *E. coli* es el resultado de la inhibición de la actividad de la proteína RECA durante la recombinación. *MUTS* inhibe la invasión mediada por RECA, de la doble cadena de ADN con que se forma el heteroduplexo durante la recombinación (Worth et al., 1994; Calmann y Marinus, 2004). La interacción entre *MSH1* y RECA para mantener la integridad de los genomas de las organelas también se determinó en el musgo *Physcomitrella patens* (Odahara et al., 2017).

Los cambios moleculares que se identificaron en los plastomas de las plántulas *cpm* descritos en esta tesis, serían evidencias de fallas en la corrección de los *mismatches* que se producen durante la replicación del ADN: las sustituciones y los indels localizados en microsatélites (repeticiones de mononucleótidos) y de fallas en el control de la recombinación: los polimorfismos en el gen y en el pseudogen *rpl23* y los casos de indels grandes. Como se dijo anteriormente, el sistema de reparación que se encarga de la corrección de este tipo de cambios moleculares en el genoma de los procariotas y en el genoma nuclear de organismos eucariotas es el sistema de *mismatch repair* y por este motivo se postula que en las plántulas *cpm* se encontraría afectado algún gen nuclear perteneciente a este sistema, cuya proteína esta direccionada al plástido y actúa sobre el plastoma. Es necesario el análisis del genoma de las mitocondrias para descartar la posibilidad de que la proteína CPM también produzca inestabilidad en este genoma.

Cabe destacar que esta sería la primera vez que se exponen evidencias de posibles fallas en el sistema de *mismatch repair* del plastoma, ya que la mayor parte de la bibliografía que existe sobre este sistema de reparación reporta sobre las consecuencias del mal funcionamiento en el genoma nuclear en el caso de los organismos eucariotas. Además, es la primera vez que en una línea mutante se identifican múltiples evidencias que señalan al mal funcionamiento del *mismatch repair* de plastomas. Si bien se han identificado cambios moleculares en el plastoma de otras dos líneas mutantes que también podrían producirse por fallas en este sistema de reparación del ADN, estos cambios corresponden solamente a una fracción de los cambios identificados en *cpm*. Estas dos mutantes corresponden al mutador de *Oenothera* y a la mutante en el gen *MSH1* de *A. thaliana* y son los dos casos en donde se logró comprobar que el mal funcionamiento de una proteína codificada por un gen nuclear afecta directamente la integridad de los genomas de las organelas. Solamente se conoce el gen nuclear afectado en el caso de la mutante de *A. thaliana*, el cual pertenece al sistema de reparación de *mismatch repair*. Es importante señalar que la mutante *cpm* es la primera mutante descrita en monotiledóneas generadora de un amplio espectro de plantas clorofílicas y que además corresponde a una planta cultivada.

En el mutador de *Oenothera* se identificaron inserciones y deleciones en cinco regiones del plastoma mediante RFLP y southern blot (Chiu et al., 1990). Luego se identificaron inserciones de una base en dos repeticiones de mononucleótidos ubicadas en regiones intergénicas y también una inserción de 4 pb y una sustitución en el gen *psbB* mediante SSCP (Chang et al., 1996). Los cambios moleculares mayoritarios identificados en *Oenothera* correspondieron a indels entre repeticiones directas en regiones del plastoma que contienen repeticiones en tándem (microsatélites) (Stoike y Sears, 1998). Se debe remarcar que el análisis de estos indels, se realizó específicamente en una región del plastoma en donde existe este tipo de repeticiones en tándem (la región entre el gen *16s rRNA* y el gen *trnI*). Los autores atribuyeron estos indels al *slippage* de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN y postularon que la producción de indels se debería a la ausencia en la mutante de alguna proteína que altera la topología del ADN del plastoma, como una topoisomerasa o una helicasa. Las repeticiones directas presentes en los indels identificados en esta mutante tuvieron longitudes de entre 6 pb y 23 pb, y fueron tanto idénticas (100% de identidad) como divergentes (74% de identidad). Los indels tuvieron tamaños de entre 180 y 600 pb. La presencia de repeticiones divergentes junto con la identificación de algunas mutaciones puntuales, permite especular con la posibilidad de fallas en el sistema de *mismatch repair* y que la causa de los indels en esta mutante de *Oenothera* también pueda ser la recombinación ilegítima entre las repeticiones por el mal funcionamiento de este sistema de reparación, tal como ocurriría en *cpm*. De todas formas, la existencia de fallas en el *mismatch repair* también explicaría la producción de indels por *slippage* de la polimerasa entre repeticiones divergentes, tal como proponen los autores.

Por otro lado, la mutante *msh1* de *A. thaliana* fue identificada como un mutador de cloroplastos (*chm*) debido a la producción de plantas variegadas (Redei, 1973), pero se demostró que las mutantes producidas por *chm* tenían re-arreglos en el ADN mitocondrial (Martínez-Zapater et al., 1992; Sakamoto et al., 1996; Abdelnoor et al., 2003). La proteína MSH1 se localiza en los nucleoides de los cloroplastos y las mitocondrias de *A. thaliana*, y se demostró luego que *msh1* induce una baja frecuencia de re-arreglos en el ADN de los cloroplastos (Xu et al., 2011). La mutante *msh1* de *A. thaliana* obtenida mediante un tratamiento con EMS, induce en la mitocondria la recombinación entre repeticiones de 50–556 pb con una identidad de secuencia tan baja como el 85%. Esta recombinación está a veces asociada con re-arreglos genómicos (Davila et al., 2011), produciendo cambios rápidos y dramáticos en el número relativo de copias de porciones del genoma mitocondrial (Abdelnoor et al., 2003; Maréchal y Brisson, 2010). La mutación en *MSH1* de *A. thaliana* también produce re-arreglos en un *loci* del cloroplasto que contiene numerosas repeticiones idénticas y divergentes de 10 – 15 pb (Xu et al., 2011), aunque el detalle molecular del re-arreglo del ADN aún no se determinó debido a que estos re-arreglos se detectaron mediante southern blot. Por lo tanto, el rol de MSH1 en el mantenimiento de la integridad del genoma del cloroplasto se conoce poco. Debido a que las plantas *msh1* no acumulan mutaciones puntuales en el genoma mitocondrial, la proteína MSH1 de *A. thaliana* parecería estar mas especializada en la regulación de la recombinación que en el *mismatch repair* en la mitocondria (Abdelnoor et al., 2003). En coincidencia con lo observado en *A. thaliana*, la disminución en la expresión de *MSH1* en tomate y tabaco desestabilizó el genoma mitocondrial

(Sandhu et al., 2007). El direccionamiento dual a mitocondrias y cloroplastos de la proteína MSH1 observado en *A. thaliana* no está presente en la proteína de otras especies como por ejemplo, maíz y soja, donde está dirigida únicamente a la mitocondria (Christensen et al., 2005; Abdelnoor et al., 2006).

El espectro de cambios moleculares en *cpm* fue más amplio que el espectro detectado en las mutantes que causan inestabilidad de los genomas de las organelas de *Arabidopsis* y *Oenothera*. En estas dos mutantes se detectaron mayoritariamente re-arreglos asociados a repeticiones del plastoma y el condrioma. De todas formas, se podría especular que el espectro de cambios observados en esos dos casos puede ser producto de que estos genomas se analizaron mediante las técnicas de RFLP y southern blot. Estas técnicas identifican indels y grandes re-arreglos con mayor facilidad que cambios puntuales. Esto se debe a que solamente detectan los cambios puntuales que se ubican en los sitios de restricción de las enzimas empleadas. En este sentido, es probable que mediante la implementación de alguna técnica como el TILLING se pueda analizar con mayor seguridad la existencia de cambios puntuales en los plastomas de estas dos mutantes. Por último, no se puede descartar que el análisis en las plántulas *cpm* de múltiples regiones del plastoma pudiera resultar en la identificación de un conjunto de cambios moleculares más amplio simplemente porque en las otras dos mutantes se analizó una porción acotada del plastoma.

### **Perspectivas: análisis de los genes que forman parte del *mismatch repair* de cebada como estrategia para la identificación del gen *cpm***

En función de los cambios moleculares detectados en los plastomas *cpm* y como una estrategia de genética directa para la identificación del gen *cpm*, se propone a futuro el análisis de las secuencias de los genes del sistema de *mismatch repair* de cebada que actúan sobre el plastoma tanto en plántulas *cpm* como en plántulas control. Sería importante realizar también el análisis de la expresión de estos genes para contemplar la posibilidad de que la mutación pudiera afectar la regulación de la expresión y no solamente la secuencia codificante de proteínas. Los principales genes candidatos a ser *Cpm* son los genes *MSH* debido a la capacidad que poseen las proteínas que estos codifican, de reconocimiento de los *mismatches* y de antirecombinación. Por otro lado, el hecho de que la proteína codificada por el gen *MSH1* de *A. thaliana* se ubique en los nucleoides de las mitocondrias y los cloroplastos, convierte a este gen en un buen candidato siempre y cuando, su funcionalidad en cebada sea diferente a la descrita en *A. thaliana* (una monocotiledónea y una dicotiledónea), y/o que la mutación existente en las plantas *cpm* tenga diferentes consecuencias sobre la funcionalidad de la proteína MSH1 respecto de lo observado en *A. thaliana*.

El análisis por homología del gen *MSH1* de *A. thaliana* en la base de datos de secuencias del genoma de cebada depositada en Ensemblplants permitió identificar seis de los genes *MSH*, a excepción del *MSH7*, con alto grado de identidad de secuencia incluso a nivel de proteínas. De estos seis genes *MSH* putativos de cebada, tres codifican isoformas proteicas con péptido señal de

direccionamiento al cloroplasto y/o a la mitocondria. Debido al direccionamiento dual de la proteína MSH1 en *A. thaliana*, no se debe descartar la posibilidad de que la proteína afectada en *cpm* también pueda tener direccionamiento a la mitocondria. Entre estos tres genes se encuentran además de *MSH1*, los genes *MSH2* y *MSH4*. Por otro lado, debido a que también se reportó actividad de antirecombinación para los genes *MLH*, este grupo de genes también se podría considerar como candidato, aunque no se conocen casos de estas proteínas direccionadas al cloroplasto.

# **CONCLUSIONES GENERALES**

Se utilizó con éxito por primera vez un mutágeno biológico en un proyecto de TILLING para la detección de la variabilidad inducida en el plastoma.

La adaptación de la técnica de TILLING al estudio del genoma de los cloroplastos resultó ser efectiva para la identificación de cambios moleculares en el ADN del plastoma en familias *cpm* con varias generaciones de autofecundación.

Se confirmó que el *cpm* induce un amplio espectro de mutaciones en el plastoma, ya que se identificaron cambios moleculares distribuidos a lo largo de las diferentes regiones de este genoma, que afectaron tanto a regiones génicas codificantes de proteínas, proteínas ribosomales y ARNs ribosomales y de transferencias, como así también a regiones intergénicas.

Se identificó con mayor exactitud el espectro de mutaciones inducidas por el *cpm*, los cambios moleculares fueron principalmente transiciones e indels de una o dos bases en repeticiones de mononucleótidos (inestabilidad de microsatélites) y en menor medida indels de mayor tamaño (indels grandes).

Las sustituciones identificadas en los plastomas *cpm* se producirían por errores cometidos por la ADN polimerasa durante la replicación del ADN del plastoma y la inestabilidad de microsatélites se produciría como consecuencia del deslizamiento de la lectura de la ADN polimerasa durante la replicación o *slippage*. Ambos errores no se corregirían correctamente en las plantas *cpm*.

La presencia de repeticiones directas en los indels grandes identificados y el hecho de que estos indels no se ubicaron en regiones del plastoma con repeticiones en tándem, sugiere que estos indels se produjeron por recombinación ilegítima entre las repeticiones directas y no por el deslizamiento de la lectura de la ADN polimerasa o *slippage*.

La alta frecuencia de polimorfismos y las combinaciones en que estos se presentaron en el gen y en el pseudogen *rpl23* de las plántulas *cpm* sugiere que los mismos se originaron por recombinación ilegítima y no por mutación como en las otras regiones del plastoma. Esta recombinación ilegítima sería no recíproca, es decir, se trataría del proceso de conversión génica.

Las plántulas *cpm* tendrían una recombinación ilegítima alterada, que produciría una recombinación aumentada entre el gen y el pseudogen *rpl23* y entre las repeticiones directas que dieron origen a los indels grandes.

El gen nuclear afectado en la mutante *cpm* codificaría una proteína dirigida al cloroplasto que normalmente actuaría corrigiendo las bases mal apareadas (*mismatches*) y que colocaría un freno a la recombinación ilegítima entre segmentos cortos y/o divergentes, contribuyendo al mantenimiento de la integridad del plastoma. Tanto la inestabilidad de microsatélites, como la aparición de sustituciones y la recombinación alterada en el plastoma *cpm* sugieren el mal funcionamiento de una proteína involucrada en el sistema de reparación del ADN del tipo *mismatch repair*.

El amplio espectro de mutaciones y la naturaleza sutil de la mayoría de los cambios moleculares que causa el *cpm* en el plastoma, permite la generación de variantes alélicas con funcionalidad residual de aplicación en genómica funcional y/o en mejoramiento genético. Esto hace que la mutante *cpm* sea un material experimental sumamente interesante y novedoso para ser utilizado como fuente de variabilidad para un genoma altamente conservado, en donde la variabilidad actual es escasa y muy difícil de inducir artificialmente por otros medios.

La mutante *cpm* puede ser de utilidad para el estudio de los sistemas de reparación del ADN del cloroplasto y de la regulación de la recombinación como parte del mantenimiento de la integridad del plastoma. Sería interesante también investigar su posible utilidad como una herramienta para la obtención de plantas de cebada transplastómicas.

## BIBLIOGRAFÍA

Abdelnoor R.V., Yule R., Elo A., Christensen A.C., Meyer-Gauen G., Mackenzie S.A. (2003). Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to *MutS*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 5968–5973.

Abdelnoor R.V., Christensen A.C., Mohammed S., Munoz-Castillo B., Moriyama H., Mackenzie S.A. (2006). Mitochondrial genome dynamics in plants and animals: Convergent gene fusions of a *mutS* homologue. Journal of Molecular Evolution. 63: 165–173.

Acharya S., Wilson T., Gradia S., Kane M.F., Guerrette S., Marsischky G.T., Kolodner R., Fishel R. (1996). hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93(24): 13629-13634.

Altmann T., Felix G., Jessop A., Kauschmann A., Uwer U., Peña-Cortés H., Willmitzer L. (1995). Ac/Ds transposon mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: mutant spectrum and frequency of Ds insertion mutants. Mol. Gen. Genet. 247(5):646-52.

Aro E.M., Suorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N., Rintamäki E. (2005). Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. J. Exp. Bot. 56(411): 347-56.

Arrieta-Montiel M., Shedge V., Davila J., Christensen A., Mackenzie S. (2009). Diversity of the *Arabidopsis* mitochondrial genome occurs via nuclear-controlled recombination activity. Genetics, 183: 1261–1268.

Baur E. (1909). Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der “varietates albomargi-natae hort.” von *Pelargonium zonale*. Z Indukt Abstamm Vererbungs 1:330–351.

Bennoun P., Spierer-Herz M., Erickson J., Girard-Bascou J., Pierre Y., Delosme M., Rochaix J.D. (1986). Characterization of photosystem II mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the *psbA* gene. Plant. Mol. Biol. 6(3): 151-60.

Birky C.W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. Ann. Rev. Genet. 35:125–148.

Bock R. (2001). Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. J Mol. Biol. 312:425–438.

Bock R. (2015). Engineering Plastid Genomes: Methods, Tools, and Applications in Basic Research and Biotechnology. Annu. Rev. Plant Biol. 66:211–41.

Boesch P., Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Tarasenko V., Cosset A., Paulus F., Lightowlers R.N., Dietrich A. (2011). DNA repair in organelles: pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. Biochim Biophys Acta 1813, 186–200.

Börner T., Schumann B., Hagemann R. (1976). Biochemical studies on a plastid ribosome-deficient mutant of *Hordeum vulgare*. In Th Bucher, W Neupert, W Sebald, S Werner, (eds) Genetics and Biogenesis of Chloroplast and Mitochondria. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 41-48.

Börner T., Sears B. (1986). Plastome mutants. Plant Mol. Biol. Rep. 4: 69–72.

- Bowman C.M., Barker R.F., Dyer T.A. (1988). In wheat ctDNA, segments of ribosomal protein genes are dispersed repeats, probably conserved by nonreciprocal recombination. *Curr. Genet.* 14(2): 127-36.
- Bzymek M., Lovett S. (2001). Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *PNAS.* 98(15): 8319 – 8325.
- Calmann M.A., Marinus M.G. (2004). Muts inhibits RecA-mediated strand exchange with platinated DNA substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 14174–14179.
- Cerutti H., Johnson A., Boynton J., Gillham N. (1995). Inhibition of Chloroplast DNA Recombination and Repair by Dominant Negative Mutants of *Escherichia coli RecA*. *Molecular and Cellular Biology.* 3003–3011.
- Chakraborty U., Alani E. (2016). Understanding how mismatch repair proteins participate in the repair/anti-recombination decision. *FEMS Yeast Res.* 16(6). pii: fow071. Epub 2016 Aug 28.
- Chang T.L., Stoike L.L., Zarka D., Schewe G., Chiu W.L., Jarrell D.C., Sears B.B.(1996). Characterization of primary lesions caused by the plastome mutator of *Oenothera*. *Curr. Genet.* 30(6): 522-30.
- Chédin F., Dervyn E., Dervyn R., Ehrlich S.D., Noirot P. (1994). Frequency of deletion formation decreases exponentially with distance between short direct repeats. *Mol. Microbiol.* 12, 561-569. PMID: 7934879.
- Chen W., Jinks-Robertson S. (1998). Mismatch repair proteins regulate heteroduplex formation during mitotic recombination in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 18:6525–37.
- Chiu W.L., Johnson E.M., Kaplan S.A., Blasko K., Sokalski M.B., Wolfson R., Sears B.B. (1990). *Oenothera* chloroplast DNA polymorphisms associated with plastome mutator activity. *Molecular and General Genetics.* 221: 59–64.
- Choquet Y., Wollman F.A. (2002). Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett.* 529(1): 39-42.
- Christensen A.C., Lyznik A., Mohammed S., Elowsky C.G., Elo A., Yule R., Mackenzie S.A. (2005). Dual-domain, dual-targeting organellar protein presequences in *Arabidopsis* can use non-AUG start codons. *Plant Cell.* 17: 2805–2816.
- Clegg M.T., Brown A.D.H., Whitfield P.R. (1984). Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley: implications for genetic conservation. *Genet. Res.* 43: 339–343.
- Clegg M. T., Gaut B. S., Learn G. H., Morton B. R. (1994). Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 6795-6801.
- Colbert T., Till B.J., Tompa R., Reynolds S., Steine, M.N., Yeung A.T., McCallum C.M., Comai L. Henikoff S. (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.* 126, 480–484.
- Colombo N., Emanuel C., Lainez V., Maldonado S., Prina A., Börner T. (2008). The barley plastome mutant CL2 affects expression of nuclear and chloroplast housekeeping genes in a cell-age dependent manner. *Mol. Genet. Genomics* 279:403–414.
- Colombo N., Rios R.D., Prina A.R. (2006). Plastome analysis of barley chloroplast mutator-induced mutants. *J. Basic. Appl. Genet.* 17:5–9.

- Comai L., Young K., Till B.J., Reynolds S.H., Greene E.A., Codomo C.A., Enns L.C., Johnson J.E., Burtner C., Odden A.R., Henikoff S. (2004). Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J.* 37(5): 778-86.
- Cooper J.L., Greene E.A., Till B.J., Codomo C.A., Wakimoto B.T. and Henikoff S. (2008a). Retention of induced mutations in a *Drosophila* reverse-genetic resource. *Genetics*, 180, 661–667.
- Cooper J.L., Till B.J., Henikoff S. (2008b). Fly-TILL Reverse genetics using a living point mutation resource. *Fly*, 2, 300–302.
- Correns C. (1909). Vererbungsversuche mit blass (gelb) grünen und buntblättrigen Sippen bei *Mirabilis Jalapa*, *Urtica pilulifera* und *Lunaria annua*. *Z Indukt Abstamm Vererbungs* 1:291–329.
- Cox M., Goodman M., Kreuzer K., Sherratt D., Sandler S., Marians K. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404: 37–41.
- Culligan K.M., Hays J.B. (2000). Arabidopsis MutS homologs AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6, and a novel AtMSH7 form three distinct protein heterodimers with different specificities for mismatched DNA. *Plant Cell*. 12(6): 991-1002.
- Datta A., Adjiri A., New L., Crouse G.F., Jinks Robertson S. (1996). Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 16(3): 1085-1093.
- Dauvillee D., Hilbig L., Preiss S., Johanningmeier U. (2004). Minimal Extent of Sequence Homology Required for Homologous Recombination at the *psbA* Locus in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts using PCR-generated DNA Fragments. *Photosynth. Res.* 79(2): 219-24.
- Davila J., Arrieta-Montiel M., Wamboldt Y., Cao J., Hagmann J., Shedge V., Xu Y., Weigel D., Mackenzie S. (2011). Double-strand break repair processes drive evolution of the mitochondrial genome in Arabidopsis. *BMC Biology* 9:64.
- Day A. (2012). Reverse Genetics in Flowering Plant Plastids. Bock R, Knoop V, editors. *Genomics of Chloroplasts and Mitochondria, Advances in Photosynthesis and Respiration*. The Netherlands: Springer, vol 35. 415–441.
- Dellaporta S. (1994). Plant DNA miniprep and microprep: versions 2.1–2.3. *The Maize Handbook*. Freeling M, Walbot V, editors. New York, Springer-Verlag N. Y. Inc. 522–525.
- de Vitry C., Olive J., Drapier D., Recouvreur M., Wollman F.A. (1989). Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: a study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 109(3): 991-1006.
- Dion E., Li L., Jean M., Belzile F. (2007). An Arabidopsis *MLH1* mutant exhibits reproductive defects and reveals a dual role for this gene in mitotic recombination. *The Plant Journal*. 51, 431–440.
- Downie S.R., Katz-Downie D.S. (1999). Phylogenetic analysis of chloroplast *rps16* intron sequences reveals relationships within the woody southern African *Apiaceae* subfamily *Apioideae*. *Can. J. Bot.* 77: 1120–1135.

- Epp M.D. (1973). Nuclear gene-induced plastome mutations in *Oenothera hookeri*. I. genetic analysis. *Genetics*. 75: 465–483.
- Erickson J.M., Rahire M., Malnoë P., Girard-Bascou J., Pierre Y., Bennoun P., Rochaix J.D. (1986). Lack of the D2 protein in a *Chlamydomonas reinhardtii psbD* mutant affects photosystem II stability and D1 expression. *EMBO J.* 5(8): 1745-54.
- Fischer N., Stampacchia O., Redding K., Rochaix J.D. (1996). Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol. Gen. Genet.* 251(3): 373-80.
- Fleischmann T.T., Scharff L.B., Alkatib S., Hasdorf S., Schöttler M.A., Bock R. (2011). Nonessential plastid-encoded ribosomal proteins in tobacco: a developmental role for plastid translation and implications for reductive genome evolution. *Plant Cell.* 23(9): 3137-55.
- Gady A., Hermans F., Van de Wal M., van Loo E., Visser R. and Bachem C. (2009). Implementation of two high through-put techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant populations. *Plant Methods*, 5, 13.
- Gamble P.E., Mullet J.E. (1989). Translation and stability of proteins encoded by the plastid *psbA* and *psbB* genes are regulated by a nuclear gene during light-induced chloroplast development in barley. *J. Biol. Chem.* 264(13): 7236-43.
- Gaut B.S. (1998). Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants. Hecht M.K. (ed) *Evolutionary biology*. Plenum Press, New York. 93–120.
- Gillham N.W., Boynton J.E., Harris. E.H. (1991). Transmission of plastid genes. *Cell Cult. Somatic Cell Genet. Plants.* 7A:55–92.
- Greiner S. (2012). Genomics of chloroplasts and mitochondrias. *Advances in Photosynthesis and Respiration Including Bioenergy and Related Processes*. Vol. 35. Plastome mutants of higher plants. Chapter 11. Springer, 237-266.
- Gressel J., Levy A.A. (2010). Stress, mutators, mutations and stress resistance. Pareek A. et al., editors. *Abiotic Stress Adaptation in Plants. Physiological, Molecular, and Genomic Foundation*. Dordrecht: Springer Science. 471–483.
- Guamét J.J., Tyystjärvi E., Tyystjärvi T., John I., Kairavuo M., Pichersky E., Noodén L.D. Photoinhibition and loss of photosystem II reaction centre proteins during senescence of soybean leaves. Enhancement of photoinhibition by the 'stay-green' mutation *cytG*. *Physiol. Plant.* 115(3): 468-478.
- Hagemann R. (2010). The foundation of extranuclear inheritance: plastid and mitochondrial genetics. *Mol. Genet. Genomics* 283:199–209.
- Hartmann C., Récipon H., Jubier M.F., Valon C., Delcher-Besin E., Henry Y., De Buyser J., Lejeune B., Rode A. (1994). Mitochondrial DNA variability detected in a single wheat regenerant involves a rare recombination event across a short repeat. *Curr. Genet.* 25(5): 456-64.
- Hasting P.J., Quah S.K., Borstel R.C. (1976). Spontaneous mutations by mutagenic repair of spontaneous lesions in DNA. *Nature.* 264: 719–722.

- Henikoff S., Till B.J., Comai L. (2004) TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol.* 135, 630–636.
- Hess W.R., Müller A., Nagy F., Börner T. (1994). Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal. *Mol. Gen. Genet.* 242: 305-312.
- Hirao T., Watanabe A., Kurita M., Kondo T., Takata K. (2009). A frameshift mutation of the chloroplast *matK* coding region is associated with chlorophyll deficiency in the *Cryptomeria japonica* virescent mutant *Wogon-Sugi*. *Curr. Genet.* 55:311–321.
- Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C.R., Meng B.Y., et al. (1989). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct *tRNA* genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217(2-3): 185-94.
- Hoffman P.D., Leonard J.M., Lindberg G.E., Bollmann S.R., Hays J.B. (2004). Rapid accumulation of mutations during seed-to-seed propagation of mismatch-repair-defective *Arabidopsis*. *Genes and Development.* 18(21): 2676-2685.
- Hunter N., Chambers S.R., Louis E.J., Borts R.H. (1996). The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *EMBO Journal.* 15(7): 1726-1733.
- Iamtham S., Day A. (2000). Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat. Biotechnol.* 18(11): 1172-6.
- Inskip W., Bloom P.R. (1985). Extinction coefficients of chlorophyll a and in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77: 483–48.
- Iyer R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem. Rev.* 106, 302–323.
- Jensen K.H., Herrin D.L., Plumley F.G., Schmidt G.W. (1986). Biogenesis of photosystem II complexes: transcriptional, translational, and posttranslational regulation. *J. Cell. Biol.* 103(4): 1315-25.
- Kanno A., Watanabe N., Nakamura I., Hirai A. (1993). Variations in chloroplast DNA from rice (*Oryza sativa*): differences between deletions mediated by short direct-repeat sequences within a single species. *Theor. Appl. Genet.* 86(5): 579-84.
- Kim J., Klein P.G., Mullet J.E. (1994). Synthesis and turnover of photosystem II reaction center protein D1. Ribosome pausing increases during chloroplast development. *J. Biol. Chem.* 269(27): 17918-23.
- Kirk J.T.O., Tilney-Bassett R.A.E. (1978). *The Plastids*, 2nd edn. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, the Netherlands.
- Khakhlova O., Bock R. (2006). Elimination of deleterious mutation in plastid genomes by gene conversion. *The plant Journal.* 46: 85-94.
- Krupinska K., Melonek J., and Krause, K. (2013). New insights into plastid nucleoid structure and functionality. *Planta* 237, 653-664.

- Kuroiwa T. (1991). The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *Int. Rev. Cytol.* 128:1–62.
- Kuroiwa T. (2010). Review of cytological studies on cellular and molecular mechanisms of uniparental (maternal or paternal) inheritance of plastid and mitochondrial genomes induced by active digestion of organelle nuclei (nucleoids). *J. Plant Res.* 123: 207–230.
- Kurowska M., Daszkowska-Golec A., Gruszka D., Marzec M., Szurman M., Szarejko I., Maluszynski M. (2011). TILLING a shortcut in functional genomics. *J. Appl. Genetics.* 52:371–390.
- Kutschera U., Niklas KJ. (2005). Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci.* 124: 1–24.
- Landau A., Diaz Paleo A., Civitillo R., Jauregui-alzo M., Prina A.R. (2007). Two *infA* gene mutations independently originated from a mutator genotype in barley. *J. Hered.* 98:272–276.
- Landau A.M., Lokstein H., Scheller H.V., Lainez V., Maldonado S., Prina A.R. (2009). A cytoplasmically inherited barley mutant is defective in photosystem I assembly due to a temperature-sensitive defect in *ycf3* splicing. *Plant Physiol.* 151:1802–1811.
- Landau A., Lencina F., Pacheco M.G., Prina A.R. (2016). Plastome Mutations and Recombination Events in Barley Chloroplast Mutator Seedlings. *J. Hered.* 107(3): 266-73. Epub 2016 Jan 16.
- Landau A.M., Pacheco M.G., Prina A.R. (2011). A second *infA* plastid gene point mutation shows a compensatory effect on the expression of the cytoplasmic line 2 (CL2) syndrome in barley. *J. Hered.* 102(5):633-9. Epub 2011 Jul 7.
- Le Signor C., Savoie V., Aubert G., Verdier J., Nicolas M., Pagny G., Moussy F., Sanchez M., Baker D., Clarke J., Thompson R. (2009). Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol. J.* 7, 430–441.
- Leister D. (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genetics.* 19: 47–56.
- Li L., Jean M., Belzile F. (2006). The impact of sequence divergence and DNA mismatch repair on homeologous recombination in *Arabidopsis*. *The Plant Journal.* 45, 908–916.
- Li Y., Sun B., Su N., Meng X., Zhang Z., Shen G. (2009). Establishment of a gene expression system in rice chloroplast and obtainment of PPT-resistant rice plants. *Agricultural Sciences in China.* 8(5): 101-105.
- Lloyd A., Milligan A., Langridge P., Able J. (2007). *TaMSH7*: A cereal mismatch repair gene that affects fertility in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology.* 7:67.
- Lovett S., Gluckman T., Simon P., Sutter V. Jr., Drapkin P. (1994). Recombination between repeats in *Escherichia coli* by a *recA*-independent, proximity-sensitive mechanism. *Mol. Gen. Genet.* 1;245(3):294-300.
- Lovett S., Feschenko V. (1996). Stabilization of diverged tandem repeats by mismatch repair: evidence for deletion formation via a misaligned replication intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93(14):7120-4.
- Lovett S.T. (2004). Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Mol. Microbiol.* 52(5): 1243-53.

- Maréchal A., Parent J, Véronneau-Lafortune F., Joyeux A., Lang B., Brisson N. (2009). Whirly proteins maintain plastid genome stability in Arabidopsis . Proc Natl Acad Sci USA 106:14693–14698.
- Maréchal A., Brisson N. (2010). Recombination and the maintenance of plant organelle genome stability. New Phytologist. 186: 299-317.
- Marsischky G.T., Filosi N., Kane M.F., Kolodner R. (1996). Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. Genes and Development. 10(4): 407-420.
- Martienssen R.A. (1998). Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 95(5):2021-6.
- Martínez-Zapater J.M., Gil P., Capel J., Somerville C.R. (1992). Mutations at the Arabidopsis *CHM* locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. Plant Cell. 4: 889–899.
- Mashkina E., Usatov A., Skorina M. (2010). Comparative analysis of thermotolerance of sunflower chlorophyll mutants. Russ. J. Genet. 46:178–184.
- Massouh A., Schubert J., Yaneva-Roder L., Ulbricht-Jones E.S., Zupok A., Johnson M.T., Wright S.I., Pellizzer T., Sobanski J., Bock R., Greiner S. (2016). Spontaneous Chloroplast Mutants Mostly Occur by Replication Slippage and Show a Biased Pattern in the Plastome of *Oenothera*. Plant Cell. 28(4): 911-29.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S. (2000). Targeted screening for induced mutations. Nat. Biotechnol.18, 455–457.
- Moens C.B., Donn T.M., Wolf-Saxon E.R., Ma T.P. (2008). Reverse genetics in zebrafish by TILLING. Brief Funct. Genomic. Proteomic. 7, 454–459.
- Moeykens C.A., Mackenzie S.A., Shoemaker R.C. (1995). Mitochondrial genome diversity in soybean: repeats and rearrangements. Plant Mol. Biol. 29(2): 245-54.
- Mogensen HL. (1996). The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. Am. J. Bot. 83(3): 383-404.
- Morton B.R., Clegg M.T. (1993). A chloroplast DNA mutational hotspot and gene conversion in a noncoding region near *rbcL* in the grass family (*Poaceae*). Curr. Genet. 24: 357–365.
- Mourad G.S., White J.A. (1992). The isolation of apparently homoplastidic mutants induced by a nuclear recessive gene in Arabidopsis thaliana. Theor. Appl. Genet. 84: 906–914.
- Muller H.J. (1930). Types of visible variations induced by X-rays in Drosophila. J. Genetics. 22: 299-333.
- Neuhaus H.E., Emes M.J. (2000). Nonphotosynthetic Metabolism in Plastids. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51, 111-140.
- Nickelsen J., Rengstl B. (2013). Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. Annu. Rev. Plant Biol. 64: 609-35.
- Novak J.E., Ross-Macdonald P.B., Roeder G.S. (2001). The budding yeast Msh4 protein functions in chromosome synapsis and the regulation of crossover distribution. Genetics. 158(3): 1013-1025

- Odahara M., Kishita Y., Sekine Y. (2017). MSH1 maintains organelle genome stability and genetically interacts with RECA and RECG in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*. 91, 455–465.
- Ogihara Y., Terachi T., Sasakuma T. (1988). Intramolecular recombination of chloroplast genome mediated by short direct-repeat sequences in wheat species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 85(22): 8573-7.
- Ogihara Y., Terachi T., Sasakuma T. (1991). Molecular analysis of the hot spot region related to length mutations in wheat chloroplast DNAs. I. Nucleotide divergence of genes and intergenic spacer regions located in the hot spot region. *Genetics*. 129(3):873-84.
- Ogihara Y., Isono K., Kojima T., Endo A., Hanaoka M., Shiina T., Terachi T., Utsugi S., Murata M., Mori N., Takumi S., Ikeo K., Gojobori T., Murai R., Murai K., Matsuoka Y., Ohnishi Y., Tajiri H., Tsunewaki K. (2002). Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol. Genet. Genomics* 266: 740-746.
- Ogihara Y., Ohsawa T. (2002). Molecular analysis of the complete set of length mutations found in the plastomes of *Triticum-Aegilops* species. *Genome*. 45(5): 956-62.
- Oldenburg D.J., Bendich A.J. (2015). DNA maintenance in plastids and mitochondria of plants. *Front Plant Sci*. 6:883.
- Palmer J.D. (1985). Comparative organization of chloroplast genomes. *Annual review of genetics* 19, 325-354.
- Parry M.A.J., Madgwick P.J., Bayon C., Tearall K., Hernandez-Lopez A., Baudo M., Rakszegi M., Hamada W., Al-Yassin A., Ouabbou H., Labhili M., Phillips A.L. (2009). Mutation discovery for crop improvement. *J. Exp. Bot.* 60, 2817–2825.
- Perry A.S., Wolfe K.H. (2002). Nucleotide substitution rates in legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat. *J. Mol. Evol.* 55: 501–508.
- Pribil M., Labs M., Leister D. (2014). Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *J. Exp. Bot.* 65(8):1955-72.
- Prina A.R. (1992). A mutator nuclear gene inducing a wide spectrum of cytoplasmically inherited chlorophyll deficiencies in barley. *Theor. Appl. Genet.* 85:245–251.
- Prina A.R. (1996). Mutator-induced cytoplasmic mutants in barley: genetic evidence of activation of a putative chloroplast transposon. *J. Hered.* 87:385–389.
- Prina A.R., Landau A.M., Pacheco M.G. (2012a). Plant mutation breeding and biotechnology. FAO. IAEA. Chimeras and Mutant Gene Transmission. Chapter 15. 181-190.
- Prina A.R., Landau A.M., Pacheco M.G. (2012b). Plant mutation breeding and biotechnology. FAO. IAEA. Mutation Induction in Cytoplasmic Genomes. Chapter 17. 203-208.
- Rajendrakumar P., Biswal A.K., Balachandran S.M., Sundaram R.M. (2002). In silico analysis of microsatellites in organellar genomes of major cereals for understanding their phylogenetic relationships. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2084–91.

- Rayssiguier C., Thaler D.S., Radman M. (1989). The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature*, 342(6248): 396-401.
- Redei G.P. (1973). Extrachromosomal mutability determined by a nuclear gene locus in *Arabidopsis*. *Mutat. Res.* 18: 149–162.
- Reichenbächer D., Börner T., Richter J. (1978). Untersuchungen am Fraktion-I-Protein der Gerste mit Hilfe quantitativer Immunelektrophoresen. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 172, 53-60.
- Rigano M., Scotti N., Cardi T. (2012). Unsolved problems in plastid transformation. *Bioengineered*. 3(6): 329–333.
- Rios R.D., Saione H., Robredo C., Acevedo A., Colombo N., Prina A.R. (2003). Isolation and molecular characterization of atrazine tolerant barley mutants. *Theor. Appl. Genet.* 106:696–702.
- Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245, 154–160.
- Rochaix J.D. (1997). Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes. *Trends Plant Sci.* 2: 419–425.
- Rochaix J.D. (2003). Functional analysis of plastid genes through chloroplast reverse genetics in *Chlamydomonas*. Larkum AW, Douglas SE, Raven JA, editors. *Photosynthesis in Algae*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 83–94.
- Rochaix J.D. (2006). The role of nucleus-and chloroplast-encoded factors in the synthesis of the photosynthetic apparatus. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 23, *The Structure and Function of Plastids*, Chapter 7, R.R. Wise and J.K. Hooper (Eds.), Springer, 145-165.
- Rowan B.A., Oldenburg D.J., Bendich A.J.(2010). *RecA* maintains the integrity of chloroplast DNA molecules in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 61: 2575–2588.
- Ruhlman T., Jansen R. (2014). The plastid genomes of flowering plants. Maliga P., editor. *Chloroplast biotechnology: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1132. New York: Humana Press. 3–38.
- Sakai A., Takano H., and Kuroiwa T. (2004). Organelle nuclei in higher plants: structure, composition, function, and evolution. *International review of cytology* 238, 59-118.
- Sakamoto W., Kondo H., Murata M., Motoyoshi F. (1996). Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by chloroplast mutator. *Plant Cell.* 8: 1377–1390.
- Sandhu A.P., Abdelnoor R.V., Mackenzie S.A. (2007). Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 104: 1766–1770.
- Saski C., Lee S.B., Fjellheim S., Guda C., Jansen R.K., Luo H., Tomkins J., Rognli O.A., Daniell H., Clarke J.L. (2007). Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes. *Theor. Appl. Genet.* 115, 571-590.

- Scharff L.B., Bock R. (2014). Synthetic biology in plastids. *Plant J.* 78: 783–798.
- Shedge V., Arrieta-Montiel M., Christensen A., Mackenzie S. (2007). Plant mitochondrial recombination surveillance requires unusual RecA and MutS homologs. *Plant Cell* 19: 1251–1264.
- Schofield M.J., Hsieh P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Ann. Rev. Microbiol.* 57, 579–608.
- Scopes R.K., Smith J.A. (1998). Analysis of proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Chapter 10. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (Eds.). John Wiley and Sons Inc. 10.0.1-10.0.20.
- Shen P., Huang H.V. (1986). Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics.* 112(3): 441-57.
- Shmakov N.A., Vasiliev G.V., Shatskaya N.V., Doroshkov A.V., Gordeeva E.I., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K. (2016). Identification of nuclear genes controlling chlorophyll synthesis in barley by RNA-seq. *BMC Plant Biol.* 16 (Suppl 3): 245.
- Sia E.A., Kirkpatrick D.T. (2005). The yeast *MSH1* gene is not involved in DNA repair or recombination during meiosis. *DNA Repair.* 4(2): 253-261.
- Singh S., Roy S., Choudhury S., Sengupta D. (2010). DNA repair and recombination in higher plants: insights from comparative genomics of arabidopsis and rice. *BMC Genomics.* 11:443.
- Smits B.M.G., Mudde J., Plasterk R.H.A., Cuppen E. (2004). Target-selected mutagenesis of the rat. *Genomics.* 83, 332–334
- Spampinato C., Gomez R., Galles C., Lario L. (2009). From bacteria to plants: A compendium of mismatch repair assays. *Mutation Research* 682. 110–128.
- Speulman E., Metz P.L., van Arkel G., te Lintel Hekkert B., Stiekema W.J., Pereira A. (1999). A two-component enhancer-inhibitor transposon mutagenesis system for functional analysis of the Arabidopsis genome. *Plant Cell.* 11(10):1853-66.
- Stadler L.J. (1930). Some genetic effects of X-rays in plants. *J. Hered.* 21: 3-19.
- Staub J.M., Maliga P. (1994). Extrachromosomal elements in tobacco plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91(16): 7468-72.
- Stoike L.L., Sears B.B. (1998). Plastome mutator-induced alterations arise in *Oenothera* chloroplast DNA through template slippage. *Genetics.* 149: 347–353.
- Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J.R., Chory J. (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* 421: 79-83.
- Stubbe W., Herrmann R.G. (1982). Selection and maintenance of plastome mutants and interspecific genome/plastome hybrids from *Oenothera*. Edelman M., Hallick R.B., Chua N.H. (eds). *Methods in chloroplast molecular biology.* Elsevier, Amsterdam/New York/Oxford, 149–165.
- Sugiura M. (1992). The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19, 149-168.

- Surtees J.A., Argueso J.L., Alani E. (2004). Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination. *Cytogenetic and Genome Research*, 107(3–4): 146-159.
- Susek R.E., Chory J. (1992). A tale of two genomes: role of a chloroplast signal in coordinating nuclear and plastid genome expression. *Aust. J. Plant Physiol.* 19: 387-399.
- Tadege M., Wang T.L., Wen J., Ratet P., Mysore K.S. (2009). Mutagenesis and beyond! Tools for understanding legume biology. *Plant Physiol.* 151, 978–984.
- Tadele Z. (2016). Mutagenesis and TILLING to Dissect Gene Function in Plants. *Current Genomics.* 17, 499-50.
- Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 260: 816–819.
- Till B.J., Colbert T., Tompa R., Enns L.C., Codomo C.A., Johnson J.E., Reynolds S.H., Henikoff J.G., Greene E.A., Steine M.N., Comai L, Henikoff S. (2003). High-throughput TILLING for functional genomics. *Methods Mol. Biol.* 236, 205–220.
- Till B.J., Zerr T., Comai L., Henikoff S. (2006). A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nat. Protoc.* 1(5): 2465-77.
- Triques K., Piednoir E., Dalmais M., Schmidt J., Le Signor C., Sharkey M., Caboche M., Sturbois B., Bendahmane A. (2008). Mutation detection using ENDO1: application to disease diagnostics in humans and TILLING and Eco-TILLING in plants. *BMC Mol. Biol.* 9, 42.
- Trouiller B., Schaefer D.G., Charlot F., Nogue F. (2006). MSH2 is essential for the preservation of genome integrity and prevents homeologous recombination in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research.* 34(1): 232-242.
- Tsai H., Howell T., Nitcher R., Missirian V., Watson B., Ngo K.J., Lieberman M., Fass J., Uauy C., Tran R.K., Khan A.A., Filkov V., Tai T.H., Dubcovsky J., Comai L. (2011). Discovery of rare mutations in populations: TILLING by sequencing. *Plant Physiol.* 156, 1257–1268.
- Tsuchiya T. (1987). Gene analysis and linkage studies in barley. *Barley Genetics V:* 175-187.
- Uauy C., Paraiso, F., Colasuonno P., Tran R., Tsai H., Berardi S., Comai L. and Dubcovsky J. (2009). A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC Plant Biol.* 9, 115
- Usatov A.V., Razoriteleva E.K., Mashkina E.V., Ulitcheva I.I. (2004). Spontaneous and induced nitrosomethylurea reversion of plastomic chlorophyll mutants of the sunflower *Helianthus annuus L.* *Russ. J. Genet.* 40:248–255.
- Vaish M., Mittal B. (2002). DNA mismatch repair, microsatellite instability and cancer. *Indian J. Exp. Biol.* 40: 989–994.
- Vothknecht U.C., Westhoff P. (2001). Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 91-101.

- Wang R., Cheng C., Chang C., Wu C., Su T., Chaw S. (2008). Dynamics and evolution of the inverted repeat-large single copy junctions in the chloroplast genomes of monocots. *BMC Evol. Biol.* 8:36.
- Wang T., Uauy C., Robson F., Till B. (2012). TILLING in extremis. *Plant Biotechnology Journal*. 10, 761-772.
- Waterhouse P.M., Graham M.W., Wang M.B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:13959–1396.
- Waters M., Pyke K. (2005). Plastid development and differentiation. *Annual Plant Reviews*, Vol. 13, *Plastids*, Chapter 2, SG Møller (Ed.), Blackwell Publishing Ltd., 30-59.
- Weil C.F. (2009). TILLING in grass species. *Plant Physiol.* 149, 158–164.
- Wicke S., Schneeweiss G.M., dePamphilis C.W., Muller K.F., and Quandt D. (2011). The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant Mol. Biol.* 76, 273-297.
- Wolfe K.H., Li W.H., Sharp P.M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 9054–9058.
- Wolfson R., Higgins K., Sears B. (1991). Evidence for Replication Slippage in the Evolution of *Oenothera* Chloroplast DNA. *Mol. Bid. Ed* 8(5):709-720.
- Woodson J.D., Chory J. (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat. Rev. Genet.* 9 (5): 383–395.
- Worth L., Clark S., Radman M., Modrich P. (1994). Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91:3238–3241.
- Wu S.Y., Culligan K., Lamers M., Hays J. (2003). Dissimilar mismatch-recognition spectra of Arabidopsis DNA-mismatch-repair proteins MSH2.MSH6 (MutS $\alpha$ ) and MSH2.MSH7 (MutS $\gamma$ ). *Nucleic Acids Research*. 31(20): 6027-6034.
- Xu Y.Z., Arrieta-Montiel M.P., Viridi K.S., de Paula W.B., Widhalm J.R., Basset G.J., Davila J.I., Elthon, T.E., Elowsky C.G., Sato S.J. et al. (2011). MSH1 is a nucleoid protein that alters mitochondrial and plastid properties and plant response to high light. *Plant Cell*. 23: 3428–3441.
- Yamane K., Yano K., Kawahara T. (2006). Pattern and Rate of Indel Evolution Inferred from Whole Chloroplast Intergenic Regions in Sugarcane, Maize and Rice. *DNA Research*. 13, 197–204.
- Zeng C.L., Wang G.Y., Wang J.B., Yan G.X., Chen B.Y., Xu K., Li J., Gao G.Z., Wu X.M., Zhao B. et al. (2012). High-throughput discovery of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms in *Brassicaceae* species by ORG-EcoTILLING. *PLoS One*. 7: e47284.
- Zhao D.S., Zhang C.Q., Li Q.F., Yang Q.Q., Gu M.H., Liu Q.Q. (2016). A residue substitution in the plastid ribosomal protein L12/AL1 produces defective plastid ribosome and causes early seedling lethality in rice. *Plant Mol. Biol.* 91(1-2): 161-77.

Zhelyazkova P., Sharma C.M., Forstner K.U., Liere K., Vogel J., Borner T. (2012). The primary transcriptome of barley chloroplasts: numerous noncoding RNAs and the dominating role of the plastid-encoded RNA polymerase. *Plant Cell* 24, 123-136.



ANEXO II. Plántulas de los grupos control.

Grupo 1: genotipo parental de <i>cpm</i>		Grupo 2: diversos genotipos de cebada	
08/1828 R		08/1001	Engledow India
08/1829 S		08/1002	Cebada Negra
09/1346-1		08/1003	Monte Cristo
10/1159-1		08/1004	Gopal
10/1538-1		08/1005	Nigrate
10/1544-1		08/1006	Chinerme
10/1549-1		08/1007	Grandpa
10/1554-1		08/1009	<i>Hordeum spontaneum</i>
10/1584-1		08/1010	Colsess IV
11/1033-1		08/1011	Colsess V
11/1037-1		08/1012	Uzu
11/1037-2		08/1014	Abacus
11/1039-1		08/1034	Trebi
11/1039-2		08/1052	Malteria Heda
11/1041-1		10/1013	Lemna Naranja
11/1041-2		10/1434	Scarlet
11/1124-1		10/1435	Golden Promise
11/1225-1		12/1214	Andreia
11/1332-1		13/1212	Quilmes Ayelen
14/1033-2		13/1213	Quilmes Paine
20 plántulas			20 plántulas