

Generació i detecció de mutacions en organismes d'interès comercial

Roger Esteban Vives

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

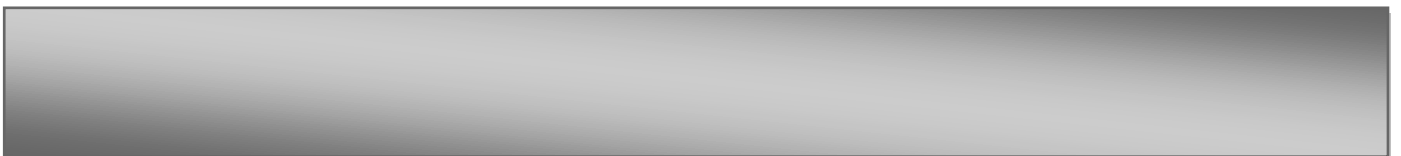
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



GENERACIÓ I DETECCIÓ DE MUTACIONS EN ORGANISMES D'INTERÈS COMERCIAL

Roger Esteban Vives
2010





UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT de FARMÀCIA

DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

GENERACIÓ I DETECCIÓ DE MUTACIONS EN ORGANISMES D'INTERÈS
COMERCIAL

ROGER ESTEBAN 2010



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT
(BIOQUÍMICA i BIOLOGIA MOLECULAR)

PROGRAMA DE DOCTORAT BIOTECNOLOGIA

BIENNI 2003/2005

GENERACIÓ I DETECCIÓ DE MUTACIONS EN ORGANISMES D'INTERÈS
COMERCIAL

Memòria presentada per Roger Esteban Vives per optar al títol de doctor per la
universitat de Barcelona

Dra. Tamara Maes
Directora

Roger Esteban
Doctorand

Dra. Montserrat Arró Plans
Turora

ROGER ESTEBAN VIVES 2010

Al meu pare Josep

Contingut

1.-INTRODUCCIÓ	1
1.1.-CONTEXT HISTÒRIC DE L'EVOLUCIÓ ARTIFICIAL DE LES ESPÈCIES CULTIVABLES	1
1.2.-CRITERIS DE SELECCIÓ DE FENOTIPS EN LA ÈPOCA CLÀSSICA (DOMESTICACIÓ)	3
1.2.1.-ELS CARÀCTERS DE LA DOMESTICACIÓ	3
1.3.-NOUS CRITERIS DE SELECCIÓ DE FENOTIPS EN LA ACTUALITAT	10
1.3.1.-MILLORA DE CARACTERÍSTIQUES RELACIONADES AMB LA PRODUCCIÓ I EL RENDIMENT	11
1.3.2.-MILLORES RELACIONADES AMB LA RESPOSTA A L'ESTRÈS ABIÒTIC	12
1.3.3.-MILLORES EN ESPÈCIES AMB NOVES APLICACIONS.....	13
1.4.-LA MILLORA GENÈTICA VEGETAL EN L'ACTUALITAT	14
1.4.1.- APLICACIÓ DE LA GENÈTICA CLÀSSICA EN LA MILLORA GENÈTICA.....	14
1.4.2.-DE GEN A FENOTIP. CONTEXTUALITZACIÓ HISTÒRICA.....	16
1.4.3.-FORWARD GENETICS.....	18
1.4.4.-GENÈTICA REVERSA.....	20
1.5.-TÈCNiques PER INCREMENTAR LA VARIABILITAT GENÈTICA	21
1.5.1.- CREUAMENT NATURAL COM A FONT DE VARIABILITAT GENÈTICA.....	21
1.5.2.-MUTAGÈNESIS INSERSIONAL	22
1.5.3.-LA TRANSGÈNIA	25
1.5.4.- LA COSSUPRESSIÓ, RNA SUPRESOR ANTISENTIT, siRNA I miRNA.....	26
1.5.5.-LA MUTAGÈNESIS QUÍMICA	29
1.6.- SISTEMES DE DETECCIÓ DE MUTACIONS	32
1.6.1.-DETECCIÓ D'HETERODÚPLEX FÍSICAMENT	32
1.6.2.-DETECCIÓ QUÍMICA D'HETERODÚPLEX	34
1.6.3.- DETECCIÓ ENZIMÀTICA DE MUTACIONS	36
1.6.4.-DETECCIÓ DE MUTACIONS PER HIBRIDACIÓ	36
1.6.5.-DETECCIÓ DE MUTACIONS PER SEQÜENCIACIÓ	38
1.7.-OBJECTIUS DE TESI	39
2.-OPTIMITZACIÓ DE LA DETECCIÓ ENZIMÀTICA DE MUTACIONS PUNTUALS DE L'ADN.	43
2.1.-INTRODUCCIÓ	43
2.1.1.-OBJECTIUS	44
2.2.-RESULTATS	45
2.2.1.-AVALUACIÓ D'EXTRACTES DE DIFERENTS PLANTES COM A FONT D'ENDONUCLEASA.....	45
2.2.2.- EFECTE DE LA MODIFICACIÓ DELS TERMINIS 5' DELS FRAGMENTES D'ADN	47
2.2.3. DETECCIÓ DE PETITES DELECCIONS/INSERCIIONS EN FRAGMENTES D'ADN DE PLÀSMIDS.....	49
2.2.4.- DETECCIÓ DE CANVIS PUNTUALS EN FRAGMENTES AMPLIFICATS D'ADN GENÒMIC AMB L'EXTRACTE DE FONOLL. ...	52
2.2.5.- ANÀLISI DEL LÍMIT DE DETECCIÓ DE L'EXTRACTE DE FONOLL EN FRAGMENTES DE DNA GENÒMIC	52
2.2.6.- ANÀLISI DEL LÍMIT DE DETECCIÓ DE L'EXTRACTE DE FONOLL EN DESAPARELLAMENTS ENTRE AL·LELS	54
2.2.7.-ANÀLISI DEL LÍMIT DE DETECCIÓ DE L'EXTRACTE DE FONOLL EN DESAPARELLAMENTS PRODUÏTS PER DELECCIONS.....	56
2.2.8.- PREPARACIÓ I CONTROL DE QUALITAT D'UN LOT DE FCE	58
2.3.-DISCUSSIÓ	60
2.3.1.-ELECCIÓ DE L'EXTRACTE DE FONOLL COM A ENZIM PER LA DETECCIÓ DE MUTACIONS.....	60
2.3.2.-IMPORTÀNCIA DE PROTEGIR ELS EXTREMS DELS FRAGMENTES EN LA DETECCIÓ DE DESAPARELLAMENTS.....	60
2.3.3.-L'EFICIÈNCIA DE L'EXTRACTE DE FONOLL EN LA DETECCIÓ DE DESAPARELLAMENTS.	60
2.3.4.-L'EXTRACTE CRU DE FONOLL TE CAPACITAT DE DETECCIÓ DE DELECCIONS	61
2.3.5.-ÈSPECIFICITAT EN EL TALL DE L'EXTRACTE DE FONOLL.....	62
2.3.6.-L'EQUILIBRI ENTRE EL SOROLL DE FONTS I LA INTENSITAT DE TALL ÉS DEGUT AL VOLUM D'ENZIM	63

2.4.-CONCLUSIÓ.....	64
3.- GENERACIÓ I IDENTIFICACIÓ DE MUTANTS EN LLEVAT PEL GEN SULFIT REDUCTASA.....	67
3.1.- INTRODUCCIÓ.....	67
3.1.1.-L'ELABORACIÓ DE LA CERVESA.....	67
3.1.2.-LA IMPORTÀNCIA DEL SULFITS COM A CONSERVADORS DELS ALIMENTS.....	69
3.1.3.-L'ACTIVITAT METABÒLICA DELS LLEVATS MODIFICA EL CONTINGUT DE SULFITS.....	70
3.1.4.-MUTAGÈNESI I GARBELLAT MOLECULAR D'UNA SOCA CERVESERA.....	71
3.1.5.-OBJECTIUS DEL PROJECTE.....	72
3.2.-RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	73
3.2.1 -POSTA A PUNT DE LA MUTAGÈNESI QUÍMICA DE <i>S. CARLSBERGENSIS</i>	73
3.2.1.1.- <i>Determinació de LD50</i>	73
3.2.1.2.- <i>Anàlisi de l'eficiència de la Mutagènesi mitjançant una soca indicadora</i>	73
3.2.1.3- <i>Mutagenesi de les soques indicadora</i>	75
3.2.2.-DETERMINACIÓ DE L'ESTRUCTURA I COMPOSICIÓ DEL GEN MET10.....	77
3.2.3.-GARBELLAT MOLECULAR: LOCALITZACIÓ DELS MUTANTS PER MET10 EN SEQÜÈNCIA TIPUS <i>S. CEREVISIAE</i>	79
3.2.3.1.- <i>Garbellat molecular en pools i localització individual del mutant</i>	79
3.2.3.2.- <i>Confirmació del candidat individual per seqüenciació</i>	81
3.2.4.-GARBELLAT MOLECULAR: LOCALITZACIÓ DELS MUTANTS PER MET10 EN LA SEQÜÈNCIA TIPUS <i>S. BAYANUS</i>	82
3.2.4.1.- <i>Garbellat molecular en pools i localització individual del mutant</i>	82
3.2.4.2.- <i>Confirmació del candidat individual per seqüenciació</i>	82
3.2.5.-PREDICCIÓ DE L'ESTRUCTURA SECUNDÀRIA SEGONS SOPMA.....	83
3.2.6.-AVALUACIÓ DE L'EFICIÈNCIA EN LA DESACTIVACIÓ DEL GEN.....	86
3.3.-CONCLUSIONS.....	89
4.-GENERACIÓ I GARBELLAT D'UNA POBLACIÓ MUTANT EN ARRÒS.....	93
4.1.-ESTRATÈGIES PER GENERAR UNA POBLACIÓ DE MUTANTS.....	93
4.1.1.-LA MUTAGÈNESI EN LLAVORS.....	93
4.1.2.-LA IMPORTÀNCIA DE LES CAPES GERMINALS PER EL PROCÉS DE MUTAGÈNESI.....	95
4.1.3.-ALTERNATIVES A LA MUTAGÈNESI DE LLAVORS.....	97
4.1.4.-OBJECTIUS.....	98
4.2.-RESULTATS.....	99
4.3.-DISCUSSIÓ.....	100
4.4.-CONCLUSIÓ.....	102
5.- IDENTIFICACIÓ DE MUTANTS DEL GEN ACS EN UNA VARIETAT HISPANA D'ORYZA SATIVA.....	105
5.1.- INTRODUCCIÓ.....	105
5.1.1.- LES FUNCIONS DE L'HORMONA ETILÈ.....	105
5.1.2.- LA SÍNTESI D'ETILÈ.....	106
5.1.3.- EL GEN ACS COM A ENZIM CLAU EN LA PRODUCCIÓ D'ETILÈ.....	107
5.1.4.- REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LES ISOFORMES ACS.....	108
5.1.5.- EL GEN ACS I EL FENOTIP STAY-GREEN.....	109
5.1.6.-OBJECTIUS.....	110
5.2.-RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	111
5.2.1.-ESTRUCTURA I COMPOSICIÓ DEL GEN ACS.....	111
5.2.2.-GARBELLAT MOLECULAR DEL GEN ACS I SEQÜENCIACIÓ.....	111
5.2.3.- PREDICCIÓ ESTRUCTURAL DE L'EFECTE DE LA MUTACIÓ EN LA PROTEÏNA.....	116
5.2.4.- ANÀLISI DE LA DESCENDÈNCIA.....	119
5.3.-DISCUSSIÓ.....	120
5.4.-CONCLUSIÓ.....	123

6.- IDENTIFICACIÓ DE MUTANTS PEL GEN SGR EN UNA VARIETAT HISPANA D'ORYZA SATIVA.....	127
6.1.- INTRODUCCIÓ.....	127
6.1.1.- LA FORMACIÓ DE LES RESERVES DE LA LLAVOR.....	127
6.1.2.- LA IMPLICACIÓ DE LA SENESCÈNCIA EN LA MOBILITZACIÓ DE RESERVES A LA LLAVOR.....	129
6.1.3.-ELS DIVERSOS FENOTIPS D'STAY-GREEN.....	130
6.1.4.-EL GEN SGR I LA REGULACIÓ DELS PROCESSOS DE SENESCÈNCIA.....	131
6.1.5.-OBJECTIUS.....	134
6.2.-RESULTATS.....	135
6.2.1.-DETERMINACIÓ DE L'ESTRUCTURA I COMPOSICIÓ DEL GEN SGR.....	135
6.2.2.-GARBELLAT MOLECULAR: LOCALITZACIÓ I IDENTIFICACIÓ DELS MUTANTS.....	135
6.2.2.1.- <i>Garbellat molecular en pools i localització de l'individu mutant</i>	135
6.2.2.2.- <i>Confirmació del candidat individual per seqüenciació</i>	137
6.2.2.3.- <i>Predicció estructural</i>	137
6.2.3.- ANÀLISIS GENOTÍPIC I FENOTÍPIC DE LA DESCENDÈNCIA.....	138
6.2.3.1.- <i>Anàlisi genotípic de la descendència i amplificació de llavor</i>	138
6.2.3.2.- <i>Anàlisi fenotípic de la població M3 de la descendència de 398s2</i>	140
6.3.-DISCUSSIÓ.....	141
6.4.-CONCLUSIÓ.....	142
7.-MATERIALS I MÈTODES.....	144
7.1. RECULL DE PREPARACIONS.....	144
7.2.-ASSAIG D'EFICIÈNCIA DE L'ENZIM FCE EN LA DETECCIÓ DE MUTACIONS.....	149
7.2.1.-OBTENCIÓ D'EXTRACTE VEGETAL CRU.....	149
7.2.2.-ANÀLISIS DE L'EFICIÈNCIA DE TALL DE DESAPARELLAMENTS DELS EXTRACTES CRUS.....	149
7.2.3.-COMPARACIÓ DE L'EFICIÈNCIA DE DETECCIÓ D'UN DESAPARELLAMENT ENTRE L'EXTRACTE CRU D' API I FONOLL.....	150
7.2.4.-L'EFECTE DE LA TIOFOSFORILACIÓ DE FRAGMENTS DAVANT LA DIGESTIÓ AMB L'EXTRACTE CRU DE FONOLL.....	150
7.2.5.-ASSAIG DE LÍMIT DE DETECCIÓ DE MUTACIÓ EN HETERODÚPLEX.....	151
7.2.6.-ASSAIG DE DETECCIÓ D'AL·LELS MUTANTS EN HETERODÚPLEX.....	151
7.2.7.- ASSAIG DEL LÍMIT DE DETECCIÓ DE DELECCIONS.....	152
7.2.7.1- <i>Amplificació d'un fragment del plàsmid pBluescript KS (+)</i>	152
7.2.7.2- <i>Digestió del plàsmids amb enzims de restricció</i>	153
7.2.7.3- <i>Generació d'extremes roma per lligar el plàsmid</i>	155
7.2.7.4.- <i>Transformació de cèl·lules competents amb els plàsmids delecionats</i>	155
7.2.7.5.- <i>Amplificació del fragment amb deleció</i>	155
7.2.7.6.- <i>Digestió dels fragments amb FCE</i>	156
7.3.-GENERACIÓ D'UNA CÈL·LULA INDICADORA.....	156
7.3.1.-ELABORACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS DH5A.....	156
7.3.2.-COMPROBACIÓ DE LA COMPETITIVITAT DE LES CÈL·LULES.....	157
7.3.3.-PREPARACIÓ DELS PLÀSMIDS.....	157
7.3.4.-MINIPREP PER OBTENIR DNA PLASMÍDIC A PARTIR D'É. COLI TRANSFORMADA.....	158
7.3.5.-AMPLIFICACIÓ DE DNA DE PLÀSMID PER TRANSFORMAR.....	158
7.3.6.-TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES DE LLEVAT PEL MÈTODE DE L'ACETAT DE LITI.....	159
7.3.7.-COMPROVACIÓ GENERACIÓ DE PROTEÏNA DE FUSIÓ.....	160
7.3.8.-MUTAGÈNESI DE LES SOQUES INDICADORES.....	161
7.4.-GENERACIÓ D'UNA POBLACIÓ MUTANT DE LLEVAT.....	161
7.4.1.-CREIXEMENT DEL LLEVAT.....	161
7.4.2.-MUTAGÈNESI.....	162
7.5.-GENERACIÓ D'UNA POBLACIÓ MUTANT D'ARRÒS.....	163
7.5.1.-GENERACIÓ DE CALL MITJANÇANT CULTIU IN VITRO.....	163
7.5.2.-MUTAGÈNESI.....	164

7.5.3.-REGENERACIÓ DE PLÀNTULES A PARTIR DE CALL MUTAGENITZAT	165
7.6.- GARBELLAT MOLECULAR.....	166
7.6.1.-SEMBRA EN PLACA DE LES COLÒNIES DE LLEVAT MUTANTS.....	166
7.6.2.-EXTRACCIÓ DE DNA DE LLEVAT MUTANT.....	166
7.6.3.-SEMBRA DE MATERIAL VEGETAL D'ARRÒS	166
7.6.4.- EXTRACCIÓ DE DNA D'ARRÒS	167
7.6.5.-GENERACIÓ DE POOLS I PRECIPITACIÓ	168
7.6.6.- REACCIÓ D'AMPLIFICACIÓ DE FRAGMENT PER PCR I HETERODÚPLEX	168
7.6.7.- REACCIÓ D'HETERODÚPLEX	170
7.6.8.-DIGESTIÓ DE L'HETERODÚPLEX PER FCE	171
7.6.9.-DETECCIÓ DE LA MUTACIÓ MITJANÇANT GEL DE POLIACRILAMIDA	171
7.6.10.-VERIFICACIÓ DE CANDIDAT MITJANÇANT SEQÜENCIACIÓ	173
7.6.11.- ANÀLISIS DE LA DESCENDÈNCIA	173
7.6.12.-GENERACIÓ D'UNA SOCA DEFICIENT PEL GEN MET10.....	174
7.6.13.-ANÀLISIS DE CREIXEMENT EN LLEVAT EN MEDI AUXOTRÒFIC AMB I SENSE METIONINA	175
8.-AGRAÏMENTS.....	177
9.-BIBLIOGRAFIA	178

Introducció

1.-Introducció

1.1.-Context històric de l'evolució artificial de les espècies cultivables

Des dels l'origen de la humanitat, l'home ha modificat els elements del seu entorn per al seu ús. Però el primer pas que modificà el futur de la humanitat fou la progressiva domesticació de plantes i animals durant el final del període paleolític i l'inici del període neolític.

A finals del període del Pleistocè (Paleolític arqueològic), període que durà aproximadament 2,6 milions d'anys, *Homo sapiens* era caçador recol·lector. Així doncs segons Cordain (2006)¹ la dieta de l'home a finals del Pleistocè fou de carn provinent de la caça, de la recol·lecció de fruits (alguns carnosos), llegums i alguns cereals. En aquesta època, i degut a la seva dieta, els primers grups humans seguien les migracions dels herbívors superiors i durant aquests desplaçaments completaven la seva dieta amb llavors de cereals entre altres. Paral·lelament, les migracions dels grans herbívors eren una conseqüència dels canvis de temperatura estacionals, que feia que aquests animals es desplaressin en busca de pastures noves. Segons Morin canvis globals de temperatura, sembla que provocaren l'extinció d'alguns grans mamífers i fomentaren la dispersió dels herbívors ungulats a àrees cada cop més llunyanes, obligant als petits grups a desplaçar-se cada cop més lluny, per poder trobar aliments (Morin 2008)². A finals de la era glacial (Pleistocè), és a dir, fa aproximadament 12000 anys, aquesta dificultat per trobar aliments va suposar un coll d'ampolla per aquestes comunitats de caçadors/recol·lectors. Per tal de poder sobreviure, van haver de ser més generalistes a l'hora d'aconseguir aliments, així que van buscar noves fonts d'alimentació, com fruits i cereals. Aquest pas va fer desplaçar l'estil de vida de caçadors/recol·lectors, cap a domesticadors graduals fent que progressivament les petites comunitats s'assentessin per tal de poder tenir més properes les zones amb cereals i poder seguir el ritme dels animals domesticats (Reeding 1988)³

Els primers grups humans del neolític van desenvolupar una agricultura suficient per mantenir un grup important d'individus en una regió en concret. Així doncs, aquest pas de grups nòmades a sedentaris ha marcat profundament l'evolució de la nostra societat actual, introduint nous conceptes com l'escriptura, construcció, organització social, entre altres activitats, que van aparèixer com a conseqüència de l'assentament lligat als cultius.

Però aquest pas no fou directe. L'adaptació de plantes salvatges a cultius fou el producte d'una selecció prèvia de grups caçadors/recol·lectors. Segons l'equip de Hartmann (Kislev *et al.*,

2004)⁴, aquests grups ja incloïen cereals dins la seva dieta i es dedicaven a recollir-los. De forma progressiva van tenir consciència que a mesura que recol·lectaven llavors, feien que posteriorment hi hagués una major proliferació d'aquestes plantes, per tant era degut a la seva acció, que al recollir-les, les estaven sembrant.

El mode emprat per a aquestes primeres comunitats d'humans, fou la selecció de les millors varietats de plantes silvestres o altrament dit, seleccionar els mutants de característiques més interessants de dins d'un gran grup. Segons la paleografia, es té coneixement de l'ús i manipulació dels cultius des d'aproximadament fa al menys 10500 anys. Durant tots aquests anys les diferents comunitats d'humans han estat experimentant i treballant en un garbellat a gran escala fent una selecció a nivell global, i una adaptació a nivell local, de les varietats més importants de vegetals. Aquestes espècies noves cada cop es van anar fent més útils i necessàries per la seva capacitat de mantenir i alimentar a un gran nombre de membres d'aquestes comunitats.

Generalment la relació que existeix entre els vegetals i els animals és de mutualisme. El vegetal ofereix a l'animal un al·licient de tipus alimentari i l'animal a canvi es dedica a fer intercanvi de pol·len o dispersió de llavors de forma inconscient. En aquesta dispersió, la pressió selectiva de les plantes requeia sobre el fet que disposessin de mode de dispersió de llavors més atractives per l'animal, i així poder colonitzar nous territoris. És a dir, hi havia una competència entre les diferents espècies per tal de captar l'atenció dels vectors de pol·linització i dels vectors de dispersió. Però l'aparició de les primeres comunitats humanes, no solament va canviar el sistema de dispersió de les diferents espècies vegetals, sinó que va canviar activament l'arquitectura d'aquestes espècies. L'home ha canviat a les espècies de vegetals, per al seu ús, a nivell genètic, sense ésser conscients d'aquest fet, tot i que aquest fenomen porti implícitament el coneixement a nivell bàsic, de biologia reproductiva, observació, anàlisi i selecció de les millors llavors. Per altra banda, al conservar els fruits i ressement-los, es van anar seleccionant cada cop, els fenotips més favorables per a l'interès humà. Posteriorment, d'aquest fenomen, se l'anomena domesticació.

El grup de Doebley i Wang han comparat la diferència genètica entre les varietats actuals de *Zea mays* i teosinte, la varietat primitiva del blat de moro. Van observar que hi ha 5 regions genètiques diferents responsables dels canvis morfològics entre totes les varietats. Això vol dir que en 7000 anys, hi ha hagut un increment molt gran del nombre de varietats de blat de moro, cadascuna amb les seves pròpies característiques genotípiques (Wang *et al.*, 1999)⁵, tot i que creuen que el procés de domesticació va durar uns pocs centenars d'anys.

Els primers agricultors van seleccionar aquells fenotips que proporcionessin major font d'aliment, és a dir, major mida de fruit, millor mida de fulles (les comestibles), major producció

de llavor/polpa/fulla per planta, millor sabor... Però per altra banda estaven seleccionant altres fenotips imperceptibles, però molt importants, com diferents mecanismes de disseminació, germinació inhibida, autopollinització .

1.2.-Criteris de selecció de fenotips en la època clàssica (domesticació)

Segons la enciclopèdia britànica⁶, la selecció de fenotips durant els orígens de les civilitzacions fou un procés anomenat domesticació. Entenem per domesticació vegetal a aquells processos de reorganització hereditària que implica la obtenció de formes cultivades a partir d'organismes salvatges. La distinció fonamental entre els organismes domesticats i els salvatges és que els primers necessiten un condicionament de la zona de cultiu per sobreviure i les espècies salvatges no. Els processos de domesticació van començar per la selecció de caràcters desitjables o essencials per poder produir un nombre suficient de recursos (generalment a partir de la llavor) per complementar la dieta dels primers grups d'humans del final del paleolític i posteriorment per alimentar als primers grups d'humans del neolític.

1.2.1.-Els caràcters de la domesticació

Segons varis autors com Sweeney and McCough asseguren que un dels factors més importants de la domesticació en arròs (*Oryza sativa*) fou la selecció d'aquells fenotips que reduïen la dehiscència (Sweeney *et al.*, 2007)⁷. L'equip de Hee-Jong Koh considera que hi ha hagut diferents tipus de dehiscència depenent de l'ús i del tipus d'eines de que es disposava per tal de separar el gra de l'espiga, establint diverses categories de dehiscència (Hyeon-So Ji *et al.*, 2006)⁸. Era necessari que hi hagués poca dehiscència, però suficient, per alliberar el gra de l'espiga un cop s'hagués recollit aquesta, un caràcter desitjable pel Neolític, però en canvi, actualment, degut als tractaments amb maquinària, és més útil un gra molt poc dehiscent. Hi ha moltes hipòtesis sobre com els primers agricultors del neolític, van aconseguir seleccionar aquelles varietats de cereals que tenien llavors poc dehiscent. Aquesta mutació que van portar les primeres varietats durant el neolític, va permetre que un cop haguessin madurat les llavors, els primers agricultors poguessin recol·lectar-les sobre de la planta, i no al terra. Autors com Doebley (Doebley *et al.*, 1991)⁹ determinen que en els cereals, la eliminació de dehiscència fou la primera que van seleccionar els agricultors del neolític. Per exemplificar-ho, fou la falta de capacitat de dehiscència, la que marcà el pas de domesticació entre la varietat salvatge de blat de moro anomenada teosintle i la varietat actual *Zea mays* (Dillon *et al.*, 2007)¹⁰ així com passà amb l'espècie Melca (*Sorghum bicolor*) i altres autors ho descriuen per

l'ordi (*Hordeum vulgare*) (Porkheirandish *et al.*, 2007)¹¹. Així doncs, els gens que ajudaven a una millor dispersió de les llavors en les varietats salvatges es van anar perdent en les varietats domesticades. Però no foren els únics caràcters que van anar essent desplaçats en detriment d'aquells caràcters més útils per l'aprofitament dels recursos per part dels humans. Podem parlar de la reducció de les arestes i de pèls accessoris en les varietats primitives d'arròs i en blat que ajudaven a la dispersió, així com altres característiques aerodinàmiques útils per la dispersió que van ser eliminades de la despesa metabòlica de la planta (Fuller *et al.*, 2007)¹²

Altres característiques que es van anar seleccionant pels homes del neolític, fou, l'eliminació de la inhibició de la germinació. Moltes llavors de cereals amb aquest tipus d'inhibició han d'eliminar físicament o químicament una capa que no permet que la llavor pugui germinar. En un principi aquesta capa inhibidora és molt útil per tal de fomentar la dispersió, ja que sovint implica haver passat pel tracte digestiu d'algun animal. Aquesta característica en les llavors no és gens desitjable, ja que en dificulta el processat. En el cas de la dormició, la llavor ha de passar un temps a baixes temperatures o haver estat dipositada sota terra durant un temps, al presentar una inhibició per sensibilitat lumínica. Els cereals com el blat, ordi i l'arròs son exemples d'espècies que necessiten l'emmagatzematge per tal d'incrementar la seva proporció de gibberel·lines i poder germinar. Aquest tipus d'inhibició és una dormició fisiològica poc profunda i durant la domesticació, ja s'ha resolt al haver-hi un període d'emmagatzematge, abans de la sembra (Barceló *et al.*, 1992)¹³ Però existeix una pressió selectiva més gran per aquelles espècies que redueixin el gruix de la seva testa. Smith va detallar tot un conjunt d'espècies en que s'havia comprovat la seva evolució al llarg del temps i com la reducció de la testa havia augmentat progressivament (Smith 1989)¹⁴. Aquest autor posa com a exemple, la Quinoa (*Chenopodium* sp) que s'ha trobat en diferents assentaments humans en la costa est de Nord Amèrica i ha reduït la testa de 40-80 µm fins a 20 µm des del 980 A.C fins al 150A.C. Poc a poc, les llavors que tenien una facilitat per germinar, eren seleccionades dels primers magatzems almenys un cop per any, relegant aquelles llavors que necessitaven una eliminació química o física de les cobertes com la testa.

Per citar altres exemples, tenim la pèrdua de part de la gluma en llavors de blat de moro. Aquesta estructura de la flor s'endureix durant el procés de maduració de la llavor, lignificant-se i afegint sílice, protegint la llavor i essent útil per la dispersió al haver de passar pel tracte digestiu d'alguns animals i eliminar-la, com a pas previ a la germinació. Aquest és un sistema molt valuós per la planta ja que s'assegura que no germinarà al peu de la planta progenitor, sinó que serà dispersada lluny del punt d'origen. Una mutació en *Zea mays* reduí la mida de les

glumes i va fer que no envoltessin del tot la llavor. Aquesta mutació va permetre que la gluma es quedés subjecta a la panotxa fent més fàcil la separació el gra (Wang *et al.*, 2005)¹⁵

El següent criteri de selecció que van tenir en compte els primers agricultors del neolític foren les característiques relacionades amb el nombre de llavors per planta. En el cas del blat de moro (*Zea mays*), cultiu originari de la regió de Meso Amèrica fa 7000 anys (Matsuoka *et al.*, 2002)¹⁶ en què es va passar d'una panotxa de 5-10 llavors en el cas del blat de moro salvatge o teosintle (*Zea mays ssp. parviglumis*) en comparació amb una panotxa de centenars de llavors de les actuals varietats comercials Figura 1 (Doebley *et al.*, 1990)⁹ descriuen com es va passar d'una varietat amb dos files de cúpules amb una espiga per cúpula, fins a les varietats actuals que comprenen 4 files de cúpules amb dos espigues per cúpula.



Figura 1. Detall del blat de moro tipus Teosintle (*Zea mays ssp parviglumis*) a l'esquerra i les actuals varietats comercials de *Zea mays*)

Per altra banda la selecció de les llavors que tenien una mida més gran fou un dels criteris més perceptible pels agricultors. Estudis realitzats en cereals, relacionen l'increment de mida de les llavors amb la domesticació (Willcox 2004)¹⁷. La mida de la llavor depèn de la posició sobre la panícula i està determinat per múltiples gens. Per tant, obtenir llavors grans a partir d'una selecció de forma conscient i mitjançant creuaments hagués estat difícil. Per altra banda, una selecció a l'atzar hagués estat encara més difícil, ja que la combinació de múltiples gens aleatòriament per obtenir fenotips amb llavors més grans és molt poc probable. Willcox, argumenta que en la zona que comprèn el Tigris i l'Èufrates, es va produir una introducció de varietats amb llavors grans, provinent d'altres regions, però que els processos de preparació de la terra i el regadiu van permetre que les llavors incrementessin la mida.

La selecció d'aquells individus que puguin tenir més nombre de flors per estructura floral, és molt important per una raó; a més flors, més llavors. D'aquesta forma, espècies com l'arròs

(*Oryza sativa*), el blat (*Triticum sp.*), el blat de moro (*Zea mays*) i en general quasi tots els cereals han incrementat el nombre de llavors augmentant la productivitat per planta sembrada. Però no ha estat l'únic criteri que s'ha seguit. En altres espècies s'ha seleccionat altres parts de la planta degut al seu valor nutricional.

Així doncs, no només parlem de l'ús de llavors, sinó que podem parlar del fruit (generalment el mesocarpi), a part del tubercle i les fulles. Com a exemples podem posar, el progressiu augment de la mida del mesocarpi del fruit d'alguns arbres fruiters membres de la família de les rosàcies *Prunus sp.* i *Pyrus sp* (Shulaev *et al.*, 2008),¹⁸ la mida de les llavors del gira-sol (*Helianthus annuus*), la quantitat de midó acumulada en la tija de reserva de la patata (*Solanum tuberosum*), o en l'arrel de la tapioca (*Manihot esculenta*).

Bàsicament, la majoria dels gens implicats en aquesta millora, son aquells que estan relacionats amb l'acumulació de carbohidrats en les diferents estructures, o bé que estan relacionats en les rutes metabòliques dels àcids grassos. Per aquest motiu és força rellevant la selecció d'aquelles varietats on el pas de perdre llavors s'ha fet en detriment del valor nutritiu del mesocarpi, com és el cas de la Banana (*Musa X paradisiaca*), on s'ha perdut la totalitat de les seves llavors. En aquest cas, la planta es reproduïx exclusivament de forma vegetativa, per rizomes. Aquesta espècie originària de la regió del Sud Est Asiàtic, és un exemple de la selecció genètica per domesticació en un clar benefici per a l'espècie humana, en detriment del benefici per la planta que al creuar dues espècies del mateix gènere com *Musa cuminata* amb *Musa balbisiana* s'han obtingut plantes flors masculines estèrils i flors femenines amb reproducció partenocàrpica sense llavors. Aquest fet permet produir un fruit altament nutritiu (120 calories/unitat) a les varietats triploides com la Cavendish, molt apreciat en les regions tropicals (Heslop-Harrison *et al.*, 2007)¹⁹

Tot i que l'augment del nombre de llavors fou i és altament desitjable, la reducció del nombre d'inflorescències té avantatges. Una mutació en *Zea mays*, redueix la ramificació lateral i conseqüentment el nombre de panotxes, però al ser una planta més compacta permet una major concentració d'individus en una àrea menor al no fer-se ombra entre les fulles de les ramificacions i les altres plantes. Aquest gen s'expressa dos cops més en el blat de moro que en el teosintle (blat de moro salvatge), fent que hi hagi una marcada dominància apical i inhibint els borrons laterals (Doebley *et al.*, 1997)²⁰. Un altre exemple de la presència d'aquesta sobreexpressió és en la melca (*Sorghum sp.*) essent més alt que el salvatge i donant-li capacitat de tenir cultius d'alta densitat sense fer-se ombra entre les fulles (Kebrom *et al.*, 2006)²¹. Hi ha un augment de rendiment en detriment de la producció individual.

Però no totes les espècies han necessitat una domesticació per modificar parts de la seva arquitectura i ser més efectives a l'hora de produir en àrees d'alta densitat. Aquest cas és el de l'arròs, que té la capacitat de créixer en àrees molt denses i produint moltes ramificacions. L'arròs no presenta una sobreexpressió del gen homòleg al de *Zea mays*, per aquest motiu, genera ramificacions laterals. Experiments realitzats per tal d'aconseguir un arròs amb un tipus d'arquitectura de melca o Blat de moro va generar mutants deficients a nivell productiu (Doust 2007)²² (Takeda *et al.*, 2003)²³.

Per altra banda, alguns cultius han necessitat quelcom més que incrementar la producció de fruits o substàncies de reserva. En alguns casos, per tal de poder utilitzar el fruit, s'han hagut de seleccionar aquells mutants que no fossin tòxics, com és el cas de varies espècies de la família de les *Solanàcies*, com la tomata (*Solanum lycopersicon*) o la patata (*Solanum tuberosum*), en que aquells mutants que produïen menys quantitat de l'alcaloide solanina, eren els més aptes per al consum. Tot i que no se sap molt bé la bioquímica en els darrers passos de la glicosilació d'aquests alcaloides, és probable que la desactivació, o modulació d'un gen, disminueixi la quantitat de solanina acumulada en el fruit fent que la fruita sigui comestible (Arnqvist L. *et al.*, 2003)²⁴.

En el cas de l'ametller (*Prunus dulcis*), la presència de Cianur d'hidrogen va fer que no fossin comestibles els fruits d'aquesta planta, ja que feia tòxiques les llavors. El cianur es forma a partir d'un compost anomenat prunasina, que és sintetitzat pel tegument de la llavor. Però una sola mutació en un gen que codifica per una B-glucosidasa degrada la prunasina que sintetitza el tegument i no l'acumula en els cotiledons (Pérez *et al.*, 2008)²⁵ Aquesta mutació fou la que va permetre que les ametlles fossin dolces i aprofitables pels caçadors/recol·lectors.

1.2.2.-Dispersió dels caràcters domesticats

En la taula 1 es pot apreciar com cada espècie que actualment compon la base alimentària de moltes societats és un producte evolutiu que fa milers d'anys que va començar. Així doncs la majoria de les espècies vegetals comestibles més importants que componen la base de la nostra alimentació es van començar a domesticar en àrees molt concretes. A partir d'aquest focus, es van anar estenent a mesura que l'home comerciava o colonitzava regions més distants. D'aquesta forma aquestes espècies, segurament, s'han estès més del que mai haguessin pogut fer utilitzant a algun altre animal com a medi de transmissió de les seves llavors.

Espècie	Origen de dispersió	Any
	<u>Sud Oest Asiàtic</u>	8500 a.C
Blat	<i>Triticum sp</i>	
Pèsol	<i>Pisum sativum</i>	
olivera	<i>Olea europaea</i>	
	<u>China</u>	7500-8000 a.C
Arròs	<i>Oryza sp</i>	
mill	<i>Panicum miliaceum</i>	
	<u>Mesoamèrica</u>	7000 a.C
Blat de Moro	<i>Zea mays</i>	
mongeta	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
carbassa	<i>Cucurbita sp.</i>	
	<u>Andes i Amazonia</u>	3500
patata	<i>Solanum tuberosum</i>	
Tapioca	<i>Manihot esculenta</i>	
	<u>Est Nord-Amèrica</u>	2500 a.C
Gira-sol	<i>Helianthus annuus</i>	
Quinoa	<i>Chenopodium</i>	
	<u>Sahel (Africa)</u>	5000 a.C
Melca	<i>Sorghum</i>	
Arròs africà	<i>Oryza sp</i>	
	<u>Àfrica Occidental tropical</u>	3000 a.C
Taro	<i>Colocasia esculenta</i>	
Palma d'oli copra	<i>Elaeis guineensis</i>	
	<u>Etiòpia</u>	?
Cafè	<i>Coffea sp.</i>	
Teff	<i>Eragrostis tef</i>	
	<u>Nova Guinea</u>	7500 a.C
Canya de sucre	<i>Saccharum officinarum</i>	
Plàtan	<i>Musa paradisiaca</i>	
	<u>Europa occidental</u>	6000-3500 a.C
Civada	<i>Avena sativa</i>	
Rosella	<i>Papaver rhoeas</i>	
	<u>Vall de l'Indo</u>	7000 a.C
Sèsam	<i>Sesamum indicum</i>	
Albergínia	<i>Solanum melongera</i>	
	<u>Egipte</u>	6000 a.C
Xufla	<i>Cyperus esculentus</i>	
Plataner	<i>Platanus occidentalis</i>	

Taula 1. Espècies amb més rellevància durant la domesticació segons el seu focus de dispersió i any aproximat de l'inici (Diamond 2006) ²⁶.

Tot i que la majoria de les espècies que es consumeixen avui en dia van originar-se en una regió, algunes es van originar en dos llocs independents i altres es van originar en àrees que poc tenen a veure les condicions en les que es va desenvolupar amb les que actualment ocupen. Un exemple clar és l'arròs (*Oryza* sp), en el que es té constància d'haver aparegut en dues regions, com a espècie millorada per l'espècie humana. Una d'elles és la regió del sud-est asiàtic (Xina) i l'altra ha estat el Sahel, a l'Àfrica. A partir d'aquests dos punts distants s'ha propagat com a aliment humà al llarg de tota la història. Actualment l'arròs es cultiva, no només al Sud-est Asiàtic i al Sahel, sinó que s'ha estès a l'Àfrica occidental-tropical, sud d'Europa, Amèrica del Nord (al Sud-est), Sud-Amèrica i regió del Sud-est (Brasil).

Podríem pensar que les varietats més productives foren les que es van propagar primer, però aquest no fou l'únic criteri de selecció en l'antiguitat. Altres caràcters van ésser seleccionats. Un d'ells és un caràcter de pèrdua de coloració del pericarpí i de l'endosperma en arròs. L'equip de McCough expliquen com una simple mutació en un gen, que s'introdueix en un cultiu tan important i majoritari com és l'arròs, i s'estengué a una àmplia àrea geogràfica (Sweeney *et al.*, 2007)²⁷. Durant el neolític en els primers cultius d'arròs, les llavors contenien un pericarpí de color vermell. Aquesta característica està actualment repartida entre totes les diferents varietats dins de 5 grups geogràfics. Però aquest canvi va aparèixer en dos grups independents, en el subgrup d'*Oryza sativa* var. Indica i en el subgrup *Oryza sativa* var. japonica. Segons Sweeney, s'ha identificat variants amb la mutació que dona fenotip de llavor blanca en 337 varietats en contraposició amb les 103 varietats vermelles sense la mutació, indicant que s'ha guanyat variabilitat genètica gràcies a l'acció de l'home. L'augment de la rellevància en quant a nombre de noves varietats i en superfície plantada s'explica gràcies a que la mutació sembla que ofereix avantatges en la cocció al ser menys dur el pericarpí. Per aquest motiu els agricultors van anar seleccionant i compartint progressivament i de forma ràpida aquesta varietat amb aquest caràcter. Paral·lelament i en una altra regió geogràfica, va aparèixer en una altra varietat el mateix caràcter i en el mateix gen, però una mutació diferent. Els caràcters que eren útils pels agricultors del neolític i en etapes posteriors, foren fixades d'una forma més ràpida del que es pot reflectir en anàlisis arqueològics.

Però les necessitats dels primers agricultors no han de ser forçosament les mateixes que els agricultors de l'actualitat. Apart de la domesticació, tal i com hem vist, un altre fenomen ha actuat en la dispersió i utilització dels diferents tipus de cultius.

1.3.-Nous criteris de selecció de fenotips en la actualitat

A part de la domesticació com a un tipus de selecció artificial, va aparèixer un altre procés de forma intencionada, anomenat creuament artificial (millora de cultius o millora genètica). És a dir, tot i no conèixer els conceptes de gen, genotip, proteïna i fenotip, els agricultors podien apreciar els caràcters i la seva transmissió en les consecutives generacions. D'aquesta forma podien seleccionar aquells caràcters més desitjables, a partir de la hibridació entre individus, i seleccionant la descendència a través de l'observació del caràcter que els era favorable. Però progressivament, i amb l'aparició d'avenços en el camp de la genètica, el criteri a l'hora de buscar noves varietats, s'està enfocant a nivell genètic. Així doncs, sovint, un caràcter determinat, és degut a l'acció d'un gen, o bé a l'acció de varis gens, ja sigui mitjançant un complex de proteïnes, o bé, regulant l'expressió i actuació d'aquests.

Les necessitats alimentaries de les poblacions ancestrals no son les mateixes que les actuals per tant les característiques ideals que es busquen en les espècies seran lleugerament diferents. Però seria més correcte afirmar que les societats actuals han arribat al seu nivell de complexitat gràcies a l'evolució dels cultius (Ross-Ibarra *et al.*, 2007)²⁸. Autors com Pääbo creuen que cultius més productius van permetre mantenir civilitzacions amb més nombre d'individus, que a la seva vegada van contribuir en un augment de la complexitat i estratificació social d'aquestes (Pääbo 1999)²⁹. Per tant la millora genètica primitiva va suposar un canvi substancial al permetre que alguns d'aquells grups poblacional humans, fessin un pas de caçadors/recol·lectors, a agricultors.

Aproximadament un 70% de les calories promig de la ingesta humana provenen de 12-15 tipus diferents de cultius al voltant de tot el món (FAO:Faostat 2008)⁴⁷ fet que ha anat canviant des de fa 10.000 anys fins a l'actualitat. Les espècies seleccionades actualment estan molt més diversificades que en l'antiguitat. Podríem dir que els esforços que es dedicaven en l'antiguitat estaven centrats al voltant de menys de 12 espècies i la majoria eren els cereals (blat, ordi, civada, arròs, mill), però avui en dia i degut a la acció humana, la diversificació és major.

La diversitat en cultius es calcula comparant el nombre de varietats de cada espècie/ha, i està correlacionada, amb el nombre de zones de producció o granges (Devra *et al.*, 2008)³⁰

Degut a l'acció humana i a partir de zones de domesticació diferents, han aparegut moltes noves varietats amb característiques diferents, que s'han anat diversificant al llarg de diverses àrees geogràfiques. La domesticació ha comportat que alguns gens es vegin afavorits respecte d'altres, en comparació amb les varietats salvatges, però per altra banda, la selecció artificial

ha produït noves varietats tot i que han vist força reduïda la seva capacitat de supervivència sense l'acció humana (Sweeney *et al.*, 2007)⁷

Tot i que a partir de les varietats salvatges que contenen una gran diversitat genètica, s'ha anat produint la selecció artificial. Aquestes espècies salvatges son molt importants ja que funcionen com a un gran banc genètic, que conté molts caràcters desitjables.

Avui en dia, encara es treballa en millorar espècies com els cereals, que encara son la base de l'alimentació humana, amb un ventall superior de característiques desitjables que van des de la mida de la planta, la composició de les llavors en sucres o lípids fins a la resistència a malalties. Podríem definir aquestes característiques desitjables fent referència a la part vegetativa de la planta (característiques fenotípiques de tipus vegetatiu), en que es millora, en diferents aspectes, l'estructura de la planta, la resistència als atacs d'insectes, la resistència a créixer en sòls desfavorables de tipus físic/químics, és a dir, la millora de tots aquells caràcters que no son la producció de llavor, però que ajuden a que la planta produeixi més.

1.3.1.-Millora de característiques relacionades amb la producció i el rendiment

Una altra característica general en els grans cultius adaptats per al consum humà i que han estat àmpliament millorats, és la capacitat de donar més d'una floració a l'any. Actualment existeixen diverses varietats de *Pisum sativum* que permeten més d'una sembra anual, sempre que la temperatura ho permeti. Aquestes varietats no son dependents de fotoperíode (o insensibles a fotoperíode) i tenen una reducció dels dies des de la sembra fins a la floració (Weeden 2007)³¹. Passa quelcom semblant amb l'arròs, que des de la revolució verda s'ha anat incrementant la producció de llavors i s'ha anat reduint el temps entre sembra. L'exemple més clar és el de les darreres varietats aconseguides per investigadors xinesos, anomenades super-arròs on han aconseguit produccions de fins a 12 Tm de llavor/ha en algunes de les noves varietats tipus Liangyoupeijiu (Katsura *et al.*, 2007)³². Aquestes noves varietats permeten una obtenció de collita cada quasi 90-120 dies anuals i això significa de 2 a 3 recollides anuals en les zones tropicals.

Per altra banda, un altre caràcter desitjable que s'ha anat seleccionant al llarg de temps, és la mida de la planta. Un arbre o cereal petit té l'avantatge de dedicar menys recursos a fabricar estructura de suport, és a dir, biomassa no aprofitable en detriment del fruit. Per tant una mida petita de la planta, a igual producció és un factor desitjable de cara a facilitar la recol·lecció. El nanisme en cereals, és útil per altres aspectes, sobretot en l'aspecte físic, ja

que una planta nana resisteix millor l'efecte del vent. L'efecte del vent provoca en el cereal, que es trenqui, i s'ajegui afavorint la proliferació de malalties com pot ser l'aparició de fongs i insectes, i la pèrdua de la producció. Aquest fou el gran èxit que marcà l'inici de la revolució verda, l'aparició d'una planta nana de blat. Posteriorment, s'han creuat amb aquelles varietats per tal de trobar plantes nanes que tinguin un sistema radicular reduït per tal de gastar menys aigua i recursos però mantenint la producció (Waines *et al.*, 2007)³³

En el cas de l'arròs, si s'ajeu per l'acció del vent, al créixer en aigua, la pèrdua de la producció és segura. Per aquests motius, al llarg dels anys s'han anat seleccionant aquells mutants que tenien una producció major i una mida menor. D'aquesta manera, s'han buscat aquells mutants que redueixen la mida de la planta, tocant la ruta metabòlica de les gibberel·lines (Peng *et al.*, 1999)³⁴.

Tenint en compte la literatura, actualment hi ha força interès en els mutants del gen stay-green (SGR), que consisteix en allargar la vida de la planta (sobretot en cereals que son espècies de creixement anual) i concretament de la fulla bandera (en monocotiledònies) que de forma indirecta seguirà augmentant la productivitat de les llavors (Thomas *et al.*, 2000)³⁵. Aquest tipus de mutació està relacionat amb la degradació de la clorofil·la, on les fulles no es tornen grogues i romanen verdes més temps. Com més temps romanguin verdes les fulles, més aliment destinen a la llavor, i d'aquesta forma s'augmenta la producció. En capítols posteriors dedicarem una major extensió a comprendre com aquesta característica és altament desitjable en arròs i com la informació provinent del blat de moro ens pot ajudar a obtenir varietats d'interès agronòmic.

1.3.2.-Millors relacionades amb la resposta a l'estrès abiòtic

La resistència a la salinitat és una altra característica desitjable (Wang *et al.*, 2003)³⁶, degut a que cada cop s'utilitzen més terres per tal de poder produir més aliment. Aquestes terres moltes vegades, disten de ser les òptimes per tal de poder-hi produir de forma intensiva. I per altra banda, les terres que tenen salinitat en capes inferiors, a base de fer-les de regadiu, aquesta sal aflora a la superfície degut a la succió que provoca el regadiu i l'assecat. Sigui quin sigui el fenomen que provoca la salinització de les terres, limitarà la producció. Per tal d'utilitzar aquestes terres i evitar els problemes d'estrès que provoca la salinització, s'han buscat fenotips resistents a l'excés de sal. L'equip de Roessner han analitzat varietats resistents de *Hordeum vulgare*, i han trobat que les varietats susceptibles a la salinitat presenten necrosis produïda per senescència (Widodo *et al.*, 2009)³⁷. La resposta fotosintètica

a l'estrès per salinitat és un procés complex que inclou molts processos cel·lulars. Els efectes, dependran de la intensitat i la duració de l'estrès hídric i dels efectes prolongats de la fotorespiració oxidativa que al produir radicals lliures ataquen a les estructures de la cèl·lula (Wingler *et al.*, 2000)³⁸ Per altra banda, les varietats resistents s'han trobat alts nivells d'hexoses fosfats (productes de la TCA, la ruta metabòlica del citrat) o bé una reducció dels nivells dels enzims fotorespiratoris o de la Rubisco³⁶. Per altra banda l'equip de Chen han trobat en soja (*Glycine max*), el gen GmPHD2 que està dins del grup de proteïnes Alfix tipus 1 PHD finger (Wei *et al.*, 2009)³⁹. Han trobat que sobreexpresant aquest gen, s'incrementa l'activitat del peroxisoma. D'aquesta forma es redueix els nivells de H₂O₂, conferint certa tolerància a la salinitat. Aquest mateix grup ha treballat en la sobreexpressió de dos factors de transcripció de Soja (*Glycine max*) en *Arabidopsis thaliana*, el GmGT2-2A i GmGT-2B. Aquestes *Arabidopsis* toleraven fins a sòls amb una presència de 180mM de NaCl i sembla que és degut a que incrementen l'expressió del gen DREB2A relacionat amb la ruta antioxidativa i del gen RCI3 relacionat amb els peroxisomes (Zong-Ming *et al.*, 2009)⁴⁰ Per tant, hi ha força estudis relacionats a trobar fenotips resistents o tolerants a la salinitat i a buscar els mecanismes relacionats en la protecció o en la desintoxicació.

1.3.3.-Millors en espècies amb noves aplicacions

Altres característiques apreciades en el fruit, poc tenen a veure amb l'alimentació. Per exemple, en el cas dels biocombustibles. L'ús d'olis extrets de plantes, com *Brassica oleracea*, *Jatropha curcas*, *Simmondsia chinensis* (jojoba), son àmpliament utilitzats per la indústria bàsica de la cosmètica, carburants, lubricants, plàstics entre altres, per tant la optimització d'aquestes espècies per la seva utilització, és també un objectiu potencial per la recerca de millora genètica. Recentment, aquest tipus de cultius, que temps enrere havien perdut interès, han centrat l'atenció de nou. L'encariment del petroli, o la necessitat de generar combustibles, més sostenibles, han impulsat de nou l'ús d'aquest tipus de cultius. Sobretot la indústria de carburants, s'ha centrat en la elaboració de biocombustibles a partir de blat de moro (*Zea mays*), o arròs (*Oryza sativa*), degut al seu baix cost i al seu relatiu rendiment. Un dels principals problemes que es troba el motor diesel per utilitzar biocombustibles és la viscositat elevada, que hi ha al pistó durant la compressió de la ignició. Però mitjançant una reacció química de transesterificació via metanol supercrític aconseguen reduir la viscositat i fer més fluid el combustible (Demirbağ 2002)⁴¹. Aquests estudis i altres, han aconseguir perfeccionar la purificació d'olis provinents de llavors (Huber *et al.*, 2006)⁴², obrint les portes a

la utilització de llavors de *Brassica napus*, *Glycine max*, La millora en aquestes varietats està enfocada a l'obtenció de mutants que produeixen olis amb continguts específics d'àcids grassos.

Totes aquestes característiques desitjables en les noves espècies es poden aconseguir utilitzant les noves tecnologies de que es disposa avui. Tot seguit farem un repàs a les que creiem que son més rellevants i que ens han dut a l'elecció de la que s'utilitzarà en aquest treball.

1.4.-La millora genètica vegetal en l'actualitat

Tal i com hem vist, els criteris seguits pels agricultors del neolític han anat canviant en funció de les necessitats que anaven apareixent. El mètode emprat per obtenir les varietats també ha anat canviant així com el mètode de cultivar aquestes varietats. La introducció d'animals per les feines de llaurar, la rotació de cultius, la hidràulica pel regadiu, la fertilització entre altres han ajudat a obtenir millors rendiments de producció. En aquest apartat ens centrarem en com ha ajudat la ciència a seleccionar nous caràcters i com la tecnologia ha permès treure al mercat noves varietats d'interès.

1.4.1.- Aplicació de la genètica clàssica en la millora genètica

Durant els anys 50 i 60 davant la falta d'aliments i augment de població per alimentar, alguns països en vies de desenvolupament van buscar solucions a la poca productivitat dels seus cultius. A partir de l'anàlisi de varietats de diferents regions es van generar híbrids més productius, que combinats amb l'aplicació de fertilitzants químics i insecticides, van permetre un increment molt significatiu de la producció mundial dels principals cultius. A aquest fenomen mundial se l'anomenà Revolució verda i va comptar amb el treball conjunt d'institucions públiques i organitzacions privades (Khush 2001)⁴³

Per citar exemples, direm que a Mèxic durant els anys 50 el Centre Internacional de Millora de Blat i Blat de Moro (en anglès CIMMYT) va començar un nou programa de millora genètica per tal de trobar noves varietats més productives en blat de moro (*Zea mays*) i que a la vegada fossin més resistents a la sequera. En aquest mateix país, van generar noves varietats per blat (*Triticum sp*) i juntament amb l'ús de fertilitzants combinats amb pesticides que va permetre quadruplicar la producció de blat en 20 anys (Waines *et al.*, 2007)⁴⁴. Per altra banda, el CIMMYT va col·laborar amb Brasil i l'organització Pirana State Cooperative per tal de generar blat resistent a la toxicitat al l'alumini (*Triticum sp*). Aquesta col·laboració va acabar generant

unes varietats resistents a l'acidificació del sòl i a la toxicitat de l'alumini, que eren al cap de 10 anys, un 30% més productives que les velles varietats (Klush 2001)⁵⁶. En altres països passà quelcom semblant. A Filipines l'institut de recerca de l'arròs (IRRI) va desenvolupar una nova varietat d'arròs anomenada IR8 (IRRI 1967)⁴⁵, que era semi-nana, a partir de les varietats Peta (d'Indonèsia) i Dee Geo Woo (Xina) (Spielmever *et al.*, 2002)⁴⁶. La utilització d'aquestes noves varietats incrementà la producció d'altres països com la Índia i Xina. Aquests exemples situen a la genètica en combinació amb l'enginyeria agronòmica com a artífexs de l'agricultura moderna.

Actualment es cultiva de forma intensiva i extensiva les varietats de 3 espècies; arròs (*Oryza sativa*), blat (*Triticum aestivum*) i blat de moro (*Zea mays*) que parteixen de varietats millorades prèviament. Tal i com es pot veure en la taula 2 la producció anual de l'any 2007 en comparació amb la producció de l'any 1961 per les tres espècies ens dona informació en tones mètriques de la importància d'aquests cultius i la evolució que han seguit.

	1961	2007
	Producció llavor (Tm)	Producció llavor (Tm)
Arròs	215·10 ⁶	660·10 ⁶
Blat de moro	205·10 ⁶	784·10 ⁶
Blat	222·10 ⁶	605·10 ⁶

Taula 2: Increment de la producció total, de les tres espècies més importants a nivell mundial. Dades provinents de FAOSTAT⁴⁷

Segons dades de la USDA⁴⁸ cada cop hi ha un increment de producció major, però tot i que hi ha un increment de la superfície conreada, el rendiment dels cultius es major. Per posar un exemple, la superfície d'arròs a nivell mundial l'any 1961 era de 115 milions d'hectàrees en comparació a les 155 milions ha de l'actualitat, però el rendiment ha passat de 1869 kg/ha a 4233 kg/ha a nivell mundial. L'alta adaptabilitat de l'arròs, tot i necessitar grans quantitats d'aigua per créixer i desenvolupar-se, l'ha fet que fos la segona espècie més conreada del món amb una producció mundial de 660 milions de tones mètriques (FAO) en una superfície de 155 milions d'hectàrees dedicades a aquest tipus de cultiu. Per altra banda és una de les espècies més consumides del planeta amb un consum anual de 432 milions de tones (USDA 2009).

D'aquesta forma, la selecció artificial ha anat incrementant el rendiment de les espècies d'interès pel consum humà, i ha influït no només en característiques quantitatives, sinó que s'han modificat característiques qualitatives, que han incrementat la seva adaptabilitat en ambients molt diferents dels òptims. Però la millora genètica en plantes va tenir un escenari completament diferent, gràcies a l'avenç de la química i la biologia, que marcarien els següents

passos a seguir. En els següents apartats es descriuran aquests canvis i les noves tecnologies utilitzades per la millora genètica de diversos cultius.

1.4.2.-De gen a fenotip. Contextualització històrica

Tal i com hem vist en anteriors apartats, la selecció artificial ha estat un procés essencial per l'adaptació de plantes silvestres a plantes aptes pel cultiu humà. La domesticació va implicar la selecció de certs fenotips en àrees d'origen concretes i la seva introducció en àrees de dispersió. Molts anys més tard, hi ha hagut una millora de les espècies vegetals domesticades i introduïdes utilitzant el coneixement científic. Aquest tipus de millores començà amb la comprensió del funcionament de les plantes a nivells més bàsics. El funcionament de l'herència descobert per Mendel dóna les premisses bàsiques per entendre com els caràcters es poden transmetre a les següents generacions (Mendel 1966)⁴⁹. Mendel va treballar observant el que passava amb certes característiques visibles de dues plantes progenitores de pèsol (*Pisum sativum*) al creuar-les entre elles. Analitzant en la descendència el que ell va anomenar com a caràcters va descobrir que seguien un patró numèric. Aquests estudis van permetre predir com es comportaria la transmissió de cert caràcter sense encara saber el mecanisme. El botànic Wilhelm Ludvig Johannsen estudià l'herència de caràcters entre plantes i encunyà el terme de gen, per definir el terme d'herència corresponent a una característica a la que es referia Mendel (Johannsen 1905)⁵⁰. Definí genotip com aquell conjunt de característiques que componen a una planta o conjunt de gens. Anomenà fenotip als resultats visibles de la interacció entre el genotip i l'ambient.

Posteriorment i gràcies a estudis realitzats per Griffith, l'equip de Oswald Theodore Avery, Colin McLeod i Maclyn McCarty van descobrir com una molècula era la responsable de la transmissió de la informació entre bacteries del gènere *Neumococcus* (Avery *et al.*, 1944)⁵¹. Aquesta molècula responsable de la transmissió d'informació era l'ADN. Kornberg fou el primer en fabricar vida en un tub d'assaig (Watson 2003)⁵². L'equip de Kornberg va descobrir la DNA polimerasa al 1958 i va copiar DNA a partir d'un filament patern i utilitzant la polimerasa de *E. coli* (Lehman *et al.*, 1958)⁵³. Però foren Watson i Crick junt amb els estudis de Rosalind Franklin i Maurice Wilkins els qui van trobar quina era l'estructura de la molècula de la transmissió d'informació entre organismes (Watson *et al.*, 1953)⁵⁴. Aquest conjunt d'estudis va suposar un nou enfocament a la química de la vida, però la genètica avançà un pas més davant les investigacions de Nirenberg i Matthaei que descobriren el funcionament del codi genètic utilitzant RNA sintètic (Matthaei *et al.*, 1962)⁵⁵ ⁵⁶. És a dir, van relacionar la informació dels triplets de mRNA i els aminoàcids que formen la proteïna.

D'aquesta forma es va tenir una evidència del cicle complet de mecanismes implicats en la transmissió de la informació entre organismes. La relació química entre el gen (genotip) i el caràcter (fenotip) és produïda a través de les molècules de ADN i proteïna. A partir d'aquest punt, es va començar a buscar el significat del DNA dels organismes. Molts investigadors es van preguntar en què consistia la informació genètica que contenen els organismes. Començà la era de la genòmica amb el primer gen que es va conèixer completament la seva seqüència. Fou el gen de la cua del bacteriòfag MS2 descobert per l'equip de Fiers (Jou *et al.*, 1973)⁵⁷ i quatre anys més tard el mateix equip seqüencià completament el genoma en RNA del bacteriòfag MS2 (Fiers *et al.*, 1976)⁵⁸.

Durant aquells anys, Herb Boyer i Stanley Cohen, comencen a treballar amb el que més endavant seria conegut com la tecnologia del DNA recombinant. A partir d'enzims de restricció Herb Boyer, era capaç de tallar i empalmar fragments de DNA. Aplicant aquesta tècnica als plàsmids de Stanley Cohen, van ser capaços d'introduir fragments de DNA de granota dins d'un plàsmid de *Escherichia coli* (So *et al.*, 1976)⁵⁹. Aquest tipus de tecnologia seria molt útil per la investigació de tot tipus d'organismes, per tal de poder replicar material genètic. Aquest descobriment va permetre produir sintèticament insulina humana mitjançant la tecnologia recombinant. Fou una de les primeres utilitats comercials que integrà tot el coneixement de més de quasi 100 anys de ciència de la genètica (Boyer 1981)⁶⁰.

S'ha d'esmentar la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa com una de les tècniques que més han ajudat en la genòmica, descoberta inicialment per Klepple (Klepple *et al.*, 1971)⁶¹ però millorada i patentada per Karl Mullis (Mullis *et al.*, 1985)⁶². Aquesta tècnica permet obtenir grans quantitats de DNA a partir d'una quantitat menor, essent molt útil com a tècnica de biologia molecular en la identificació i classificació de virus i bacteries, en la identificació de gens i com a complement de moltes altres tècniques (Barlett 2003)⁶³

Altres tècniques i noves metodologies van ajudar a entendre la informació continguda en els gens de diversos organismes. D'aquest mode, va aparèixer un mètode per la seqüenciació de DNA (Sanger *et al.*, 1977)⁶⁴ descobert pel grup de Fred Sanger, Walter Gilbert, i Allan Maxam, que un cop automatitzat fou àmpliament utilitzat permetent avançar en el camp de la genòmica.

La seqüenciació automatitzada combinada amb la informàtica va permetre posteriorment la computació de moltes seqüències de grups diversos i generar les bases dels primers bancs de dades a escala global, per tal de compartir la informació entre tots els grups (com per exemple el NCBI al 1988). Utilitzant varis d'aquests seqüenciadors automàtics es va poder seqüenciar completament el genoma humà a principi del segle XXI entre altres genomes (IHGSC 2000)⁶⁵

(Venter *et al.*, 2000)⁶⁶. L'any 2000 un equip multidisciplinari aconseguí completar la seqüència d'una planta, l'*Arabidopsis thaliana* amb els seus 5 cromosomes (Arabidopsis genome initiative 2000)⁶⁷ i 5 anys més tard apareixia la seqüència completa d'un altre organisme amb un interès molt gran al ser la segona planta més productiva del planeta, l'arròs (International Rice Genome Sequencing Project 2005)⁶⁸.

La seqüenciació del DNA ha suposat un avenç en la investigació biomèdica, com en molts altres camps. El mateix 2005 va aparèixer una altra tècnica basada en la piroseqüenciació 5' en pous de picolitres, que ha revolucionat la investigació en genètica. L'equip de Rothberg va dissenyar una tècnica, que ha aconseguit augmentar la velocitat de seqüenciació de 400-600 Mbp (Megabases) en 10 hores permetent seqüenciar genomes en un sol dia, com les 580 kbp de *Mycoplasma genitalium* (Margulies *et al.*, 2005)⁶⁹. Aquesta tècnica permetrà en un futur seqüenciacions personalitzades molt útils en medicina.

Totes aquestes tècniques han permès que la genètica molecular sigui la ciència que estudia el comportament molecular dels processos relacionats amb els gens a nivell d'estructura i funció. La integració de tot aquest coneixement i l'aplicació de les tècniques d'anàlisi i manipulació molecular ha obert una nova possibilitat en la generació de noves varietats com es comentarà a els progressius apartats

1.4.3.-Forward Genetics

Segons la definició de Enciclopaedia, Forward Genetics, és un tipus d'aproximació en genètica que té com a finalitat identificar el gen que genera una funció particular partint d'un fenotip (2009)⁷⁰. Hi ha la possibilitat d'identificació d'un gen que controla una funció particular, a partir d'un fenotip mutant. Els mutants aporten pistes sobre funcions controlades genèticament així com marcadors genètics que indiquen la regió del genoma que conté el gen responsable. Algunes de les tècniques utilitzades, fou el clonatge posicional, que consistia en aïllar i clonar un gen a partir d'una proteïna (relacionada per exemple amb alguna malaltia). La tècnica consisteix en generar marcadors genètics sense tenir informació prèvia i generar sondes amb les quals podem utilitzar-los per trobar el gen dins d'una llibreria genètica per exemple. Amb aquesta tècnica s'ha trobat en gens responsables diverses malalties com la Corea de Huntington (Gusella *et al.*, 1983)⁷¹ o la fibrosi quística (1989)^{72 73 74} o la atàxia de Friedreich⁷⁵

Una altra tècnica emprada fou la generació de llibreries de DNA, tècnica que consisteix en generar una col·lecció de fragments de DNA que representa a tot el genoma d'un organisme en concret i insertar-lo dins de molts . Aquesta llibreria facilita el garbellat i l'aïllament d'un gen en particular (Maniatis *et al.*, 1978)⁷⁶ Les llibreries de DNA eren creades mitjançant fraccionament a partir d'enzims de restricció o per mètodes físics. Els fragments son insertats dins de plàsmids en cèl·lules i posteriorment congelats. Cada gen individualitzat en la llibreria és identificat mitjançant hibridació tipus Southern blott o bé mitjançant Western Blott en cas que sigui el producte de l'expressió d'un gen.

Hsiao i Carbon van desenvolupar una altra tècnica utilitzada en forward genètics és l'anomenada "chromosome walking ", que consisteix en generar un mapa físic per tal de seleccionar clons pertanyent a llibreries de DNA que continguin regions de solapament contigües i reconstruir l'ordre dels gens al llarg del segment del cromosoma (Hsiao *et al.*, 1979)⁷⁷. Per tal de poder-ho fer, es parteix d'un marcador molecular per tal d'identificar els gens adjacents fins a trobar el gen interessant. El clon inicial era fragmentat i cada fragment era clonat dins d'un plàsmid per ser utilitzat com a sonda per identificar la seqüència on hibridava o amplificat per PCR. A partir d'aquí, s'utilitzava el producte com a sonda en una llibreria i s'amplificaven fragments que eren seqüenciats. Mitjançant el solapament de les seqüències adjacents era seqüenciat el fragment major fins identificar la seqüència del gen. Com més pròxims al gen d'interès estiguin els marcadors moleculars, abans s'hi arribava.

El mapeig genètic és un altre tipus de genètica Forward que consisteix en situar sobre el cromosoma els diferents fragments identificats a partir d'una llibreria genètica.

Hi ha varis tipus de mapes físics diferint en escala i detall, com per exemple la tinció de bandes, que serveix per generar **mapes citològics** i per establir patrons que serviran per detectar les grans anomalies com les delecions cromosòmiques. Altres tècniques son els **mapes tipus contig**, que solapant la informació provinent de llibreries es pot completar la informació cromosòmica (Botstein *et al.*, 1980)⁷⁸ Durant aquest període de temps concret, tal i com ho descriu Michael R Culbertson, fou una "navegació sense mapa de carretera", ja que s'anaven trobant mutants fenotípics en diverses espècies, però sense saber res sobre el seu genotip (Culbertson 2007)⁷⁹. Poc a poc es va anar estudiant la posició que els gens ocupaven dins dels cromosomes, a través de les freqüències de recombinació, mapeig, QTL. Les noves tècniques com la Reacció en Cadena de la Polimerasa (Mullis 1983), o finalment la seqüenciació d'una espècie com *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis Genome Initiative* 2000)⁸⁰ va permetre la identificació de molts gens i relacionar certs fenotips en altres espècies.

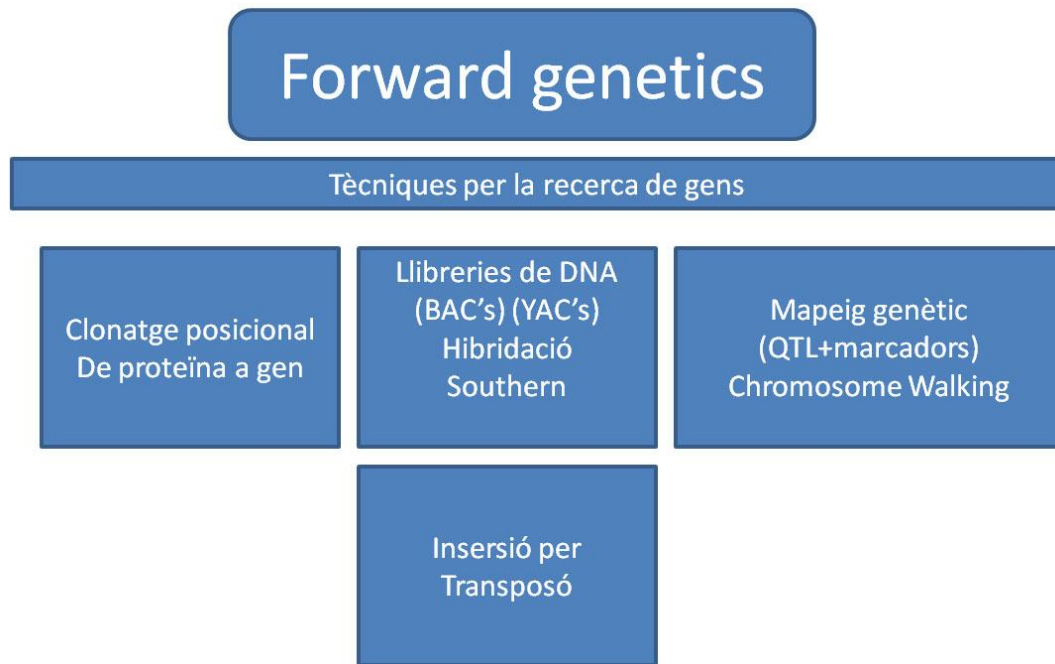


Figura 2: Resum de les tècniques emprades en Forward genetics, per identificar un gen.

1.4.4.-Genètica reversa

A mesura que les tècniques de biologia molecular es perfeccionaven i es feien més accessibles a més grups de treball, van aparèixer més estudis incrementant el coneixement dels gens i la seva funció. La seqüenciació, va permetre identificar aquells gens que generaven fenotips mutants així com completar els genomes de diversos organismes. Gràcies a les llibreries, genoteques i les tècniques de seqüenciació per gels d'acrilamida van permetre identificar els nucleòtids que constituïen la seqüència bàsica de cada gen. Tot aquesta informació es va anar dipositant en grans bancs de dades per poder compartir entre els diferents grups de treball.

La genètica reversa utilitza la informació acumulada en bases de dades, per tal de trobar el funcionament dels gens i per l'establiment sistemàtic de la relació gen-fenotip de gens de seqüència coneguda mitjançant la inactivació o modificació de l'activitat del gen en qüestió. En la figura 3 es resumeixen algunes de les tècniques emprades per tal de trobar la relació entre fenotip i genotip.

La inactivació es pot aconseguir de diferents formes, aleatòria (mutagènesis insersional, químic o de radiació) o dirigit (RNA d'interferència, recombinació homologa). Les aproximacions aleatòries, a mes a mes, requereixen el desenvolupament de mètodes identificació de les posicions dels canvis introduïts.

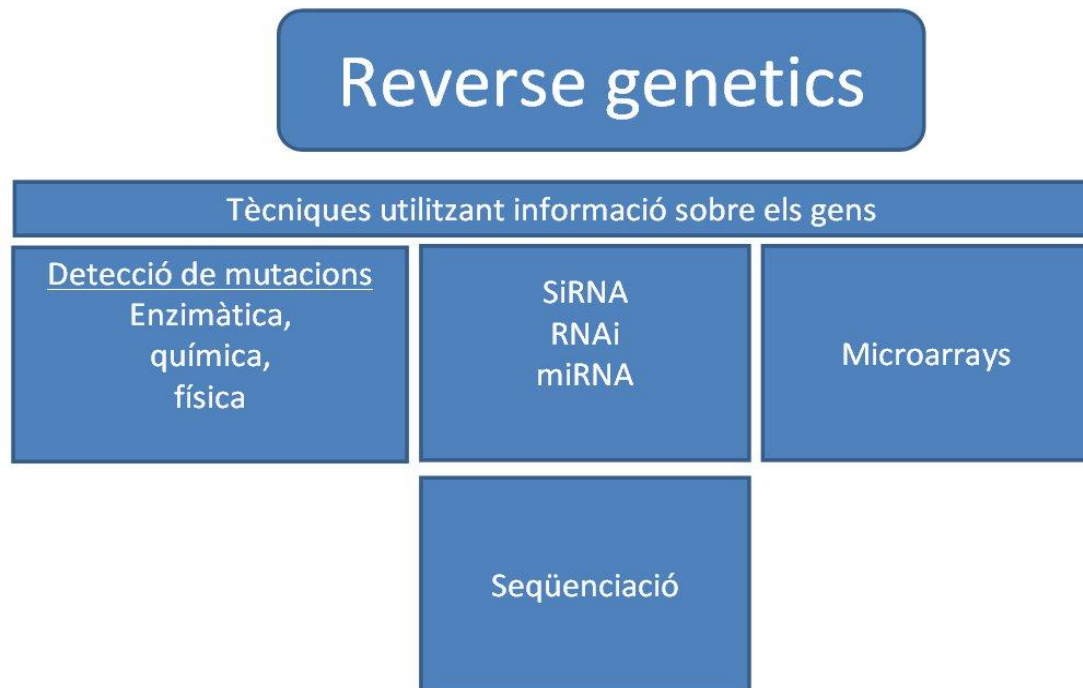


Figura 3: Conjunt de tècniques emprades en Reverse Genetics, a partir del coneixement previ del gen a estudiar .

1.5.-Tècniques per incrementar la variabilitat genètica

La variabilitat genètica és la mesura de la tendència dels genotips individuals en una població, a variar d'una altra. Es diferencia de la diversitat genètica, en què és la quantitat de variació apreciada en una determinada població. La variabilitat d'un caràcter descriu com aquest tendeix a variar en resposta a les influències genètiques i a l'ambient (Yale University 1995) ⁸¹. Per als estudis en genètica, sovint, s'ha d'alterar el fenotip per tal d'indagar en el funcionament d'un gen. Per tant, s'incrementa la variabilitat genètica utilitzant diferents tècniques, ja que d'una altra forma, es necessitaria molt temps, o fins i tot seria poc probable.

1.5.1.- Creuament natural com a font de variabilitat genètica

Tal i com s'ha explicat en aquesta introducció anteriorment, els creuaments naturals entre diferents varietats d'una espècie han introduït gens que han aportat caràcters que han estat utilitzats per l'home des dels principis de l'agricultura. Un exemple d'aquests és la introducció del gen *tb1* en des de teosintle a les diverses varietats de *Zea mays* (Doebley *et al.*, 1990)⁹ de la mateixa forma que el caràcter de coloració del gra d'arròs, on el gen *Rc* es va distribuir en altres poblacions (Sweeney *et al.*, 2007)⁷ El creuament natural o artificial entre diverses varietats és una font molt important per estudiar els gens. L'estudi sobre la distribució d'un

caràcter entre la descendència s'ha estudiat per localitzar un determinat caràcter i mapejar-lo (QTL). Aquests estudis han permès localitzar marcadors genètics que han servit posteriorment per acotar l'estudi d'un gen i localitzar-lo físicament sobre d'un cromosoma.

1.5.2.-Mutagènesis insercional

La tècnica consisteix en el disseny d'un fragment de DNA que salta de forma aleatòria dins d'un altre gen, o ens les proximitats d'aquest eliminant la seva funció, a través d'interferir en la seva expressió. La inserció de un fragment de ADN dins d'un gen no sols afecta a la seva funció, sinó que permet la identificació de la regió on s'ha insertat. Els element transponibles foren descoberts per Barbara McClintoch que va estudiar com es comportava l'herència del caràcter del color dels grans de blat de moro (McClintoch 1950)⁸². McClintoch investigava el comportament anòmal d'aquest caràcter, ja que no seguien els patrons mendelians d'herència de caràcters. Va descobrir que uns elements mòbils eren els responsables del canvi de patró de coloració de les llavors al insertar-se dins dels gens responsables de la coloració de les llavors (McClintoch 1953)⁸³. Les aplicacions d'aquest descobriment encara van tardar força temps en aparèixer.

No fou fins que l'equip de Martin començà a treballar amb elements transponibles per tal d'identificar el locus del gen pallida en *Antirrhinum majus* (Martin *et al.*, 1985)⁸⁴. Utilitzant el transposó Tam3 l'equip de Martin va generar unes línies de *Antirrhinum* amb mutacions en el gen *pal*. A partir d'aquí i mitjançant aquesta tècnica d'etiquetatge anomenada, transposon tagging van aconseguir una seqüència parcial del gen *pal* (Coen *et al.*, 1986)⁸⁵ a partir de clonar-lo i seqüenciar-lo.

L'equip de Benzer i l'equip de Goodwin van desenvolupar un mètode que permetia identificar un sol individu mutant utilitzant la inserció d'un element transponible en un gen donat en una població de centenars de mosques (Ballinger *et al.*, 1989)⁸⁶ i (Kaiser *et al.*, 1990)⁸⁷. Sabent la seqüència del gen a estudiar i la seqüència de l'element transponible, es possible dissenyar un garbellat per PCR que tan sols amplifiqués un producte específic del gen quan el transposó quedi insertat dins. Utilitzant un cebador específic del gen i un d'específic del element d'inserció es podria detectar si s'ha insertat correctament dins del gen i per tant, desactivant la seva funció (Koes *et al.*, 1995)⁸⁸.

La mida del producte d'amplificació indicarà la distància del primer del gen i la posició de la inserció. Aquesta tècnica permet trobar fins i tot els transposons que s'han insertat dins d'introns (és a dir mutacions silencioses), perquè la detecció es fa exclusivament a nivell genotípic i pot realitzar-se fins i tot si la mutació es heterogènia i no depèn del fenotip.

Un pas més endavant en la tecnologia es la eliminació del ús del cebador del gen específic: amplificant tots les seqüències flanquejants dels elements de inserció en una població, utilitzant només cebadors d'aquest i potser un cebador corresponent a un adaptador.

Una altra varietat d'aquesta tecnologia, és l'activation tagging, que consisteix en insertar un fragment de T-DNA mitjançant una bactèria, que conté un promotor molt potent.

A partir d'aquí, es podia sobreexpressar tot allò que estès darrera del promotor "de novo" per tal d'estudiar el seu efecte, i identificar-lo a la vegada (Sluys *et al.*, 1987)⁸⁹. L'equip de Koncz (Koncz *et al.*, 1989)⁹⁰ per altra banda va perfeccionar la tècnica transformant call d'Arabidopsis i insertant un promotor de virus junt a un gen de resistència a la higromicina, per tal de seleccionar aquelles plantes que havien introduït l'insert.

La tecnologia de la inserció d'elements transponibles tipus "activation tagging" es va utilitzar per generar una gran quantitat de mutants en una població d'Arabidopsis (Weigel *et al.*, 2000)⁹¹ (Alonso *et al.* 2003)⁹², generant una altra eina per poder indagar en el coneixement i el funcionament dels gens, a partir de la seva desactivació, com a aproximació en la genètica reversa. Detectant el canvi d'expressió de les plantes mutants respecte a un control mitjançant un chip de DNA, es van descobrir varies funcions i interaccions entre gens, anteriorment desconegudes. Posteriorment altres grups han utilitzat la mateixa tècnica, aplicada a altres espècies, com l'arròs (Jeong *et al.*, 2002)⁹³ o la civada (Ayliffe *et al.*, 2007)⁹⁴, trobant gens mutants relacionats amb la biogènesis i el desenvolupament vegetal, tot i que focalitzen l'atenció en el funcionament de gens relacionats amb la producció de llavors, o en el funcionament gens responsables d'omplir de midó el gra.

L'avenç en tecnologia, ha permès fusionar diverses tècniques, per tal facilitar la identificació de gens. Tal i com comentaven anteriorment, es pot detectar el gen on s'ha insertat un transposó a partir de l'amplificació de la regió coneguda del transposó.

Winterberg i Reznikov, (Winterberg *et al.*, 2007)⁹⁵ van establir el protocol per rastrejar llibreries mutades mitjançant l'ús de microarrays. Aquest equip van generar una població mutant d'*Escherichia Coli* en la soca K12, mitjançant un transposó que feien saltar dins del genoma per generar una població mutant d'aquesta soca. A partir d'aquí comparaven les

soques mutants fent-les créixer en un medi selectiu contra soques que creixien en medis rics. Per altra banda, van poder estudiar els transcrits in vitro a partir del promotor T7 que portaven els transposons. Aquesta nova tècnica va permetre generar i estudiar una població mutant, a nivell de genòmica i de transcriptòmica.

L'equip de Tanaka (Takabatake *et al.*, 2008)⁹⁶ ha treballat mitjançant la fragmentació de DNA amplificant DNA de línies de ratolí fent un mapejat genòmic complet, buscant elements transponibles amplificant DNA fraccionat i marcant-lo amb Cianidina Cy5 i Cy3 per tal de detectar-lo en micromatriu de DNA i han aconseguit localitzar les regions on s'inserten els IAP (partícula intracisterna A). Mitjançant la fragmentació i amplificació selectiva (primers degenerats) i rescat per biotina, seleccionaven fragments que posteriorment, hibridaven per micromatriu de DNA.

Per altra banda, Gerats and Maes, van implementar una tècnica per garbellar més quantitat d'individus utilitzant poblacions mutants i a partir de sondes individuals marcades, o marcant els fragments flanquejants i hibridant no tan sols una, sinó milers de sondes organitzats en micromatrius de ADN. (Maes *et al.*, 1999)⁹⁷ Aquesta tècnica permet garbellar un gran nombre de pools ja que es diposita el DNA de pools en una matriu on si existeix un mutant es detectarà simultàniament en l'anàlisi d'ordenades i en l'anàlisi de coordenades, sabent la posició exacta del pool. A partir d'aquí es pot analitzar en concret el pool per identificar individualment el mutant.

Una extensió d'aquesta tècnica seria la recent combinació de la inserció de fragments i la seqüenciació d'última generació (454 Life science) que s'ha realitzat en petúnia (Vandenbussche *et al.*, 2008)⁹⁸. L'equip de Gerats i Vandenbussche van generar una població de mutants en *Petunia sp* utilitzant l'element transponible dTph1. Utilitzant una estratègia de garbellat multidimensional de pools de DNA (Maes *et al.*, 1999)⁹⁷ i la piroseqüenciació van localitzar la planta mutant per a cada gen desactivat. Aquesta nova tecnologia permetia generar i localitzar un individu en concret dins d'una població mutant.

La tecnologia de la mutagènesis d'inserció ha servit per descobrir una gran varietat de gens mutants amb informació molt important, és a dir, com a tècnica per descobrir gens ha estat molt útil tot i que no és pot utilitzar per tal de generar una varietat comercial ja que conté inserts transgènics. A més a més, esta limitat a aquestes espècies que contenen un element mòbil conegut o que son fàcils de transformar amb agrobacteri.

1.5.3-La Transgènia

Aquesta tècnica molecular permet introduir una característica desitjable dins d'una espècie que mai abans l'havia presentat. Aquesta tecnologia utilitza eines de biologia molecular que permet la manipulació i transmissió de gens entre espècies. L'equip de Schilperoort (Marton *et al.*, 1979)⁹⁹ va començar a treballar en cèl·lules de *Nicotiana tabacum* amb el plasmid Ti (tumor inducer) d'*Agrobacterium tumefaciens*, desgranant els gens que estaven relacionats amb el seu mode d'infecció. Van descobrir que hi havia una forma de transmetre gens dins de la planta utilitzant un estadi cel·lular no diferenciat anomenat call.

La idea bàsica de la transgènia, és la introducció de gens forans, amb promotors l'alta expressió per tal que les cèl·lules, i posteriorment, els teixits desitjables, expressin una proteïna en concret. Però per tal d'aconseguir aquesta fita, s'ha de tenir en compte molts aspectes previs. Durant els anys 80 varis grups en diferents llocs i quasi al mateix temps van treballar en la inserció de gens de bactèria en cèl·lules vegetals, com gens de resistència a antibiòtics com la neomicina (Fraley *et al.*, 1983)¹⁰⁰ (Bevan *et al.*, 1983)¹⁰¹ o el cloramfenicol (Herrera-Estrella *et al.*, 1983)¹⁰²

A partir d'aquests descobriments es va veure les possibilitats que oferia insertar gens dins de plantes, sobretot en les monocotiledònies, ja que en aquest grup pertanyen les espècies més conreades del planeta. El grup de Schilperoort (Slogteren *et al.*, 1984)¹⁰³ van treballar amb les monocotiledonies *Narcissus sp* i *Chlorophytum sp*, i per altra banda el grup de Van-Montagu (Hernalsteens *et al.*, 1984)¹⁰⁴ van treballar amb *Asparagus officinalis*.

El principi bàsic de la transgènia consisteix en trobar el gen diana, que codifica per una proteïna única, que s'associa a un únic procés. Aquest gen s'inserta dins d'un plàsmid bacterià modificat que conté un promotor actiu (d'origen víric) que modularà l'expressió de la proteïna a nivell de teixit i regularà també el temps que s'expressarà. Generalment s'utilitzen promotors constitutius per tal d'expressar la proteïna en tot moment. A més a més, conté un gen de selecció del plàsmid que codifica per un gen de resistència a un antibiòtic, que s'utilitza per tal de seleccionar aquells vectors que han incorporat el gen d'interès. Per altra banda, també conté un gen de resistència a un antibiòtic, que servirà per seleccionar aquelles cèl·lules vegetals que hagin incorporat el gen d'interès. Normalment apart, d'aquests gens, també s'inclou un gen que reacciona a proves histoquímiques, o bé un gen de fluorescència com la GFP per tal de localitzar in vivo la incorporació del gen d'interès.

Tots aquests estudis van portar a l'empresa Monsanto¹⁰⁵ l'any 1996, a generar el primer organisme vegetal modificat de tipus comercial, la soja (*Glycine max*) Roundup Ready resistent al herbicida glifosat. El mateix any, CIBA seeds (ara Novartis) comercialitzà el blat de moro (*Zea mays*) KnockOut i NatureGard amb el gen Bt (CryIAb). L'any 1997 Monsanto anuncia que comercialitzarà el blat de moro (*Zea mays*) Bt-Xtra amb el gen de la toxina Bt (CryIAb). El mateix any apareix Liberty Link, un blat de moro (*Zea mays*) amb un gen de resistència a glufosinat-amoni desenvolupat i comercialitzat per AgrEvo¹⁰⁶. La mateixa empresa comercialitza l'any següent el Star Link, un blat de moro amb el gen de la toxina Bt Cry9C. Actualment, aquest tipus de millora genètica, és àmpliament utilitzada comercialment a Àsia i a Amèrica, tot i que en la resta del món genera controvèrsia a la població.

1.5.4.- La cossupressió, RNA supresor antisentit, siRNA i miRNA

Els estudis de Izant i Weinttraub sobre la supressió de la transcripció utilitzant RNA antisentit van demostrar la possibilitat de interrompre de forma reversible, l'acció d'un gen (Izant *et al.*, 1984)¹⁰⁷. Melton va aplicar RNA antisentit per tal d'inhibir l'expressió in vivo d'un mRNA cèl·lules in vivo (Melton 1985)¹⁰⁸. A partir d'aquests estudis es va demostrar que l'aplicació d'aquesta tecnologia tenia moltes possibilitats en diverses àrees, sobretot en medicina. Holt va sintetitzar un RNA antisentit en línies cel·lulars tumorals de ratolí (3T3) (Holt *et al.*, 1986)¹⁰⁹. Aquest era alliberat en l'organisme i al unir-se al RNA, es genera un hpRNA (hairpin RNA), un complex del propi organisme, que degrada l'RNA a mesura que es transcriu, inhibint la funció d'aquest. Tot i l'eficàcia d'aquesta tècnica, continua essent impossible d'utilitzar-la clínicament, per combatre el càncer, degut al mode de penetrar dins de l'organisme (Dias *et al.*, 2002)¹¹⁰. Tot i això, aquesta tècnica ha estat àmpliament utilitzada en varis camps d'investigació com a eina d'anàlisi de la funció gènica (Kusaba 2004)¹¹¹ on aquest tipus de RNA antisentit, és un regulador transcripcional força comú en mamífers (Katayama *et al.*, 2005)¹¹².

Per altra banda, l'equip de Jorgensen (Napoli *et al.*, 1990)¹¹³ va descobrir per casualitat que les seves flors de *Petunia sp* quimèriques, presentaven variegacions estranyes. Jorgensen volia sobreexpressar el gen de la Xalcona sintasa per tal d'incrementar la intensitat de coloració de les flors, però en comptes d'això va aconseguir desactivar reversiblement el gen d'algunes de les cèl·lules dels pètals. En comptes de tenir plantes amb flors de color, tenia flors de color magenta/violeta amb traces blanques. A aquest fenomen el van anomenar cossupressió i el seu efecte era degut a RNA antisentit degut a les duplicacions i inversions del constructe

insertat. El seu estudi va determinar que l'efecte de la cossupressió depenia de la distància del gen insertat al gen homòleg. Per altra banda i quasi al mateix temps, l'equip de van der Krool van observar en *Petunia* la cossupressió dels gens degut a la sobrepressió (Van der Krool *et al.*, 1990)¹¹⁴. Van detectar una reducció significativa de mRNA i que aquest és el motiu per la disminució de pigmentació en les seves flors. Per altra banda, estudis realitzats amb tabac suggereixen que el grau de cossupressió està correlacionat amb la metilació (Ingelbrecht *et al.*, 1994)¹¹⁵.

Posteriorment l'equip de Dennis treballaren en la supressió de la Metil transferasa (MET1) mitjançant un RNA antisentit en *Arabidopsis* (Finnegan *et al.*, 1996)¹¹⁶. Van infectar i segregar la descendència, i fins i tot les plantes que no contenien el constructe (i no expressaven l'antisentit) tenien problemes de creixement, així com d'infertilitat. Amb aquesta tècnica es va demostrar que durant la meiosi la metilació de cisteïnes és fonamental pel correcte desenvolupament de la planta. En animals, fou l'equip de Mello els que van demostrar que la resposta inhibidora era major, si injectaven doble cadena de RNA, és a dir, els efectes podien ser majors amb menor quantitat de RNA, i fins i tot en la següent generació (Fire *et al.*, 1998)¹¹⁷. Però no fou fins al 1999, en que Hamilton i David Baulcombe van descobrir que l'acció de un RNA de 20-25 nucleòtids (anomenat posteriorment siRNA), podia actuar inhibint la transcripció de RNA (Hamilton *et al.*, 1999)¹¹⁸. El siRNA prové d'un dsRNA (RNA doble cadena) que és processat per la Riboendonucleasa III (DICER) i amplificat per la RdRP (RNA-dependent RNA polimerasa) formant petits siRNA de doble cadena. Aquests són separats entre la cadena complementària del siRNA i la cadena passatgera que serà degradada. La cadena complementària siRNA s'uneix a la proteïna AGO (Argonauta) dins del complex RISC (RNA-induced silencing complex), que reconeix el mRNA a silenciar. És la proteïna DICER del complex RISC, la que tallarà el mRNA a silenciar (veure Figura 4).

L'aplicació d'aquesta tècnica implica generar plantes transgèniques que expressin un repressor de la traducció com el que ha fet l'equip de Polverari que ha dissenyat un dsRNA, per tal d'inactivar el gen *ihproC-PP197*, que confereix resistència a la planta *Nicotiana benthamiana* al virus Plum Pox (família Potyviridae) (Pandolfini *et al.*, 2003)¹¹⁹. Aplicant el coneixement sobre la inactivació post-traducciona van crear una resposta de siRNA contra el gen de resistència *ihproC-197* en *Nicotiana benthamiana*, de tal forma que al infectar la planta amb el virus, es generava una resposta de resistència al virus, que era bloquejada pel siRNA, resultant infectada la planta. D'aquesta forma van poder demostrar que la resistència era degut a aquest gen en concret. Recentment, un grup de Nova Delhi, ha aconseguit bloquejar la

maduració de fruits de tomata, permetent que aguantin fins a 45 dies més que el control. Han sintetitzat un constructe amb que codifica per dos siRNA, bloquejant una α -manosidasa i una β -D-N-acetilhexosaminidasa, reduint considerablement la maduració al retardar la formació de etilè en fruit (Meli *et al.*, 2010)¹²⁰.

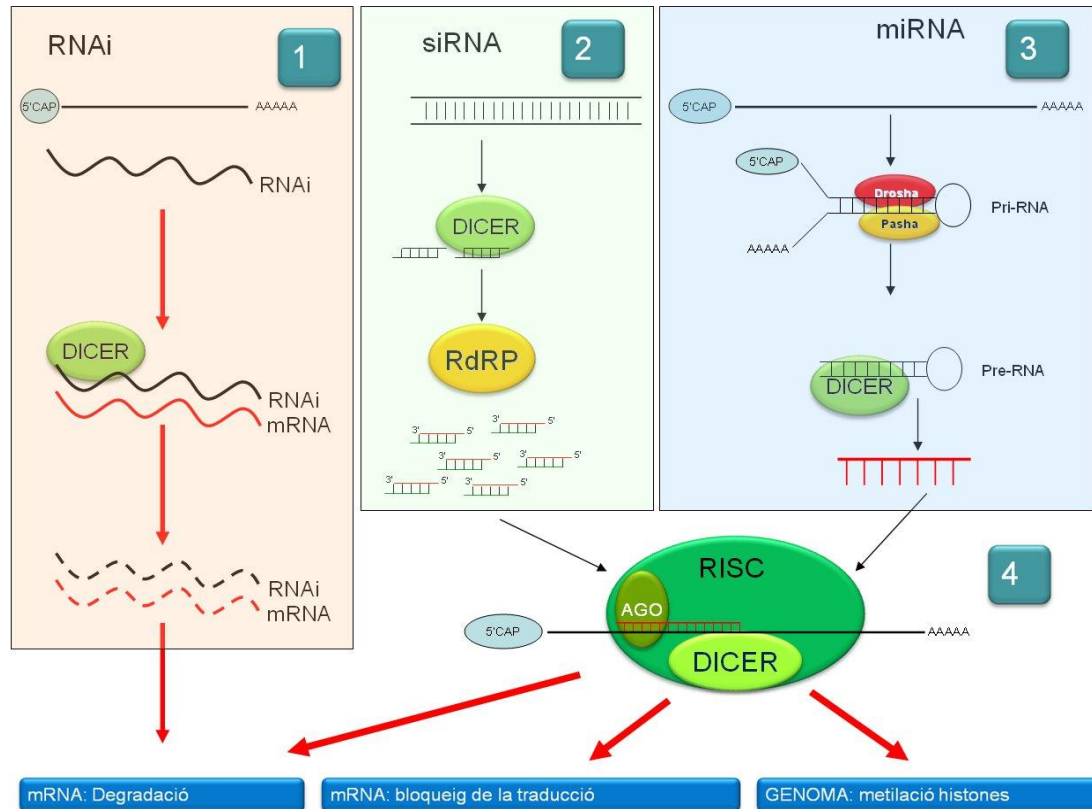


Figura 4: Diferents tipus de RNA d'interferència depenent del seu origen i de la seva funció: **1.-**RNAi monocatenari que es complementa amb un mRNA produït per la cèl·lula, formant un dsRNA que degradarà la Riboendonucleasa III (DICER). **2.-** siRNA (small interference RNA), a partir d'un dsRNA es digereix i posteriorment s'amplifica mitjançant la polimerasa RdPR. Posteriorment s'elegeix la cadena complementària que s'unirà al complex RISC i la cadena passatgera serà degradada. **3.-**miRNA (microRNA). A partir d'una cadena simple de RNA que es plega com a pri-mRNA i mitjançant les proteïnes Drosha i Pasha el RNA madura fins a pre-mRNA. La Riboendonucleasa DICER ho talla en fragments per tal d'obtenir la cadena complementària que s'unirà al complex RISC. **4.-**Els RNA interferent s'uneix a la proteïna Argonauta AGO i junts reconeixen el mRNA diana i mitjançant la riboendonucleasa III (DICER) del complex RISC bloquejaran la traducció del missatger, degradaran el mRNA o bé actuaran a nivell de genoma, metilant les histones i modulant l'accés de les polimerases al DNA.

RNAi: RNA interferència; **siRNA** (small interference RNA); **miRNA:** micro RNA; **DICER:** Riboendonucleasa III; **RdRP:** RNA-dependent RNA polimerasa; **ssRNA:** Single strand RNA (RNA cadena simple); **dsRNA:** double strand RNA (RNA cadena doble); **pri-RNA:** RNA primari; **pre-RNA:** RNA precursor

Un altre tipus de silenciament, és el de tipus miRNA. Aquest tipus de mecanisme de control de la traducció fou descobert l'any 1993 en *Caenorabditis elegans* per l'equip de Ambros i Lee (Lee *et al.*, 1993)¹²¹. La diferència amb el siRNA es degut a que parteix d'un pri-mRNA, és a dir, un RNA missatger que es processa un d'una forma diferent, però el mode d'acció és el mateix

que en siRNA. El micro RNA és un tipus de RNA de 25-30 nucleòtids que te la capacitat de parar la traducció (disgregació dels Ribosomes), degradació durant la formació de la proteïna, degradació de la proteïna durant la traducció, inhibició de l'elongació durant la traducció modulant l'acció dels gens (Eulalio *et al.*, 2008)¹²² Es creu que aquest tipus de control de la traducció del mRNA és molt més important del que es creia abans. En plantes, hi han nombrosos estudis en que busques diverses seqüències per tal de conèixer el funcionament i la modulació del miRNA en *Arabidopsis* (Llave *et al.*, 2002)¹²³

En humans, és fonamental el saber com es regulen i com actuen els miRNA ja que estan relacionats amb diversos tipus de càncer. S'ha demostrat que l'existència de clústers anomenats "regions fràgils", on hi ha molts gens relacionats amb el càncer, apareixen seqüències que codifiquen per moltes varietats de miRNA, de forma, que sembla que actuen com a oncogens (Calin *et al.*, 2004)¹²⁴ (Joo Lee *et al.*, 2008)¹²⁵ i que estan relacionats amb la metastàsis (Weinberg *et al.*, 2008)¹²⁶, Jiang *et al.*, 2008)¹²⁷

1.5.5.-La Mutagènesis química

La mutagènesis és un sistema no dirigit d'introducció de canvis genètics generats per substàncies químiques o bé per ones energètiques. Àmpliament utilitzada en els orígens de la genètica, sobretot per tal d'identificar els gens que generaven certs fenotips. Durant aquests anys es va descobrir que els Raig X podien induir mutacions en *Drosophila* i conseqüentment generar una població de mutants per tal de comprendre el funcionament dels cromosomes i del gens (Muller 1927)¹²⁸. Stadler utilitza la combinació de Radi i de Raig X (radiacions d'ona curta) per tal de generar una població d'ordi mutant (Stadler 1928)¹²⁹ i observar com segregaven les mutacions a la descendència. Posteriorment hi van haver molts altres estudis utilitzant la radiació com a agent mutagenitzant com els estudis de Bryson and Davidson on van treballar amb raigs UV en *Escherichia coli* per trobar mutants resistents a fags (Bryson *et al.*, 1951)¹³⁰.

Durant els anys 50 hi van haver molts estudis sobre l'efecte de diversos composts químics sobre els organismes, com l'estudi de Krieg sobre l'efecte del Etil metanosulfonat en la reversió de la capacitat infectiva del bacteriòfag T4 (Krieg 1963)¹³¹. Durant aquests any, altres estudis encapçalats pels doctors Puk i Paovan començar a experimentar amb diferents composts químics com la 5-Bromodeoxyuridina que eren útils per generar mutacions en poblacions de cèl·lules animals de ratolí (Puk *et al.*, 1967)¹³² o els estudis de Oeschger i

Hartman amb ICR en *Salmonella* (Oeschger *et al.*, 1970)¹³³. Russel va utilitzar el N-ethyl N-Nitrosurea (ENU) per mutagenitzar espermatogonis (cèl·lules germinals de ratolí) on va observar que tenia un efecte mutagènic 5 cops major que la dosi més efectiva de raig X (Russel *et al.*, 1979)¹³⁴.

Posteriorment, durant els anys 60 i 70 es van fer molts tests per tal d'identificar diferents tipus de composts químics susceptibles de ser mutagènics. El grup de Oeschger van observar que els mutàgens generaven mutacions en determinades regions amb més freqüència que en altres (Oeschger *et al.*, 1970)¹³⁵. Les van anomenar Hotspot (regions calentes) com les zones amb més freqüència de recombinació durant la meiosi de les eucariotes. El grup de Ames, va desenvolupar un test per tal de poder comparar diferents composts i determinar el seu potencial carcinogènic comparant varies soques de *Salmonella typhimurium* en que algunes tenien danyat el sistema de reparació d'errors, o tenien danyada la capa de lipoproteïnes de la membrana. Comparant diferents composts químics, es va poder observar com aquests penetraven dins de la cèl·lula i com danyaven el seu material genètic en funció de la seva capacitat de reparar els errors (Ames *et al.*, 1973)¹³⁶.

Durant els anys 70 Carlson comença a treballar en mutagènesi de cultius cel·lulars de plantes de tabac (*Nicotiana tabacum*) amb el compost químic, 5-Bromo Deoxiuridina (BUdR) (Carlson 1970)¹³⁷. Aquest compost s'incorporava al DNA en comptes de la Timidina i reaccionava a la llum visible, per tant matava les cèl·lules que s'estaven reproduint. D'aquesta forma feia créixer les cèl·lules en un medi que fos deficient per un nutrient i al afegir la BUdR feia una selecció, ja que el compost matava les cèl·lules que no eren auxotròfiques per aquest nutrient al dividir-se. Carlson utilitzant un sistema similar obté mutants resistents a un compost segregat per la bactèria *Pseudomonas tabaci*, que és un anàleg de la metionina (metionina sulfoximina o MSO) (Carlson 1973)¹³⁸. En aquest cas va treballar amb el mutagen etil metanosulfonat (EMS), per seleccionar plantes resistents al MSO. Renee Sung va utilitzar cultius en suspensió de protoplasts de soja (*Glycine max*) per mutagenitzar-los amb EMS i cultius de pastanaga (*Daucus carota*) mutagenitzats amb nitrosoguanidina (NTG) i estudiar les dosis correctes per tal que les cèl·lules fossin resistents a la cicloheximida o al fluorouracil (Sung 1976)¹³⁹. L'equip de Christianson i Chiscon (Christianson *et al.*, 1978)¹⁴⁰ van treballar en mutagènesi de cèl·lules haploides provinents de cultius d'anteres en tabac (*Nicotiana tabacum*) per generar cèl·lules resistents a 3 anàlegs d'aminoàcids (s-aminoetilcisteïna, metiltiptòfan i etionina, en comptes dels aminoàcids essencials lisina, triptòfan i metionina). Van utilitzar com a mutagens la nitrosoguanidina (NTG) i com a agents contra-selecció fou radiació UV. Tal i com es pot observar en la majoria d'estudis d'aquesta època es seleccionava

les mutacions mitjançant un agent contra seleccionador. Per una banda es generava una població de mutants utilitzant un mutagen i després s'exposava les cèl·lules davant l'agent al qual havien de sobreviure. Aquest tipus d'aproximació poc a poc va anar canviant a mesura que va aparèixer tecnologia necessària per detectar mutacions puntuals.

A partir de l'èxit de la mutagènesi química, com a mitjà per augmentar la variabilitat genètica, diversos grups van generar poblacions amb fenotips mutants com en el cas de Chaleff (Chaleff *et al.*, 1984)¹⁴¹ que va generar línies de tabac (*Nicotiana tabacum*) resistents a herbicides o l'exemple de Carrol (Carrol *et al.*, 1985)¹⁴² que va mutagenitzar una població de soja per trobar individus que tinguessin la capacitat de nodular a altes concentracions de KNO₃. Altres grups van treballar amb blat per obtenir noves varietats resistents a l'herbicide Imidazolinone (Newhouse *et al.*, 1992)¹⁴³

L'aparició de tècniques noves per augmentar la variabilitat genètica, com l'ús de RNA d'interferència, la transgènia va fer disminuir l'interès per la mutagènesi química, però a finals dels 90, i principis del segle XXI, ha guanyat interès en diversos grups com a eina per augmentar la variabilitat genètica (Till *et al.*, 2004)¹⁷⁵ (Colberg *et al.*, 2001)¹⁷⁴, (Cooper *et al.*, 2008)¹⁷⁹

Quan les mutacions en el genoma son petites i aleatòries, induïdes per mutàgens químics, son necessaris altres mètodes per identificar la seva posició i naturalesa. Exceptuant la seqüenciació directa, la majoria de tècniques utilitzaran el comportament fisicoquímic del fragment i la mutació. Per tal d'agrupar les diferents tècniques emprades en la detecció de mutacions o SNP's hem separat la detecció de mutacions en dos grups en funció de la propietat física o química utilitzada. La mutagènesi química no requereix coneixement previ del genotip per tal de generar la població mutant, ja que mitjançant l'ús de mutàgens químics, es seleccionaran individus mutants fenotípics de dins d'una població.

1.6.- Sistemes de detecció de mutacions

1.6.1.-Detecció d'heterodúplex físicament

Les tècniques de detecció que es basen en les propietats físiques dels fragments amplificats, es classifiquen en varis grups. La més senzilla d'elles seria la que aprofita només la composició de seqüència que davant d'un camp d'electroforesi corria de forma diferent.

És l'anomenada tècnica de DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) utilitzada en un principi per seqüenciar gens (Eshaghpour *et al.*, 1977)¹⁴⁴ aquesta tècnica ha anat variant fins que Oefner and Underhill la van utilitzar per detectar un desparellament entre dues seqüències de DNA (Oefner *et al.*, 1995)¹⁴⁵. La clau d'aquesta tècnica és la fase sòlida que té afinitat diferencial per ssDNA (ADN cadena simple) i dsDNA (DNA doble cadena). El DNA es desnatura per temperatura i es deixa renaturalitzar. D'aquesta forma obtindrem 4 tipus de fragments, els 2 fragments originals (els homodúplexs, salvatge i el que conté SNP) i els 2 tipus de fragments híbrids (heterodúplexs). Un cop la mostra és injectada dins de la columna, la temperatura de fusió dels fragments renaturalitzats determinarà el temps que necessita el fragment per passar per la columna, fent que els heterodúplex no siguin retinguts. Aquesta tècnica és senzilla d'automatitzar i és molt específica, però s'ha d'optimitzar molt bé l'afinitat de la temperatura de fusió de la columna. Amb aquesta tècnica Yu *et al.*, (2005)¹⁴⁶ han estudiat mutacions en el gen MYH7 de la cadena pesada de la β miosina en pacients amb cardiomiopaties hipertròfiques. El grup Pereira i Xavier-Neto han realitzat estudis sobre malalties del cor com les relacionades amb el gen ALDHIA2 que codifica per una retinaldehid deshidrogenasa de tipus II, mitjançant la tècnica DHPLC buscaven les diferències al·lèliques responsables de la pèrdua de funcionalitat de l'enzim que transforma la vitamina A (Pavan *et al.*, 2009)¹⁴⁷. Recentment un grup multidisciplinari de la Universitat de Texas (Lott *et al.*, 2009)¹⁴⁸ han trobat mutacions per DHPLC, en el gen DEAR1 (Ductal epithelium Associated RING Chromosome 1) que sembla que juga un paper important com a regulador dominant en la morfogènesis acinar en les glàndules mamàries i que seria útil com a mètode predictiu relacionat amb el desenvolupament de càncer de pit. L'equip de Henikoff (McCallum *et al.*, 2000)¹⁴⁹ va aplicar l'ús del mutagen químic EMS per generar mutacions en una població d'*Arabidopsis thaliana* i una columna de DHPLC per tal de detectar les mutacions.

Una altra tècnica que és àmpliament utilitzada és la que Fisher i Lerman van descobrir l'any 1979 la tècnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) que emprava diferents productes químics (Urea o formamida) per separar els homodúplexs dels heterodúplexs és a

dir, permet separar la doble cadena i accentuar més la mobilitat dels fragments en una matriu d'electroforesis (Fisher *et al.*, 1979)¹⁵⁰. El fonament d'aquesta tècnica resideix en que certs productes químics a altes temperatures poden desestabilitzar el DNA al assolir en punt de fusió. Els fragments que contenen un desaparellament format per una mutació tenen tendència a desestabilitzar-se abans que els fragments de doble cadena (que encaixen perfectament), en presència d'un agent desnaturitzant i davant de temperatura, per aquest motiu, a certes concentracions d'agent desnaturitzant aquestes es separen i migren d'una forma més ràpida que els fragments estables, que romanen en forma de doble cadena (Fisher *et al.*, 1980)¹⁵¹. Aquesta tècnica ha estat utilitzada en diversos assaigs clínics per detectar certes patologies relacionades amb canvis de base provocades per mutacions com en el cas del gen PKD1 de la malaltia poliquística renal (Stekrova *et al.*, 2009)¹⁵² o per detectar mutacions en el gen BCRA1 relacionat en càncer de pit (Young *et al.*, 2009)¹⁵³. De totes maneres, molts anàlisis mèdics han estat substituïts per tècniques més acurades com la DHPLC i la seqüenciació per detectar malalties (Half *et al.*, 2009)¹⁵⁴. Aquestes tècniques són poc emprades en genètica vegetal. En canvi si són força interessants per detectar diferències entre grups de bacteris presents en la capa vegetal en descomposició en un sòl (Sugano *et al.*, 2005)¹⁵⁵ (Trifonova *et al.*, 2009)¹⁵⁶

Les tècniques TGGE (Temperature Gradient Gel Electroforesis) o bé la variant TGCE (Temperature Gradient Capilar Electroforesis) funcionen d'una forma semblant que l'anterior, però en comptes de separar les dues cadenes amb un producte químic es fa per temperatura. Aquesta tècnica parteix de la idea que el DNA parcialment desnaturitzat és molt més restrictiu i viatja més lentament en un medi porós com un gel. Aquesta propietat permet la diferenciació de DNA segons la temperatura de fusió (melting temperature). Per tal de detectar SNP's la tècnica utilitza els dos tipus diferents de DNA, el DNA al·lèlic sense cap mutació (salvatge) i l'al·lel amb la mutació. El DNA és barrejat i desnaturitzat per temperatura i renaturitzat quan la temperatura baixa. Durant aquest procés es formen nous fragments de dsDNA (doble cadena), dos de tipus homodúplex corresponents als fragments originals (mutant i salvatge) i dos de tipus heterodúplex amb cada una de les possibles combinacions de cadena simple. En aquest punt es fa un gel desnaturitzant amb gradient de temperatura, on correran de forma diferent depenent del tipus de desaparellament, és a dir, els heterodúplexs es desestabilitzen a una temperatura inferior que els homodúplexs que són més estables (Henco *et al.*, 1990)¹⁵⁷ Aquestes tècniques estan àmpliament utilitzades per determinar malalties clíniques, basades en SNP's i en què es valora el seu baix cost davant altres tècniques igual d'efectives però més noves i més cares (Hestekin *et al.*, 2006)¹⁵⁸.

Dins d'aquest grup tenim una tècnica que és una variant de l'anterior i s'anomena tècnica de HRM (High Resolution DNA melting). En aquesta tècnica s'utilitza un procés d'amplificació per PCR, juntament amb l'ús de tècniques de desnaturalització de DNA per temperatura. Es dissenyen uns primers marcats amb fluoròfors per amplificar una regió concreta (l'amplicó).

Un cop s'ha amplificat tot el fragment comença la desnaturalització per temperatura incrementant de 55 a 95°C i un fluorímetre monitoritza la desnaturalització post PCR de l'amplicó de DNA doble cadena (dsDNA). A partir d'aquí apareix una gràfica tipus sigmoïdal on es pot determinar si els al·lels per un locus eren homozigots o bé heterozigots (Cameron *et al.*, 2003)¹⁵⁹ o bé SNP's entre varietats (Liew *et al.*, 2004)¹⁶⁰. Aquesta tècnica ha permès la identificació malalties des de la diferenciació entre grups patògens de *Mycobacterium*, fins a la detecció de GIST (gastrointestinal stroma tumors), o la detecció variacions en els 4 exons del EGFR (Epidermal Growth factor Receptor) en carcinoma de pulmó (Erali *et al.*, 2008)¹⁶¹, o la detecció de mutacions en el gen BRCA1 i BRCA2 relacionat en càncer de pit (Tanako *et al.*, 2008)¹⁶².

Els SSCP (Single Strand Conformacional Polimorphism), detecta els salts que es produeixen en els diferents tipus de conformacions que formen les cadenes simples de DNA. Per tal de generar aquest tipus de conformacions s'han de separar les doble cadenes de DNA i passar a simples i per poder-ho fer s'escalfa la mostra fins a 95°C i ràpidament es baixa la temperatura a 4°C amb gel, d'aquesta forma les cadenes soles no poden formar de nou la doble cadena i es queden plegades estabilitzant-se en si mateixes. Cada fragment genera un plegament determinat. Aquesta tècnica és molt utilitzada en assaigs clínics degut al seu baix cost experimental. Àmpliament utilitzat per analitzar mutacions en el exons de la proteïna P53, responsable directe en casos de tumors (Berggren *et al.*, 2001)¹⁶³, (Golubovskaya *et al.*, 2009)¹⁶⁴, o marcadors per la malaltia de Crohn (Seidelin *et al.*, 2009)¹⁶⁵

1.6.2.-Detecció química d'heterodúplex

Una de les formes més bàsiques de detecció de desaparellaments per heterodúplex, és la detecció química per KMnO₄, en que desaparellaments en heterodúplex en cadenes de DNA formades a partir de PCR poden ser detectades. Quan aquests heterodúplex estan en un medi amb clorit de tetrametilamoni, el permanganat de potassi trenca el desaparellament format

per un desaparellament no complementari entre una timina i qualsevol altra base (menys Adenina). El DNA fixat en un substrat de paper tipus Hybond es tallat per acció química, es detecta a través d'una electroforesis (Gogos *et al.*, 1990)¹⁶⁶

També es possible detectar els desaparellaments en un heterodúplex per acció enzimàtica. La proteïna MutS, reconeix els bucles petits formats per a les desaparellaments de dues molècules que no son complementaries al 100% i s'uneix a elles. Aquesta unió es pot detectar mitjançant electroforesis ja que retarda lleugerament la migració (Lien *et al.*, 1983)¹⁶⁷ Les propietats d'interacció d'aquesta proteïna al desaparellament de DNA està generant interès en els camps de la biomedicina al poder acoblar biosensors que detectin desaparellaments (Han *et al.*, 2002)¹⁶⁸ (Zhong *et al.*, 2004)¹⁶⁹ (Cho *et al.*, 2006)¹⁷⁰

Altres proteïnes anomenats mismatch endonucleases no tan sols reconeixen el desaparellament, sinó que poden tallar-lo. Concretament Volker M. Vogt va començar a treballar amb aquest tipus d'endonucleases a partir de soques d'*Aspergillus* (Vogt 1973)¹⁷¹. Per altra banda el grup de Shugar testaven l'eficiència a nivell químic d'un enzim provinent de la mongeta tipus mung (Kole *et al.*, 1974)¹⁷².

L'equip de Oleykowski va trobar una nova forma de descobrir les mutacions en un organisme determinat (Oleykowski *et al.*, 1998)¹⁷³. Mitjançant uns primers marcats amb marcador 5'FAM per cebador Forward i 5'-TET pel cebador reverse que amplificaven les mostres que contenien una deleció junt amb les mostres salvatges pel gen BCRA1. Van generar per temperatura, heterodúplex que contenien desaparellaments que es formen entre fragments de DNA salvatge i els fragments de DNA que contenien un SNP. Aquests heterodúplexs eren reconeguts per una endonucleasa, la CEL I (provinent de l'espècie *Apium graveolens*), que els feia un tall, i mitjançant una electroforesi, podien trobar la mutació injectant la mostra dins d'un seqüenciador. D'aquesta forma podien llegir dues bandes de tall amb els dos fluoròfors i la banda sense tallar corresponent als homodúplexs.

L'equip de Henikoff (Colbert *et al.*, 2001)¹⁷⁴ va aplicar als seus estudis de generació de mutants per mutàgens químics el sistema de detecció de mutacions de Oleykowski, al utilitzar l'enzim CELI. Aquest nou sistema d'identificació de mutacions, aplicat a garbellat en plantes ha estat àmpliament utilitzat posteriori per tal de detectar mutants en poblacions des de blat de moro (Till *et al.*, 2004)¹⁷⁵ o arròs (Till *et al.*, 2007)¹⁷⁶, fins a Zebra Fish (Wienholds *et al.*, 2003)¹⁷⁷ o *Drosophila* (Winkler *et al.*, 2005)¹⁷⁸

1.6.3.- Detecció enzimàtica de mutacions

Aquesta tècnica és àmpliament utilitzada per a detectar noves varietats en espècies d'interès agronòmic com arròs (*Oryza sativa*), blat de moro (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), o d'ús científic com la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) el peix zebra (*Danio rerio*) i *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) (Till *et al.*, 2007)¹⁷⁶, (Till *et al.*, 2004)¹⁷⁵, (Darlow *et al.*, 2008)¹⁷⁹, (Winkler *et al.*, 2005)¹⁷⁸, (Wienholds *et al.*, 2003)¹⁷⁷ i (Colbert *et al.*, 2001)¹⁷⁴.

Aquesta tècnica combina l'ús clàssic de mutàgens químics que provoca diferents tipus de lesions a l'organisme, i l'ús d'una nucleasa que reconeix els desaparellaments entre bases que genera la nova cadena amb seqüència mutada i la cadena original .

Els primers articles que utilitzen aquesta tècnica provenen d'estudis previs en enzims del tipus nucleases que reconeixien i tallaven desaparellaments entre bases en cadenes simples i en cadenes de tipus complementaries. Concretament Volker M. Vogt va començar a treballar amb aquest tipus d'endonucleases a partir de soques d'*Aspergillus* (Vogt 1973)¹⁸⁰. Per altra banda el grup de Shugar testaven l'eficiència a nivell químic d'un enzim provinent de la mongeta tipus mung (Kole *et al.*, 1974)¹⁷². No fou fins que l'equip de Oleykowski va començar a treballar en la detecció de mutacions utilitzant una endonucleasa extreta de la planta *Apium graveolens* (Oleykowski *et al.*, 1998)¹⁷³. A partir d'aquí altres grups han seguit amb la investigació sobre l'ús d'endonucleases, per tal de detectar desaparellaments generats per mutacions però utilitzant endonucleases purificades a partir d'un extracte vegetals, com la Cel I Oleykowski Posteriorment i a partir del treball de l'equip de Yeung i Oleykowski, altres grups van fer garbellats moleculars (Colberg *et al.*, 2001)¹⁷⁴ (Till *et al.*, 2004)¹⁸¹ utilitzant l'endonucleasa provinent de *Apium graveolens*.

1.6.4.-Detecció de mutacions per Hibridació

Dins d'aquest grup hi ha la detecció de mutants per micromatrius, en que l'aproximació consisteix en una hibridació de DNA mutant en oligonucleòtids dissenyats, i es basa en el fet que una hibridació perfecta sempre es més forta que una hibridació amb desaparellament. (Southern *et al.*, 1992)¹⁸²

Quan la diferència de dues seqüències es mínima (una sola base), la capacitat de discriminació mitjançant la hibridació es limitada. Tot i així, grups com el de Lockhart van contribuir a la detecció de SNP's al generar tecnologies com la dels microarrays en que es podia diferenciar una sola base, i aplicar-ho a una gran varietat de gens al miniaturitzar la tècnica (Lockhart *et*

al., 1996)¹⁸³. D'aquesta forma van ser possibles els garbellats d'alta densitat. Però el problema, era que es podia estudiar molts gens però només entre poques mostres. Per tal no es podia fer un garbellat a gran escala.

La detecció de SNP's i mutacions mitjançant hibridació per microarrays està força influenciada per les condicions experimentals i pel context de la seqüència (De Bellis *et al.*, 2002)¹⁸⁴. Però el perfeccionament de la tècnica ha permès l'aparició de noves aproximacions per detectar SNP's i mutacions d'una forma més precisa. Son les tècniques de detecció de mutació (o SNP) per hibridació combinat amb un processat enzimàtic. El processat enzimàtic pot ser de tres formes, per miniseqüenciació, per extensió o per lligació.

La tècnica de SBE (Single Based Extension TAGS) apareix com a resultat dels experiments de Syvänen (Syvänen *et al.*, 1990)¹⁸⁵ en què amplificava un fragment lligat a una base de vidre, utilitzant un primer. El processat per miniseqüenciació, consisteix en una hibridació d'un petit fragment de DNA a mostres a estudiar. Aquest fragment hibrida just abans de la presència d'un SNP, i al afegir dideòxi-nucleòtids marcats (ddDTP-TAMRA, ddGTP-R110, ddATP-R6G i ddTTP-ROX) una polimerasa els afegeix. D'aquesta forma, només s'afegeix un sol nucleòtid que està marcat i segons la fluorescència, es sap de quin SNP es tracta (Syvänen 1999)¹⁸⁶ La tècnica de la Single Based Extension TAGS aplicada a un microarray (Hirschhorn *et al.*, 2000)¹⁸⁷ va aparèixer com una aplicació per genotipar tots els SNP's humans possibles d'una forma més ràpida i efectiva.

La hibridació i processat enzimàtic per extensió consisteix en una modificació de la tècnica anterior, però els nucleòtids son dNTP's (amb una dCTP-Cy5) de forma que permeten una extensió sobre de les sondes d'una micromatriu (Pastinen *et al.*, 2000)¹⁸⁸ És a dir, la sonda fa de cebador per una reacció d'amplificació per PCR i la mostra a analitzar s'hi uneix. Només si la unió és específica entre el cebador i el DNA hi ha extensió i els nucleòtids marcats és el que detecta un sensor.

La tercera variant de detecció de SNP's i mutants és la hibridació i processat enzimàtic per lligació, o també anomenada OLA (oligonucleotide ligation assay) o tècnica zip-code (Gerry *et al.*, 1999)¹⁸⁹ Aquesta tècnica consisteix en una barreja de tècnica molecular de PCR i un microarray anomenat zip code. La tècnica consisteix en amplificar una regió que contingui o pugui contenir mutacions i s'amplifica per multiplex. Aquests productes serviran després com a motllo, per una altra amplificació que s'anomena (SBE) Single Base Extension. Els primers zip bifuncionals de la SBE acaben una base abans del lloc de la mutació o del lloc de l'SNP i

l'extensió es fa amb ddNTP marcats amb biotina. Posteriorment es segresten aquests fragments que han incorporat biotina amb una molècula d'estreptavidina amb Cy3. Aquest tipus d'aproximació s'està utilitzant molt en el cas d'anàlisis de mutacions en gens d'alta sensibilitat a càncer, com el BRCA1 de càncer de pit (Cheulhee *et al.*, 2008)¹⁹⁰.

1.6.5.-Detecció de mutacions per seqüenciació

Altament anomenada la gold standart de les tècniques de genètica reversa, pel fet de ser el punt final de confirmació de la presència d'una mutació. Tot i el gran avantatge que suposa poder detectar la mutació mitjançant aquesta tècnica, resulta molt car un garbellat a gran escala. Inicialment s'utilitzà la tècnica SANGER, a través de diverses plataformes com Applied Biosystems o Illumina però recentment, ha aparegut la tècnica 454 Life Science que utilitza la tecnologia de piroseqüenciació (Margullis *et al.*, 2005)¹⁹¹ en pous de picolitres de capacitat.

Amb el desenvolupament d'aquestes noves tecnologies de seqüenciació d'alta eficiència, han sorgit noves aplicacions a la detecció de mutacions, com es la tecnologia KeyPoint de la empresa Keygene, empresa basada originalment en la tecnologia de la AFLP (Vos *et al.*, 1995)¹⁹²

Aquesta tècnica consisteix en una seqüenciació massiva en paral·lel a partir d'una població mutant. A partir de DNA aïllat es fa una PCR multidimensional amb uns primers que contenen una etiqueta de posicionament, ja que la reacció es fa mitjançant una agrupació de DNA (pools). A partir d'aquí es seqüència utilitzant la tècnica de piroseqüenciació 454 Lifescience i es diferencia la interpretació de les mutacions respecte dels SNP's per mètodes de càlcul de probabilitats estadístiques (Rigola *et al.*, 2009)¹⁹³. És una tècnica útil, per varis motius com el fet, que les seqüències a buscar estan dirigides cap a regions on siguin susceptibles d'aparèixer un codó STOP, no necessita treballar amb endonucleases, és escalable i automatitzable però és molt cara, ja que cada fragment s'ha de seqüenciar molts cops per tenir constància que està suficientment representat estadísticament.

1.7.-Objectius de tesi

El propòsit principal d'aquesta tesi, és aconseguir augmentar la variabilitat genètica en organismes i localitzar a través d'un garbellat molecular, aquells mutants que presentin unes característiques desitjables concretes. Per aconseguir-ho s'havien de resoldre certs aspectes que vam dividir en dos objectius primaris

El primer objectiu fou testar un mètode eficient de detecció de mutacions en poblacions grans. Per tal de detectar els mutants es va elegir el mètode de l'anàlisi d'heterodúplex mitjançant un enzim de tipus endonucleasa, per ser el que permetia escalar fins a analitzar una població de mutants. Aquest extracte havia de poder detectar una mutació en pools de DNA per reduir costos de garbellat i a com a element desitjable, es volia testar si era capaç de detectar delecions per tal de poder adaptar la tècnica a altres tipus de mutacions, com les delecions generades per fast neutron.

El segon objectiu fou la generació d'un mètode eficient d'augmentar la variabilitat genètica en diversos tipus d'organismes. Davant la importància de trobar noves varietats amb característiques noves desitjables i degut a la seva rellevància dins del mercat de l'alimentació, es va decidir generar poblacions mutants de llevat i arròs mitjançant mutagènesis química.

Aquests dos organismes requerien dos aproximacions diferents per tal d'augmentar la seva variabilitat. En llevat per tal de poder testar l'efecte del mutagen es va dissenyar un constructe per analitzar el temps d'aplicació i la dosi. Per altra banda es volia dissenyar un sistema per comprovar l'eficiència en desactivar gens.

Dins de la generació de mutacions en plantes superiors, es volia veure si era possible generar una població de mutants en arròs evitant el mosaïcisme i reduint el temps necessari des de la mutagènesi fins el garbellat molecular.

Finalment, es van elegir per a cada organisme gens que tinguessin un interès per les seves aplicacions comercials. El criteri usat en cada cas serà objecte d'estudi en els següents apartats.

Optimització de la detecció enzimàtica de mutacions puntuals de l'ADN.

2.-Optimització de la detecció enzimàtica de mutacions puntuals de l'ADN.

2.1.-Introducció

La detecció de polimorfismes es d'alta importància per l'anàlisi de la variabilitat genètica i per la detecció de les causes en algunes malalties genètiques.

Les mutacions es poden detectar mitjançant el comportament de les propietats físiques i químiques del DNA utilitzant una electroforesis en gels desnaturalitzant, o bé mitjançant la resposta a la hibridació per micromatrius o bé a través de la detecció directa de la identitat del polimorfisme mitjançant la seqüenciació.

Un altre sistema de detecció de la variabilitat genètica és a través de la acció enzimàtica, emprant nucleases que reconeixen els desaparellaments de bases deguts a la formació d'heterodúplex entre una cadena mutada i la cadena original. Algunes endonucleases tenen la capacitat de reconèixer aquest desaparellament i tallen l'heterodúplex en aquesta posició.

La primera nucleasa de desaparellament coneguda, fou l'endonucleasa S1, es va preparar a partir d'un extracte d'*Aspergillus* (Volker M. Vogt 1973)¹⁹⁴. Fins aquest moment, les nucleases havien estat utilitzades per quantificar la hibridació d'àcids nucleics, per l'aïllament de regions de cadena simple que s'havien autohibridat, o per l'anàlisi del plegament en superhelix del DNA (Wiegand *et al.*, 1975)¹⁹⁵. Per altra banda el grup de Shugar (Kole *et al.*, 1974)¹⁷² van començar a testar l'eficiència a nivell químic d'un enzim provinent de la mongeta tipus mung. Fujimoto en el mateix any, va extreure i testar una endonucleasa a partir del fong *Penicillium citrinum* (Fujimoto *et al.*, 1974)¹⁹⁶. Així doncs, algunes nucleases que s'estaven testant, es va comprovar que tenien la capacitat de detectar desaparellaments en el DNA, com els produïts davant la pèrdua d'un nucleòtid (Shenk *et al.*, 1975)¹⁹⁷, o com els desaparellaments de base degut a mutacions. Però posteriorment, i pel que s'ha vist, les endonucleases S1, MBN, P1, no eren molt efectives a l'hora de tallar desaparellaments de bases, i petits loops formats per delecions d'una base (Dodgson *et al.*, 1977)¹⁹⁸ (Wiegand *et al.*, 1975)¹⁹⁵.

Molt mes tard, l'equip de Yeung va tornar a avaluar extractes de diferents tipus de plantes i va seleccionar a CEL1, una endonucleasa extreta de la planta *Apium graveolens*, com la mes eficient per identificar petites insercions, delecions, o canvis puntuals de la seqüència

(Oleykowski *et al.*, 1998)¹⁷³ . Dos anys més tard el mateix equip (Yang *et al.*, 2000)¹⁹⁹ van clonar el gen que codificava CEL1, que ha permès comercialitzar l'enzim amb el nom Surveyor (Transgenòmics). Van demostrar la utilitat de CEL1 detectant mutacions en BRCA1, un gen molt important per a la predisposició de càncer de pit (Pimkin *et al.*, 2007)²⁰⁰.

L'equip d'Oleyowsky va realitzar diversos assaigs de detecció de mutacions es va realitzar amplificant un fragment d'ADN amb oligonucleòtids marcat amb fluorescència FAM i TET , desnaturalitzant i renaturalitzant l'ADN, digerint els heterodúplexs generats (en cas d'haver-hi mutacions) mitjançant la nucleasa de desaparellament, i realitzant electroforesi per a resoldre els fragments d'ADN (Kulinsky *et al.*, 2000)²⁰¹.

El grup de Henikoff fou el primer en fer garbellats sistemàtics per detectar mutacions puntuals, en poblacions de plantes mutades per EMS. Inicialment, el grup usava DHPLC per a la detecció de heterodúplexs (Mc. Callum *et al.*, 2000)¹⁴⁹ però mes tard canviaren la seva preferència i començaren a utilitzar la detecció enzimàtica amb CEL1 (Colbert *et al.*, 2001)¹⁷⁴(Till *et al.*, 2004)¹⁷⁵ i la detecció mitjançant l'electroforesi en gels d'acrilamida en equips semiautomàtics com els de LiCOR.

2.1.1.-Objectius

L'objectiu d'aquest capítol és buscar una nova endonucleasa que tingui una activitat òptima per detectar desaparellaments d'una sola base, o bé delecions de varis parells de bases. Per tal de trobar una endonucleasa pròpia i per establir i millorar la tecnologia enzimàtica de mutacions es va avaluar les endonucleases de diferents parts de diversos extractes vegetals i una de comercial.

2.2.-Resultats

2.2.1.-Avaluació d'extractes de diferents plantes com a font d'endonucleasa

Per avaluar el seu potencial com a fons de endonucleasa, es van seleccionar diferents plantes de la famílies de Apiaceae i Amarantacea, descrites anteriorment pel seu contingut en endonucleases.

Concretament, es van preparar extractes crus de les fulles i del tall de l'api (*Apium vulgare*), del fonoll (*Foeniculum vulgare*), de les bledes (*Beta vulgaris* var. Cicla), de les fulles dels espinacs (*Spinacia oleracea*) i del julivert (*Petroselinum crispum*), seguint una adaptació del protocol de Till *et al.*, 2004)¹⁸¹



Figura 5: Certs enzims presents en extractes de vegetals poden ser utilitzats com a eines d'anàlisi molecular. (D'esquerra a dreta): api (*Apium vulgare*), fonoll (*Foeniculum vulgare*), bledes (*Beta vulgaris* var. Cicla), espinacs (*Spinacia oleracea*) i julivert (*Petroselinum crispum*)

Aquest conjunt d'extractes més l'enzim comercial Surveyor (Transgenòmics) es van utilitzar per a detectar un desparellament en un heterodúplex artificial generat mitjançant l'incubació a 96°C per tal de formar un heterodúplex mitjançant l'hibridació d'un oligonucleòtid 41-mer marcat amb el fluorofor Cy5 i un 40 mer marcat amb el fluorofor Cy3. Ambdós oligonucleòtids eren complementaris i a més a més portaven un grup fosforotioat en la posició 5', en una funció que es discutirà més endavant. Com a conseqüència de la hibridació del 40mer i del 41mer, que conté una base extra en la posició 21 (equivalent a una inserció/deleció d'una base), l'heterodúplex format per la hibridació generava un petit bucle extrahelical que pot ser reconegut per l'endonucleasa de l'extracte.

Després d'incubar 200 ng d'heterodúplex durant 30 minuts a 45°C tal i com està descrit per Yeung *et al.*, es va parar la reacció i es van separar els fragments generats en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant. Finalment, el gel es va escanejar en un Typhoon 8600 a 633nm i 532nm per a detectar les senyals de Cy5 i Cy3, respectivament.

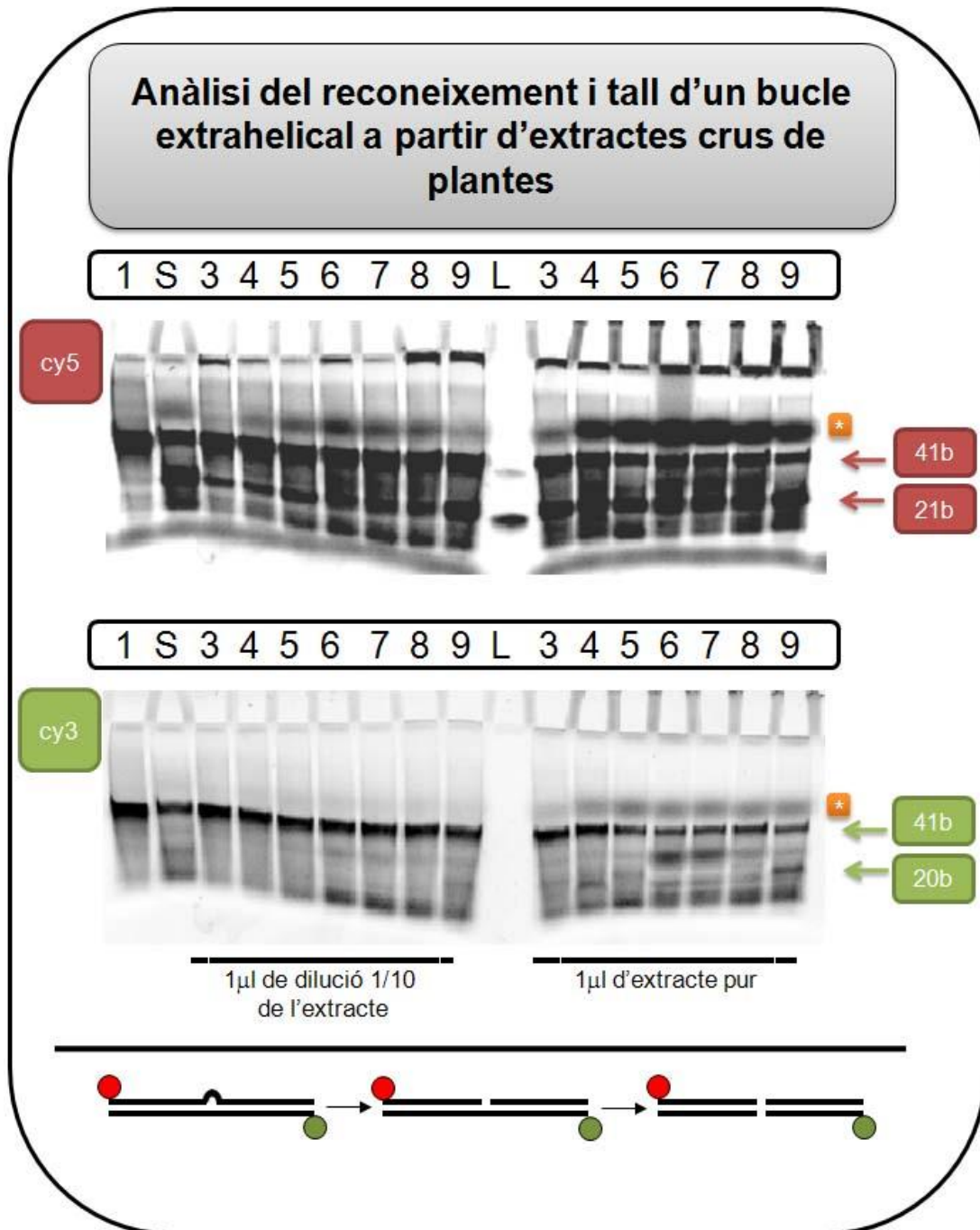


Figura 6: Anàlisi del reconeixement i tall d'un bucle extrahelical a partir d'extractes crus de plantes. S'han carregat les digestions en un gel d'acrilamida desnaturalitzant (veure detalls a material i mètodes) Imatges de l'escanejat pel canal Cy5 dels fragments de ADN i escanejat del canal Cy3
Carril 1: control negatiu amb aigua, S: control positiu amb surveyor (Transgenòmics), 3: fulles d'api, 4: talls d'api, 5: fonoll, 6. fulles de bledes, 7: talls de bledes, 8: espinacs, 9: julivert, L: Control positiu format pels dos oligonucleòtids de 41 i 21 bases respectivament.
En la part inferior de la figura està representat un esquema general de les reaccions enzimàtiques detectades.

2.-Optimització de la detecció enzimàtica de mutacions puntuals de l'ADN.

En la figura 6 A, es pot observar que tots els extractes crus han tallat fins un 50% el fragment sintètic 41 mer marcat amb Cy5 utilitzant 1µl de la dilució 1/10 i fins a 75% quan s'aplicava 1 µl de l'extracte sense diluir en el cas de les endonucleases de l'extracte de julivert. Sembla ser, però que en els casos de l'extracte de bledes, espinacs i tall d'api, existeix una degradació de DNA. Es pot observar millor en les digestions amb extracte pur, que en les digestions amb extracte diluït.

Per altra banda, la cadena complementària de 40 mer marcat amb Cy3 (figura 6 B) s'ha digerit sense degradació aparent en els extractes de julivert i fonoll i en la reacció realitzada amb l'enzim purificat comercial, i en tots els casos aquesta reacció es molt minoritària.

Aquesta observació indica que, en les condicions en que s'han usat, existeix una asimetria molt important i que les endonucleases reconeixen i produeixen preferentment una osca a l'ADN en la posició de la màxima distorsió (el bucle extrahelical), però que son molt menys efectives a l'hora de tallar l'altra cadena una vegada que l'estructura quedi relaxada.

L'extracte de julivert havia demostrat la major activitat en l'assaig d'avaluació, però el fonoll te un altra avantatge apreciable: es mes gran i es pot trobar fresc i en quantitats suficient amb molt de facilitat. Per tant, es va decidir de realitzar una comparació mes detallada entre els extractes de api (Oleykowski *et al.*, 1998)¹⁷³ i el fonoll.

2.2.2.- Efecte de la modificació dels terminis 5' dels fragments d'ADN

L'extracte cru de fonoll te una activitat endonucleasa i possiblement exonucleasa tot i que tenim la sospita que el fragment a digerir ha d'estar protegit per tal d'evitar que l'extracte digereixi de forma inespecífica el fragment a analitzar. Per tal de demostrar la necessitat de protegir-los, es va amplificar un fragment de 3kb amb i sense primers modificats en l'extrem 5' amb un grup fosfotioat. El DNA provinent de DNA genòmic de llevat de dues espècies diferents, com son el *Saccharomyces cerevisiae* i el *Saccharomyces carlbergensis* presenten fins a 4 SNP's que al amplificar i mesclar-los que generen 4 desaparellaments. Els fragments combinats es va digerir posteriorment amb l'extracte cru de fonoll utilitzant diversos volums per tal d'observar l'efecte del tall en els fragments amplificats.

2.-Optimització de la detecció enzimàtica de mutacions puntuals de l'ADN.

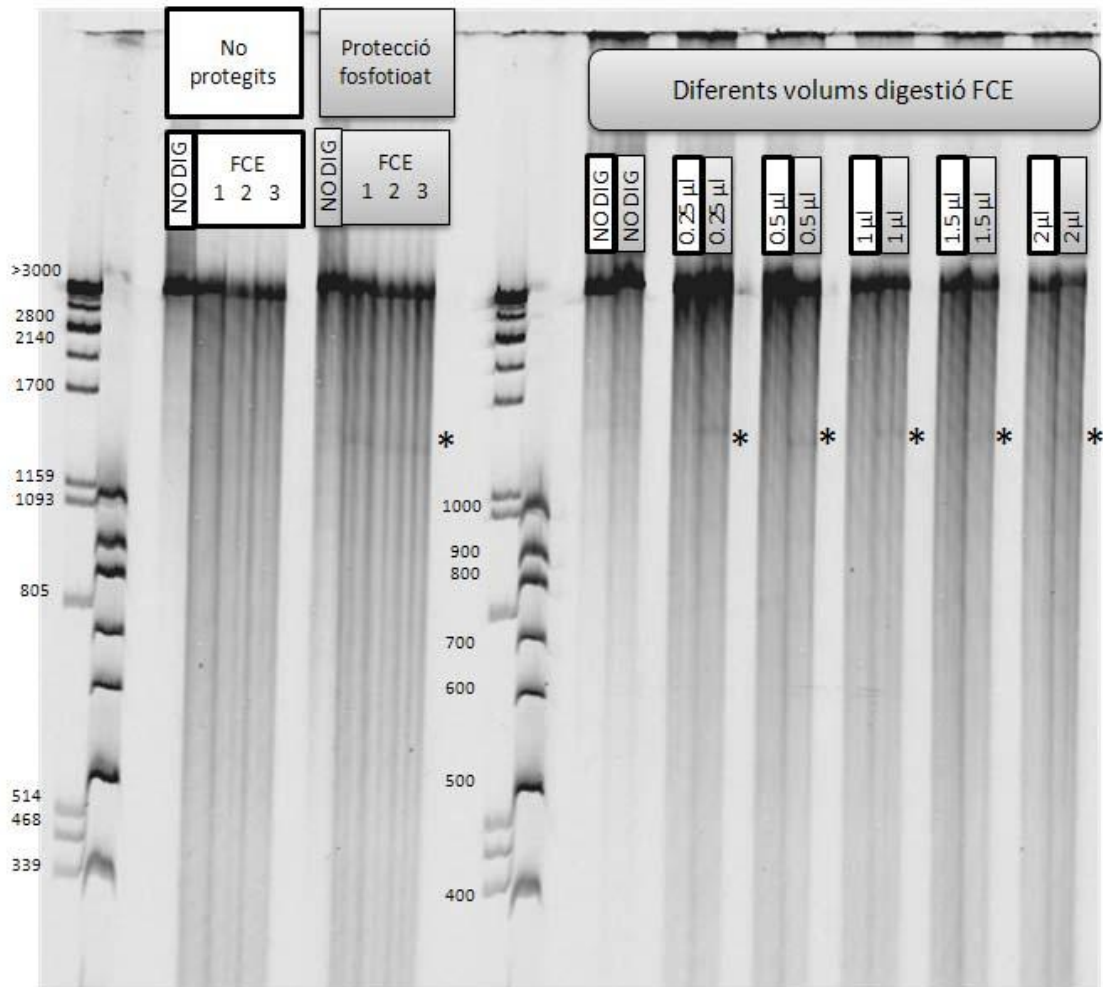


Figura 7: Digestió amb diferents volums d'extracte cru de fonoll en fragments de 3kb del gen Met10 en llevat, amb i sense protecció en l'extrem 5' del fragment amb una modificació d'un grup fosfotioat. L'asterisc marca el fragment tallat. Els nombres 1,2 i 3 a l'esquerra de la figura corresponen a repeticions del mateix fragment.

Només els fragments que s'havien amplificat amb els primers modificats amb el grup tiofosfat han estat tallats per l'extracte cru de fonoll. En els fragments que no contenen protecció en l'extrem 5' l'extracte cru de fonoll no ha tallat el desaparellament. Dels 4 talls que s'esperaven detectar en aquest fragment de 3kb només se n'ha detectat 1 però present en les 3 repeticions en aquells fragments que presentaven el grup fosforotioat. En la digestió en funció del volum d'extracte cru de fonoll, s'ha detectat que a més volum d'enzim hi havia una disminució de la banda de tall, només en aquells fragments amb la modificació 5'. En els fragments sense modificació 5', no s'ha detectat cap banda de tall. En les digestions que s'ha afegit aigua en comptes d'extracte cru de fonoll, no s'aprecia el soroll de fons, que es detecta en la resta de mostra, tan en els fragments amb modificació com en el que no presenten modificació 5'.

2.2.3. Detecció de petites deleccions/insercions en fragments d'ADN de plàsmids.

Com a pas següent, es va comparar la capacitat dels extractes d'api i de fonoll per a tallar fragments d'ADN mes llargs d'ADN (2kb), amplificat per PCR a partir de diferents plàsmids que contenien una inserció/delecció d'una sola base. Per amplificar aquests fragments es van utilitzar dos tipus de cebadors marcats amb Cy5 i Cy3 i protegits en posició 5' amb un grup fosforotioat. Posteriorment aquests fragments es van barrejar i sotmetre a un cicle de desnaturalització /renaturalització per tal de formar uns heterodúplexs, que es van incubar amb diferents concentracions de l'extracte d'api i de fonoll. Com a control, es va incloure també el tractament del fragment de PCR homodúplex i el tractament amb l'enzim Surveyor (Transgenòmics). Els productes resultants es van analitzar en un gel d'agarosa (1,5%) i es van detectar mitjançant el Typhoon 8000. Cal destacar que l'anàlisi en gel d'agarosa només permet la detecció de fragments tallats, perquè fragments que continguin un tall amb tan sols una osca no canviaran massa la mobilitat del fragment en el gel.

Com es pot observar en les Figures 8 i 9 hi havia una clara diferència entre l'extracte de fonoll per una banda i l'extracte d'api i l'enzima comercial Surveyor (Transgenòmics) per l'altra. Mentre aquestes últimes demostraven clares evidències de degradació de la mostra, tant en el cas de ADN en conformació homodúplex (M) com heterodúplex (MM), l'extracte de fonoll deixava els fragments M intactes i produïa talls en els fragments MM. De fet, és possible que en una part dels fragments "sense tallar" de les reaccions amb menys extracte, s'hagi produït una osca en una de les dues cadenes de l'heterodúplex, però en el gel d'agarosa tan sols es poden veure els fragments de ADN tallat completament. Barrejant fragments de PCR amb versions mutants en una relació de 5 a 1; s'espera que com a màxim 20% dels fragments es convertirà en heterodúplex, i per tant, serà tallat per l'extracte. Efectivament, en la figura 9 es pot veure que per a digerir 200ng de ADN (relació 5 a 1), l'activitat de l'extracte es satura entre uns 3-6µg de proteïna total extreta.

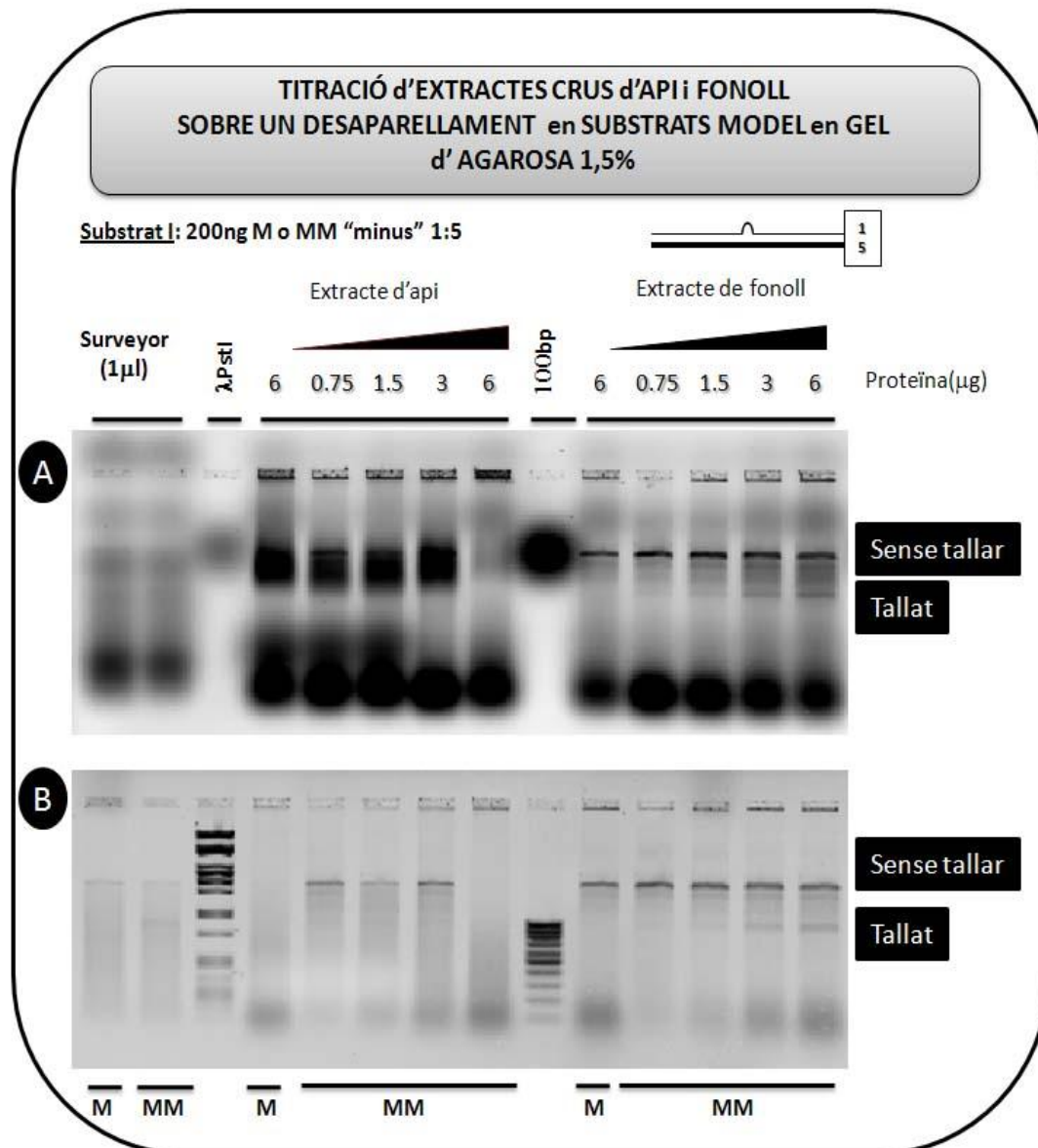


Figura 8: Titració de l'activitat de tall d'ADN mitjançant diferents volums de l'extracte cru d'api i fonoll sobre un substrat artificial. El material del substrat I, es compon per dues cadenes, una de les quals conté inserció d'una base i està en una proporció 5 cops inferior respecte a la seva complementaria. Un cop format l'heterodúplex es va digerir amb els dos extractes i amb l'enzim comercial Surveyor. Els canals de lectura usats per l'scanner Typhoon son el Cy5(A) i Cy3(B)

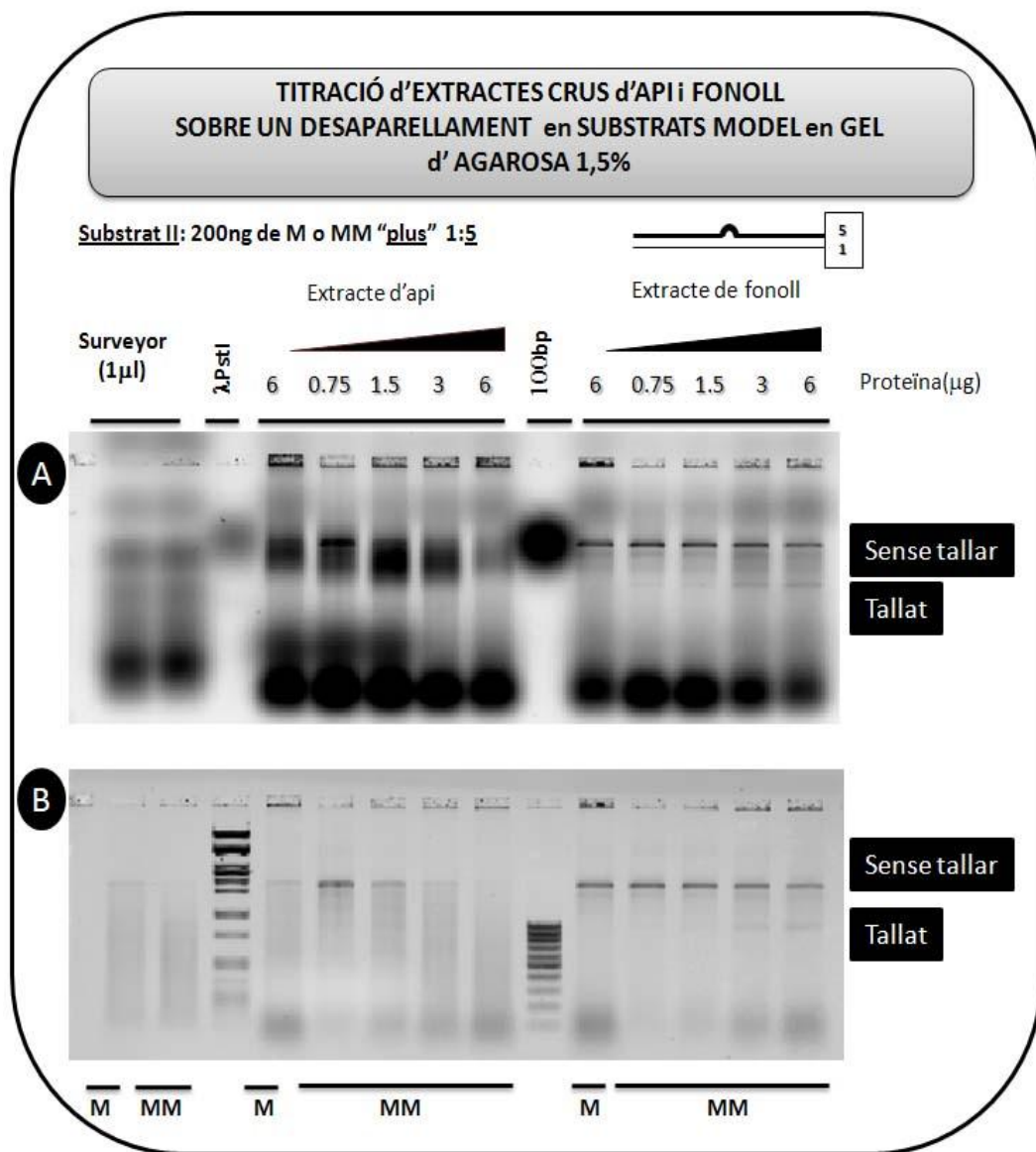


Figura 9: Titració de l'activitat de tall d'ADN mitjançant diferents volums de l'extracte cru d'api i fonoll sobre un substrat artificial. El material del substrat II, es compon per dues cadenes, una de les quals conté inserció d'una base i està en una proporció 5 cops superior respecte a la seva complementària. Un cop format l'heterodúplex es va digerir amb els dos extractes i amb l'enzim comercial Surveyor. Els canals de lectura usats per l'scanner Typhoon són el Cy5(A) i Cy3(B)

2.2.4.- Detecció de canvis puntuals en fragments amplificats d'ADN genòmic amb l'extracte de fonoll.

L'extracte cru de fonoll te la capacitat de detectar desaparellaments generats a partir de material provinent de plàsmid, és a dir, material generat artificialment. Per tal de comprovar l'eficiència de l'enzim a l'hora de tallar desaparellaments en DNA genòmic, s'han amplificat els fragments d'un gen provinent de dues soques de llevat, la soca de l'espècie *Saccharomyces cerevisiae* i la soca cervesera industrial *Saccharomyces carlsbergensis* CARL (veure condicions en apartat 2.5.4 de materials i mètodes). Aquest cop, es van utilitzar oligonucleòtids protegits en la posició 5' amb un grup fosforotioat (però sense grup fluorescent) en la amplificació i posteriorment es va afegir Sybr-gold (un agent intercalant d'ADN fluorescent) i els fragments es van separar en un gel d'acrilamida no desnaturalitzant

2.2.5.- Anàlisi del límit de detecció de l'extracte de Fonoll en fragments de DNA genòmic

En el gen *Met10* (veure figura 10) existeixen dos polimorfismes entre les dues soques, que ens seran útils a l'amplificar-los, ja que al generar la reacció d'heterodúplex, es provocarà dos desaparellaments. Per detectar el límit de detecció d'heterodúplex per l'extracte cru, es van provar diferents proporcions de DNA genòmic de l'espècie *Saccharomyces cerevisiae* i l'espècie *Saccharomyces carlsbergensis*, simulant una hipotètica situació que es donaria en un garbellat molecular, on una mutació estaria en proporció inferior respecte al total de DNA genòmic. El material a digerir és el fragment format per les seqüències representades en la Figura 10, i esperem detectar fragments de 754bp, 648 bp, 539 bp, 433 bp i 215 bp. Depenent de la resolució que obtinguem en detectar la mutació, ens donarà una aproximació del volum d'enzim a utilitzar.

Tal i com es pot observar en la figura 10, l'extracte cru de fonoll ha estat capaç de detectar els polimorfismes entre les dues soques de llevat fins una proporció de 1:16, essent aquest el límit de detecció de l'enzim, tot i que s'aprecien de forma atenuada, bandes de tall en proporcions 1:32 i 1:64. En els controls negatius on hi és present només una de les dues mostres, no s'observen bandes de tall. S'observa també que no podem detectar la banda de tall corresponent als 433 pb, o bé que hi és present amb molta poca intensitat. Durant la seqüenciació dels fragments mutants amplificats de CARL en el capítol 4, es va observar que el fragment del gen *Met10*, contenia una còpia truncada fet que pot influir en el límit de detecció.

2.-Optimització de la detecció enzimàtica de mutacions puntuals de l'ADN.

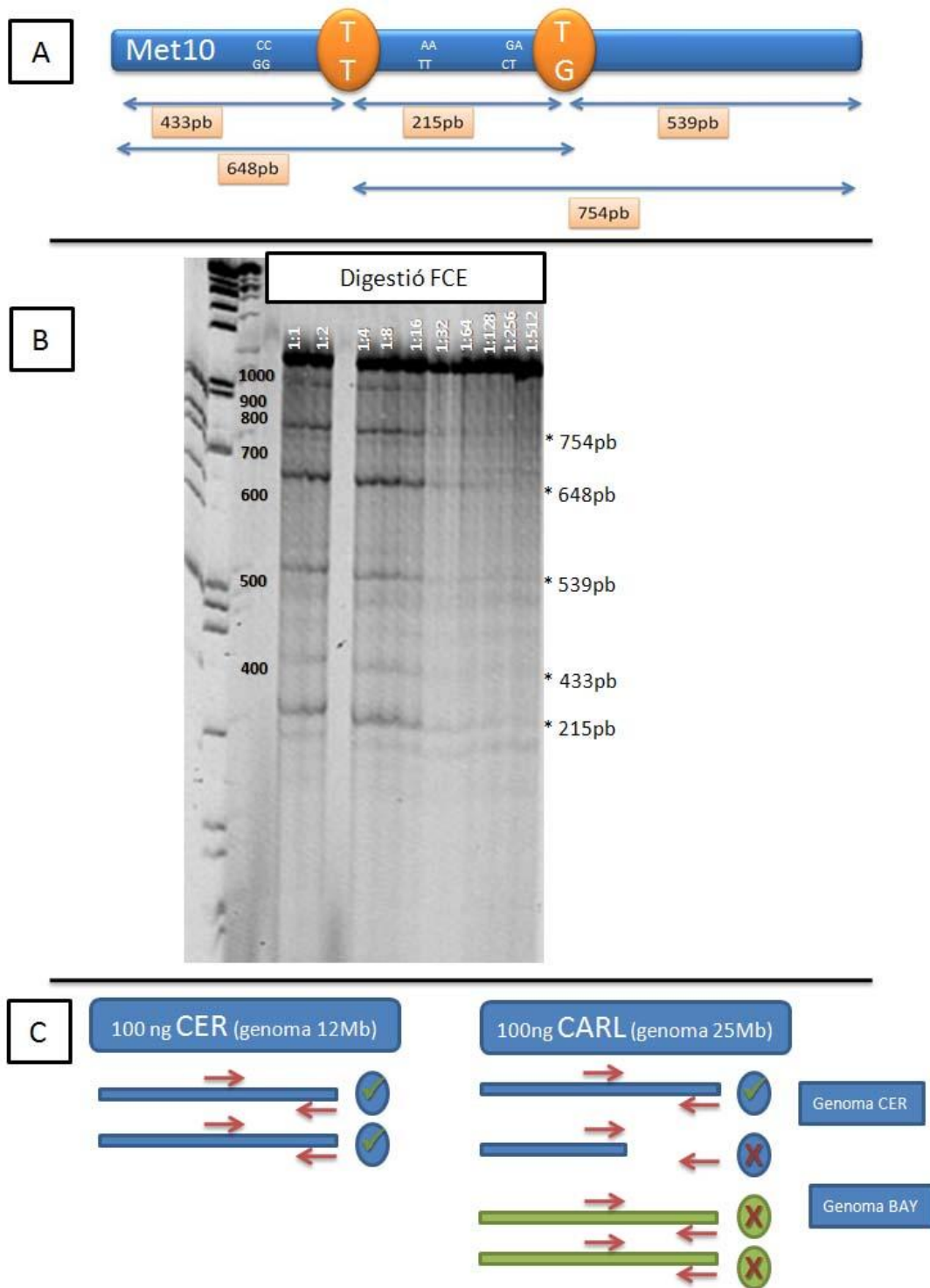


Figura 10: **A**). Esquema de l'heterodúplex format per la unió de dos fragments amplificats del gen Met10. Hi ha la relació dels fragments resultants possibles, en parells de bases (**pb**), tenint en compte els talls totals i parcials de l'enzim FCE. **B**) El material a digerir fou la mescla de les proporcions de *Saccharomyces cerevisiae* (CER) i *Saccharomyces carlbergensis* (CARL) en, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512. Digestió a 45°C durant 30 minuts el material. La digestió es carregà en un gel d'acrilamida segons l'apartat 2.5.7 de materials i mètodes. En asterisc s'han marcat les bandes que son producte de tall. **C**) Detall de la contribució de fragments de cada espècie durant l'amplificació del gen met10 a partir dels DNA genòmics de CER i CARL, tenint en compte els nanograms de partida, la mida del genoma, i que CARL presenta un truncament natural en el genMet10 en la zona d'amplificació.

Per altra banda, de les 5 bandes de tall teòriques esperades al mesclar els SNPs de les dues varietats de Llevat, sembla ser que n'hi ha unes que apareixen més que altres. Concretament la que correspon als 433 pb es la que es veu menys, i la de 754 pb té una mica més d'intensitat. En canvi la de 648 pb i la de 539 pb són les que més fortes es veuen, que indica que el desaparellament en la posició 648 es processa amb més facilitat per l'endonucleasa que el de la posició 433. Les bandes de 433pb i 754pb van lligades i correspondrien a les bandes que resulta de tallar la seqüència CC-T-CT o bé GG-T-GA, per altra banda les bandes de 539pb i les de 648pb, són el resultat de tallar la seqüència AA-T-GA o bé TT-G-CT.

2.2.6.- Anàlisi del límit de detecció de l'extracte de Fonoll en desaparellaments entre al·lels

Després d'haver vist que l'extracte cru de fonoll tenia la capacitat de detectar una proporció de desaparellaments de 1:16 (mutant: salvatge), es va voler analitzar com responia l'extracte cru de fonoll davant la detecció dels al·lels. Fins aquest punt, s'havia comprovat l'eficiència de l'enzim detectant una mostra davant d'una proporció creixent de mostra salvatge, però sempre amb el mateix al·lel polimòrfic. Per aquest motiu es va dissenyar un assaig on s'avaluaria l'eficiència de detecció de l'extracte davant d'un mutant heterozigot o d'un homozigot dins d'una mescla de DNA salvatge en proporcions de 1:1 fins a 1:1024. Es va elegir el fragment del gen SGR en l'individu 398s2 del que teníem individus en heterozigosi i homozigosi (Veure figura 11).

S'ha pogut comprovar que l'extracte té la capacitat de detectar al·lels dins d'un conjunt més gran de DNA, fins a un límit de proporció 1:16.

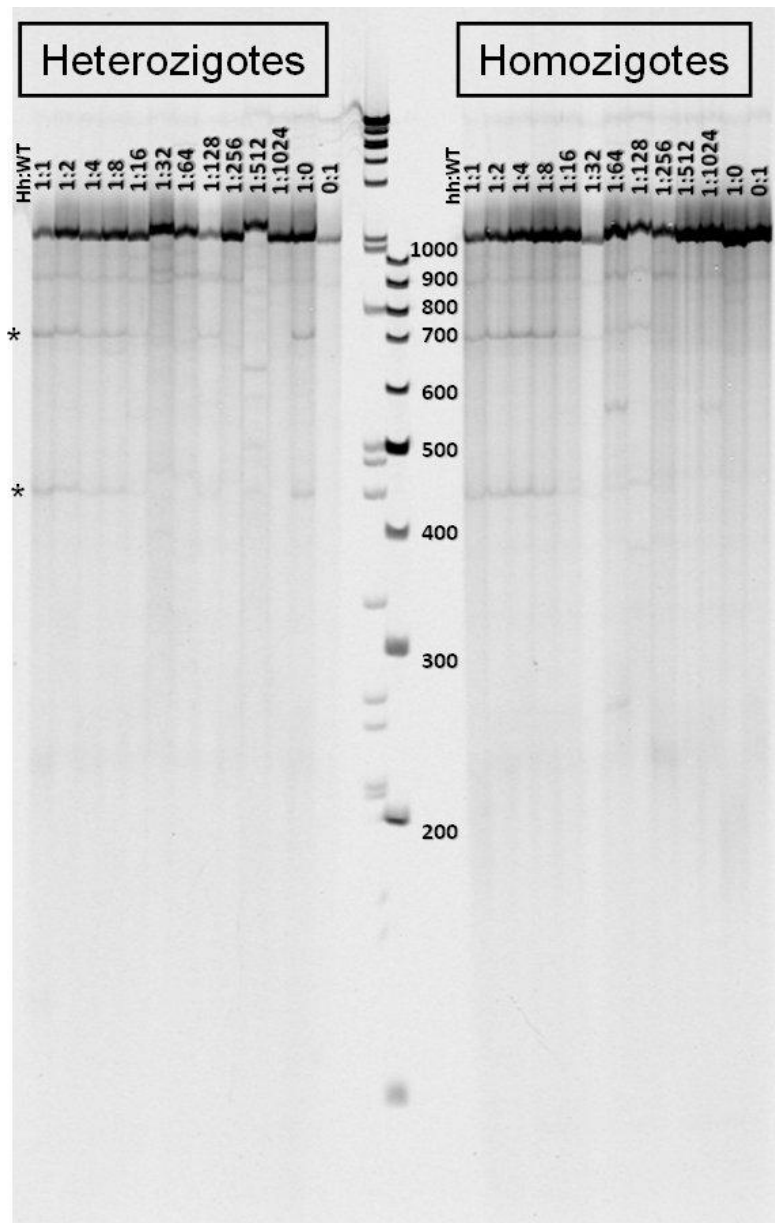


Figura 11: Anàlisi del límit de detecció del desaparellament entre l'heterodúplex format entre el mutant 398s2 i el DNA salvatge WT en el gen SGR d'una varietat d'arròs.

Mutació:salvatge-> 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 0:1, 1:0.

Per amplificar el fragment de 1135bp s'han utilitzat uns primers diferents als utilitzats en el garbellat del capítol 5. En aquest cas la digestió produí fragments de tall de 714bp i 421 pb

2.2.7.-Anàlisi del límit de detecció de l'extracte de Fonoll en desaparellaments produïts per delecions

Després de les proves per demostrar que l'extracte cru de Fonoll era capaç de detectar mutacions en diferents proporcions i fins i tot, de detectar al·lels, es va testar l'extracte en la detecció de delecions. Per comprovar l'eficiència de tall vam generar fragments amb delecions de diversa mida a partir del plàsmid pBluescript KS. Utilitzant la combinació de 2 enzims de restricció hem dissenyat fragments amb diverses delecions per tal de provar el límit de detecció al tallar l'extracte cru de fonoll dels loops de diverses mides que s'havien generat. En la figura 12, es mostren els fragments de forma visual, i els enzims emprats en la "construcció" d'aquests fragments. En el capítol 2 de materials i mètodes es detalla amb més precisió com s'han generat els fragments.

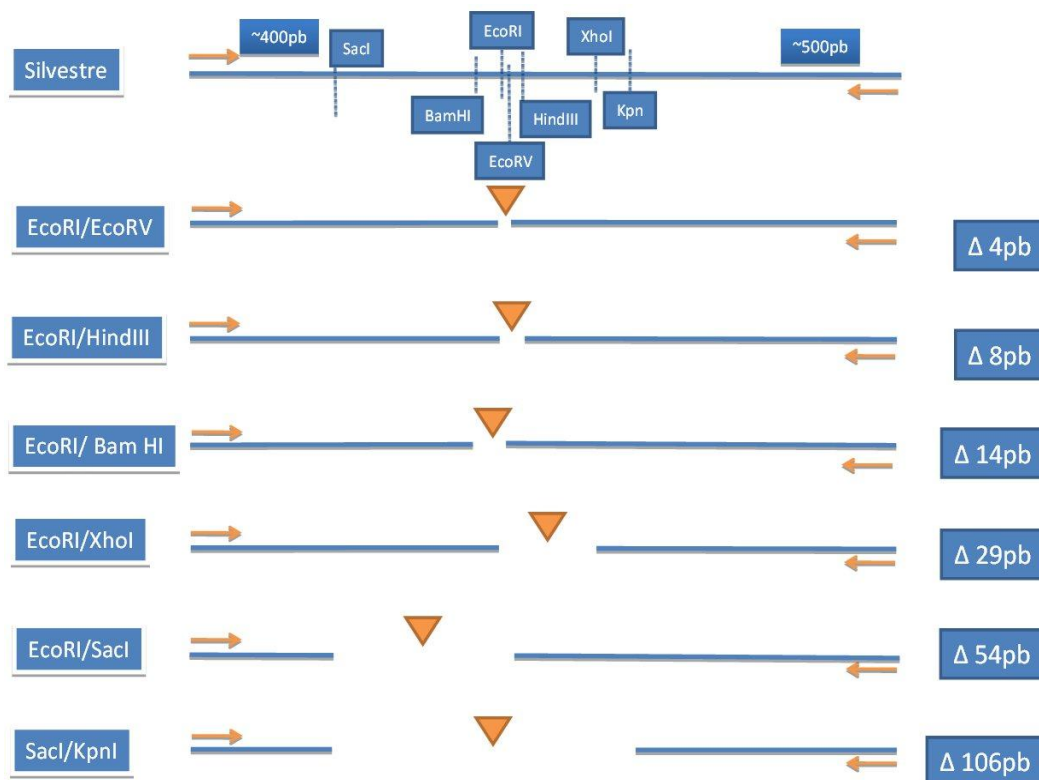


Figura 12: Representació gràfica dels diferents tipus de tall, i la deleción en parells de bases que presenta. També estan indicats els enzims utilitzats per tal de tallar els fragments i aconseguir les delecions de forma artificial. Al principi de cada fragment hi ha la relació dels dos enzims utilitzats i al final el nombre de bases de la deleción.

2.-Optimització de la detecció enzimàtica de mutacions puntuals de l'ADN.

Després de generar els fragments es provà diferents proporcions per veure el límit de detecció de l'enzim en cas de poder detectar el desaparellament generat per la delecíó. És a dir, provarem la proporció 1:1, 1:4 i 1:8, posant com a limitant al fragment que presenti la delecíó, més un control negatiu, que serà el mateix fragment pBluescript sense delecíó i hibridat amb ell mateix. Un cop amplificats per PCR, i després de la reacció de generació d'heterodúplex, es va digerir cada mostra amb l'extracte de fonoll Tal i com es pot observar en el gel d'acrilamida, (Figura 13) l'enzim FCE es capaç de detectar delecions de fins a 106 parells de bases.

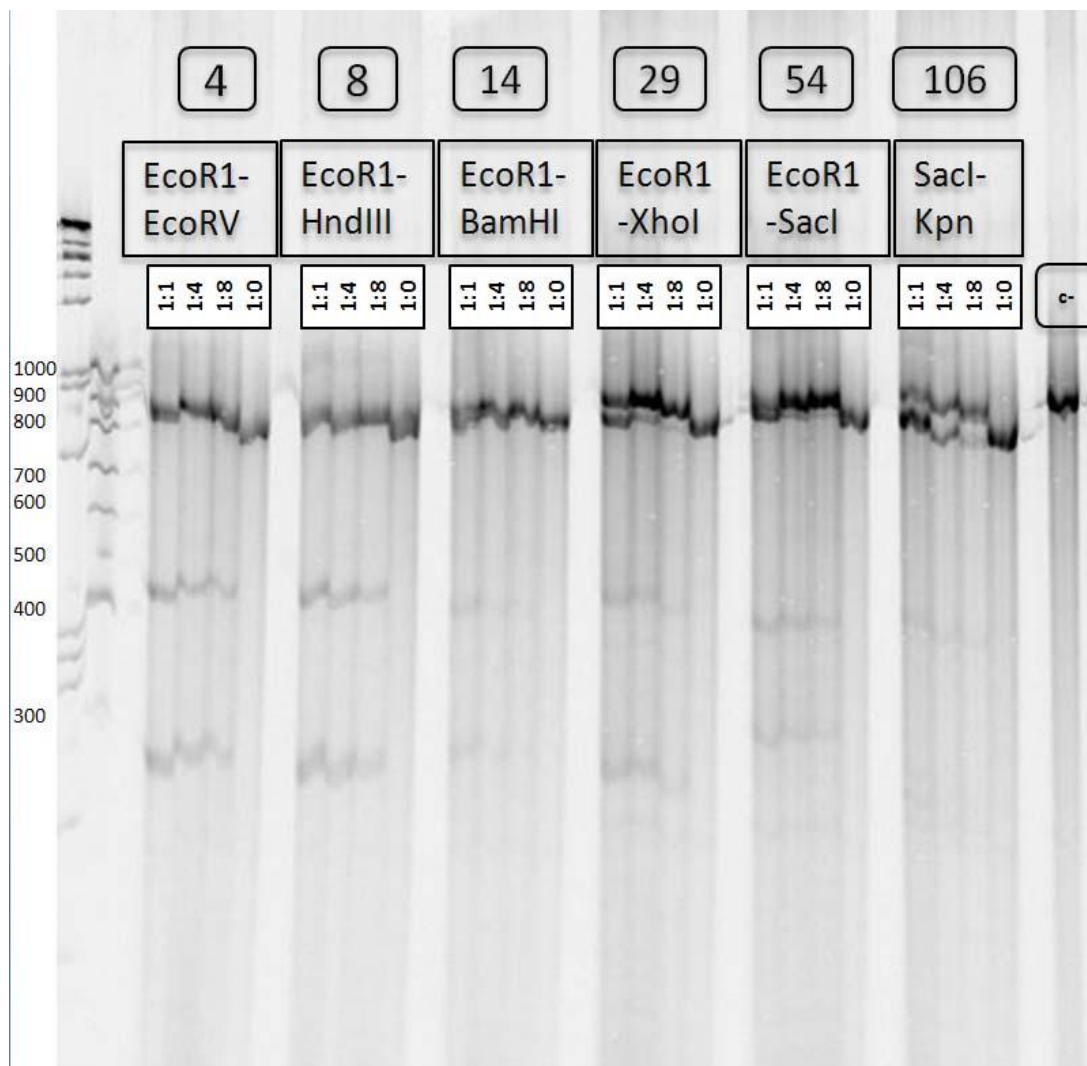


Figura 13: Digestió de fragments amb delecions relació pBSKS+: fragment delecíó; a: 1:1; b:1:4; c:1:8; d: 1:0. Controls Met10C. CER:200, a: 1:0; b:0:1; c: 1:4; d:1:8). C- és el control negatiu de pBSKS+ sense cap delecíó.

2.-Optimització de la detecció enzimàtica de mutacions puntuals de l'ADN.

Per una banda, és més eficient tallant loops més petits, com el de EcoRI-EcoRV, de 4 parells de bases, o com EcoRI-HindIII de 14 parells de bases en què tenim una resolució de fins a 8 cops en menor proporció la seqüència amb la deleció respecte al control pBSKS+. Per altra banda EcoRI-BamHI de 8 parells de bases de deleció apareix una mica més flux, tot i que no te massa sentit a priori, al tenir menys base de deleció que EcoRI-HindIII de 14 bases de deleció. Per altra banda, EcoRI-XhoI i EcoRI-SacI de 29 i 54 parells de bases de deleció respectivament, tenen una resolució menor al poder identificar el loop provocat per la deleció. Només quan estan en proporció 1:1, o bé 1:4 es detecta amb una ajustada definició, el qual és suficient si treballem amb pools de 4 individus. Finalment, l'enzim FCE es veu molt limitat a l'hora de tallar loops formats per fragments de més de 100 parells de bases de deleció. Suposem que degut a un tema físic, ja que la proteïna es incapaç de situar-se al voltant del loop i tallar-lo, però per altra banda, aquestes delecions tan grans, fins i tot les delecions de 50 parells de bases, es poden observar en un gel d'acrilamida, sense necessitat d'un tall per endonucleasa, per tant, tindriem igualment la capacitat per detectar aquest tipus de mutacions. Es cert però en fragments més petits de 3kb

2.2.8.- Preparació i control de qualitat d'un lot de FCE

Havent vist que l'efecte de l'extracte cru de fonoll tenia efecte en els tests d'activitat, es va extreure en un volum major per tal de preparar-lo pels garbellats en poblacions mutants. No obstant es va analitzar quin era el volum òptim per digerir els desaparellaments.

En la figura 14 es van testar diversos volums d'enzim per a cada mostra, formada per diverses proporcions de desaparellaments entre DNA salvatge/mutant dels fragments del gen Met10 de les mostres CER i CARL. La proporció que sembla que permet detectar millor el desaparellament fins a 1:16 fou el que emprà 1 µl d'extracte cru de fonoll. Cal remarcar que s'ha tornat a observar que a major volum d'extracte cru de fonoll obtenim una major digestió de l'heterodúplex format, però sembla ser que es manté constant la intensitat de les bandes tallades per l'enzim.

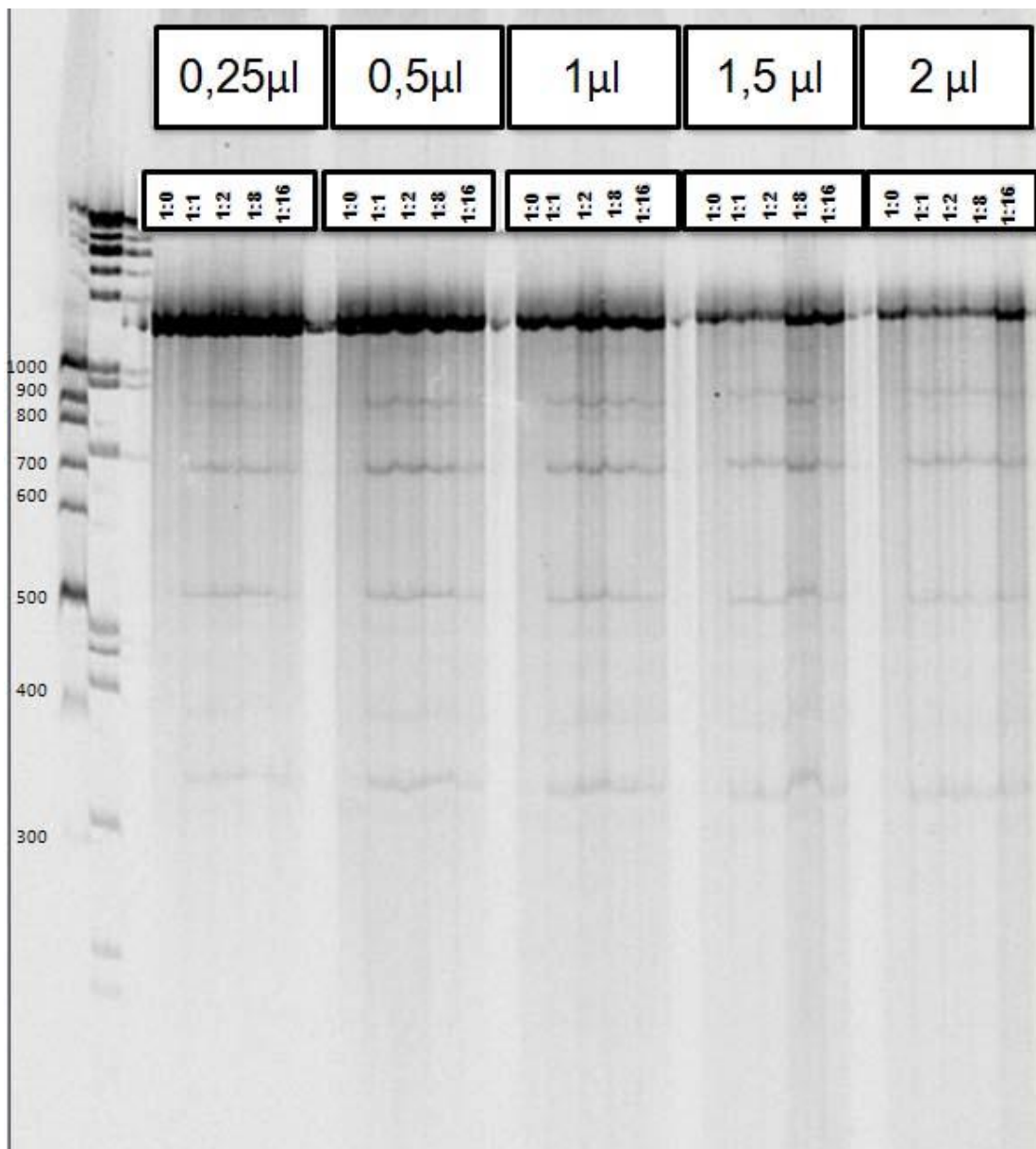


Figura 14: Gel d'acrilamida de les digestions de l'heterodúplex entre CER:CARL en volums d'extracte de fonoll de 0.25, 0.5, 1, 1.5 fins a 2 µl. La proporció entre CER:CARL és de 1:0, 1:1, 1:2, 1:8, 1:16.

2.3.-Discussió

2.3.1.-Elecció de l'extracte de fonoll com a enzim per la detecció de mutacions.

La majoria d'extractes crus que es van analitzar generaven talls inespecífics en un fragment sintètic, tot i que tallaven el desaparellament. De tots els extractes crus de les diverses plantes, foren l'extracte de fonoll i el de julivert, els que millor senyal de tall van donar. Tot i que l'extracte cru de julivert tallava massa fragments de forma inespecífica davant l'augment de volum de l'enzim. No obstant, en general la majoria d'extractes a l'augmentar el volum d'enzim en la reacció provocava que molts d'ells generessin talls inespecífics en els fragments. L'extracte cru de fonoll no produïa tants talls inespecífics, com en el cas de l'extracte cru d'api, i de l'enzim comercial surveyor (Transgenòmics).

2.3.2.-Importància de protegir els extrems dels fragments en la detecció de desaparellaments

L'ús de primers amb protecció fosforotioat en l'extrem 5', permetia la detecció del desaparellament entre les dues cadenes. L'activitat endonucleasa 5'-3' permet la detecció dels desaparellaments entre cadenes, però si no hi ha protecció, l'extracte cru de fonoll digereix el fragment amplificat. A la vegada es va detectar que en l'extrem 3' hi ha activitat exonucleasa, ja que a més volum d'extracte cru de fonoll no hi havia més intensitat de la banda de tall, però hi havia una major digestió del fragment. En els fragments sense protecció s'observava la mateixa digestió del fragment, però sense detectar la banda de tall. Per tant, es pot dir que l'extracte cru de fonoll presenta una activitat endonucleasa 5'-3' i una activitat exonucleasa 3'-5'. L'ús d'un volum adequat de l'extracte cru, ens permet detectar desaparellaments tot i que es probable que la mida del fragment, també interfereixi en el límit de detecció del desaparellament.

2.3.3.-L'eficiència de l'extracte de fonoll en la detecció de desaparellaments.

L'extracte cru de fonoll va demostrar que tenia la capacitat de tallar fragments amplificats a partir de material genòmic. Es va demostrar, que no era necessari passar l'extracte per una columna de diàlisi, ja que la mostra sense purificar era capaç de tallar els desaparellaments d'una sola base de SNP's amb un límit de resolució de 1 fragment dsDNA mutant contra 16 fragments salvatges dsDNA. Altres grups que han treballat amb la endonucleasa CEL I, han trobat que el límit de detecció d'un desaparellament era la relació 1:16 (Till *et al.*, 2004)¹⁸¹

Tot i que davant de la prova de detecció de polimorfismes entre els fragments amplificats de DNA en dues soques de llevat, la soca *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces carlbergensis* vam detectar que les intensitats de tall eren lleugerament inferiors a l'esperat. Sabem que *Saccharomyces carlbergensis* té 25 Mb (Nakao *et al.*, 2009)²⁰² i *Saccharomyces cerevisiae* 12 Mb (Goffeau *et al.*, 1996)²⁰³, per tant a igual material de partida (100 ng en el nostre cas), obtindrem una diferència de fragments amplificats 1:2 de CARL respecte CER. Però tal i com vam descobrir al seqüenciar individualment mutants en el capítol 4, la soca CARL, presenta una de les dues còpies del gen Met10, truncat. Per tant, estariem parlant, que a igual volum de partida de DNA en ambdues soques, CARL està en una proporció 4 cops inferior que CER. Així doncs, el límit de detecció dels polimorfismes, en aquest cas, no és de 1:16, sinó estariem parlant d'un límit de 1:4 real.

De totes formes, en la majoria de garbellats moleculars de poblacions mutagenitzades, aquest no serà el cas més típic. El més comú serà trobar un al·lel mutant dins d'un grup de 4 o 8 mostres sense la mutació. Per tant una altra qüestió que es plantejà fou el límit de detecció de l'enzim davant un al·lel mutant diluït entre DNA genòmic salvatge. En aquest cas es va analitzar, el límit de detecció d'una mutació en un i dos al·lells d'un gen d'arròs arròs que presentava una dotació cromosòmica 2n. Tal i com esperàvem, la resposta d'intensitat de senyal en la detecció d'un al·lel en heterozigosi és meitat que la intensitat de senyal en la reacció de detecció d'un en homozigosi. Al barrejar la mateixa quantitat de DNA de dos fragments amb diferent dotació al·lèlica en una reacció de generació d'heterodúplex és molt difícil que es generi un intercanvi de cadenes al 100%

En la detecció d'un desaparellament en heterozigosi, l'al·lel que conté la mutació o l'SNP, teòricament, està en una relació de 1:3 si acceptem que s'ha afegit la mateixa quantitat de DNA de les dues mostres com a material de partida. En canvi, en el material amb dotació en homozigosi, està en una relació 1:1 i per tant es generen més nombre de fragments amb el desaparellament per poder detectar.

2.3.4.-L'extracte cru de fonoll té capacitat de detecció de delecions

Mentre que la majoria de les mutacions puntuals (com les causades per l'actuació de mutàgens com l'EMS) tenen solen tenir efectes més discrets en l'efectivitat de la proteïna que tradueixen, les delecions, en canvi si generen efectes més significatius. Per aquest motiu es va

testar la capacitat de l'extracte FCE de reconèixer i digerir deleccions de diferents longituds i tal i com s'ha vist, l'extracte cru de fonoll ha reconegut els 6 tipus de fragments amb els diferents desaparellaments. Això ens permetrà utilitzar l'enzim en un espectre més variat de mutàgens.

2.3.5.-Especificitat en el tall de l'extracte de fonoll

La tensió generada pel bucle o bé la forma física del desaparellament es tallada correctament per l'extracte cru de fonoll, tal i com s'ha vist, en els desaparellaments formats per deleccions. Per altra banda, els desaparellaments formats per una base diferent, també son detectats per l'extracte cru de fonoll, tot i que amb diferent senyal d'intensitat depenent de la base desaparellada. Així doncs, aquest fet ens planteja la pregunta de si la capacitat de detecció d'una mutació depèn de la seqüència que l'envolta, ja que aquesta afectaria a la tensió del bucle, a part de la tensió formada per la parella de nucleòtids desaparellats. Algunes endonucleases que reconeixen desaparellaments (P1 i Nucleasa Mung Bean) tenen certes preferències per la seqüència que està al voltant del desaparellament. El grup de Kabotyianski (Kabotyianski *et al.*, 1995)²⁰⁴, sostenen que les 2 bases que hi ha al voltant del desaparellament tipus hairpin, determina el tipus de tall que cada endonucleasa farà. Per altra banda segons Santalucia la temperatura de fusió, així com el seu comportament termodinàmic de dos fragments complementaris depenen de la seqüència (Santalucia *et al.*, 1998)²⁰⁵. Per això, el tipus de seqüència al voltant del loop pot afectar a la formació del desaparellament i per tant tindrà conseqüències en la formació de tall per part d'aquestes endonucleases.

Altres estudis suggereixen que nucleases com la endonucleasa MBE (Mung Bean Endonuclease), la S1 (*Aspergillus*) i la CELI només tallen una sola cadena (Till *et al.*, 2004)¹⁷⁵ (Oleykowsky *et al.*, 1998)¹⁷³. Segons Bauman l'endonucleasa MBN talla preferiblement desaparellaments T i A, en canvi l'endonucleasa S1 talla Adenines (Bauman *et al.*, 1986)²⁰⁶. Till va detectar que en les regions riques en CG els desaparellaments eren més difícils de detectar amb l'extracte cru d'api (Cel), però ho van atribuir a condicions poc favorables de Mg²⁺ i pH. Segons Till, no hi havia diferència en l'eficiència de tall atribuïble a l'entorn del desaparellament. Oleykowsky (1998) va detectar, que l'enzim CELI purificat, presentava certa tendència a tallar uns desaparellaments de tipus substitució de base, més que altres. Concretament, tallava molt efectivament els desaparellaments que continguessin una citosina, especialment C/C, però quasi no s'apreciava el tall en desaparellaments T/T (Oleykowsky *et al.*, 1998)¹⁷³.

Segons els resultats obtingut en la detecció de mutacions dels garbellats en els capítols 4 i 5, l'extracte cru de fonoll te preferència per detectar els desaparellaments A/C i T/G, en una àmplia majoria tot i que també es capaç de detectar desaparellaments, T/T, A/G i C/C. La preferència de l'extracte cru de fonoll pels desaparellaments A/C i T/G coincideix, amb els que genera el mutagen EMS, que provoca transicions de canvis de base tipus G/C→A/T.

2.3.6.-L'equilibri entre el soroll de fons i la intensitat de tall és degut al volum d'enzim

Que l'extracte cru de fonoll no talli del tot els desaparellaments generats, pot ser causat pel tipus de tall que provoca. Podria ser que l'enzim tingués dificultat per tallar la doble cadena per aquests desaparellaments degut a la falta d'enzim, però no és així, ja que encara que n'hi afegim més, no aconseguim observar més intensitat en les bandes de tall. Si el motiu pel qual no es tallen és que l'extracte es satura i no pot seguir tallant, en les reaccions amb més quantitat d'enzim no haurien de quedar fragment complets. Però no és així, i la relació del patró de tall entre els diferents fragments sembla independent de la quantitat d'enzim que hi afegim. Per altra banda que a l'augmentar el volum d'enzim i que mantinguem la mateixa intensitat de tall, però que disminueixi el substrat pot voler dir que l'enzim també talla de forma inespecífica a partir d'una determinada concentració. Però mitjançant aquest tipus d'experiments, no podem saber si el tall es produeix a les dues cadenes complementàries o bé si hi ha tall tipus osca, o bé si hi han talls mixtes. Till també comenta que tot i que desapareixi el DNA natiu, no augmenta la intensitat de les bandes de desaparellament. Se sap que l'enzim Cel I de l'api, te activitat 3'-5' exonucleasa (Till *et al.*, 2004)¹⁷⁵ (Oleykowsky *et al.*, 1998)¹⁷³ i tal i com hem vist, pot tallar el DNA, produint gradació de DNA que genera soroll de fons. Sembla ser, que podria passar el mateix amb el material amplificat, que tot i estar protegit per la modificació dels primers tipus fosfotioat, és degradat degut a l'excés d'enzim de l'extracte. Estaríem parlant que l'enzim trenca el desaparellament, utilitzant la seva capacitat endonucleasa 5'-3', però per altra banda va degradant els extrems no protegits 3', fent ús de la seva capacitat exonucleasa 3'-5'. L'extracte cru de Fonoll, te una activitat asimètrica també, ja que primer elimina la tensió formada pel loop o bé, pel desaparellament i posteriorment podria degradar la cadena complementària

S'ha vist que en l'endonucleasa S1 talla la cadena simple per l'extrem 3' degut a que es formen petits desaparellaments, en els extrems terminals del DNA (Kroeker *et al.*, 1976)²⁰⁷. A certa temperatura, poc temps i davant un excés de l'enzim, S1 tallava tot el DNA. Segons Bauman

(Bauman *et al.*, 1986)²⁰⁶ les endonucleases MBN i S1, tenen activitat no específica en els extrems 3' dels fragments i a certa temperatura, tallen de forma indiferent tot el DNA. Així doncs, sembla ser que el soroll de fons és generat per una degradació del DNA davant un excés d'endonucleasa, més que produït per errors produïts durant la PCR.

L'equip de Cao (Gao *et al.*, 2007)²⁰⁸ han treballat amb l'endonucleasa V de *Thermotoga maritima* (Tma), que mitjançant mutacions han canviat la seva especificitat per certs desaparellaments. Certs residus de la proteïna reconeixen per posició diferències en l'arquitectura del DNA, i tallen només la cadena que presenta el desaparellament. En el seu estudi reconeixen que la nucleasa Tma te dificultat per detectar desaparellaments A/C dins de regions riques en GC.

2.4.-Conclusió

Hem pogut comprovar que l'extracte de Fonoll Fresc, te unes capacitats similars a altres endonucleases que hi ha disponibles al mercat actualment. No només es capaç de detectar diferents tipus de desaparellaments produïts per un canvi de base, sinó que és capaç de detectar delecions força grans amb una molt bona resolució. La seva eficiència en tallar desaparellaments i permeten la seva detecció/identificació depèn del balanç entre la seva activitat endonucleasa 5'-3' i la seva activitat exonucleasa 3'-5'

Aquesta capacitat de detectar diferents tipus de mutacions la fa molt versàtil per a molts tipus diferents d'assaigs de detecció de mutacions en garbellats moleculars. De la mateixa forma s'ha vist que pot treballar en poblacions on s'hagi utilitzat diferents tipus de mutàgens des de EMS que pot provocar mutacions puntuals, passant pels raigs γ . Per tant, el rang de detecció de mutacions per desaparellaments va des d'una sola base diferent, fins a 106 parells de bases de delecio. A partir de 54 pb de delecio i depenent de la mida del fragment amplificat, es pot detectar a simple vista observant un gel d'agarosa, per aquest motiu, ja no seria necessari el garbellat per deteccio de desaparellaments.

Així doncs, l'extracte cru de FONOLL és útil per detectar una ampli rang de mutacions, i fins i tot, sense purificar és útil per utilitzar directament en les tècniques de garbellat de tipus enzimàtic.

S'ha vist també, que la protecció amb un enllaç fosforotioat, és força útil per tal de reduir el soroll de fons, de la mateixa forma que utilitzar una concentració d'extracte cru adequada evita una degradació dels fragments indiscriminada.

Generació i identificació de mutants en llevat pel Gen sulfit reductasa

3.- Generació i identificació de mutants en llevat pel Gen sulfit reductasa

3.1.- Introducció

3.1.1.-L'elaboració de la cervesa

La cervesa és una beguda alcohòlica obtinguda a partir de la fermentació de diversos cereals . En el procés d'elaboració s'utilitzen com a productes bàsics, l'aigua, el cereal, el llúpul i el llevat, en que la varietat a utilitzar dependrà de cada marca i regió de producció.

L'elaboració de la cervesa està dividida en 5 fases: l'elaboració del malt, obtenció del most, la fermentació, la maduració o repòs i l'acondicionament de la cervesa per l'envasat.

La primera fase consisteix en la elaboració del malt a partir de llavors de cereals com l'ordi (*Hordeum vulgare*), o del blat (*Triticum sp.*), entre altres, on es sotmet el gra a unes condicions òptimes d'humitat , temperatura i ventilació que afavoreixen la germinació del embrió i l'inici del desenvolupament. Durant aquest procés es formen diversos enzims específics que seran inhibits temporalment mitjançant un procés d'assecat per aire calent, per evitar el consum del material de reserva per part de l'embrió. Acte seguit comença un procés de torrefacció (molt important segons el tipus de varietat de cervesa), polvorització i tamisat del malt. A partir d'aquest punt es pot emmagatzemar la farina de malt per la seva posterior utilització.

La segona fase consisteix en l'elaboració del most o brasage, que s'obté a partir de la mescla de malt i aigua. L'objectiu del brasage és produir un most amb les característiques necessàries per produir la cervesa desitjada. Això s'aconseguirà mitjançant la solubilització enzimàtica de tots els components del malt. El malt és barreja amb aigua en una caldera que es va escalfant progressivament fins una temperatura que dependrà de la recepta, normalment són temperatures progressives de 45, 62 i 72°C. Durant aquest procés actuen els diferents enzims que conté el malt, destacant l'empastament o proteòlisi (45-55°C), maceració o amilòlisi (62-65°C) i sacarificació (70-75° C) on s'activen les amilases que començaran a degradar de nou el midó. En una segona caldera s'afegeix el que s'anomenen els adjunts que poden ser sèmola de cereal de blat de moro, arròs, blat o altres. Els adjunts es barregen amb aigua que s'escalfa per tal d'alliberar el midó. Posteriorment, es barregen els continguts de les dues calderes, on a

més malt o midó, més sucres tindrà el most, i consegüentment més contingut alcohòlic tindrà la cervesa. Després del filtrat de la mescla, s'obté un líquid anomenat most, de color més o menys marró en funció de la torrefacció del malt. Seguidament a aquest most se li eleva la temperatura fins a l'ebullició, i és en aquest punt on s'afegeix el llúpul, la flor d'una planta enfiladissa, de la família de les cannabinàcies. Les flors femenines d'aquesta planta proporcionen els alfa àcids que al isomeritzar-se donaran a la cervesa l'aroma i el sabor amarg a més de contribuir en l'estabilitat de l'escuma. En aquesta fase d'ebullició que dura aproximadament una hora i mitja, s'aconsegueix la precipitació de les proteïnes, l'evaporació de compostos indesitjables per la cervesa, l'inactivació dels enzims i l'esterilització del most.

La tercera fase de l'elaboració de la cervesa és la fermentació. El most es barreja amb el llevat durant un 4-10 dies per tal de fermentar els sucres a alcohol. Depenent de la varietat de llevats que s'afegeixi al most es produirà un tipus de cervesa o un altre. Les cerveses de tipus Ale, son de fermentació ràpida, ja que els llevats tipus *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen *et al.*, 1996)²⁰⁹ passen de 4-6 dies a temperatures entre 18-25°C i produeixen més aromes i gustos afruitats a la cervesa. En canvi les cerveses de tipus Lager, son cerveses de fermentació baixa, en què passen de 8-10 dies a temperatures de 10-15°C on llevats de tipus *Saccharomyces carlsbergensis* (Vaughan-Martini 1987)²¹⁰ produiran un altre tipus de cervesa tenint tendència a flocular més, al ser llevats més pesats. Les cerveses de tipus fermentació espontània, son aquelles que no utilitzen llevats afegits, sinó que empren els llevats propis de l'ambient o els que contenen els grans i son un tipus de llevat molt concret de cada regió productora. Altres cerveses fan una doble i fins i tot una triple fermentació essent cerveses amb força graduació alcohòlica i denses de cos. Durant la fermentació es produeix molta calor, ja que és una reacció exotèrmica, i per tal que els mateixos llevats no acabin perdent eficiència, degut a la calor, s'ha de mantenir constant la temperatura del tanc fermentador.

En la quarta fase, es passa la cervesa a un tanc de maduració de 20 a 25 dies a 2-4°C on es clarifica i acabarà d'adquirir el sabor característic fent una fermentació més lenta. En algunes cerveses, tornarà a un tanc de fermentació per tal de fer una segona fermentació.

Finalment, en la cinquena fase es filtra la cervesa i s'hi afegeixen de nou diòxid de sofre o metabisulfits per tal d'estabilitzar el sabor i per evitar el creixement microbià durant l'emmagatzemament.

3.1.2.-La importància del sulfits com a conservadors dels aliments

Els sulfits son composts inorgànics amb propietats antioxidants usades com a conservants en la indústria alimentària. Els sulfits han estat usats des de l'antiguitat com a additius per preservar el sabor dels aliments, com a conservants contra el creixements de microorganismes patògens, contra el deteriorament del producte, és a dir, allargant la vida útil del producte.

En la cervesa, els sulfits s'afegeix en format de diòxid de sofre (SO_2) o de metabisulfit de sodi ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) o potassi ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$). El diòxid de sofre o el metabisulfit, s'equilibra en solució aquosa en forma de àcid sulfurós (SO_2), bisulfit (HSO_3^-), o sulfit (SO_3^{2-}) trobant la seva presència depenent del pH. Tot i així hi ha una proporció de diòxid de sofre, que es el que dóna les propietats antimicrobianes, aromàtiques i gustatives a la cervesa (flavour). Per aquest motiu tan en vins com en cerveses es parla de dos tipus de composts de sofre, el sulfurós total i el lliure, i la normativa europea i espanyola (BOE 95/2/CE)²¹¹ controlen els límits que poden contenir ambdós tipus de productes.

L'etanol és un dels composts que juntament a diòxid de sofre (segons la IUPAC) modulen el creixement microbià destruint la vitamina B1 (tiamina). Per altra banda el diòxid de sofre actua com a antioxidant inhibint l'activitat de certs enzims que podrien alterar el color i olor de la cervesa i del vi (Poulton *et al.*, 1970)²¹² (Ough *et al.*, 1987)²¹³. És més coneguda l'activitat bisulfit com a conservant dels aromes, però sembla ser que al poder combinar-se amb altres molècules formant una unió més o menys estable, bloqueja cert composts secundaris de la fermentació que donen un mal gust a la cervesa (Bartowsky *et al.*, 1995)²¹⁴.

Per altra banda, i degut a que els sulfits poden ocasionar problemes de salut, la legislació especifica quins límits de sulfits entren dins de la legalitat en funció dels seus consumidors potencials. Està descrit que pels consumidors sensibles poden sofrir atacs d'asma, anafilaxis, dolor abdominal, urticàries, rinoconjuntivitis, atacs d'apoplexia i fins i tot la mort (Tarlo *et al.*, 1993)²¹⁵. Tot i que els casos donats son pocs, la necessitat de controlar l'adició de sulfits és una característica indispensable, així com etiquetar correctament que el producte en conté.

A més a més, la Directiva Comunitària 2003/89/CE, obliga a etiquetar aquells productes que continguin més de 10mg/l de sulfits total. Se sap que aquells productes que contenen més de 35mg/l de sulfurós lliure, piquen al nas, per tant no és gens recomanable. Per altra banda la legislació prohibeix l'adició de més de 150 mg/l de sulfurós total. En el cas de la cervesa els límits legals son 20mg/L en totes les cerveses, incloses les de tipus sense alcohol i 50mg/L en les cerveses de doble fermentació. La quantitat màxima de sulfits admesa legalment en les cerveses sempre és força superior a la que realment s'afegeix a la cervesa, tenint en compte el nombre de fermentacions a què ha estat sotmesa.

3.1.3.-L'activitat metabòlica dels llevats modifica el contingut de sulfits

Durant la maduració de la cervesa i degut al temps que roman embotellada, els llevats poden alterar el contingut de sofre de la cervesa (Zamora 2005)²¹⁶.

Tot i que es té en compte el còmput de SO₂ total, durant l'emmagatzematge de la cervesa el diòxid de sofre pot passar un altre cop a sofre (S₂), a Sulfurós i finalment a sulfat (SO₄), variant el sulfurós lliure. Aquest fenomen és l'anomenada evolució del contingut de sulfits lliures i és un procés que no es pot controlar. El llevat pot variar lleugerament les proporcions de sulfits al incorporar-lo per fabricar aminoàcids, o bé al contrari, expulsar-ne de nou, degut al catabolisme d'aminoàcids. Sigui com sigui, l'alteració dels sulfits pot provocar el canvi de les propietats organolèptiques de la cervesa, al permetre que grups carboxils quedin de forma lliure, modificant l'aroma i compromentent l'estabilitat del producte.

La transformació del sulfit durant la fermentació, és dut a terme per la proteïna Sulfít reductasa (subunitat de la qual és codificada pel gen Met10), que té la funció de passar els sulfits a sulfhídric. És a dir, els llevats alteren aquesta composició en funció de la seva pròpia activitat metabòlica, majoritàriament en les rutes de biosíntesi de aminoàcids. A partir de l'adició de sulfits, els llevats passen els sulfits a l'interior de les seves cèl·lules mitjançant unes permeases. Mitjançant l'activitat de diversos enzims, els Sulfats poden passar a sulfhídric durant els primers 10 dies de fermentació.

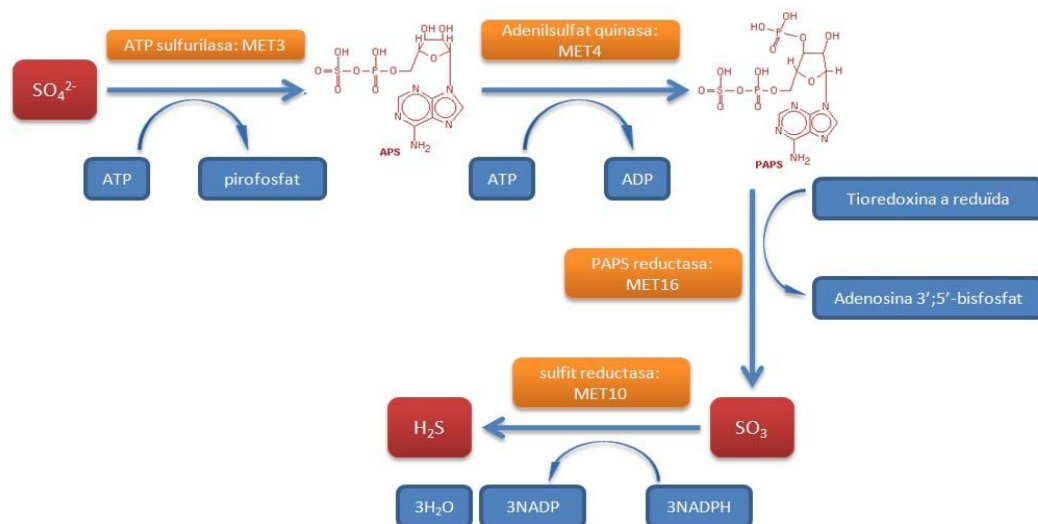


Figura 15: Ruta metabòlica de la reducció dels Sulfats a sulfurs en llevats. Font KEGG

El gran valor comercial de cada soca emprada en l'elaboració d'una cervesa, la fa única per les propietats fermentatives i el bouquet que dona al producte final. Per tant serà desitjable,

conservar les característiques de la varietat i eliminar només els gens que intervenen en la transformació de sulfits a sulfur d'hidrogen. Concretament seria interessant desactivar els gens responsables de les subunitats de la sulfit reductasa.

3.1.4.-Mutagènesis i garbellat molecular d'una soca cervesera

Les soques de llevat productores de cervesa, presenten varies diferències respecte a les soques silvestres o amb les espècies que son utilitzades en estudis en laboratori. Per una banda tenim les soques de fermentació alta o **ales** que constitueixen un grup de llevats diploides relacionats amb soques de *S. cerevisiae* de laboratori.

Per altra banda existeixen les soques lager que tenen més capacitat de fermentació a baixes temperatures i donen una major graduació d'alcohol a la cervesa. En aquestes soques trobem *Saccharomyces pastorianus* que és un híbrid allo-tetraploide entre *S. cerevisiae* i *S. bayanus* (Vaughan-Martini *et al.*, 1985)²¹⁷ i (Yamagashi *et al.*, 1999)²¹⁸. Aquesta soca, anomenada també *Saccharomyces carlsbergensis*, i té la capacitat de fermentar a temperatures que oscil·len des de 6 a 12°C fins a 34°C com a màxim. Per altra banda la nostra soca de *Saccharomyces carlsbergensis* té poca o nul·la capacitat esporulativa (o amb espores de baixa viabilitat), i es reproduïx majoritàriament de forma vegetativa.

Aquesta soca conté quasi un 60% més de contingut d'ADN que el llevat de fermentació ràpida *S. cerevisiae*, tot i que estudis sobre DNA mitocondrial i DNA ribosòmic en *S. pastorianus* es creu que la major proporció del material genètic deriva de *S. bayanus* que de *S. cerevisiae* (Piskur *et al.*, 1998)²¹⁹ i (Montrocher *et al.*, 1998)²²⁰. Recentment s'ha seqüenciat el genoma de *Saccharomyces pastorianus* descobrint que conté uns 25 Mb (Nakao *et al.*, 2009)²²¹. El genoma, que mesura 25 Mb conté seqüències derivades dels sub-genomes de *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus*, agrupats en 36 cromosomes, dels quals 8 presenten translocacions entre ambdues espècies i una regió mitocondrial circular originària de *Saccharomyces bayanus*. Per altra banda, el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* és de 12 Mb, i uns 6275 gens (Goffeau *et al.*, 1996)²⁰³ i el genoma de *Saccharomyces bayanus* és de 11 Mb (Kellis *et al.*, 2003)²²². La indústria cervesera està interessada en soques poliploides amb la capacitat d'alliberar sulfits (SO_3^{2-}) (o no transformar el SO_2), perquè reduiria la necessitat d'afegir sulfits artificialment.

Park va trobar que les soques amb sobreactivació de la permeasa SSU1 incrementaven lleugerament els sulfits en el medi al expulsar-los del citoplasma del llevat (Park *et al.*, 2000)²²³.

Però tot i haver un lleuger increment dels sulfits en el medi, l'organisme els continuava utilitzant per les seves activitats metabòliques al no haver disminució de l'activitat sulfít reductasa.

Hansen per altra banda, va generar soques de *S. carlsbergensis* modificades genèticament que eren defectuoses per l'enzim sulfít reductasa (Met10) o per l'enzim homoserine O-acetyl transferase (Met2). Mitjançant recombinació homologa, van eliminar seqüencialment les dos còpies dels gens Met2 en individus segregants haploides (tipus Mata; Mat α de *S. carlsbergensis* i van regenerar unes soques de *S. carlsbergensis* mitjançant la sexualitat del llevat (anomenada mating). Per l'altre banda, va seguir la mateixa estratègia per eliminar el gen Met10. Hansen va trobar que aquestes soques modificades incrementaven la producció de sulfits i d'aquesta forma milloraven el sabor de la cervesa (Hansen *et al.*, 1996²²⁴; Hansen *et al.*, 1996)²⁰⁹.

Les soques sense capacitat de mobilització de sulfits són viables, però es tornen auxotròfiques per la metionina (Hansen *et al.*, 1996)²⁰⁹ (Park *et al.*, 2000)²²³, (Masselot *et al.*, 1975)²²⁵.

3.1.5.-Objectius del projecte

Els resultats de Hansen demostren que és possible obtenir soques de llevat amb una producció augmentada de sulfits. No obstant, les soques de Hansen han estat generades mitjançant la tecnologia del ADN recombinant. Aquest fet implica a nivell legal que la utilització de aquestes soques per a la producció de cervesa o vi infringiria la legislació comunitària vigent, a part que probablement provocarien rebuig en el consumidor. Per aquesta raó, es va seguir una estratègia de mutagènesi no dirigida, de tipus química, en una soca industrial de llevat acoblada a la detecció de mutants a nivell molecular. El primer objectiu fou determinar les condicions de la mutagènesi a través de l'elaboració d'una soca indicadora i testar l'eficiència genotòxica i citotòxica del mutagen EMS. Un cop determinades les condicions de mutagènesi es va generar una població mutant de llevat per garbellar individus que presentessin una mutació que desactivés el gen Met10. Concretament el nostre objectiu fou la disminució progressiva de la producció de sulfits, localitzant dins d'una població aquells mutants que tinguessin un defecte en l'enzim sulfít reductasa mitjançant la inhibició de les diferents còpies funcionals del gen Met10 dels dos genomes. A partir de l'obtenció d'una soca mutant amb una còpia de la proteïna sulfít reductasa no funcional, s'establiran les subseqüents rondes de mutagènesi per tal d'anar aconseguint nous mutants per les altres còpies del gen. Finalment estudiar la viabilitat de la soca mutant per l'enzim sulfít reductasa.

3.2.-Resultats i discussió

3.2.1 -Posta a punt de la mutagènesi química de *S. carlsbergensis*

3.2.1.1.-Determinació de LD50

Abans de fer una mutagènesi a gran escala, s'ha d'avaluar l'efecte del mutagen en l'organisme amb que es vol treballar. A l'hora d'aplicar el protocol de detecció de mutacions, s'ha de tenir en compte l'eficiència del mutagen i diferenciar la genotoxicitat de la citotoxicitat. Sabem que l'etil metilsulfonat (EMS) provoca ambdós efectes, per tant s'ha de comprovar com afectarà el mutagen a l'organisme i seleccionar les condicions òptimes del procés de mutagènesis.

L'habilitat del mutagen a l'hora d'induir lesions dependrà de la concentració que utilitzem, el temps d'exposició i de la facilitat que tingui per penetrar dins de la cèl·lula. Disposar d'aquesta informació ens permetrà optimitzar la reacció de mutagènesis en funció del mutagen elegit.

Sabem per Ames que els organismes responen de forma diferent a segons quins tipus de mutagen, i temps d'exposició per tal de produir el màxim canvi sense matar a l'organisme, per tant, hem de determinar prèviament, l'efecte que tindrà el mutagen en l'organisme en el nostre cas, una soca de llevat de tipus haploide i diploide (Ames 1973)¹³⁶.

S'ha utilitzat el càlcul de la dosi letal 50 per determinar quina concentració i temps d'exposició és aquell que mata a la meitat de la població, extrapolant el seu efecte mutagènic com a òptim.

3.2.1.2.- Anàlisi de l'eficiència de la Mutagènesis mitjançant una soca indicadora

Per saber si el mutagen generarà mutacions en el genoma amb la freqüència desitjada, hem generat unes soques indicadores que contenen una proteïna de fusió, que ens permetran saber-ho.

Per tal de mesurar l'efecte de diversos mutàgens, s'ha generat unes soques de prova (haploides i diploides) que ens permetin detectar visualment el tipus de dany generat per cada tipus de mutagen, tan a nivell genotòxic (substitució de bases, generació de codons STOP, alteracions en l'inici de transcripció...).

Mitjançant la fusió d'un gen que codifiqui per una proteïna fluorescent a un gen de llevat utilitzant el seu propi promotor es podrà estudiar l'efecte del mutagen en un gen i consegüentment la proteïna que se'n deriva. Com a gen diana, es va seleccionar ZWF1 (Glucosa 6 fosfat deshidrogenasa), ja que aquest gen complia amb varis requeriments moleculars fonamentals com; a) poder generar una proteïna (relativament gran) de fusió

terminal estable, b) expressar sota el control d'un promotor constituït a un nivell i c) mantenir la viabilitat de la cèl·lula després de la inactivació de la proteïna.

Per aconseguir la fusió primer es va generar in vitro, mitjançant SFH-PCR (Short Flanking Homology) una fusió d'una seqüència curta de ZWF1 i una proteïna fluorescent (veure Figura 16) i després es va intercanviar amb la seqüència endògena del llevat mitjançant la recombinació homòloga. La inserció de la construcció de còpia única es va realitzar tant en una soca haploide (W303-1) com en una diploide (S288C) de *S. cerevisiae* (estat hemizigot). Es va elegir una colònia fluorescent de la soca haploide W303 (YGE01, fluorescència YVenus) i una de la soca diploide S288C (YGE02, fluorescència GFP). La inserció correcte es va comprovar mitjançant PCR.

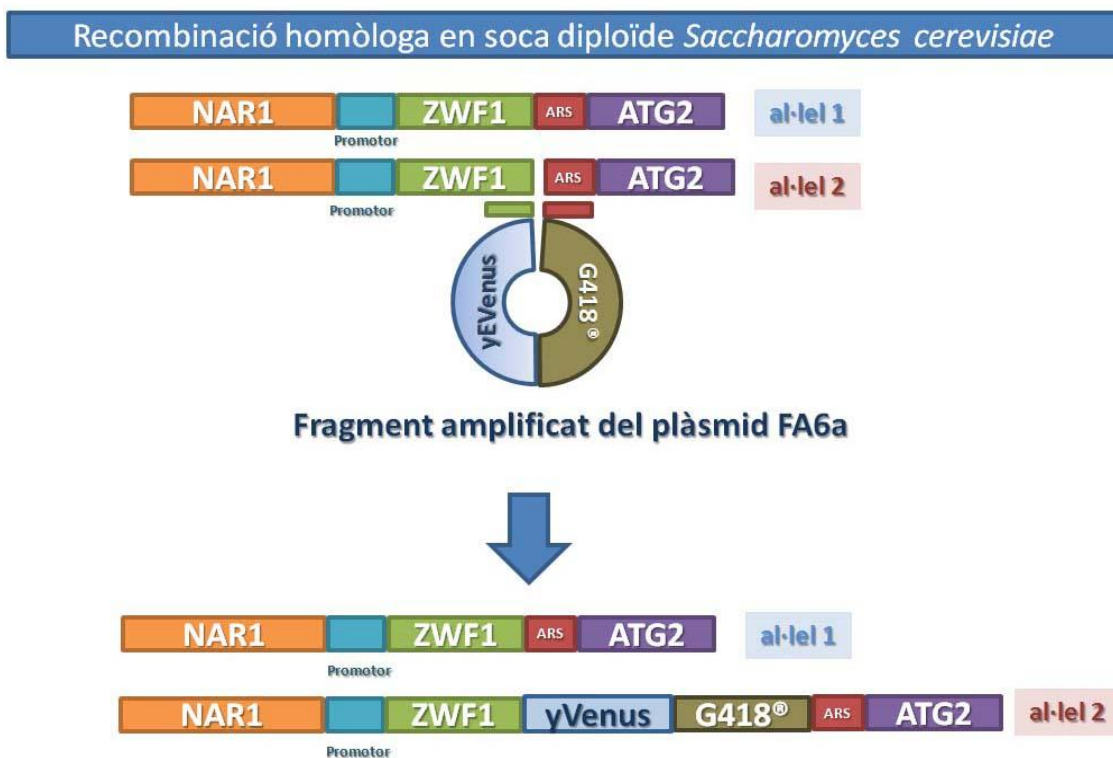


Figura 16: Esquema de la zona d'inserció en un dels al·lels del gen ZWF1 amb el fragment amplificat amb oligos quimerics (ZWF1-linker y G418-ARS) en el cromosoma XIV de *Saccharomyces cerevisiae*. Es tracta d'una inserció senzilla per a cada al·lel

La comprovació de la inserció de una còpia única del constructe està explicat en l'apartat 7.3.7 (Comprovació generació de proteïna de fusió)

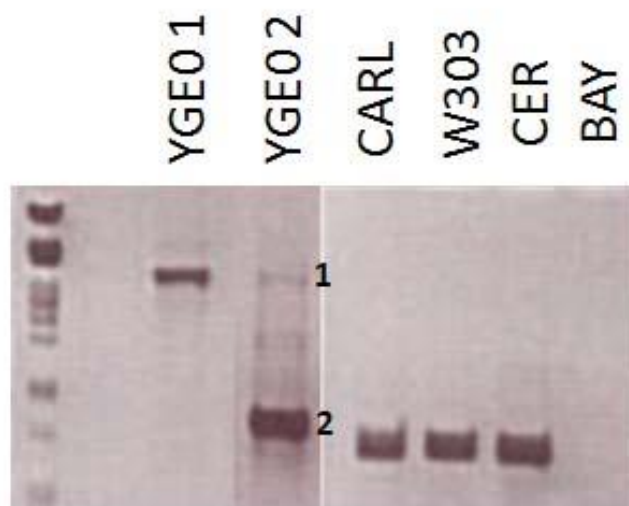


Figura 17: Amplificació del fragment recombinant entre els gens ZWF1 i ATG2 en un al·lel dependent de la dotació cromosòmica de cada soca. El fragment de 3164 correspon al marcador insertat per recombinació homòloga que conté els gens de resistència a la geneticina, kanamicina, el linker i el gen de fluorescència. El fragment de 944 correspon a la regió genòmica de llevat sense el constructe. Notis que les soques control CER, W303 i la el sub-genoma CER en la soca poliploide CARL amplifiquen. La soca BAY no amplifica al haver estat dissenyat els cebadors per a la regió del genoma de CER.

3.2.1.3-Mutagenesi de les soques indicadora

A partir d'aquí es va fer créixer un cultiu líquid de YGE01, YGE02 i *C. carlsbergensis* amb el mutagen EMS (2,6% v/v) amb temps d'exposició que anaven des dels 20 fins als 120 minuts. Com a controls negatius, es van fer créixer les mateixes soques sense mutagen. Qualsevol canvi de base (transició, transversió, inserció) que es produeixi en la seqüència que transcriu per la proteïna fluorescent fusionada i que afecti la seva funcionalitat, provocarà una pèrdua de la fluorescència. D'aquesta forma totes aquelles colònies de llevat que sobrevisquin a la mutagenesi i que haguessin perdut la capacitat de fluorescència (dany genotòxic) seran utilitzades pel càlcul de l'eficiència del mutagen.

Observant els resultats de supervivència de les soques control i de la nostra soca *C. carlsbergensis*, podem comparar i extrapolar els resultats de la freqüència de canvi. S'ha de tenir en compte les dades de la taula 3 on es pot observar la diferència entre la genotoxicitat entre les soques haploide YGE01 i diploide YGE02 a un temps determinat. Observant els resultats s'observa que la citotoxicitat augmenta a major temps d'exposició com en el cas de la soca haploide on la supervivència és inversament proporcional al temps d'exposició, trobant així una disminució progressiva i exponencial de la supervivència.

Temps Exposició EMS	CITOTOXICITAT (%Viabilitat: Tractades/No tractades)			GENOTIXICITAT (Freq KO.fluor/ TOTAL)	
	Min	yGE01	yGE02	CARL	yGE01
0	100	100	100	0,0051	0
20	90,9	94,3	46	0,1928	0,006
40	67,7	63,5	40,5	0,146	0,0092
60	41,9	56,8	20,8	0,1685	0,0095
80	10,3	54,1	17	0,2079	0,016
100	3,3	32,6	2	0,2186	0,017
120	0,6	28,1	0,1	0,375	0,047

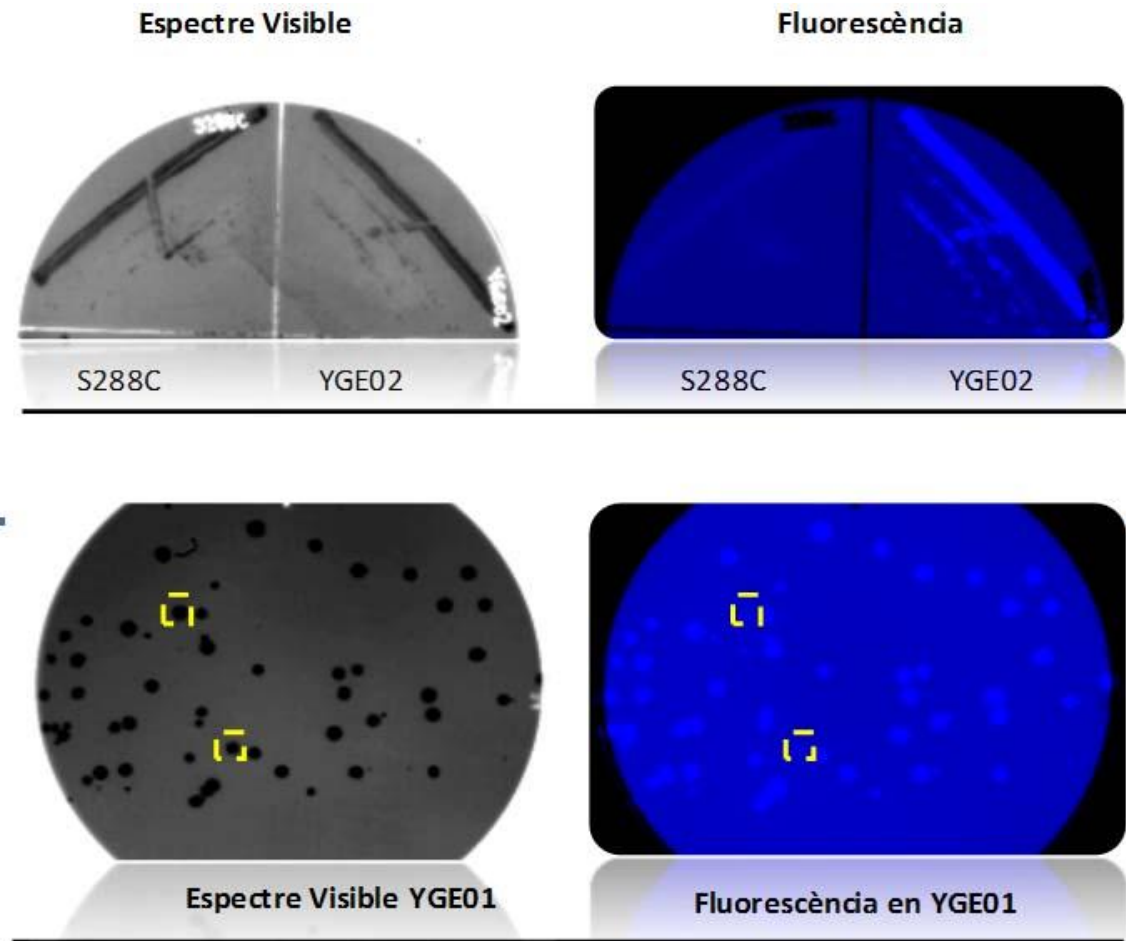
Taula 3: Efecte citotòxic de les soques haploide yGE01, diploide yGE02 i poliploide *S.carlsbergensis* en funció del temps d'exposició al mutagen EMS (Etil Metanosulfonat), representat en % segons les tractades / no tractades. La Genotoxicitat s'ha expressat com la pèrdua d'expressió de yVenus o canvi de color en les yGE01 dividit pel total de supervivents. Notis el percentatge segons si és haploide o diploide.

En canvi la soca diploide YGE02 te una resposta diferent, ja que fins als 80 minuts d'exposició al mutagen no s'observa una disminució de menys del 50% de supervivència, tot i que pot sobreviure més de 120 minuts en presència del mutagen. La major sensibilitat de la soca haploide al mutagen era esperada, per que un individu haploide es més sensible a la pèrdua de gens essencials degut a la mutagènesis.

Sorprenentment, la soca tetraploide fou més sensible a la presència del mutagen ja que te la mateixa supervivència als 20 minuts que la soca haploide yGE01 després d'una hora.

Si observem els efectes genotòxics produïts pel mutagen (veure figura 16) en la soca diploide (YGE01) i haploide (YGE02), s'observa, que en la diploide, hi ha menys desactivació de fluorescència i que a partir dels 60 minuts d'exposició podem trobar una desactivació de la fluorescència en l'1% de les colònies. Pel mateix temps d'exposició trobem que en la soca YGE01 obtenim més de 15% .

Es va extrapolar la informació a la soca industrial i per aquest motiu es va elegir el temps d'exposició entre 40 minuts, que en teoria es podia obtenir un nombre òptim de mutants en una població de 2000 individus com a tenir una freqüència aproximada de 10^{-3} mutacions/kb.



Efecte EMS sobre el GEN γ VENUS en soca YGE01

Figura 18: En la part superior, comparació entre la soca salvatge S288C i la soca recombinant amb el fragment YGE02, que li confereix fluorescència la proteïna Yvenus. En la part inferior s'indiquen dues colònies amb pèrdua de l'activitat de la proteïna Yvenus en la soca YGE02 mutagenitzada amb EMS. El recompte de colònies que van perdre la fluorescència respecte del total, ens va donar la freqüència de genotoxicitat del mutagen a diversos temps d'exposició del mutagen.

En la figura 18 es pot observar la comparació entre la soca indicadora YGE02 i la soca S288C. Al posar en contacte la soca indicadora amb el mutagen, hi ha un percentatge de colònies que perden la fluorescència, tal i com s'aprecia en la part inferior de la figura.

3.2.2.-Determinació de l'estructura i composició del gen Met10

El gen *met10*, codifica per la subunitat alfa de la proteïna sulfit reductasa, i la seva activitat està relacionada dins la ruta metabòlica de la reducció del sulfur d'hidrogen a partir de sulfat.

El gen està situat dins del cromosoma VI de *Saccharomyces cerevisiae*, dins la regió NC_001138.4, i el seu locus és el YFR030W. El gen no presenta introns i codifica per una subunitat de 1035 aminoàcids per la proteïna Sulfit reductasa. En el nostre garbellat, hem

3.-Garbellat en llevat pel gen Met10

amplificat majoritàriament, la regió final de la proteïna on hi ha més informació disponible, en cas de trobar mutacions i el nostre fragment era de 1000 pb aproximadament. Per dissenyar els cebadors ens hem basat en la informació del genoma complet de *Saccharomyces cerevisiae* i dels fragments de YAC's i BAC's de *Saccharomyces bayanus*. Entre els gens Met10 de les dues espècies hi ha una homologia d'un 81% a nivell genòmic, essent suficientment semblant per tal que els gens puguin presentar la mateixa activitat enzimàtica tot i que amb lleugeres diferències que ens van permetre el disseny de cebadors pel garbellat d'una forma independent dels dos genomes de *S. carlsbergensis*.

Per tal de maximitzar la probabilitat d'obtenir una mutació que afectés a la funcionalitat del gen Met10, es van analitzar els diferents dominis funcionals de la proteïna.

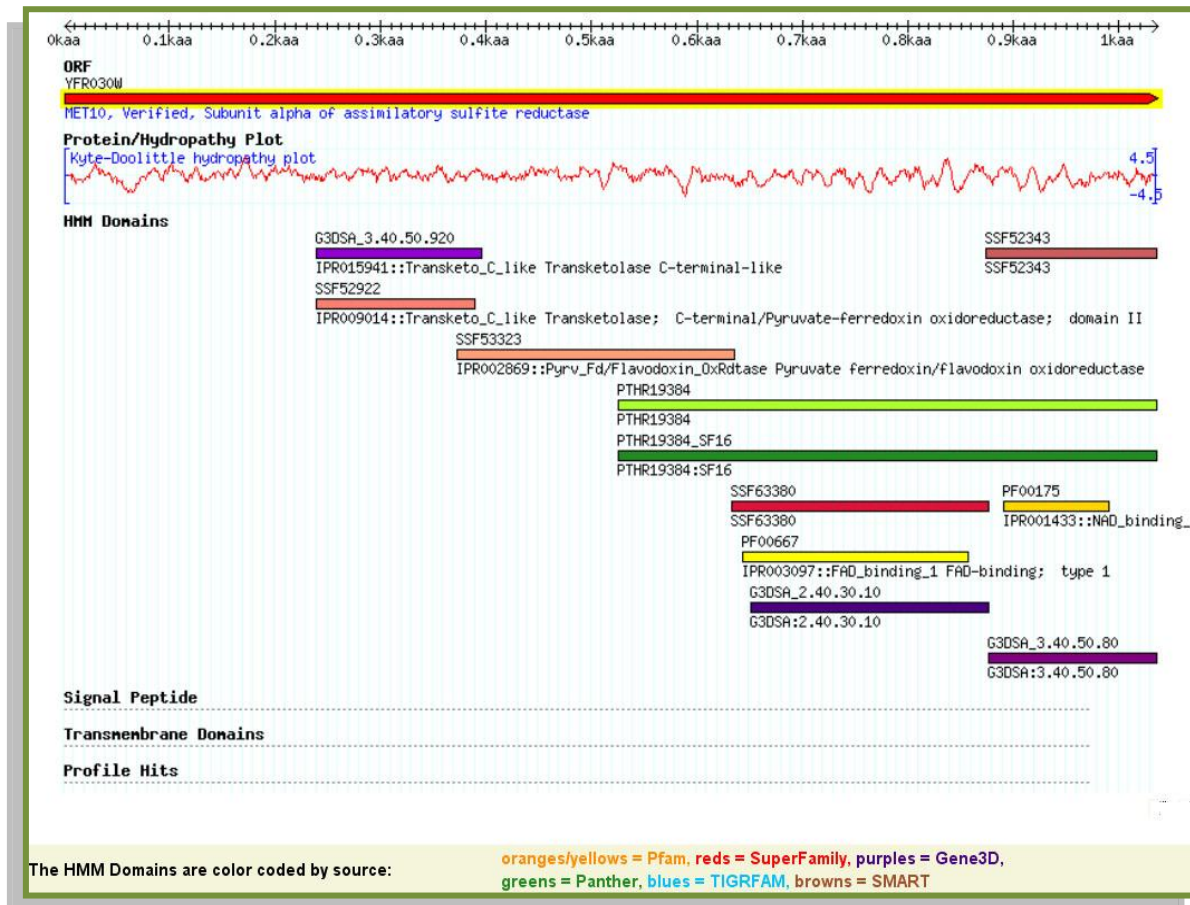


Figura 19: Dominis funcionals del gen Met10 per *Saccharomyces cerevisiae* segons diferents bases de dades. En aquest garbellat molecular s'ha elegit amplificar la segona meitat del gen, degut a que és el que hi ha més informació per tal d'analitzar posteriorment l'efectivitat de la mutació en interrompre l'activitat del gen (Font, Saccharomyces Genome Database. <http://www.yeastgenome.org/>)

3.2.3.-Garbellat molecular: localització dels mutants per Met10 en seqüència tipus *S. cerevisiae*

Pel garbellat molecular, es van utilitzar dos oligonucleòtids per a amplificar el fragment del gen Met10 corresponent a la part C terminal de la proteïna que conté el centre actiu NADPH oxido reductasa. La estratègia general era realitzar un garbellat primari sobre el ADN de pools de quatre colònies, i confirmar els positius sobre el ADN de les colònies independents.

3.2.3.1.- Garbellat molecular en pools i localització individual del mutant

Les mostres candidates putatives en pools que foren detectades mitjançant l'anàlisi de l'extracte cru de fonoll, es van verificar de forma individual.

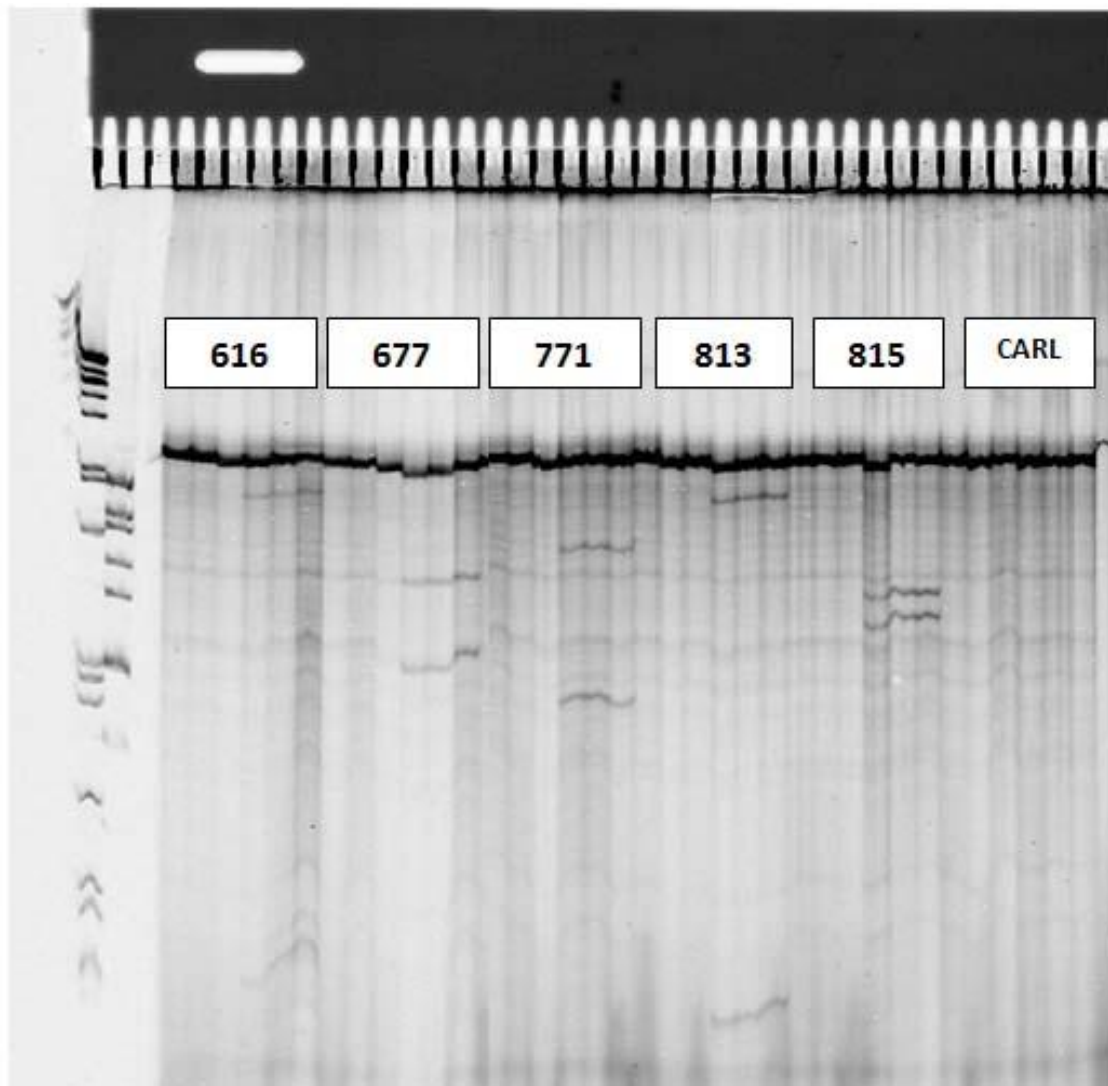


Figura 20: Candidats per la mutació en el gen Met10C. Les tres primeres mostres de cada grup corresponen al candidat individual sense mesclar amb un *S.carlsbergensis* Wild type, i les 3 altres el candidat barrejat amb la mateixa concentració de *S.carlsbergensis*.

Candidat	Canvi de base	Aminoàcid	
616	G->A	GLY(687)ASP	G687D
677	G->A	GLU (786)GLU	E786E
680	G->A	ARG(643)LYS	R643K
771	G->A	GLU (865) LYS	E 865 K
813	G->A	GLY (943) ASP	G 943 D
815	C->T	LEU (804) PHE	L 804 F

Taula 4: Resum de mutacions de la soca *S.carlsbergensis* corresponent al gen Met10C per la varietat *Saccharomyces cerevisiae*

Durant el garbellat de pools es van detectar varis mutants candidats en ambdós gens, Met10C i Met10B. Però sorprenentment es va veure que en el cas dels candidats per Met10C, no es podien confirmar a nivell individual en l'anàlisi de FCE de detecció d'heterodúplexs.

No obstant, la seqüenciació del fragment amplificat confirmava la presència del canvi, i a més a més l'absència de la seqüència del al·lel original en la colònia mutant (figura 21).

Per tant, hi havien dues possibilitats: a) En el gen Met10 del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* de la soca *S. carlsbergensis*, la mutació s'havia introduït de forma simultània en ambdós al·lells (una opció improbable), o b) un dels dos al·lells de Met-10 CER ja presentava una deleció en la regió final del gen abans de sotmetre la soca CARL a la mutagènesi. Efectivament, barrejant les mostres de ADN de les soques mutades amb el DNA de la soca sense mutagenitzar, l'anàlisi amb FCE per la detecció d'heterodúplexs permetia perfectament detectar els mutants.

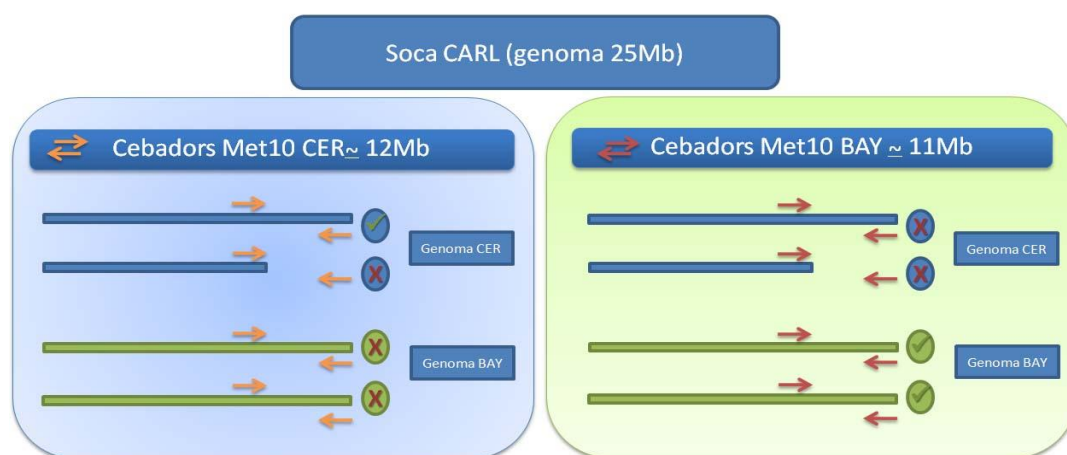


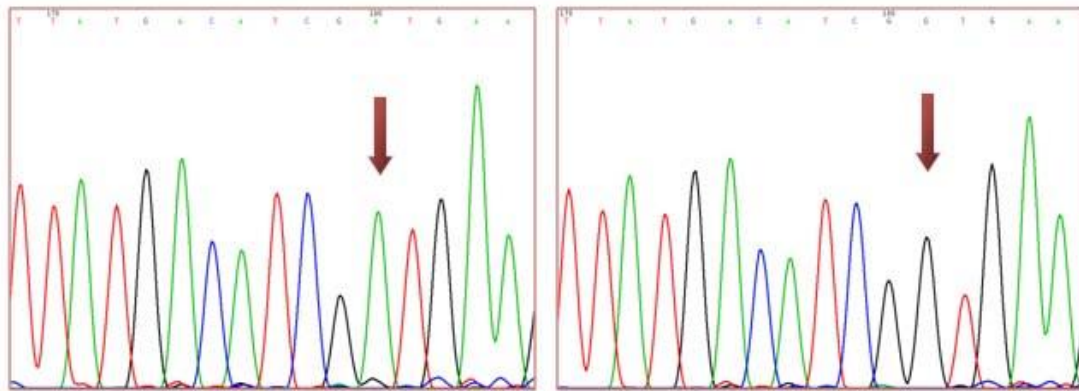
Figura 21: Representació de l'amplificació d'un fragment del gen Met10 en la soca *Saccharomyces carlsbergensis* depenent dels primers utilitzats. Notis que en la part del genoma corresponent a *Saccharomyces cerevisiae* hi ha una deleció.

3.2.3.2.- Confirmació del candidat individual per seqüenciació

Després de la identificació de les mutacions en pools de 4 individus mitjançant gels d'acrilamida, es va verificar per seqüenciació i comparant-ho amb el seu control, la presència de mutació i el tipus. Notis que en el cromatograma cada nucleòtid està representat segons un color. **Adenina**, verd; **Timina**, vermell; **Citosina**, blau i **Guanidina** en negre.

616 Met10C End

El mutant 616 conté un nucleòtid diferent a la soca control de *S. carlsbergensis*. En el cromatograma es detecta única mutació en la al ser aquesta soca hemizigota per aquest gen.

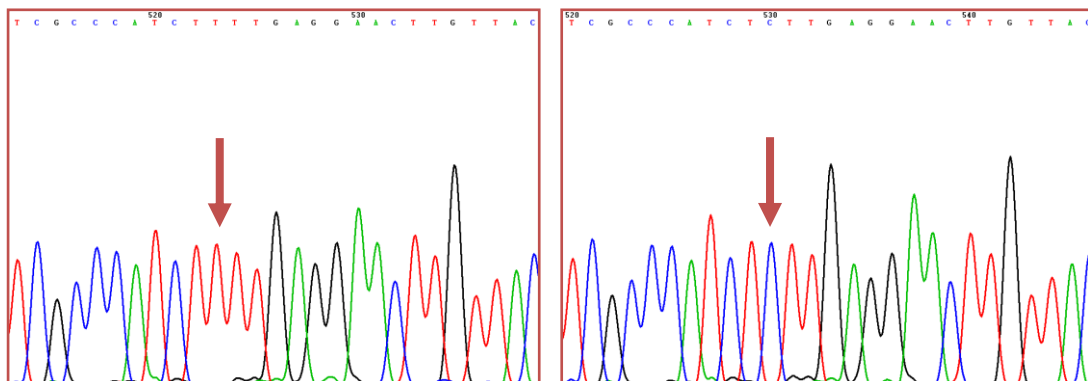


616 Met10 C End Forward

S.carlsbergensis Met10C End

815 Met10C End

El mutant 815 conté una mutació en la regió exònica. La mutació, de la mateixa manera que en la resta de candidats per Met10, s'ha detectat barrejant mostres de la varietat salvatge CARL



815 Met10 C End Forward

S.carlsbergensis Met10C End

3.2.4.-Garbellat molecular: localització dels mutants per Met10 en la seqüència tipus *S. bayanus*

Per el garbellat molecular, per als individus que presentaven mutacions per la seqüència tipus *S. bayanus* es van utilitzar dos oligonucleòtids per a amplificar la part C terminal de la proteïna que conté el centre actiu (figura 21)

El garbellat primari es va realitzar sobre el ADN de pools de quatre colònies, i els positius es van confirmar sobre el ADN de les colònies independents.

3.2.4.1.-Garbellat molecular en pools i localització individual del mutant

Resum de les mutacions resultat del garbellat pel gen Met10 en *Saccharomyces bayanus*

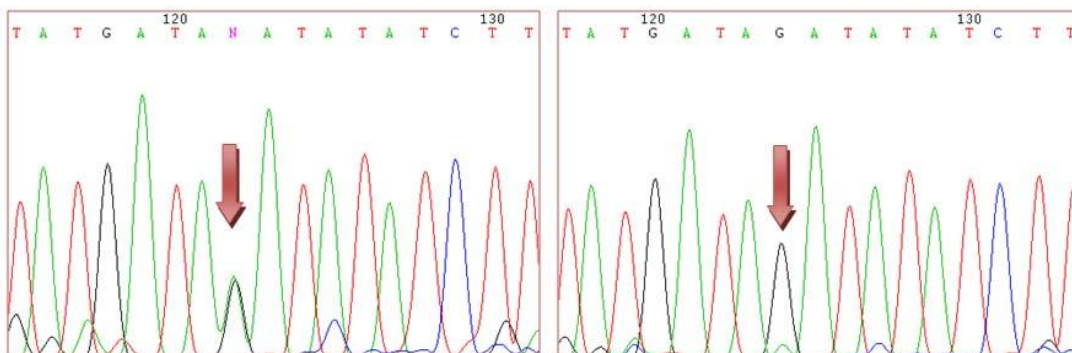
Candidat	Canvi de base	Aminoàcid	
416	G->A	GLU (818) LYS	E818K
467	G->A	ARG (668) LYS	R668K
543	T->C	PRO (872) LEU	P872L
544	G->A	LYS 845 LYS	K845K
687	T->C	PHE 678 SER	F678S
800	G->A	VAL 800 ILE	V800I

Taula 5: Resum de les mutacions pel gen Met10 en *Saccharomyces bayanus*

3.2.4.2.-Confirmació del candidat individual per seqüenciació

En aquest cas, no es van detectar diferències entre la seqüència tipus bayanus en *S.carlsbergensis* i *S. bayanus* i observem que els mutants presenten en el cromatograma dos nucleòtids en la posició mutada

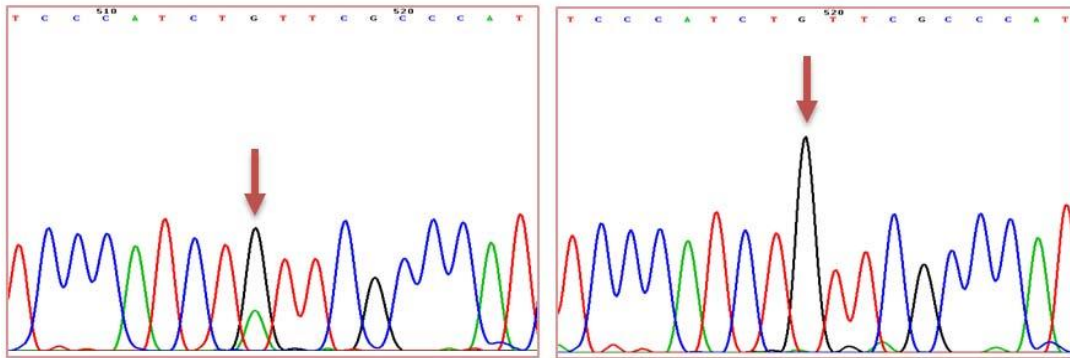
467 Met10B End



467 Met10B END

CARL Forward Met10B End Control

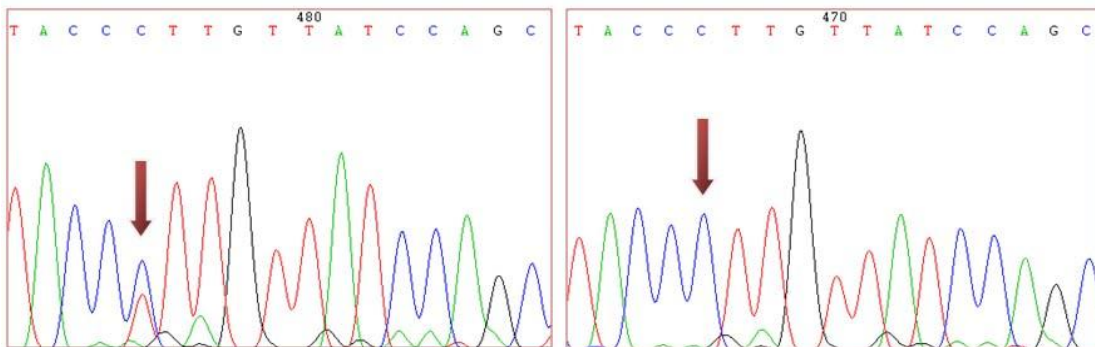
800 Met10B End



800 Forward Met10B End

CARL Forward Met10B End Control

544 Met10B End



544 Reverse Met10B End

CARL Reverse Met10 B END control

3.2.5.-Predicció de l'estructura secundària segons SOPMA

Per tal d'avaluar l'efecte de les mutacions generades per EMS es va estudiar si les substitucions afectarien teòricament a la funcionalitat de la proteïna. Es va utilitzar el programa predictiu SIFT (Pauline *et al.*, 2006)²²⁶, i es va comprovar que algunes mutacions afectaven al comportament de la proteïna. Junt amb aquest programa es va buscar com afectava el canvi d'un aminoàcid en l'estructura secundària de la proteïna amb el programa SOPMA (Deleage 1995)²²⁷, en cada una de les seqüències mutants. El programa compara les seqüències consens de diverses bases de dades i prediu com afectarà a l'estructura global de la proteïna. Els autor

asseguren una fiabilitat del 69,5% en predir l'estructura secundària pels estats de helix alpha, gir beta i espiral aleatòria.

Si tenim en compte la predicció del programa SOPMA, l'efecte teòric que aporten les mutacions com es pot veure en la (taula 4 només les soques, 616 i 815 tenen mutacions que podrien canviar l'estructura secundària d'algun motiu de la proteïna. Per altra banda les soques mutants per la variant de Met10 en *Bayanus* hi ha les soques 416, 467, 543 i 687 que tenen mutacions amb una capacitat potencial de desactivar la proteïna.

Met10 CER	CARL	616	677	680	771	813	815
Alpha helix (Hh)	41,35	41,35	41,35	41,35	41,35	41,35	41,35
3 ₁₀ helix (Gg) :	0	0	0	0	0	0	0
Pi helix (Ii) :	0	0	0	0	0	0	0
Beta bridge (Bb)	0	0	0	0	0	0	0
Extended strand (Ee)	16,81	17,1	16,81	16,81	16,81	16,81	17,1
Beta turn (Tt) :	5,8	6,18	5,8	5,8	5,8	5,8	6,18
Bend region (Ss) :	0	0	0	0	0	0	0
Random coil (Cc) :	36,04	35,36	36,04	36,04	36,04	36,04	35,36

Met10 BAY	CARL	416	467	543	544	687	800
Alpha helix (Hh)	41,74	44,06	42,03	44,06	41,74	42,03	41,74
3 ₁₀ helix (Gg) :	0	0	0	0	0	0	0
Pi helix (Ii) :	0	0	0	0	0	0	0
Beta bridge (Bb)	0	0	0	0	0	0	0
Extended strand (Ee)	17,49	16,91	17,29	16,91	17,49	17,29	17,49
Beta turn (Tt) :	5,41	5,22	5,8	5,02	5,41	5,8	5,41
Bend region (Ss) :	0	0	0	0	0	0	0
Random coil (Cc) :	35,36	33,82	34,88	34,01	35,36	34,88	35,36

Taula 6: Predicció sobre el canvi conformacional de l'estructura secundària de la proteïna produït per la mutació, mitjançant el programa SOPMA. El programa representa el percentatge dels diferents tipus de d'estructures secundàries presents en la proteïna. Un canvi d'aminoàcid pot fer variar el tant per cent de cada motiu per les variants de la proteïna sulfat deshidrogenasa. En vermell s'han ressaltat els canvis estructurals respecte el control. Font: SOPMA

A més a més de l'estudi amb SOPMA, hem utilitzat el programa d'anàlisi de dominis conservats anomenat Phyre (Kelley and Sternberg 2009)²²⁸ per tal d'aconseguir informació a nivell teòric, quina de totes les mutacions era la més efectiva per tal de valorar l'efectivitat de canvi de la mutació. Juntament amb aquests programes es va utilitzar el programa CLUSTAL (Campagne *et al.*, 2000)²²⁹, que ens va permetre comparar els dominis funcionals conservats de les espècies *Ustilago maydis*, *Botrytinia fuckeliana*, *Aspergillus oryzae*, *Zygosaccharomyces rouxii* amb les espècies d'interès *Saccharomyces bayanus* i *Saccharomyces cerevisiae*.

Domini	Funció	Mutant	Espècie	Mutació
FKEAY	Desconeguda			
LRPD	Desconeguda			
VKENRRL(V)TP	Desconeguda			
YDRN(Y)IFHIEFDL(I)	Desconeguda	467	BAY	R668K
S(T)GL(M)TYDI G EALGI(V)HA	Desconeguda	616	CER	G687D
DIFGR(K)PPKK(R)FYEAL	Desconeguda			
PL(M)KRR E YSIASS(C)QKV	Grup NADPH oxidoreductasa	416	BAY	E818K
SVKP(S)SVMKLP	Desconeguda	543	BAY	P872K
VIMSGLGTGLAPFKAIVE	Grup ferredoxin reductasa			
GSRHQREEYCYGEEWEAYQ	NAD binding site oxidoreductasa			
FSRDQPQKIYIQDR	Desconeguda			

Taula 7: Estudi de dominis conservats mitjançant el programa Phyre. El programa mostra aquells dominis que estan més conservats comparant-ho amb un gran nombre de seqüències de diferents espècies. En vermell l'aminoàcid mutat i entre parèntesis els aminoàcids tolerats. Per altra banda es va comparar aquestes dades amb els resultats de comparar en el programa CLUSTAL la seqüència proteica de diferents espècies com *Ustilago maydis*, *Botrytinia fuckeliana*, *Aspergillus oryzae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*).

Font PHYRE: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>

CLUSTAL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

El programa Phyre tenia en compte que Met10 que codifica per la subunitat α d'una sulfit reductasa (NADPH) flavoproteïna [EC 1.8.1.2] i segons les bases de dades de la Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) que ha comparat conté varis dominis molt conservats que defineixen la seva activitat. Per una banda hi ha una FAD binding site, on hi ha una alta correlació amb altres proteïnes. Es tracta d'un lloc d'unió amb un grup FAD i engloba des de l'aminoàcid 643 fins al 856. Per altra banda existeix el domini NAD binding oxidoreductasa. Engloba els aminoàcids 891 fins al 987. Aquesta informació és molt útil davant el fet de comparar les mutacions amb aquestes regions molt conservades. Evidentment, hi ha altres regions molt conservades (tal i com hem pogut deduir utilitzant el programa CLUSTAL) que no se sap del tot quina és la seva funció, però que pot ser des de tipus estructural fins a residus que orienten el substrat dins del centre actiu. Al no disposar d'informació segura sobre la seva activitat, deduirem que al presentar-se molt conservades en altres espècies, tindrà una funció

important sense especificar quina. Curiosament son els mutants 616 (gen corresponent a *S. cerevisiae*) i els mutants 467 i 543 (*S. bayanus*) els que més efecte tenen sobre aquestes regions conservades. El mutant 467 conté una substitució de una Arginina per una Lisina que segons SOPMA produeix un canvi important, però segons PHYRE, no és suficient com per desestructurar la proteïna ja que els dos son aminoàcids molt semblants.

Les noves soques mutants restants (616 CER i 416, 543 BAY) eren bones candidates segons PHYRE per ser utilitzades en les següents rondes de mutagènesis.

3.2.6.-Avaluació de l'eficiència en la desactivació del gen

Després de la detecció dels mutants pel gen Met10 C, es va voler testar si l'inactivació d'una o dues còpies del gen MET10 ja tenia un efecte sobre la activitat total de la sulfit reductasa.

Per tal de comprovar-ho es van dissenyar diferents assaigs de creixement en medis auxotròfics per la metionina.

Segons la informació obtinguda en la figura 20 les soques mutants de Met10C tenen una sola còpia activa i segons la predicció teòrica del PHYRE es va elegir la soca 616 per detectar la viabilitat del gen MET10 per utilitzar-lo com a colònia de partida per les següents rondes de mutagènesis. Per tal de detectar si la còpia del gen estava desactivada es va realitzar un experiment de creixement de les soques en cultiu sòlid en medi mínim amb i sense metionina. Cap de les soques generades representen mutants complets per la funció sulfit reductasa, però l'eliminació gradual de l'activitat podria representar una sèrie al·lèlica amb una pèrdua gradual de la funció.

Com a control positiu, es va generar una soca deficient en Met10, per tal d'observar com es comportava una determinada soca davant la incapacitat d'absorbir sulfats, en un medi ric. Degut a la facilitat de treballar amb recombinació homòloga es va elegir una soca haploide com a punt de partida, ja que d'aquesta forma només feia falta desactivar una còpia del gen.

La soca generada es va anomenar W303 KO Met10; els detalls de com es va generar es poden trobar a material i mètodes. Es va realitzar un creixement comparatiu entre les soques *S. carlsbergensis*, W303, el mutant 616 i W303 KO Met10- en medi mínim complementat amb metionina i sense (figura 21). També es van fer créixer en medi ric YPD i en un banc de dilucions per tal d'observar com els controls i els mutants reaccionaven davant del creixement en un medi ric.

El resultat obtingut en l'anàlisi de creixement en medi sòlid YPD demostra que en medis sense Metionina la soca W303 KO no creixia (figura 22) i indicava que la 616 tenia un creixement reduït, mentre que les soques *S. carlsbergensis* i W303 creixien sense problemes.

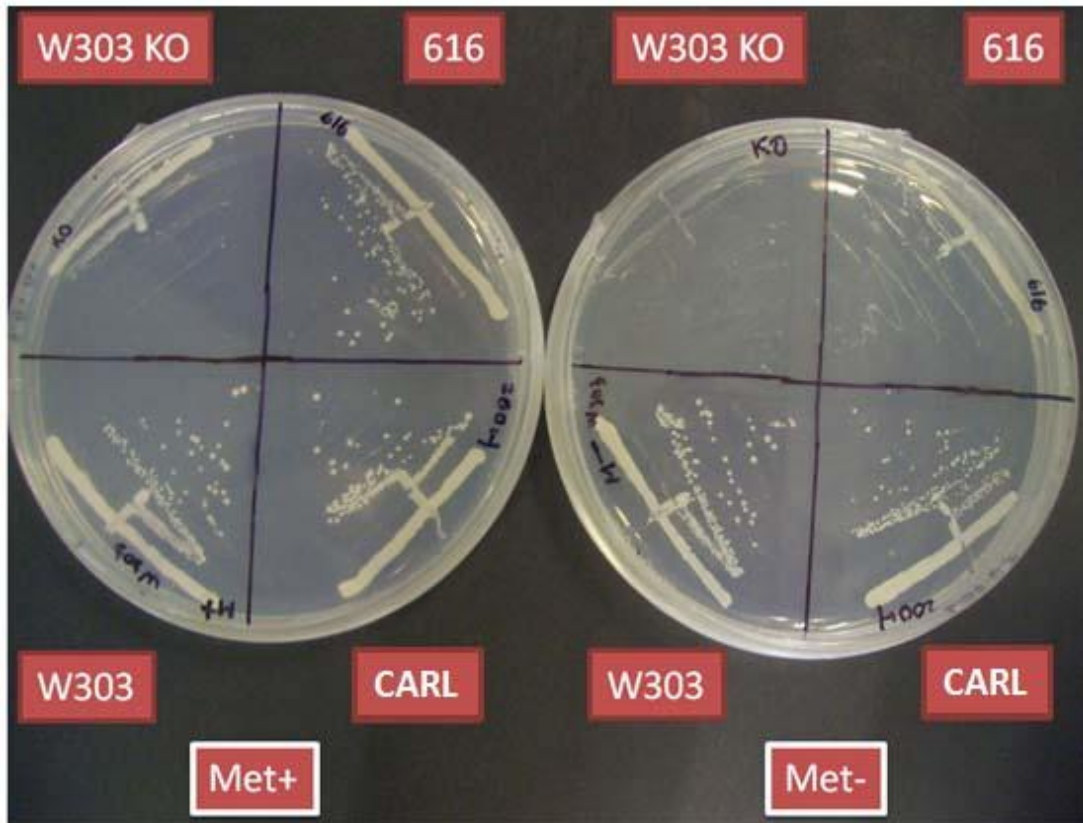
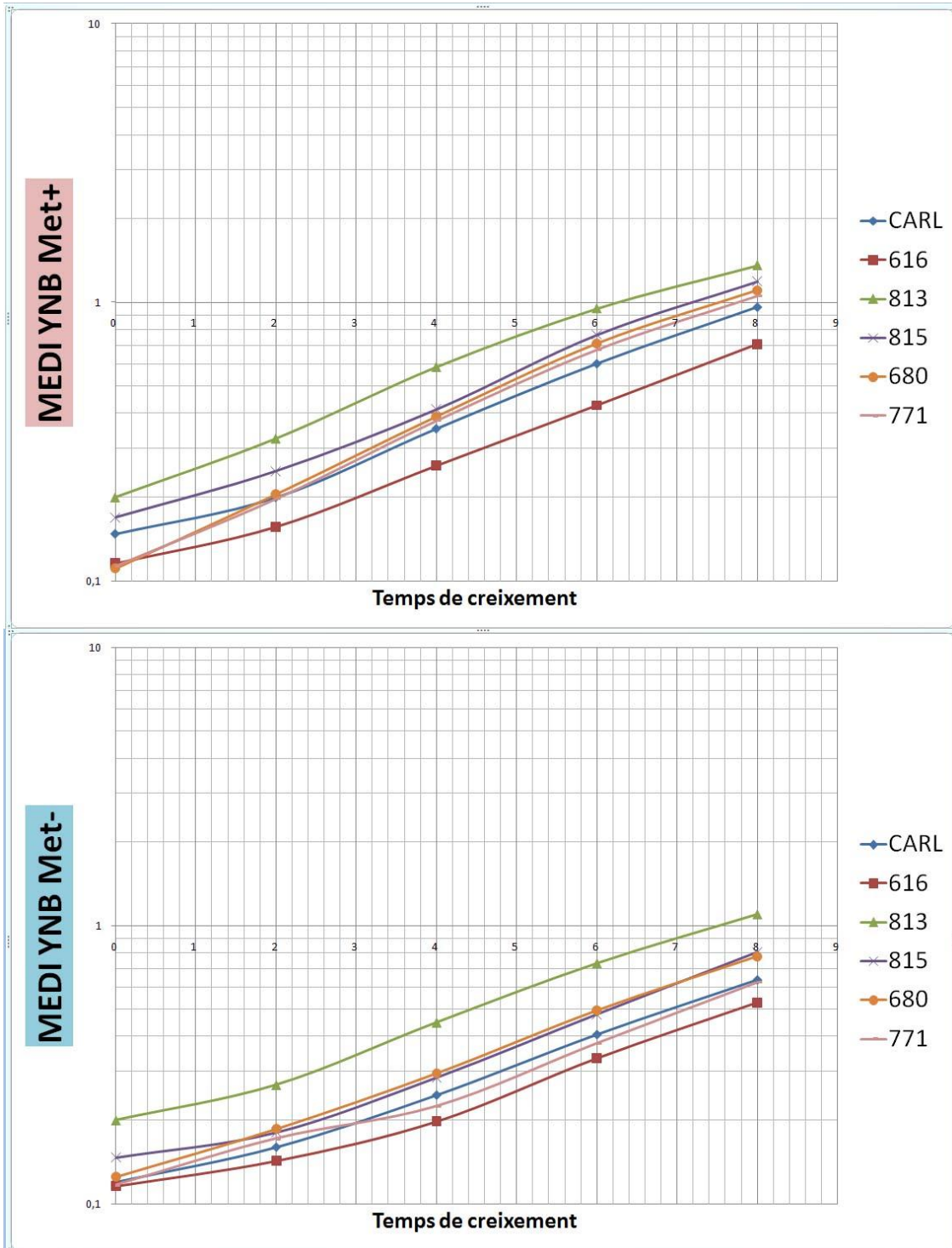


Figura 22: Plaques de petri amb medi Mínim YNB+HIS+LEU+TRP+ADE amb i sense Metionina. Notis el comportament de 616 comparant-ho amb la soca haploide W303 KO Met10-, en el medi mínim sense complement de metionina).

Per fi de quantificar millor les possibles diferències de creixement de les soques mutades es va analitzar la seva corba de creixement en medi líquid sense o amb metionina. D'aquesta forma, si el llevat tingués dificultats per sintetitzar la metionina, observariem una disminució en el seu creixement, detectat per la lectura de la seva densitat òptica en un espectrofotòmetre.



Gràfica 1: Gràfiques comparatives de tipus logarítmic que representen el creixement dels mutants en medi YNB complementat amb aminoàcids essencials, amb i sense Metionina. Es va mesurar el creixement en forma D.O (a 600 nm) utilitzant la terbolesa com a mesura de creixement, a cada hora durant 8 hores en ambdós tipus de cultius.

En medis líquids no s'han observat diferències significatives en la velocitat de creixement de les diferents soques.

Tal i com està descrit en la literatura, encara que hi hagi una sola còpia del gen, la soca continuarà processant els sulfits a sulfur d'hidrogen en soques tetraploides, i en la desactivació parcial obtinguda en les soques mutants ja es detecta alliberament de SO₂. En l'article les soques que tenen fins a 3 còpies desactivades del gen *MET10* produeixen un 27% més de SO₂, i la desactivació total de les còpies del gen *MET10*, multiplica per 6 la producció de SO₂ respecte a la soca salvatge (Hansen *et al.*, 1996)²⁰⁹

3.3.-Conclusions

En aquest treball, hem posat a punt el procés de mutagènesi de la soca de llevat *S. carlsbergensis*. S'ha generat una soca indicadora que permetrà analitzar l'efecte que puguin tenir diferents mutàgens en cas que es vulgui millorar la mutagènesi. Aquesta soca permetrà comparar l'efecte d'un mutagen a nivell citotòxic i genotòxic per tal de dissenyar altres experiments i poder prendre decisions en funció de l'eficàcia obtinguda. Els resultats que s'han mostrat amb el mutagen EMS, han demostrat que es podia obtenir mutants viables pel gen *Met10* en la una soca al·lotetraploide.

El KO dels gens *Met10* en la soca *S. carlsbergensis* emprada en aquest estudi, no ha estat suficient per obtenir una reducció detectable de la producció de SO₂. Tot i que estava previst generar segregants meiòtics (mitjançant reproducció sexual) i provar l'efecte dels al·lels mutats en una soca KO total, tal i com s'havia fet en l'article de Hansen, no ha estat possible, degut a la total impossibilitat d'aconseguir segregants, tot i haver-ne invertit importants esforços per aconseguir-ho.

Per aconseguir mutants no transgènics en aquesta soca serà necessari sotmetre les soques mutades en les dues còpies de *Met10* de tipus *S. cerevisiae* a rondes addicionals de mutagènesi per noquejar de manera seqüencial totes els diferents al·lels de *Met10*.

Tot i que sotmetre la soca a més rondes de mutagènesi podria acumular mutacions letals en altres regions del genoma, en aquest cas la tetraploïdia i la redundància de les funcions gèniques probablement permetrien l'acumulació de mutacions

Generació i garbellat d'una població mutant en Arròs

4.-Generació i garbellat d'una població mutant en Arròs

L'arròs és una de les tres espècies més plantades a tot el món amb una producció anual mundial de 660 milions de tones (FAOSTAT)⁴⁷ El seu interès comercial és el motiu que impulsa a buscar contínuament, varietats adaptades a diferents regions i amb una producció superior. La millora de les varietats locals és una solució per tal d'evitar modificar, mitjançant creuaments, les característiques desitjables d'altres varietats. Per aquest motiu s'ha elegit modificar varietats locals d'arròs, que ja estan adaptades al clima mediterrani, augmentant la variabilitat genètica mitjançant mutagènesis química.

4.1.-Estratègies per generar una població de mutants

4.1.1.-La mutagènesi en llavors

Molts grups han incrementat la variabilitat genètica en diversos tipus de vegetals, treballant amb mutagènesi en, com Carlson (Carlson 1973)¹³⁷ que treballà en tabac o Renee Sung (Sung 1976)¹³⁹ que va generar una població de mutants en cultius cel·lulars de soja (*Glycine max*) i pastanaga (*Daucus carota*), altres grups l'han emprat en *Arabidopsis* (Colberg *et al.*, 2001)¹⁷⁴ Blat de moro (Till *et al.*, 2004)¹⁷⁵ o arròs (Till *et al.*, 2007)¹⁷⁶.

Molts grups coincideixen en l'ús del EMS com un agent òptim per augmentar la variabilitat genètica. L'etil metanosulfonat és un mutagen teratogènic i possiblement un agent carcinogènic que s'utilitza per generar mutacions aleatòries en els garbellats genètics. Bàsicament produeix mutacions per substitució a través d'alquilacions a guanidines, fent que posteriorment i durant la replicació del DNA, la polimerasa substitueixi la citosina complementària per una timina, produint-se el canvi de G:C a A:T en una freqüència d'una mutació per cada 294 kb (Till *et al.*, 2007)¹⁷⁶ Per altra banda l'EMS té una baixa toxicitat i una bona permeabilitat cel·lular permetent que la cèl·lula continuï vivint i transmetent la mutació a la resta de filles (Sega 1984)²³⁰.

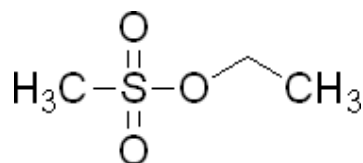


Figura 23: En aquest assaig hem utilitzat el mutagen EMS o etil metanosulfonat, per la seva permeabilitat en cèl·lules vegetals com per la seva acció.

4.-Generació i garbellat d'una població mutant en Arròs

La majoria de grups han generat les poblacions de mutants de plantes a partir de la exposició de llavors al mutagen. Per tal de mutagenitzar una llavor que està germinant, el producte haurà de passar a través de diversos teixits depenent si l'entrada és via radicular, o pot entrar directament per l'epidermis foliar, per exemple.

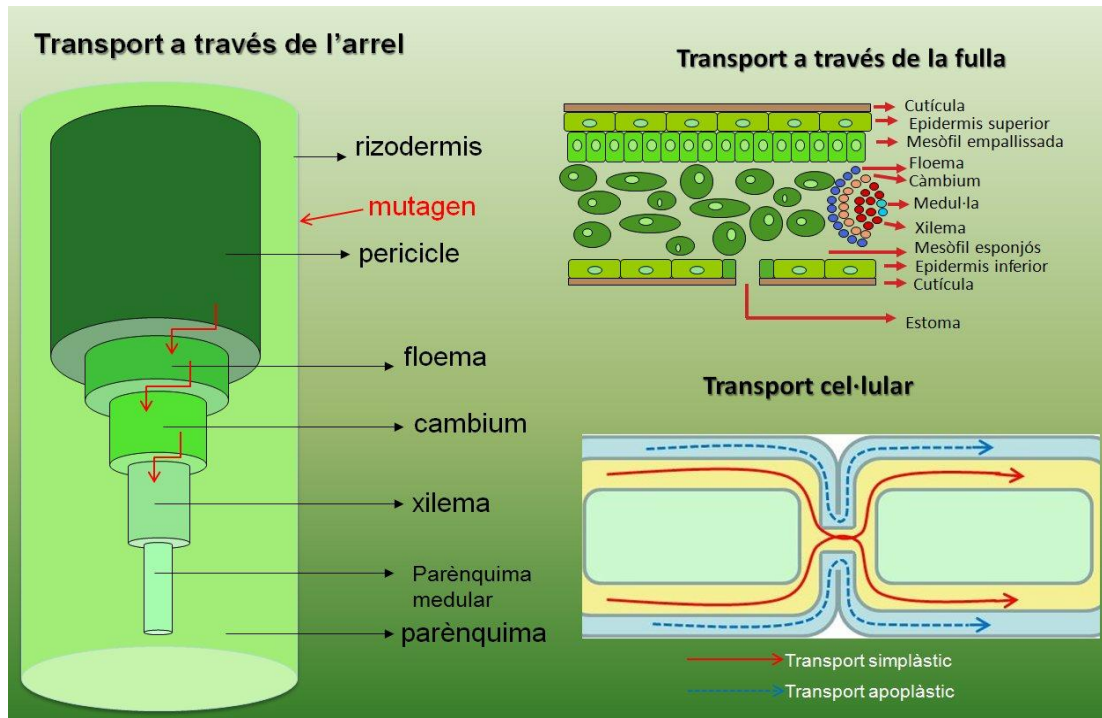


Figura 24: A l'esquerra, secció de l'arrel amb les diferents capes de teixits. Un mutagen hauria d'entrar fins al xilema per tal d'arribar fins al meristem apical. A la dreta, un tall transversal de la fulla amb les diverses capes. Seria un tipus d'entrada pel mutagen menys probable, però per tal d'afectar al meristem hauria d'entrar via floemàtica.

La via d'entrada de la majoria d'elements químics en solució dins de la planta és via radicular, i a través de canals de ions o dissolts en aigua. En la regió de la rizodermis, existeixen uns canals anomenats aquaporines que són força específics pel tipus de solut que permet entrar dins de l'arrel. Un cop aquests composts entren dins de l'arrel, són dirigits cap als vasos vasculars del xilema. Per altra banda, la via de transport de soluts es fa via apoplàstica (a través de la paret cel·lular) i via simplàstica (per dins del citoplasma de la cèl·lula). A través del xilema, els composts són distribuïts des de l'arrel fins a la resta de la planta (Kaldenhoff and Fischer, 2006)²³¹. Per tant el mutagen ha de ser soluble en aigua per poder passar a través dels canals i a través de les proteïnes de membrana.

L'experiència dels assaigs d'Ames (Ames *et al.*, 1973)¹³⁶ demostrà que l'efecte d'un mutagen depenia de la permeabilitat de la membrana de la cèl·lula. Ames va demostrar que per un

4.-Generació i garbellat d'una població mutant en Arròs

mutagen en concret podia revertir el gen de síntesi de la Histidina en determinades soques de *Salmonella sp.* en funció de la permeabilitat de la membrana de la bactèria.

Per tant, per tal de poder generar mutacions que puguin passar a la següent generació, serà necessari que el mutagen traspassi les diferents barreres cel·lulars de membranes i parets.

El mutagen finalment, ha d'arribar a la regió meristemàtica que conté les cèl·lules germinals per tal de provocar allí les lesions, ja que serà en aquesta regió on es generaran les flors i és a través de les flors per on es transmetrà la mutació a la següent generació.

Les plantes resultants de la mutagènesi són un mosaic de cèl·lules amb i sense la mutació, i tan sols les mutacions generades en els precursors de les cèl·lules germinals (i no de les somàtiques) tenen una possibilitat d'establir-se com a mutacions estables en la següent generació (M2).

El moment de realitzar la mutagènesi és molt important per aconseguir incidir sobre les cèl·lules germinals, ja que, si la planta té els seus òrgans formats, el mutagen tindrà més dificultat en penetrar dins de la planta per tal d'arribar fins la zona meristemàtica, ja que la planta pot tenir formades estructures impermeables, tan en arrel, com en fulles i tija (veure Figura 24 Per aquest motiu és recomanable realitzar la mutagènesi sobre llavors durant la germinació, sobre pol·len o sobre calls.

4.1.2.-La importància de les capes germinals per el procés de mutagènesi

Quan el mutagen introdueix un canvi en un gen dins del nucli d'una cèl·lula meristemàtica, aquesta es va dividint fins a repartir-la en els diferents teixits que s'aniran derivant per diversos tipus de divisions.

El primer model que intenta explicar a nivell morfològic i funcional com funciona el meristem s'anomena model túnica-còrpus (Schmidt 1924²³²; Sativa and Blakeslee 1940)²³³. Tot el desenvolupament de la planta ve determinat per l'activitat de dos meristems durant l'inici de la germinació de la llavor. Un és el meristem apical que és un conjunt de cèl·lules indiferenciades que donaran lloc a les estructures aèries, tal com són les fulles, tiges i secundàriament apareixen els meristems laterals (en monocotiledònies són anomenats intercalars i ajuden a l'allargament de la tija) i els meristems florals (Sativa *et al.*, 1943)²³⁴. L'altre és el meristem radicular, que apareix també durant l'inici de la germinació.

4.-Generació i garbellat d'una població mutant en Arròs

Per tal de diferenciar un de l'altre, les cèl·lules durant els primers estadis de divisions, defineixen la part apical de la part basal, mitjançant el fenomen de la polaritat. A partir d'aquí, es diferencien en capes de cèl·lules dos tipus d'estructures, anomenades, Túnica i Corpus. En dicotiledònies la Túnica presenta dos tipus de capes anomenades L1 i L2. En canvi les monocotiledònies, només presenten la capa L1.

Aquestes capes es caracteritzen per dividir-se de forma anticlinal, generant capes superficials és a dir, en una direcció, lliscant sobre la capa inferior. L'altre grup estructural és el Corpus, que presenta la capa L3 tan en dicotiledònies com en cotiledònies. El corpus presenta divisions de tipus anticlinal i periclinal. És a dir, té la capacitat de créixer en ambdues direccions, dotant als teixits de superfície (divisions anticlinals) i volum (divisions periclinals).

En la monografia de Tax (Tax *et al.*, 2006)²³⁵ es resumeix la informació sobre la regulació de l'expressió dels gens que expliquen els models clàssics de desenvolupament morfològic i funcional de divisió cel·lular, descrivint la localització de les zones centrals i perifèriques del meristem i per tant la direcció del creixement.

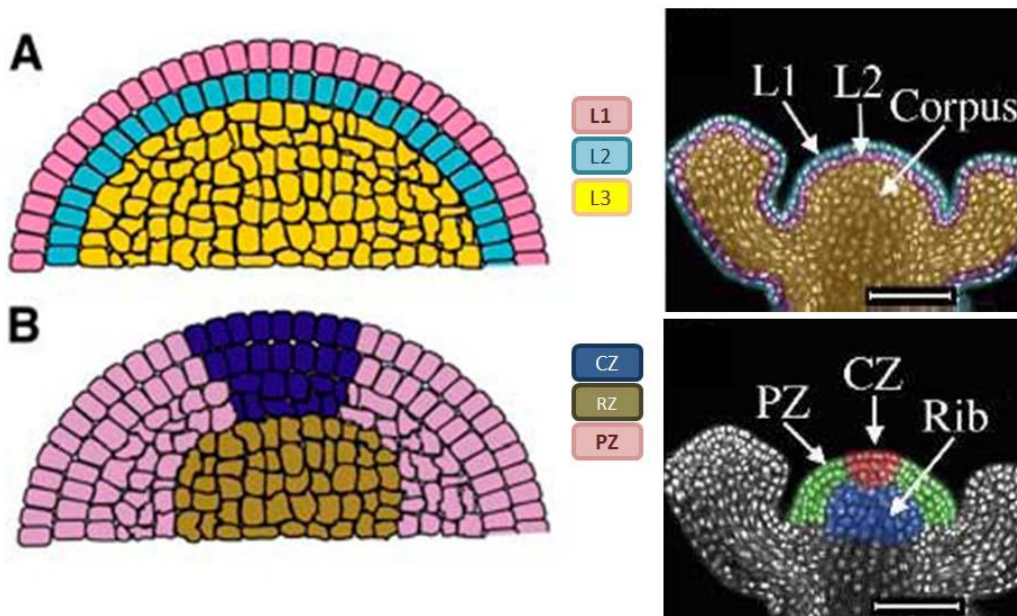


Figura 25. Diferents tipus de meristems. A: *Model Túnica-corpora* amb les capes L1 i L2 que corresponen a la Túnica (en monocotiledònies només presenten la capa L1), L3 que correspon al Corpus.

B: *Model Zonal*, CZ Zona central ; RZ: Zona Rib; PZ: Zona periferal

Esquema extret de Tax (2006) i fotografies de la dreta corresponents a una estructura SAM en *Arabidopsis Thaliana* (Elliot Meyerowitz)²³⁶

D'aquesta forma es va observar que la zona central (CZ) es dividia més lentament que la zona perifèrica (PZ). Per altra banda la zona perifèrica, envolta a la zona central, així com la zona del

4.-Generació i garbellat d'una població mutant en Arròs

Meristema Medul·lar o Zona Rib(RZ) generarà cèl·lules que formaran part de fulles i tiges en desenvolupament.

En el nostre cas, ens interessa molt saber com es comporten aquests teixits i les seves corresponents cèl·lules, ja que durant la mutagènesis generalment només quedarà afectada el genoma d'una cèl·lula. Si volem que aquesta cèl·lula generi una estructura completa nova, haurà de ser en la zona meristemàtica on haurà d'actuar. A més volem que la mutació es transmeti a la següent generació, per tant haurà d'afectar almenys a les estructures reproductives. En dicotiledònies, la capa L2 conté les cèl·lules precursors de les cèl·lules germinals.

En arròs, només hi ha una capa L1 en la túnica, i els gàmetes es generen a partir de la capa L3. A partir del meristem apical (SAM), es generarà el meristem floral (FM) que serà el responsable de formar les espiguetes de la panícula de l'arròs. No es disposa d'informació precisa que permeti estimar el nombre de cèl·lules precursors de les cèl·lules germinals presents en la llavor, ni per tant una estimació del grau de mosaïcisme de la planta adulta, però s'espera que serà més important que en la dicotiledònia *Arabidopsis*, degut a l'avançat estat de formació de l'embrió en la llavor madura.

El mosaïcisme en les plantes M1 obliga a realitzar el garbellat molecular de mutacions en la generació M2, i fa que sigui preferible realitzar l'anàlisi fenotípic en la M3.

4.1.3.-Alternatives a la mutagènesi de llavors

L'eficiència en la mutagènesi dependrà de la capacitat que tingui el mutagen en penetrar dins dels teixits i de provocar un canvi en zones meristemàtiques. Per tant, com més gran sigui la llavor, o més teixits dificultin l'entrada del mutagen, més difícil serà obtenir una mutació. Per aquest motiu s'han buscat altres alternatives a la mutagènesi de llavors.

Mutagènesi de pol·len

La mutagènesi de pol·len es va emprar inicialment en el blat de moro. La tècnica requereix recollir el pollen en el camp en condicions òptimes de viabilitat, mutagenitzar el pollen i realitzar la fecundació in situ (a temperatures elevades i emprant un equip especial de protecció individual). Tot i la dificultat tècnica de la mutagènesi, varis grups han establert línies mutants estables de blat de moro (Neuffer 1957)²³⁷, (Amano *et al.*, 1965)²³⁸, (Mottinger 1970)²³⁹. Per altra banda, tot i l'eficiència d'aquesta tècnica, no es possible utilitzar-la en l'arròs degut al curt temps de vida del pol·len.

4.-Generació i garbellat d'una població mutant en Arròs

Mutagènesi de cèl·lules no diferenciades

Una de les formes d'accelerar la generació d'una població de mutants, és assegurar-se que totes les cèl·lules d'un individu, que surtin de la mutagènesis continguin la mateixa mutació. La mutagènesi de calls i la regeneració de plantes a partir d'ells ofereix aquesta possibilitat; tot i que és una aproximació més intensiva que la mutagènesi de llavors perquè requereix un major volum de treball de cultiu in vitro. Una alternativa a la mutagènesi de cèl·lules germinals és la mutagènesis de cèl·lules no diferenciades com els protoplasts i els calls.

Protoplast és aquella cèl·lula vegetal a la que s'ha eliminat total o parcialment la seva paret cel·lular. La mutagènesi de protoplasts s'ha utilitzat per obtenir línies cel·lulars resistents a composts químics, seleccionant cèl·lules resistents mitjançant l'exposició al compost en el cultiu i la regeneració posterior de plantes a partir de les cèl·lules resistents. (Carlson 1973)¹³⁸ (Sung 1976)¹³⁹ (Colijn *et al.*, 1979)²⁴⁰.

Call, son aquell conjunt de cèl·lules que provenen d'un teixit diferenciat i tornen a un estat indiferenciat, però a diferencia dels protoplasts tenen paret cel·lular. Els calls que provenen de cèl·lules de l'embrió, anteres o fulles joves i son cultivats en medis apropiats, poden arribar a regenerar una planta sencera ²⁴¹. La mutagènesis de calls i te l'avantatge que permet millorar l'accés del mutagen a les cèl·lules, i com que les plantes es regeneren a partir d'una o poques cèl·lules, tindran un grau de mosaïcisme molt baix i permetran realitzar el garbellat directament en la primera generació de plantes.

En la literatura es troben pocs exemples de regeneració de mutants a partir de mutagènesi de protoplasts resistents seleccionats i cap exemple de poblacions senceres de mutants químics generats partir de calls.

4.1.4.-Objectius

L'objectiu principal d'aquest projecte es generar una població d'arròs mutant a partir de mutagènesis química de call per a garbellat molecular de mutacions, i avaluar la eficiència del procés de mutagènesi i l'obtenció de la població per aquesta via.

4.2.-Resultats

Una forma de poder aconseguir una mutagènesi en el major nombre de cèl·lules de la planta ens el dona la facilitat que te l'arròs de poder passar per l'estadi de call. Si aconseguim una generació de mutants a partir de la mutagènesi de calls, és molt probable que integrem una mutació, però presentada en quasi totes les cèl·lules de la planta, ja que es parteix d'un nombre menor de cèl·lules.

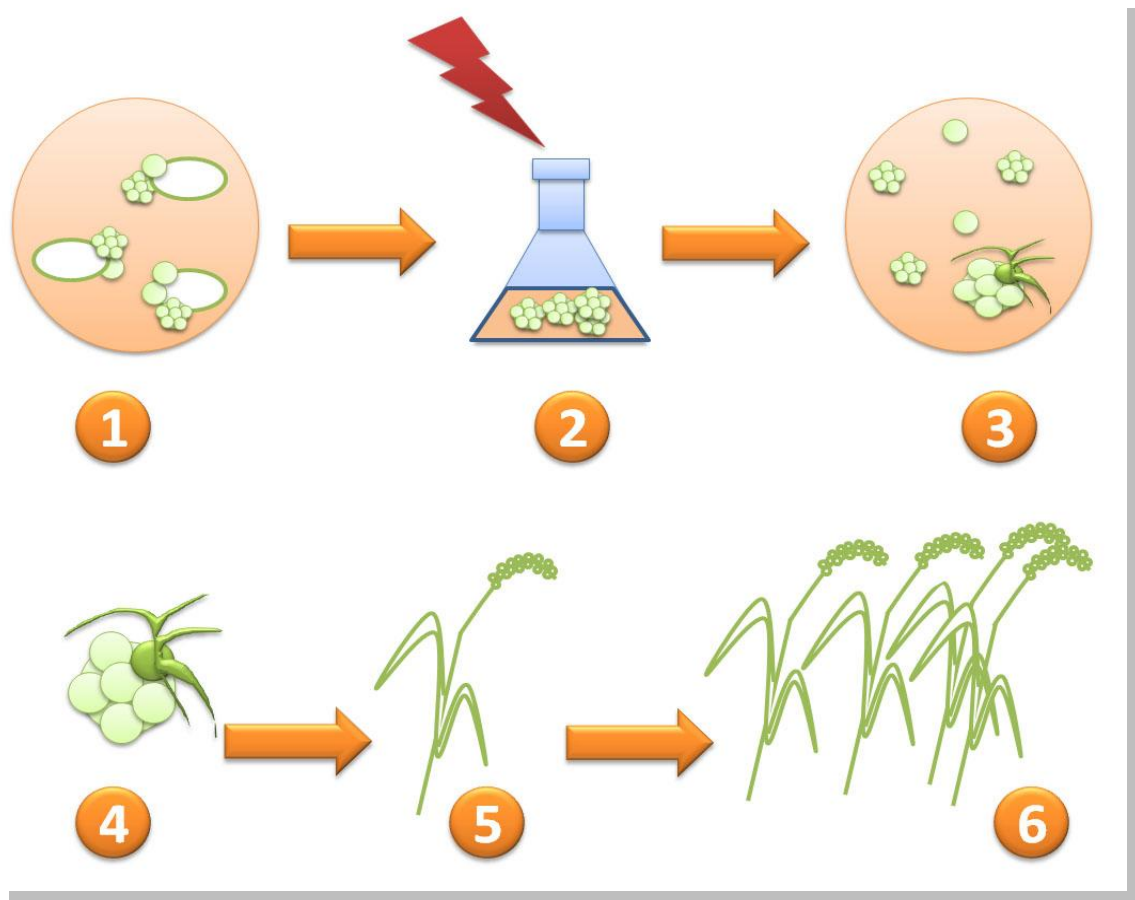


Figura 26: Mutagènesi de call embriogènic. 1.-Creixement del call embriogènic a partir de llavors. 2.- Creixement cel·lular en cultiu líquid i mutagènesi 3.-Regeneració de plàntula a partir de call mutagenitzat. 4.-Regeneració de plàntula. 5.-Aclimatació de plàntula. 6.-Sembrada de plàntula per garbellar molecular.

Per la generació de calls embriogènics es va partir de llavors d'arròs de tipus *japonica* prèviament esterilitzats per evitar contaminacions (veure figura 26). Les llavors es van fer créixer en la foscor en un medi sòlid especial amb l'hormona 2,4 D que permet que es formi agrupacions de calls. Després de 3 setmanes apareixen calls d'aparença esfèrica i brillant (calls

4.-Generació i garbellat d'una població mutant en Arròs

embriogènics) que es seleccionen, utilitzant una lupa binocular, de la resta de calls no útils amb contorn irregular, trencadís i no brillant .

Aquests calls embriogènics es van mutagenitzar (veure secció 7.4 del capítol de material i mètodes) utilitzant el mutagen EMS. Després de la mutagènesi els calls son transferits a un nou medi sense hormones. Durant les següents 4 setmanes el call s'estabilitzarà i continuarà formant nous calls. A partir d'aquest punt, el call es transfereix a un medi amb hormones que permetran que es formin cèl·lules verdes amb capacitat fotosintètica i finalment seran aquestes les que es transferiran a un medi d'arrelament fins que es formin petites plàntules.

Les plantes regenerades, son transferides a una cambra de plàstic que contingui una humitat elevada respecte l'exterior, però menor que la que tenien dins del tub de vidre. Això es fa, per què les plàntules han crescut en l'interior d'un tub on la humitat era molt propera al 100% i no han endurit l'epidermis ni han fabricat estructures per evitar la pèrdua d'aigua. Un cop han passat uns dies en humitat inferior que en cultiu in vitro, les plàntules estan llestes per créixer a l'hivernacle.

Utilitzant aquest protocol es va generar una població d'aproximadament 5000 plantes individuals en 6 mesos.

4.3.-Discussió

La generació de plantes mutants a partir de call, presenta avantatges i inconvenients respecte la mutagènesi de llavors. En la mutagènesi de llavors, el protocol és relativament més senzill, ja que consisteix en desinfectar les llavors, realitzar el tractament amb el mutagen, sembrar les llavors en un hivernacle o camp experimental i recollir la primera generació de llavors. A partir d'aquesta primera generació de llavors anomenada M1, es sembren unes quantes llavors per tal d'obtenir la segona filial o M2 (veure figura 27). Aquest segon pas es realitza per tal d'evitar garbellar aquelles plantes que després de la mutagènesi, hagin incorporat una mutació somàtica que no puguin passar a la següent generació. Per aquest motiu, la planificació dels assaigs de camp, es vital per tal que siguin successives les dues sembres.

El moment òptim per sembrar l'arròs depèn de la zona de sembra, però en la regió arrossera espanyola va des de finals d'abril fins a mitjans de maig. La planta creix fins que a finals de setembre o principis d'Octubre que és quan es recull la planta per obtenir el gra. Després d'aquest període, ja no es pot practicar cap sembra, ja que les temperatures de l'hivern no ho permeten.

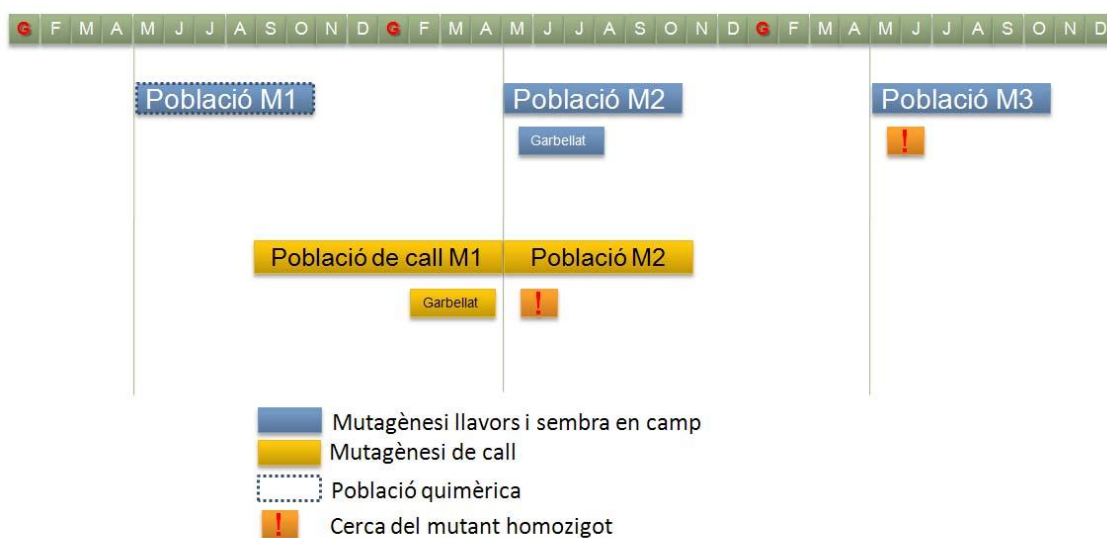
4.-Generació i garbellat d'una població mutant en Arròs

Això vol dir que la planta d'arròs ha trigat al voltant de 6 mesos des de la sembra fins a la recol·lecció, però serà necessari un any i mig per tal d'obtenir les llavors de la M2.

Si fem créixer les plantes en un hivernacle i en un volum de terra menor, obtindrem les primeres llavors després de 4 mesos aproximadament, si la planta té una temperatura òptima. Tot i que l'hivernacle tingui calefacció, durant l'hivern la producció de llavors és menor, i sovint la planta floreix però no és capaç de formar correctament el pol·len, i la majoria de les llavors són avortades, o bé no pot omplir correctament la llavor, patint un descens del rendiment de la producció.

Tot i que es pot fer l'anàlisi de les poblacions un cop ha estat sembrada la M1, s'haurà d'esperar a obtenir les llavors M2, per tal de buscar una planta homozigota per qualsevol mutació trobada durant el garbellat.

La mutagènesi de call, permet obtenir unes 5000 plàntules amb una mutació fixada i amb una alta probabilitat que la passi a la següent generació, en uns 6 mesos. Si la planificació s'adapta a la sembra en hivernacle abans de l'estiu, es pot obtenir la M2, en uns 4 mesos més.



Planificació de la generació d'una població mutant a partir de call



Figura 27: Planificació de diferents poblacions de mutants d'arròs, depenent de l'estratègia de mutagènesi. La població M3 en la mutagènesi de llavors és necessària per tal d'obtenir llavors homozigotes per la mutació. En la mutagènesi en call no és necessari generar una tercera població, ja que s'evita la població quimèrica.

4.4.-Conclusió

S'ha aconseguit en 6 mesos generar una població de mutants d'arròs d'aproximadament 5000 plantes mitjançant la mutagènesi de calls embriogènics tot i que el requeriment de personal i material per generar la població és major que en les altres estratègies. Aquesta tècnica per altra banda, només es pot aplicar a les espècies en les quals s'hagi descrit que poden formar call i regenerar plantes amb una alta eficiència.

Realitzant la mutagènesi sobre calls, es possible guanyar de 12 a 15 mesos sobre la mutagènesi de llavors. No obstant, es crucial escollir bé el moment d'inici del treball in vitro per obtenir les llavors de les plantes regenerades de la generació M1 en el moment adequat.

La tècnica de mutagènesi obre la porta a la modificació d'espècies de llarg cicle de vida sempre que existeixi un protocol eficient d'obtenció de calls i regeneració de plantes, com es el cas de la planta de cafè *Coffea arabica* .

A més a més, seria possible seguir la mateixa estratègia proposada per aconseguir mutants de llevat en *S. carlsbergensis* del capítol 3. Per posar un exemple, si no fos factible aconseguir homozigots per la via de la reproducció sexual en un temps raonable, es pot plantejar obtenir-los mitjançant cicles consecutius de mutagènesi en call obtingut de les plantes M1 que continguin la mutació.

**Identificació de mutants del gen ACS en una
varietat hispana d'*Oryza sativa***

5.- Identificació de mutants del gen ACS en una varietat hispana d'*Oryza sativa*

El gen OsACS1 es indispensable per gametogènesi en *Oryza sativa*

5.1.- Introducció

Els vegetals utilitzen les hormones com a reguladors fisiològics de processos interns o com activadors de respostes fisiològiques davant de certs estímuls externs. El control fisiològic dels vegetals mitjançant hormones és un procés que dista de ser conegut en la seva totalitat. Un petit grup d'hormones son les responsables d'una gran varietat de respostes morfològiques que va des del control de processos metabòlics fins a la regulació de l'expressió de gens. Però a la seva vegada, les hormones son regulades per processos o desencadenants externs. El coneixement dels mecanismes que intervenen en la síntesi de l'hormona pot donar informació molt valuosa per tal d'aplicar-la en la millora de varietats de plantes d'interès comercial.

5.1.1.- Les funcions de l'hormona etilè

L'etilè és la olefina més senzilla. Aquest gas es capaç de provocar respostes en la planta a molt baixes concentracions, amb interessants efectes no només a nivell fisiològic, sinó a nivell comercial. El coneixement de l'efecte d'aquesta hormona es remunta als estudis de Wiesner (1878) que estudià la curvatura produïda en algunes plàntules quan creixien en la foscor. Wiesner observà que les plàntules tenien una orientació horitzontal en comptes de la vertical esperada. Temps més tard Molishn (1884) detectà que el gas de les llums del laboratori afectaven a la resposta geotròpica de les arrels. No fou fins que Neljubow (1901) va relacionar les respostes obtingudes per Weisner i Molishn amb el gas etilè de les llums del laboratori. L'etilè produïa elongació horitzontal en plàntules i per altra banda produïa altres tipus d'anomalies com reducció de l'elongació de la tija i augment de l'expansió de l'arrel (Barceló *et al.*, 1992)¹³ Així doncs aquest conjunt de fenòmens produïts per l'etilè fou conegut com la triple resposta (Waggoner *et al.*, 1954²⁴², Barry *et al.*, 2001),²⁴³. Aquesta hormona és produïda en varis òrgans arribant a produir-se fins a 500 nl/g*h o fins i tot de 10-100nl/l en aire (Theologis 1992)²⁴⁴

Els efectes de l'etilè som amplis, i van des de la maduració dels fruits, senescència floral, abscisió de fulles i pètals, inhibició de l'elongació de plàntules germinades i estímul de la iniciació radicular (Jakubowicz 2002)²⁴⁵

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

A part del paper que juga l'etilè en la triple resposta, aquest és el responsable del desenvolupament foliar en certes plantes. S'ha demostrat que l'augment d'etilè en fulles provoca el seu creixement i que al final de la fase de desenvolupament foliar, és a dir en la fulla madura, disminueixen els nivells. Els canvis morfològics provocats per l'etilè son variats, ja que aquesta hormona incideix en la divisió i expansió cel·lular així com la mobilització de l'auxina. Osborne va classificar les cèl·lules vegetals en funció a la seva resposta a les auxines i a l'etilè (Osborne 1977)²⁴⁶. Les cèl·lules de tipus I responien a l'elongació per l'efecte de l'auxina però no de l'etilè. En aquest grup hi ha la gran majoria de plantes terrestres. Les plantes de cèl·lules del tipus II s'expandeixen en resposta a l'efecte de l'etilè però no de les auxines. Les plantes de cèl·lules de tipus III responen a ambdues hormones, expandint-se i elongant-se.

Un altre procés que regula l'etilè és la senescència. La senescència és un conjunt de processos que duen a un òrgan o bé a una planta sencera, a una mort programada. La senescència en fulles adultes, es útil per exemple, per tal de redistribuir els nutrients per la planta en fulles que han arribat al zenit, o bé per detoxificar la planta de substàncies perniciosos. Per altra banda, la senescència és necessària per tal d'ajudar a madurar a les llavors de certes espècies. La majoria de cereals son anuals i la seva estratègia consisteix en formar estructures vegetatives i acumular substàncies de reserva en aquestes estructures. Les substàncies de reserva serviran per alimentar a les llavors i un cop aquestes estan formades, la planta entra en un període de senescència i és durant aquest estadi de mort programada quan les llavors acaben de madurar .

5.1.2.- La síntesi d'etilè

La producció d'etilè comença per la transformació de S-Adenosil Metionina (SAM) a partir de la Metionina, a través de l'enzim Metionina adenosil transferasa (Lieberman *et al.*, 1964)²⁴⁷. El SAM és ràpidament transformat a Aminociclopropà 1 carboxilat (ACC) + metiltioadenosina, mitjançant l'enzim Aminociclopropà 1 –carboxilat sintasa (ACS) (Yang *et al.*, 1984)²⁴⁸. Aquest enzim produeix una gamma-ciclació i utilitza a el piridoxal 5' fosfat (PLP) com a cofactor per catalitzar la reacció. ACC passa a etilè mitjançant l'enzim Aminociclopropà 1 carboxilat oxidasa (ACO) i utilitzant l'oxigen com a agent oxidant.

Per altra banda un compost molt important i decisiu en la senescència de les fulles és el SAM, ja que és el punt de partida de la síntesi d'etilè, però a la vegada també ho és per la ruta de les poliamines. Les poliamines (putresceina, espermidina i espermina), tenen un paper en la planta estimulants la divisió cel·lular i evitant la mort cel·lular. Si es bloqueja la síntesi de ACC al

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

ser desactivada la funció de la ACS la ruta es desvia cap a la síntesi de poliamines, evitant la formació d'etilè, impedit la senescència, i per altra banda, estimulant la divisió cel·lular.

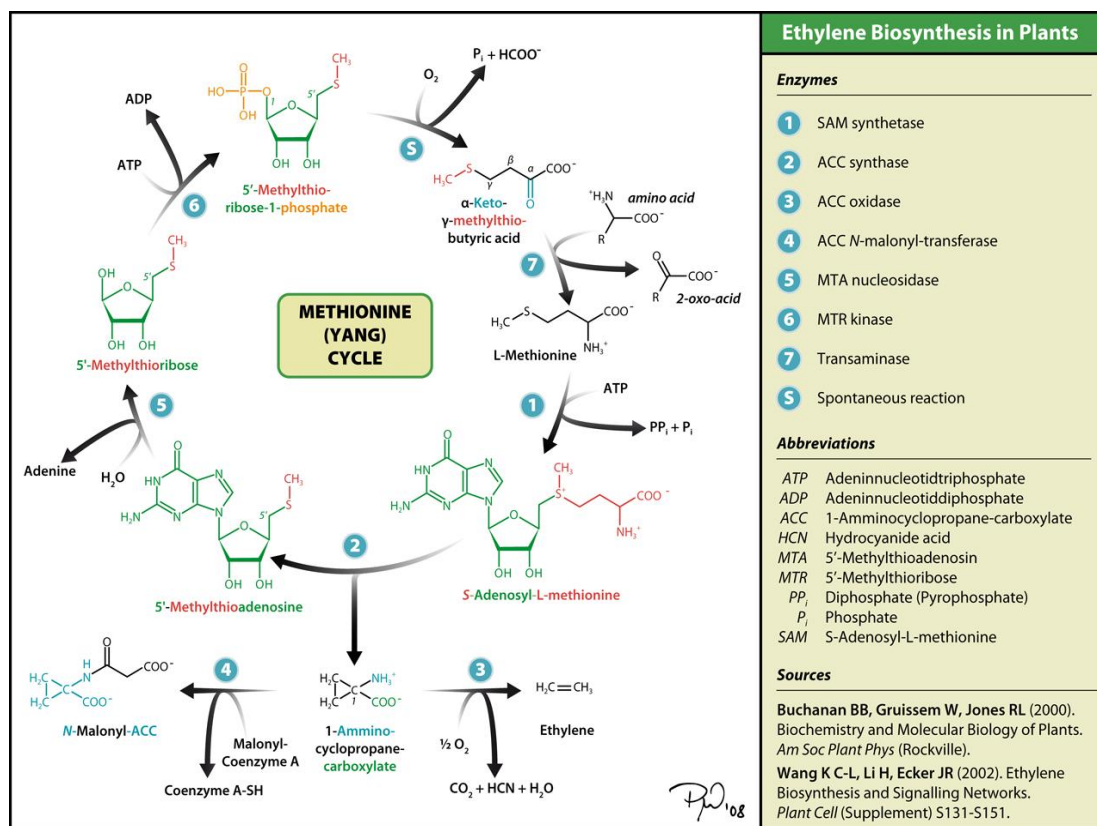


Figura 28: Esquema de la ruta metabòlica de l'etilè. Font: Wikipedia a partir de Buchanan *et al.*, 2000 i Wang *et al.*, 2002

Per tant, l'enzim ACS, juga un paper fonamental en la ruta de síntesi i regulació tan de l'etilè com de les poliamines.

5.1.3.- El gen ACS com a enzim clau en la producció d'etilè

El gen ACS pertany dins d'un conjunt de gens de la família de les aspartat aminotransferases. Aquesta família pertany a la seva vegada a la superfamília de piridoxal fosfat (PLP) dependent aspartat aminotransferasa. Els gens ACS estan presents en plantes de diverses espècies allunyades filogenèticament que s'ha mantingut conservat ja que és un enzim clau dins la ruta metabòlica de l'etilè (veure figura 29). El piridoxal fosfat combina amb un alfa aminoàcid per formar un compost anomenat base de Schiff o aldimina.

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

El seu funcionament ha estat força estudiat en *Arabidopsis thaliana* on s'han trobat fins a 11 gens ACS. Altres espècies com *Lycopersicon esculentum* i *Zea mays* contenen gens similars a *Arabidopsis* amb regions molt conservades entre elles.

Cladogram

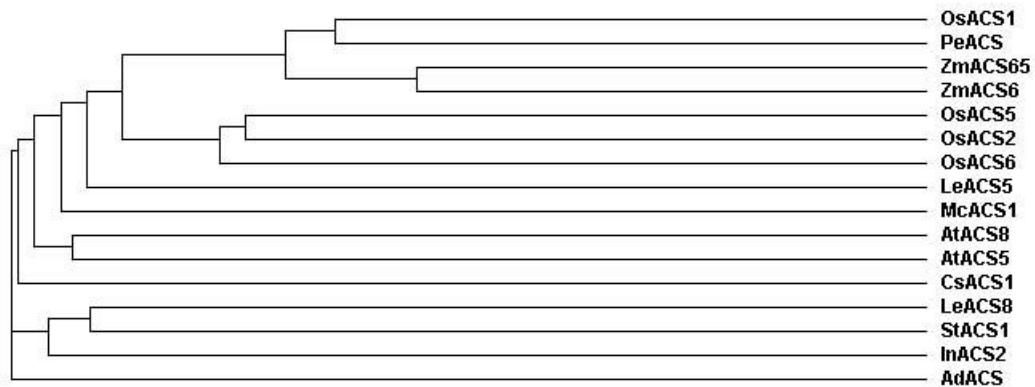


Figura 29: Arbre filogenètic de la proteïna ACS1, ACS2, ACS5, ACS6 d'*Oryza sativa*(Os) en comparació amb els gens les espècies *Phyllostacys edulis* (Pe), *Zea mays* (Zm), *Musa cuminata* (Mc), *Lycopersicum sculentum* (Le), *Solanum tuberosum* (St), *Ipomoea nil* (In), *Actinidia deliciosa* (Ad), *Arabidopsis thaliana* (At).

L'enzim ACS actua en forma de homo o heterodímers formats per combinacions de les diferents isoformes que resulten de l'expressió dels gens ACS d'una espècie. Per tal d'entendre el funcionament de l'enzim que es tradueix del gen ACS, van combinar en *E. coli* les diverses isoformes de ACS de l'espècie *Arabidopsis thaliana* i van observar que de les 45 combinacions possibles, només 25 eren funcionals (Tsuchisaka *et al.*, 2004)²⁴⁹. En arròs s'ha trobat fins a 6 gens per a Os ACS.

La presència de diversos gens que codifiquen per diferents isòmers de l'enzim ACS permet una alta diversitat de respostes en cèl·lules i teixits depenent de l'origen de l'estímul.

5.1.4.- Regulació de l'expressió de les isoformes ACS

L'expressió dels diversos gens ACS ha estat font d'estudi en l'organisme model *Arabidopsis thaliana* i s'ha trobat que el patró d'expressió de cada gen depèn del tipus d'estímul. La resposta davant d'un estímul determinat provoca l'expressió de diversos gens que expressaran les proteïnes de les diferents isoformes, que combinades formant dímers, catalitzaran la reacció. S'ha trobat també que diversos estímuls provoquen diferències d'expressió en els diferents òrgans de la planta. Es va observar que en l'arrel i davant l'estímul provocat per la hormona àcid indolacètic (IAA), es va trobar que dels 11 gens de ACS, hi havia resposta dels gens AtACS2, 4, 5, 6, 8 i 11. En canvi els gens AtACS1 i 9 no donaven resposta. Altres

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

experiments realitzats en *Arabidopsis* van demostrar que davant un fenomen com la hipòxia, s'expressaven els gens AtACS2, 6, 7 i 9. Altres exemples de resposta a estímuls són la reacció davant la llum i la foscor provocant l'expressió del gen AtACS8, que segueix un patró de tipus cicle circadià. Altres estímuls com el fred, la calor, l'anaerobiosi i els ions Li⁺, donen també respostes d'expressió diferents (Yamagami *et al.*, 2003)²⁵⁰; (Vandenbussche *et al.*, 2003)²⁵¹; (Thain *et al.*, 2004)²⁵² i (Peng *et al.*, 2005)²⁵³.

Per altra banda en la literatura es pot trobar referències a la regulació postraduccionals en *Arabidopsis thaliana* on els mutants *Eto2* i *Eto3* presenten mutacions a la C-ter dels dímers codificats pels gens AtACS5 i AtACS9 respectivament. Les mutacions de tipus dominant és traduïen en una sobreproducció d'etilè en *Arabidopsis* (Chae *et al.*, 2003)²⁵⁴.

5.1.5.- El gen ACS i el fenotip stay-green

Una de les característiques més desitjables en l'agricultura és l'increment de la producció de llavors per hectàrea i el rendiment. Per a la indústria alimentària, la producció consisteix en el pes de llavors per hectàrea i el rendiment consisteix en el pes de llavors per hectàrea després dels diferents tractaments que deixen a la llavor a punt per la seva comercialització.

S'han destinat molt esforços per tal de conèixer els mecanismes genètics que estan relacionats en la producció de flors, el transport de sucres a les llavors i els factors que regulen la mida (Murchie *et al.*, 2002)²⁵⁵.

Per la maduració de la llavor, la fulla bandera alimenta la llavor durant la seva formació aportant d'un 60 a un 100% de sacarosa (Murchie *et al.*, 2002)²⁷⁴. Tot el sucre que no es format per la fulla bandera es transporta des de les zones de producció fins a la base de la fulla bandera mitjançant mecanismes de transport de llarga distància tipus via floemàtica, on el sucre viatja fins a la panícula (Scofield *et al.*, 2007)²⁷³.

Mutants en gens que són responsables de la senescència provoquen un retràs del procés, permetent a la planta seguir fabricant sucres que s'envien a la llavor (Jiang *et al.*, 2004)²⁵⁶.

En *Zea mays* s'ha trobat una mutació en un gen ACS que presentava un fenotip de tipus stay-green, concretament en el gen ZmACS6 fent que la planta romangués verda durant més temps al endarrerir el període de senescència. D'aquesta forma, les llavors de blat de moro incrementaven el pes de la llavor al produir sucres de reserva durant més temps.

Per altra banda, hi ha constància que la presència de mutacions en algun dels isogens permet que davant un estímulo extern hi hagi una variació en el patró de resposta. Un exemple el trobem en blat de moro *Zea mays*, on mutants en ZmACS6 presenten tolerància a la sequera (Young *et al.*, 2004)²⁵⁷.

5.1.6.-Objectius

El principal objectiu d'aquest projecte es aconseguir trobar en arròs mutants amb el mateix efecte que el dels mutants de *Zea mays* pel gen ZmACS6, en què una pèrdua de funcionalitat d'aquest gen produïa uns efectes de tipus stay-green davant la senescència i la seva conseqüència sobre l'increment de pes de les llavors.

Mitjançant el garbellat d'una població mutant d'arròs generada a partir de mutagènesis química es buscarà la desactivació el gen homòleg en arròs del gen ZmACS6 per tal d'obtenir el mateix efecte que el descrit en *Zea mays*.

Per altra banda i utilitzant la informació disponible dels mutants pel gen ACS en *Zea mays* i buscant l'homologia en altres espècies es va indagar en l'efecte i el funcionament d'aquest gen en *Oryza sativa*.

5.2.-Resultats i discussió

5.2.1.-Estructura i composició del gen ACS

Per tal de trobar la seqüència homòloga del gen de *ZmACS6* de *Zea mays* en *Oryza sativa*, es van fer alineaments per blast (NCBI). El gen homòleg més proper a *ZmACS6* de *Zea mays* en l'arròs fou Os03g0727600 (*OsACS1*), 85% identitat de aa. En la Figura 30 i 31, es representen els el cladograma i els alineament dels gens ACS en blat de moro i l'arròs. *OsACS1* es transcriu com un mRNA de 1461 base que codifica per una proteïna de 487 aa. Es van dissenyar 2 parells de primers per tal d'amplificar dos fragments de *OsACS1*, un d'ells conté els exons 1,2 i 3 i l'altre conté l'exó 4. Per més detalls, veure apartat 7.5.4 del capítol de materials i mètodes

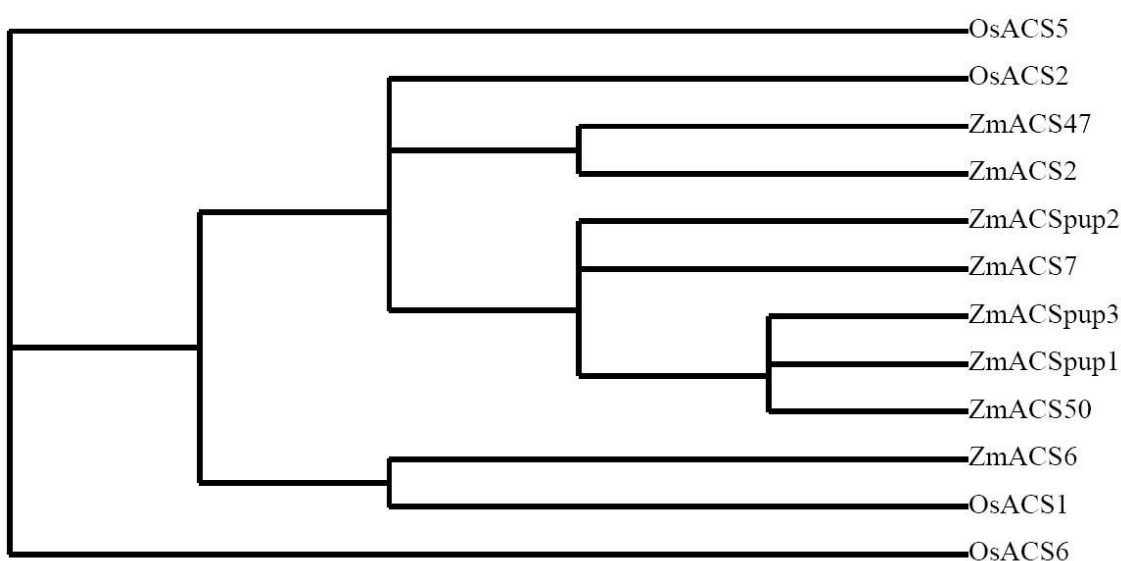


Figura 30: Cladograma producte de l'alineament de les seqüències d'arròs Os ACS1, Os ACS2, Os ACS5 i OsACS6 amb les seqüències de *Zea mays*, ZmACS2, ZmACS47, ZmACS50, ZmACS6, ZmACS7 i 3 seqüències putatives marcades com a ZmACSpup1, 2 i 3. Alineaments per CLUSTAL i MUSCLE ^{258 259}

5.2.2.-Garbellat molecular del gen ACS i seqüenciació

El garbellat molecular s'ha fet analitzant pools d'ADN de plantes (veure apartats 7.5.3 fins al 7.5.11 del capítol material i mètodes). Es van identificar 9 positius mitjançant l'anàlisi individual per FCE (Figura 32). Després de la confirmació de les mutacions en gels d'acrilamida es van seqüenciar les mostres a nivell individual mitjançant el mètode SANGER (apartat 7.5.10 en material i mètodes). Els canvis de seqüència d'ADN i de proteïna estan resumits en la taula 8.

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

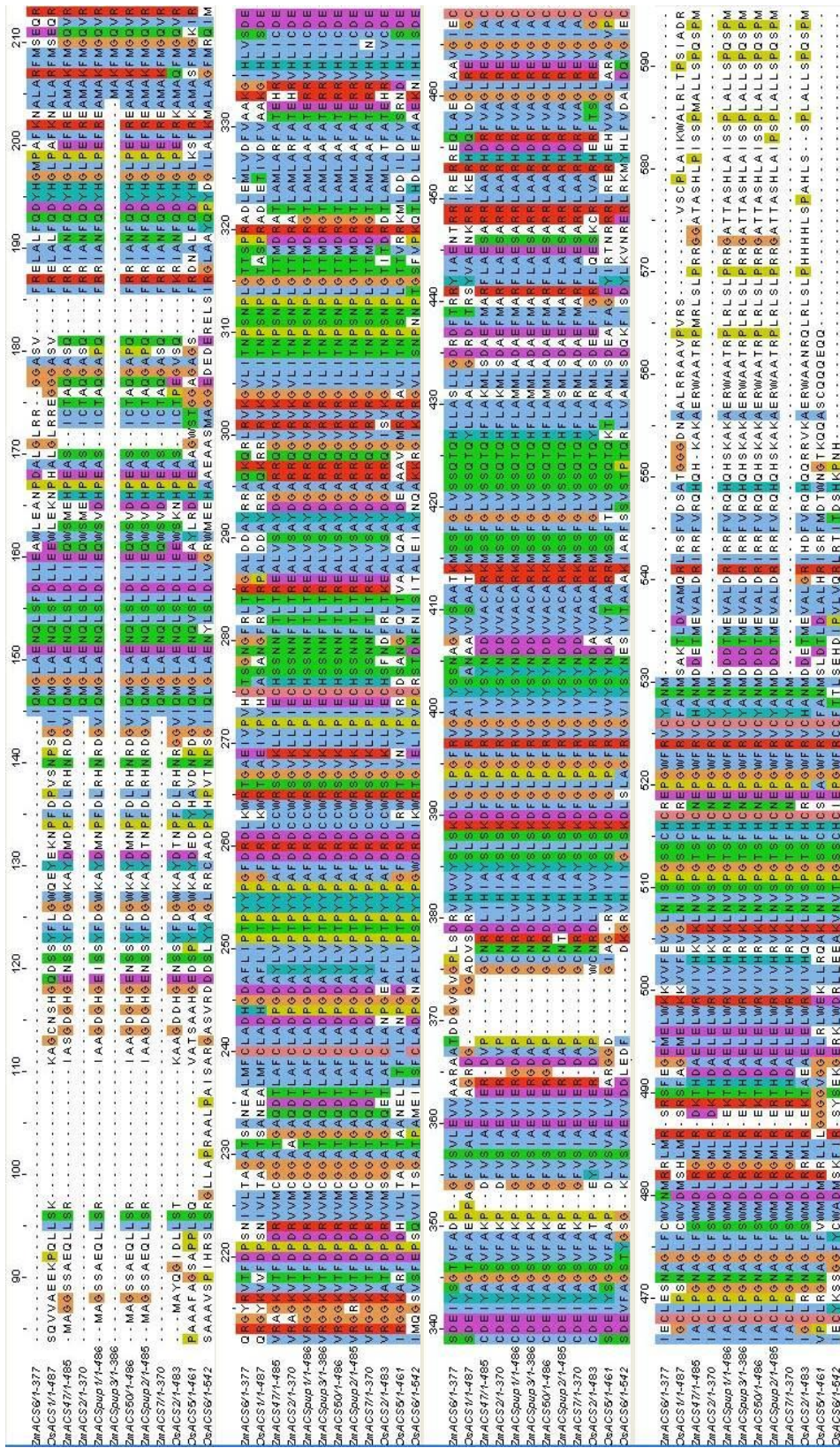


Figura 31: Alineament entre els diversos gens ZmACS de *Zea mays* i els gens Os ACS d'*Oryza sativa*. Els aminoàcids conservats estan representats amb el mateix color mentre que les regions que no presenten consens resten en color blanc

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

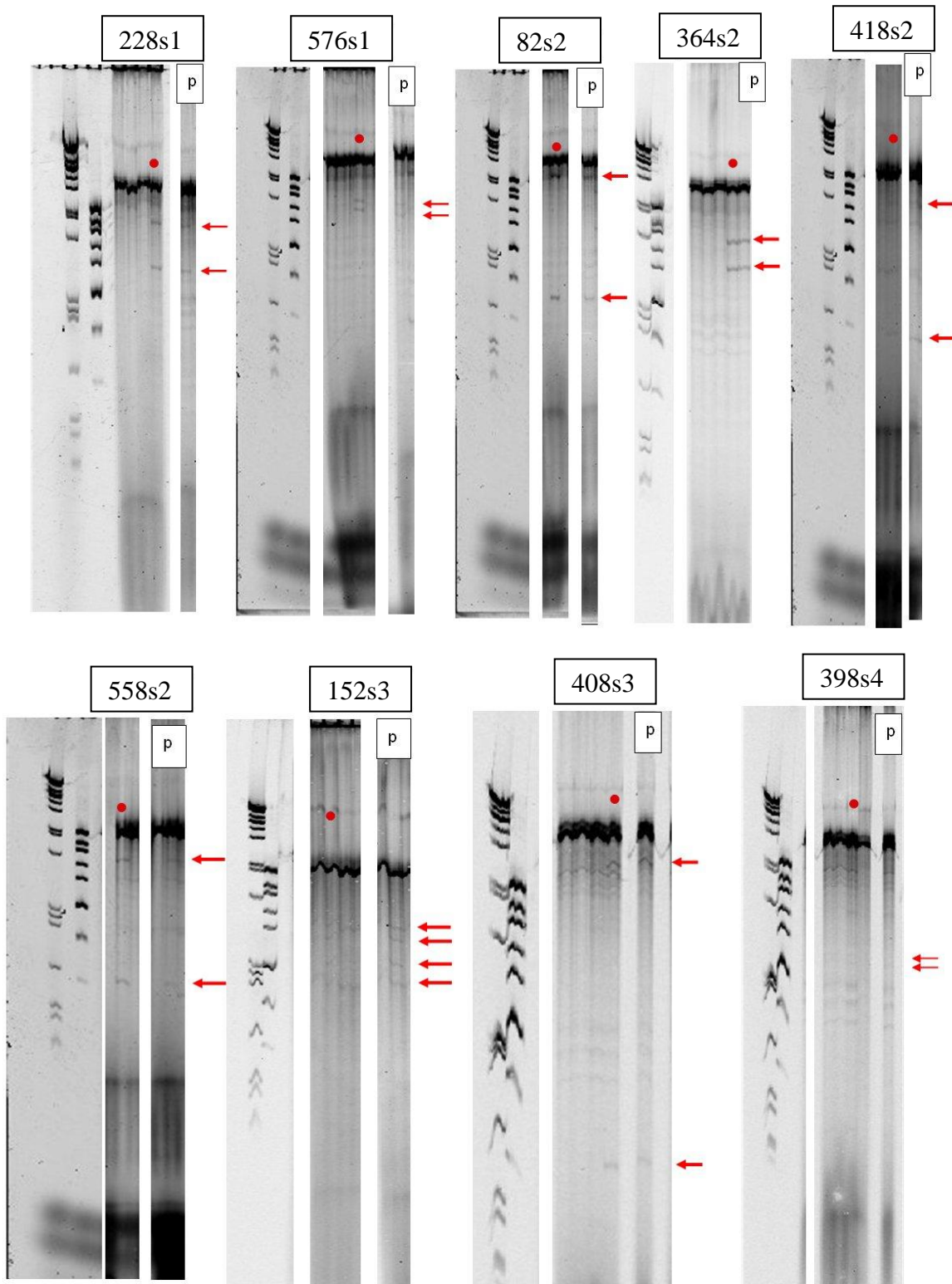


Figura 32: Resum dels gels d'acrilamida marcant la mostra pool (marcat com a P) i la mostra individual, marcada amb un punt vermell. Notis que hi ha 2 grups de mostres que amplifiquen una regió de 1200 pb que conté 3 exons (el 1, 2 i3) i varis introns entre aquests. Dins d'aquest grup està format per els mutants 228s1, 576s1, 38s2, 364s2, 408s3, 398s4. Un altre grup que amplifica l'exó 4 amb 1000pb i que està format pels mutants 418s2, 558s2, 152s3. Els marcadors de mida són dreta λ Pst i esquerra 100bp.

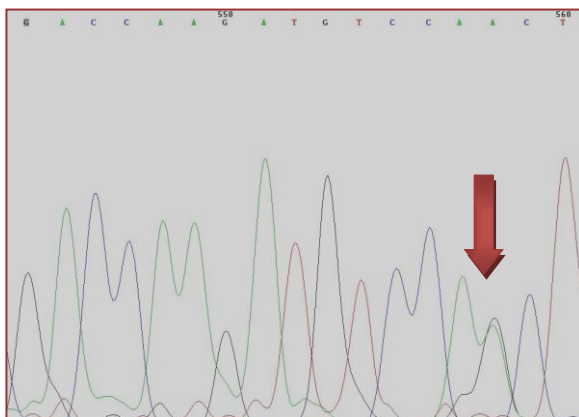
- λ Pst: 11501, (5077, 4749, 4507), 2556, 2443, 2140, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 247
- 100bp: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400 parells de bases

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

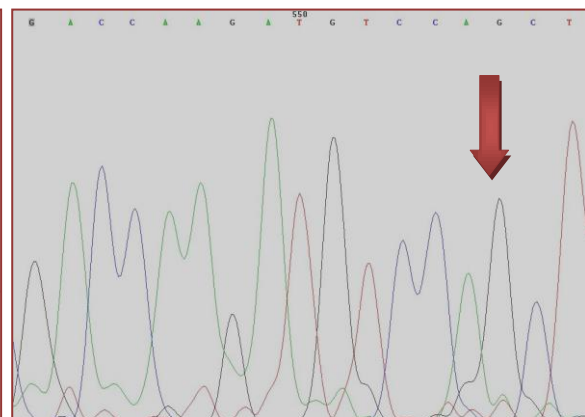
Candidat	Canvi de base	Aminoàcid	Abreviat	Resultat mutació
228s1	G->A	SER 314 ASN	S314N	EFFECTIVA*
576s1	C->T	LEU 354 PHE	L354P	EFFECTIVA*
82s2	C->T	PHE 231 PHE	F231F	SILENCIOSA
364s2	G->A	LYS 395 LYS	K395K	SILENCIOSA
418s2	C->T	SER 28 SER	S28S	SILENCIOSA
558s2	G->A	GLN 114 GLN	Q114Q	SILENCIOSA
152s3	T->G	CYS 20 GLY	C20G	NO EFFECTIVA
152s3	G->A	AG/GT**		EFFECTIVA
408s3	C->T	INTRÓ		SILENCIOSA
398s4	G->C	ALA 246 PRO	A246P	EFFECTIVA*

Taula 8: Tipus de mutacions trobades en el garbellat molecular pel gen ACS. Prediccions fetes amb el programa SIFT *Efectivitat teòrica segons algoritme SIFT ** Lloc de reconeixement exó

Candidat nº228s1

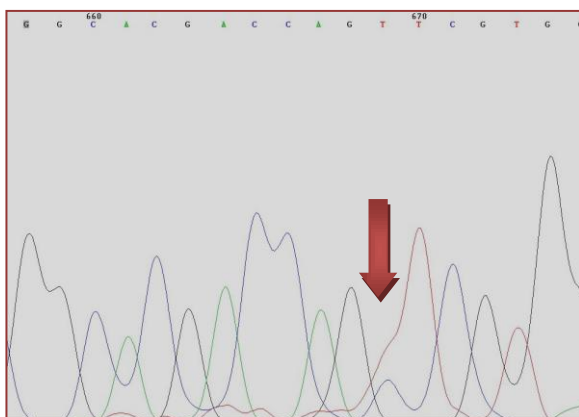


(228s1 ACS1 exó 4.2 Forward)

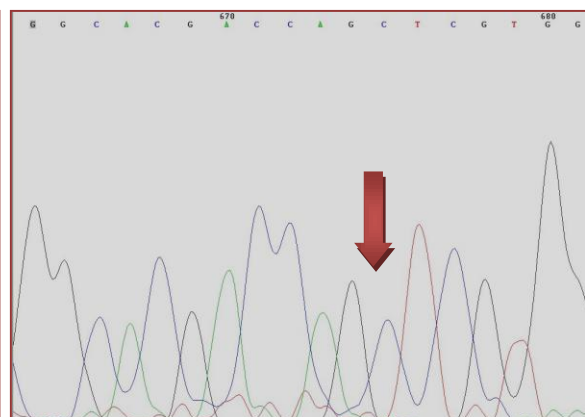


(Control ACS1 exó4.2 Forward)

Candidat nº576s1

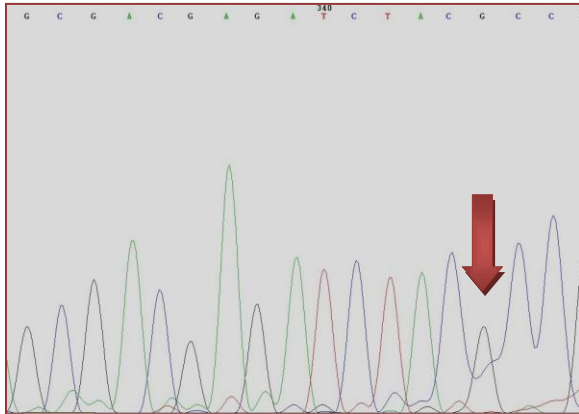


(576s1 ACS1 exó 4.2 Forward)

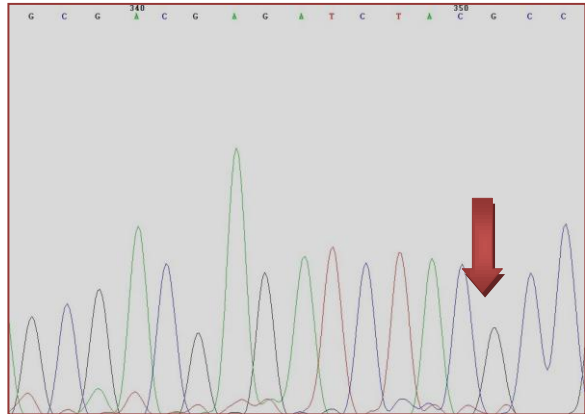


(Control ACS1 exó4.2 Forward)

Candidat nº398s4

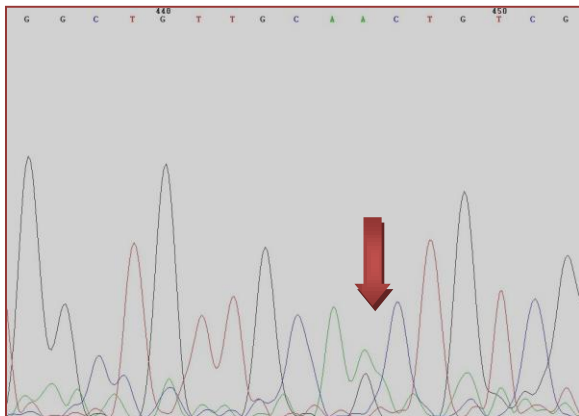


(398s4 ACS1 exó 4.2 Forward)

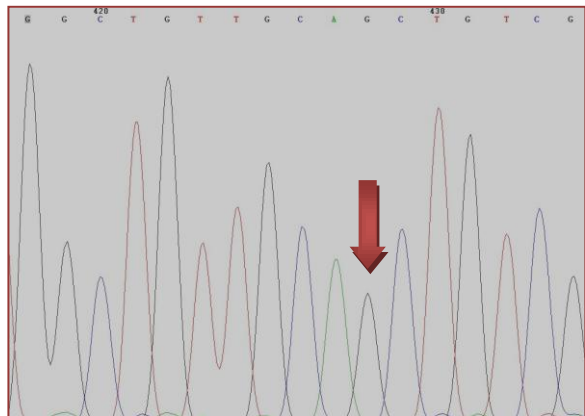


(Control ACS1 exó4.2 Forward)

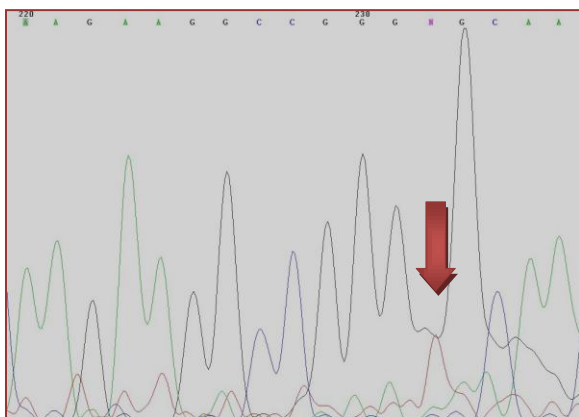
Candidat nº152s3



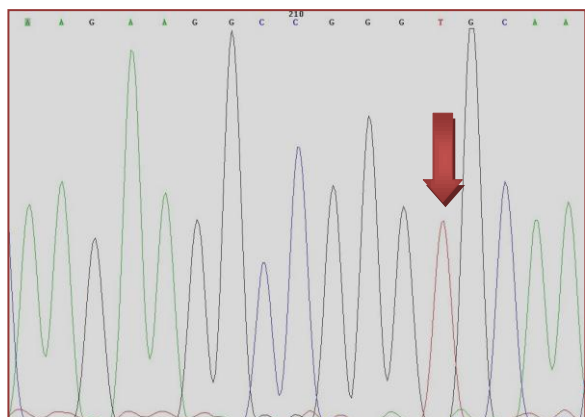
(152s3 ACS1 exó 123 Forward)



(Control ACS1 exó 123 Forward)



(152s3 ACS1 exó 123 Forward)



(Control ACS1 exó 123 Forward)

5.2.3.- Predicció estructural de l'efecte de la mutació en la proteïna.

Per predir l'efecte teòric de la mutació, s'han utilitzat els programes CLUSTAL i SIFT. SIFT utilitza la informació i la conservació de les seqüències de proteïnes de diferents espècies amb la mateixa funció, per predir l'efecte que produirà d'una mutació particular. Amb CLUSTAL, un algoritme d'alineament múltiple de seqüències, s'ha emprat la informació provinent de mutants en *Arabidopsis thaliana* (Chae *et al.*, 2003)²⁵⁴ i en *Solanum lycopersicum* Jakubowicz de les quals hi ha força estudis sobre el funcionament de la proteïna ACS i la seva regulació (Jakubowicz 2002)²⁴⁵

Dels 9 mutants aïllats, 5 van produir un canvi silenciós (i.e. no hi havia canvi de la seqüència proteica), un va produir un canvi predit com a no efectiu per SIFT. Els altres quatre mutants tenien una alta probabilitat d'afectar la funció de OsACS1:

*El mutant 152s³ presenta dues mutacions. Una d'elles provoca un canvi en una cisteïna en la posició 20 canviant-la per una Glicina, i el programa SIFT prediu que no és efectiva amb un 68% de fiabilitat. La mutació que pot tenir més rellevància recau en la zona intrònica, en la zona de reconeixement de l'exó que és necessària per formar l'spliceosoma. Tal i com s'ha vist en plantes d'arròs (Isshiki *et al.*, 2006)²⁶⁰, la regió exònica/intrònica (splice acceptor site) és delimitada per la seqüència AG/GT. Aquesta zona es reconeguda pel complex d'splicing de les ribonucleoproteïnes SnRNP, i eliminen del mRNA la seqüència intrònica. En el mutant 152s3, la mutació canvia la regió AG/GT, per AA/GT, impossibilitant el reconeixement del splice acceptor site de l'exó 2 per part del complex proteic SnRNP. En el cas que es formés un missatge sense l'exó 2, es perdrien 137 bases i a més a més, la pèrdua d'aquest exó provocaria una alteració del patró de lectura just després dels 60 aa codificats per l'exó 1, fent que la resta de la proteïna sigui no funcional.

*El mutant 228s¹ presenta un canvi d'una asparagina en comptes d'una serina en la posició 314 on segons la predicció de SIFT hi ha una probabilitat del 99% d'afectar la funció de la proteïna.

*El mutant 576s¹ presentava una mutació que produí un canvi en la Lisina de la posició 354 per una Prolina amb una probabilitat del 98% d'alterar la proteïna.

*El mutant 398s⁴ presentava un canvi de l'aminoàcid Alanina en la posició 246 per una prolina i té una probabilitat del 100% de canviar la proteïna .

En la figura 33, es representa l'alineament de diferents seqüències de proteïnes ACS feta per CLUSTALW. OsACS1 de l'espècie *Oryza sativa* (fam. Poaceae) i ACS de *Phyllostachys* (bambú), tenen un 86% de similitud. ZmACS6 de *Zea mays* té un 85% de semblança amb OsACS1 l'arròs.

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

A mesura que ens allunyem filogenèticament d'*Oryza sativa* ens trobem més diferències en la seqüència proteica, així doncs el gen ACS1 de *Musa cuminata* conté un 68% de semblança el gen de StACS1 de *Solanum tuberosum* (patata) conté un 66%, el gen InACS2 d'*Ipomoea* nil i el gen ACS de *Actinidia deliciosa* presenten un 65% i els CsACS1 de *Cucumis sativa* i el gen AtACS5 de *Arabidopsis thaliana*, un 63 i 61% respectivament.

Finalment el gen *LeACS2* de *Lycopersicum esculentum* i el gen PpACS del briòfit *Physcomitrella* patens contenen un 45 i un 30% respectivament.

Les mutacions identificades en el nostre garbellat cauen en regions conservades i amb demostrada importància per la funció de la proteïna. Per estudiar la importància de certs aminoàcids en la funció del gen *LeACS2*, Tarun (Tarun *et al.*, 1998)²⁶¹ van realitzar una mutagènesis aleatòria (in vitro) i mitjançant la complementació d'una soca bacteriana deficient en l'activitat ACS van definir 3 classes de mutacions que afecten a l'expressió o a l'activitat de *LeACS2* (veure classes i exemple en la figura 33).

Les mutacions de la **Classe I** corresponen a fenotips que contenen de 0 a 5% de l'activitat de la proteïna ACS salvatge i amb el mateix nivell d'expressió proteica que en la varietat salvatge. Els mutants de **Classe II**. de 5 a 50% de l'activitat de la proteïna salvatge, sense canvi de nivell d'expressió proteica. Els mutants de **Classe III** no presentaven cap activitat detectada de la proteïna ACS, i sense expressió detectable de la proteïna.

Per tant, canvis en l'aminoàcid Alanina com en el cas del mutant d'arròs 398s4, provoquen canvis de Classe I i II en mutants de tomata depenent del aminoàcid de substitució. Passa quelcom semblant amb la mutació de l'individu 228s1 d'arròs que conté una mutació en una zona molt conservada en varies espècies.

Així doncs, la comparació entre l'efecte de petits canvis en la funció de *LeACS2* i els canvis d'aminoàcids en els mutants de *OsACS1*, així com els resultats en els programes bioinformàtics de predicció de canvis, tot apunta a que els mutants per a *OsACS1* d'aquest garbellat tenen la funció del gen alterada.

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

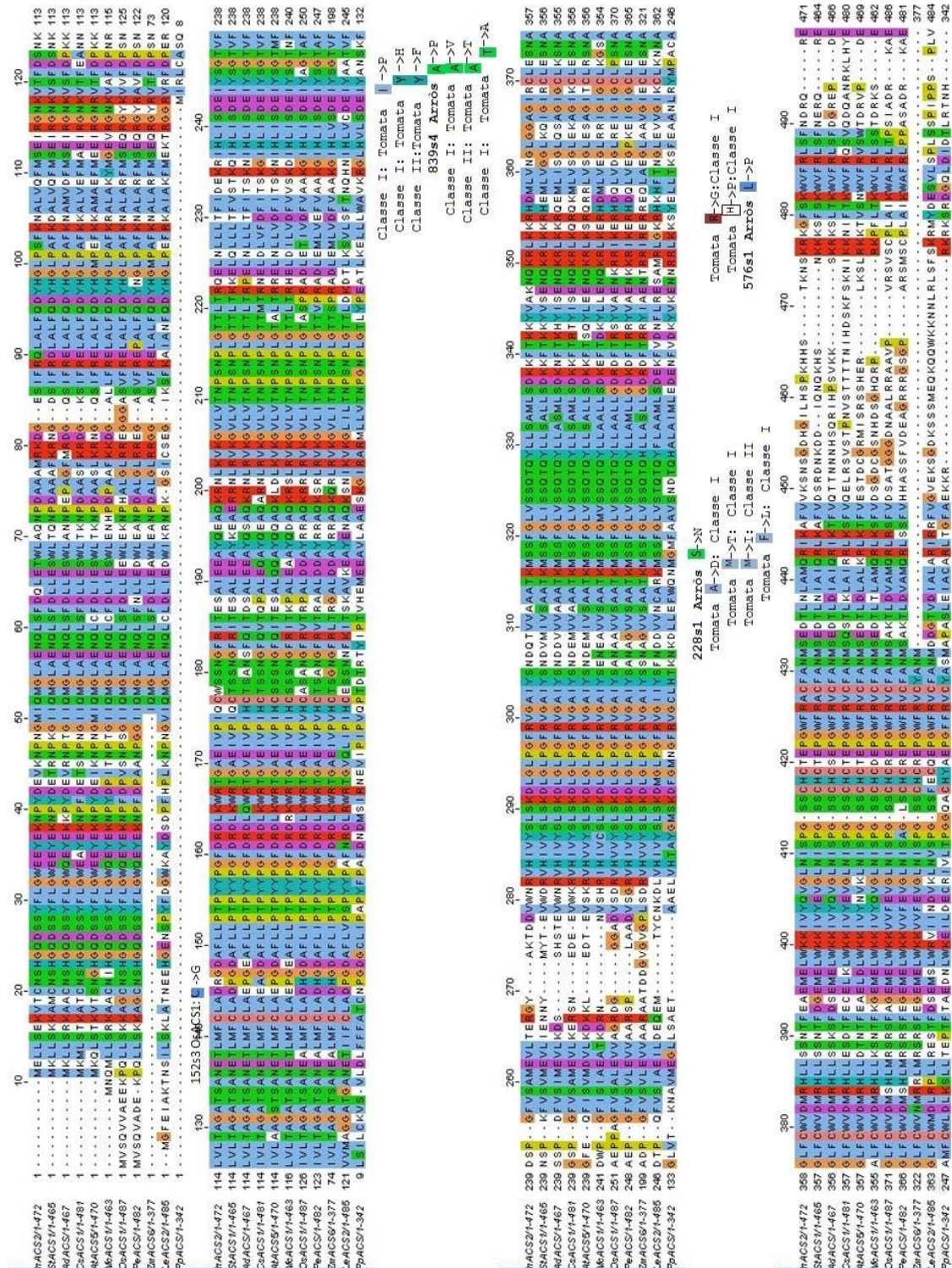


Figura 33: Alineament mitjançant el programa Clustal entre les seqüències d'aminoàcids de la proteïna ACS, en les espècies, *Oryza sativa* (rice), i *Lycopersicon esculentum* (tomata). S'han mostrat els alineaments i la posició dels diferents mutants. Per altra banda es mostren el grau d'alteració de la proteïna ACS en funció de la seva activitat en Lycopersicon (Tarun *et al.*, 1998). **Classe I:** de 0 a 5% de l'activitat de la proteïna ACS salvatge, sense canvi de nivell d'expressió proteica. **Classe II:** de 5 a 50% de l'activitat de la proteïna ACS salvatge, sense canvi de nivell d'expressió proteica. **Classe III:** Cap activitat detectada, sense expressió detectable de la proteïna.

5.2.4.- Anàlisi de la descendència

La planta 152s3 que portava la mutació en el splice acceptor site de l'exó 2 de OsACS1 tenia la capacitat de produir inflorescències i flors aparentment normals, però era estèril. La esterilitat afecta a una part de les plantes mutades en la generació M1 i no es necessàriament degut a la mutació introduïda. Per tant es va intentar rescatar el al·lel mutant mitjançant creuaments de les flors amb pol·len d'una línia salvatge, però no es va poder obtenir cap llavor.

La resta de mutants heterozigots van ser fenotípicament normals i van produir llavors, que es van sembrar per tal d'estudiar el fenotip potencial de les plantes homozigotes en la M2. Les plantes descendents es van analitzar mitjançant PCR i anàlisis per FCE per tal de determinar el seu genotip (apartat 7.5.11)

Mutant	Llavors (g) M1	Efecte mutació
228s1	3,9	S314N
576s1	12,3	L354P
152s3	ESTÈRIL	GT/AG
398s4	9	A246P

Taula 9: Quantitat de llavors obtingudes en la M1 per a cada mutant. Les plantes que foren identificades com a positives a través de l'anàlisi molecular, es van trasplantar en un test més gran i es van recollir les seves llavors. A sota hi ha una taula amb els grams de llavors recollides en la M1. Cada gram pot contenir fins a 30 llavors. Posteriorment es van elegir al voltant de 60 llavors per ser plantades i detectar la segregació. Aquestes llavors recollides en la primera ronda, van ser ressebrades un altre cop per poder observar el comportament de la descendència.

Per als descendents del mutant 228s1, es van identificar plantes heterozigotes amb una còpia mutant i una còpia salvatge del gen però no es va identificar cap individu amb els dos al·lells mutats (taula 10) No es va identificar plàntules que duguessin la mutació en la descendència dels mutants 398s4 i 576s1, cosa que indica que tenen efectes més forts que 228s1 sobre l'estructura de OsACS1. Es va comprovar les dues plantes mare i es confirmà de nou que aquestes plantes portaven aquestes mutacions. Això podria indicar que en arròs el gen ACS1 es essencial per al desenvolupament o per la funció de los gametòfits masculins i femenins, la fertilització o el desenvolupament del embrió de l'arròs.

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

Mutant	Descendència M2		
	AA	Aa	aa
228s1	14	15	-
576s1	18	-	-
398s4	17	-	-

Taula 10: Nombre de llavors en la descendència de la M2 pels diferents mutants ACS. Per tal de detectar la segregació en la M2, es va repetir l'anàlisi generant a la vegada un heterodúplex amb les mostres amb i sense un control d'arròs (veure apartat 7.5.11) .

5.3.-Discussió

En blat de moro, mutants obtinguts mitjançant mutagènesi d'inserció per transposons en la ACC sintasa han mostrat endarreriment en la senescència que els permetia incrementar el pes de les llavors. Concretament, mutacions en el gen *ZmACS2* però sobre tot *ZmACS6* produeixen menys etilè i mostren un retard en la degradació de la clorofil·la i del procés de senescència (Gallie *et al.*, 2004)²⁶². En aquests mutants s'observà una major capacitat de retenir clorofil·la de tipus a i b dins de la fulla. D'aquesta forma, les fulles d'aquests mutants conserven la seva capacitat fotosintètica i la seva capacitat de síntesi de sucres. En aquest estudi, es demostra que el *gen ZmACS6* te més força i redueix la síntesi d'etilè fins a un 90% , mentre que *ZmACS2* aporta una funcionalitat menor i redueix un 45% la síntesi de ACC però no la elimina. Les fulles continuen fent fotosíntesi i la RUBISCO segueix sintetitzant sucres, per tant les llavors poden tenir un contingut energètic superior, una característica altament desitjable. L'efecte de disminució de la senescència de la fulla era més evident en fulles velles que en fulles joves, bàsicament per què la senescència no es dona tan en fulles joves. Per altra banda també s'observà que hi havia un increment en la tolerància a la sequera en mutants per la ACC sintasa en blat de moro. L'equivalent del *gen ZmACS6* de blat de moro en arròs és el *gen OsACS1*.

En aquest capítol, hem descrit l'aïllament de 9 mutants en *OsACS1*. El mutant 152s3 conté dos mutacions, una substitució d'una glicina per una cisteïna que molt probablement no te cap efecte sobre la proteïna i una mutació que afecta al "splice acceptor site" de l'exó 2, pèrdua que provoca una alteració del patró de lectura just després dels 60 aa codificats per l'exó 1, fent que la resta de la proteïna sigui no funcional. La planta mutant era estèril, i no se ha pogut analitzar la mutació en la descendència.

Segons l'algoritme de predicció SIFT, les mutacions en 398s4 , 576s1 i 228s1 tenen efectes deleteris en la proteïna *OsACS1*. Els canvis observats estan localitzats en regions molt conservades de les proteïnes ACS i tenien una alta probabilitat de alterar el funcionament de

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

l'enzim. Tots tres eren fèrtils i produïen llavors. Però no es van trobar mutants homozigots en la descendència de l'individu 228s1, i tots els descendents dels mutants 398s4 i 576s1 eren homozigots per l'al·lel silvestre però no havien transmès la mutació.

El gen OsACS1 en arròs està implicat en la gametogènesi i la fecundació

Els resultats obtinguts indiquen que OsACS1 es un gen indispensable per la reproducció de la planta d'arròs. Hirano (Hirano *et al.*, 2008)²⁶³ ha suggerit que l'etilè és necessari durant certes fases de la formació del pol·len. En el seu estudi, en que va comparar l'expressió de diversos gens durant les diferents fases de formació dels gàmetes, va demostrar que el gen OsACS6 augmenta l'expressió durant la fase de formació de pol·len LBC (Late Bicelular) i l'estadi TC (Tricelular). De Martinis descriu la importància de l'etilè durant la formació de l'òvul a partir dels primers estadis de formació de la macròspora (De Martinis *et al.*, 1999)²⁶⁴.

Tan en *Nicotiana* (De Martinis *et al.*, 2002)²⁶⁵ com en *Zea mays*, Mol demostren com després de la fecundació hi ha una alliberació elevada d'etilè en el pistil que permet la penetració del tub pol·línic (Mol *et al.*, 2004)²⁶⁶. Aquest fenomen es produeix quan hi ha un contacte d'una espóra amb l'estigma i quan el tub pol·línic entra en contacte amb l'òvul.

Per altra banda s'ha descrit que l'etilè es necessari per acabar la formació de l'òvul. Tan en Orquídiades del gènere *Phalaenopsis* com en solanàcies *Nicotiana tabacum*, està descrit que l'òvul no s'acaba de formar fins que s'ha produït la fecundació (De Martinis *et al.*, 2002)²⁶⁵.

L'equip de Llop (Llop *et al.*, 2000)²⁶⁷ van veure que hi havia una expressió diferencial entre els diferents gens de ACS en *Lycopersicon esculentum*. Després de 3 hores que el pol·len entrés en contacte amb l'estigma es va començar a formar el tub pol·línic i va augmentar la formació d'etilè en l'estil. Analitzant el mRNA van veure que el gens LeACS1A s'havia activat en l'estil mentre que la resta de gens ACS o no s'expressaven o estaven a nivells basals (com LeACS2 i LeACS6).

Les plantes mare mutants per OsACS1 identificades en aquest treball eren totes heterozigotes i no demostraven cap altre defecte visible, però no produïen llavors homozigotes per la mutació. Per tant es dedueix que les mutacions en OsACS1 afecten a les cèl·lules produïdes per la micro i macrosporogènesi o al procés de fecundació. Així doncs totes les plantes mare mutants tenien la capacitat de produir llavors amb l'al·lel silvestre, per tant l'alteració no es produïa en cap cas en el teixits heterozigots de la planta mare, com es el estil,estigma així doncs l'alteració en la reproducció havia de ser en les cèl·lules reproductores.

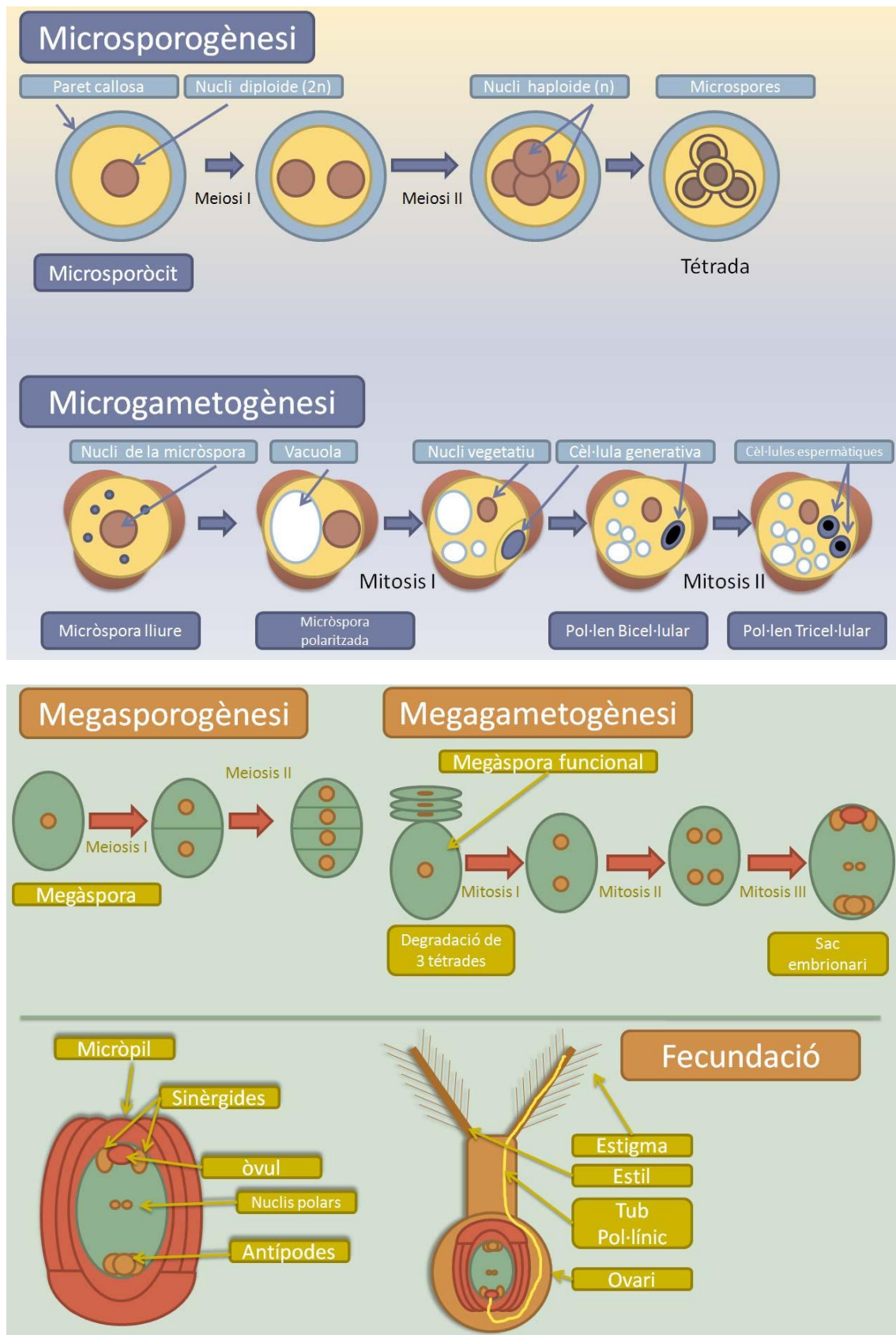


Figura 34: (Superior) Procés de formació del pol·len que inclou la microesporogènesi i la microgametogènesi. (Inferior) Procés de formació del sac embriogènic i l'òvul a partir d'una megàspora. Els diferents estadis de formació de l'òvul poden variar depenent de l'espècie. En el procés de fecundació el pol·len forma el tub pol·línic per tal d'unir els dos nuclis del pol·len amb l'òvul i les cèl·lules polars formant l'embrió i l'endosperma respectivament.

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

Durant la formació de gàmetes les cèl·lules reproductores amb l'al·lel silvestre tampoc tenien la capacitat de complementar el dèficit de OsACS1 en les seves cèl·lules reproductores germanes amb l'al·lel mutat (com en el cas de la tètrada del microsporangi). Per tant el seu paper sembla que és de tipus cèl·lula autònoma tot i que l'etilè es una molècula petita gasosa amb capacitat de difondre ràpidament en els teixits tot i que la distància entre les cèl·lules sigui mínima. Aquesta situació es podria donar durant les fases finals de la microsporogènesi, on es forma una capa protectora per impermeabilitzar el pol·len, i podria estar en consonància amb l'observació de Hirano que descriu que la expressió de OsACS6 augmenta en les últimes fases del desenvolupament del gra de pol·len. Per altra banda OsACS1 també es necessari pel desenvolupament del òvuls, per què en cas contrari, totes les plantes heterozigotes per la mutació en OsACS1 tindrien la capacitat de produir llavors heterozigots.

Un dels mutants obtinguts, 228s1 produïa llavors heterozigotes en la mateixa proporció que els homozigots silvestres. La mutació 228s1 podria representar un al·lel mutat mes dèbil i això podria indicar que una reducció de la producció de etilè no afecta en la mateixa mida a la producció de pol·len o òvuls.

De forma diferent a la situació de ZmACS6 en blat de moro, hem demostrat que el gen homòleg mes proper a l'espècie d'arròs resulta indispensable per a la reproducció de la planta.

5.4.-CONCLUSIÓ

Tot i el 86% d'homologia entre el gen ACS6 de *Zea mays* i el gen ACS1 d'*Oryza sativa*, la seva resposta davant la senescència és diferent entre les dues espècies. En *Zea mays*, les mutacions en el gen ACS6 van donar un fenotip de tipus stay-green en que la fulla i la planta en general es conservava verda i funcional mentre les plantes salvatges havien entrat en senescència. En canvi en arròs les mutacions en el gen homòleg al de *Zea mays* han conclòs que aquest gen és indispensable per la reproducció de la planta, ja que no només juga un paper important en la senescència, sinó que l'etilè endogen és necessari per la formació de les llavors i/o en la formació del gàmetes. Els resultats obtinguts demostren la gran importància que te el coneixement detallat dels patrons d'expressió de gens en famílies multigèniques per abordar els estudis de genètica reversa. No obstant actualment no existeixen estudis complets d'expressió gènica que cobreixin la totalitat de tipus cel·lulars i la seva relació amb les interaccions biòtiques i abiòtiques del seu entorn que es generen durant el desenvolupament, creixement, reproducció i mort, tot i que hi ha iniciatives per aconseguir-ho (Mercadé *et al.*, 2009)²⁶⁸

5.-Garbellat en arròs pel Gen Staygreen ACS

També il·lustra que no sempre es possible extrapolar la funció gènica només en base de la homologia entre gens, però que cal estudiar els patrons d'expressió i la possible interacció de diferents còpies gèniques i les redundàncies parcials que es poden produir en cada situació.

**Identificació de mutants de tipus Stay-green pel
Gen SGR en una varietat hispana d'Oryza sativa**

6.- Identificació de mutants pel Gen SGR en una varietat hispana d'*Oryza sativa*

6.1.- Introducció

La planta d'arròs (*Oryza sativa*) degut a la importància econòmica que té arreu del món fa que sigui una planta molt interessant per tal de buscar mutants que augmentin la producció de llavors. A més a més compleix els requisits per tal d'obtenir mutants utilitzant l'estratègia de la mutagènesi de call, al haver-hi protocols molt concrets sobre la formació i regeneració de call.

6.1.1.- La formació de les reserves de la llavor

La planta d'arròs necessita entre 5 i 6 mesos per tal de créixer vegetativament i reproduir-se formant les llavors. Una temperatura mínima mitja de 30-33°C/diaris i la reducció d'hores de llum per les varietats sensibles a fotoperíode són els factors necessaris per la floració, i una temperatura mitjana de 20-22°C es necessària per omplir les llavors. L'arròs produeix una inflorescència de tipus panícula que conté els grans d'arròs. Aquests grans són alimentats via directa a través de la seva fulla bandera, que és la fulla que acompanya a la inflorescència.

Les substàncies de reserva de la llavor estan formades majoritàriament per un 79% d'hidrats de carboni (midó del tipus amilosa i amilopectina), un 12% d'aigua, un 7,12% de proteïna, un 1,4% d'àcids grassos i un 1,3% de fibra (dades segons USDA).²⁶⁹ Els hidrats de carboni del gra d'arròs són formats dins les cèl·lules de la planta a partir de la ruta metabòlica de les pentoses en què es fixen dues molècules de diòxid de carboni ambiental utilitzant l'energia i el poder reductor que s'ha produït durant la fotosíntesi.

La fotosíntesi és el procés en què es crea poder reductor (NADPH) i energia (ATP) a partir de fotons captats per la molècula clorofil·la. La clorofil·la a la seva vegada està agrupada en complexos proteics (LHCP) i serveix per concentrar fotons i per excitar un electró que passarà a la cadena de transport dels fotosistemes, dins d'una estructura anomenada tilacoides (figura 35). A partir de l'excitació d'un fotó la planta genera energia en forma d'ATP i poder reductor en forma de NADPH durant la fase fotosintètica. Paral·lelament, l'acumulació d'aquests metabòlits i gràcies a la presència de CO₂, que entra a través dels estomes, s'activa el procés de fixació de Carboni, dut a terme per l'enzim RUBISCO (Ribulosa Bisfosfat Carboxilasa Oxigenasa) que generarà polisacàrids que serviran des de la fabricació d'estructures de suport

de la planta fins a la generació sucres de reserva que seran mobilitzats fins les llavors, per posar uns exemples.

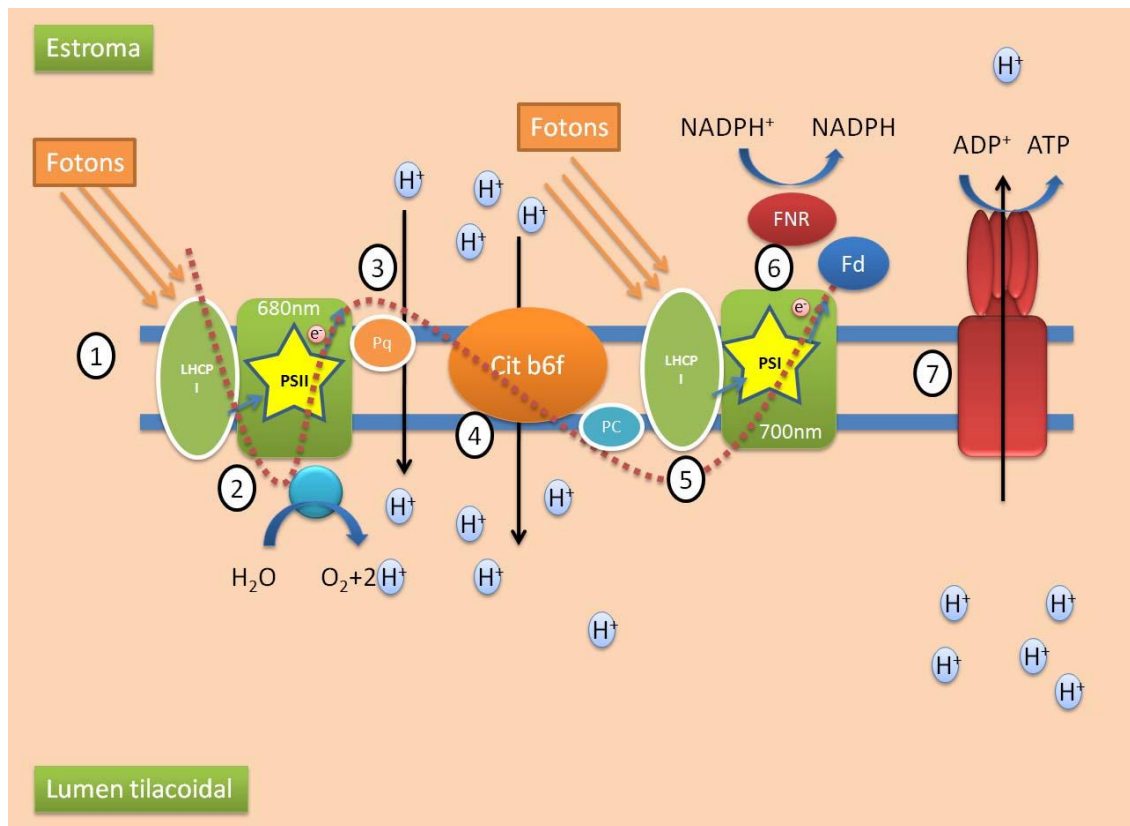


Figura 35 Procés de la fotosíntesis

LHCP: Ligth harvesting Complex Protein. **PSI i II:** Fotosistema I i II. **PQ:** Plastoquinona. **Cit b6f:** Citocrom b6f. **PC:**Plastocianina. **Fd:** Ferredoxina. **FNR:** Ferredoxona NADP+ Reductasa

1.-Els fotons exciten les clorofil·les (la majoria de tipus b) dels Complexos Antena. La fotosíntesis comença excitant el complex antena del Fotosistema II (PSII) que passen per resonància un electró excitat cap a una clorofil·la P680nm (roig proper). 2.-En aquest pas es genera O_2 i $2H^+$ mitjançant fotòlisis de l'aigua on un electró d'aquesta és l'acceptor de l'energia. 3.-L'electró arriba fins a una Plastoquinona que transporta un H^+ des de l'estroma fins al Lúmen tilacoïdal. 4.-L'electró continua fins al citocrom b6f que viatja per la membrana tilacoïdal fins a una plastocianina. En aquest pas es bomba un altre protó cap al Lúmen tilacoïdal. 5.-L'electró ha perdut energia, però el complex antena de la P700 (roig llunyà) recull energia que el passa a aquest. 6.-L'electró carregat arriba fins a una ferredoxina i a la seva vegada a una ferredoxina NADP+ Reductasa, que formarà NADPH. 7.- Utilitzant la diferència de potencial entre l'estroma i el lúmen, generada pels protons una ATPasa uneix un ADP+ i un P, per formar ATP. En vermell i discontinu, es representa el pas de l'electró energètic per tot el cicle.

Aquesta figura representa la fotosíntesi acíclica on s'acaba formant ATP i NADPH, però hi ha la possibilitat de generar energia sense poder reductor (NADPH) en la fotosíntesi cíclica, on només participi el fotosistema I. Els electrons que arriben a la Ferredoxina, passen al complex b6f generant gradient de protons, que seran utilitzats per la ATPsintetasa (Alberts *et al.*, 1994)²⁷⁰.

Tant el procés de la fotosíntesi com el procés de la fixació de carboni van lligats i son regulats per la llum, (al generar suficient ATP com NADPH), per la disponibilitat de CO₂ i pels precursors dels sucres com son la ribulosa, i el gliceraldehid 3 fosfat.

Segons Cha , la productivitat d'una planta ve determinada per l'assimilació neta entre la quantitat de recursos incorporada a través de la fotosíntesis menys la dissipada per creixement i manteniment (Cha *et al.*, 2002)²⁷¹

Per altra banda, segons Mae, la fixació de carboni per part de la proteïna RUBISCO en arròs (una planta d'estratègia C4) és un 30-40% menor que espècies tipus C3.

Les plantes que adopten una estratègia de fixació de carboni de tipus C4 per tal d'evitar la pèrdua energètica per fotorespiració en ambients amb baixes concentracions de CO₂, separen la captació i la fixació de carboni en dos compartiments. En les cèl·lules del mesòfil es produirà la captació de CO₂ (fosfoenolpiruvat a oxalacetat i a malat), i la fotosíntesi, però la fixació del carboni per la via de les pentoses, es produirà en les cèl·lules de la baina que és on hi ha l'enzim RUBISCO. Mitjançant una bomba de malat-piruvat, el malat entra en les cèl·lules de la baina i d'allí passa a piruvat alliberant una molècula de CO₂ que entrarà en la ruta metabòlica de les pentoses.

Així doncs l'arròs necessitarà més temps en fabricar hidrats de carboni de reserva per la llavor (Mae 1997)²⁷², i per aquest motiu és desitjable, que la planta segueixi més temps alimentant a la llavor.

6.1.2.- La implicació de la senescència en la mobilització de reserves a la llavor

Abans de la fase de formació de les llavors la majoria dels cereals acumulen carbohidrats de reserva en diferents zones de la planta mobilitzant-se via floemàtica. Aquests hidrats de carboni son sintetitzats en les fulles a partir de la fixació de CO₂ a través del cicle de les pentoses. Durant aquest procés son utilitzats els productes que s'han format durant la fotosíntesi, com el poder reductor en forma de NADPH i l'energia en forma de ATP. A través del floema els composts de carboni sintetitzats arriben per tota la planta fins la fulla bandera que serà la que alimenti a les llavors en formació (Scofield *et al.*, 2007)²⁷³ El sistema via floemàtica és un tipus de transport actiu, via apoplàstica que requereix transportadors actius per facilitar el moviment entre cèl·lules

La fulla bandera, no obstant, produeix durant el període de formació i maduració del fruit, del 60-100% del contingut de carboni que es destina a nutrients de reserva (Murchie *et al.*, 2002)²⁷⁴.

Per altra banda, un cop la llavor estigui del tot formada, un 70-90% del contingut de nitrogen que serà transportat a la llavor, provindrà de les fulles, i la majoria d'aquest haurà estat formant part de les proteïnes i altres molècules com la clorofil·la. Per tant, la forma d'utilitzar aquest nitrogen és mitjançant la degradació de les estructures fotosintètiques en un procés de mort programada anomenat la senescència.

La senescència és aquest procés fisiològic en que la planta reorganitza els nutrients d'estructures no funcionals cap a altres estructures on siguin necessàries. En algunes plantes, la senescència de les fulles és un procés natural i necessari per tal d'acabar d'omplir de nutrients les llavors en les plantes anuals, o per fabricar noves fulles en la següent estació en les plantes de tipus caducifoli o fins i tot per tal de detoxificar parts de la planta. Aquests processos inclouen la mort cel·lular programada i localitzada, que comença per una reorganització cel·lular en la que progressivament es van produint canvis metabòlics.

Aquests canvis metabòlics consisteixen en una hidròlisis i degradació de macromolècules, així com una destrucció d'estructures com els tilacoides, derivant els nutrients essencials cap a les fulles joves.

D'aquesta forma, en els estadis finals de maduració de les llavors, la planta ha de fer un balanç entre la fixació de carboni per part de la RUBISCO i l'activació de la senescència per omplir la llavor amb nitrogen, abans que les condicions climàtiques i ambientals siguin massa desfavorables i acabin matant a la planta. Quan arriba aquest moment s'activen els processos de senescència a través de l'actuació de les hormones de senescència tipus ABA i a la vegada inhibides per les citoquinines, que son les responsables d'estimular la formació de clorofil·la en fulles joves (Jiang *et al.*, 2007)²⁷⁵.

Algunes varietats de plantes retarden el inici de la senescència, o retarden el procés de la senescència conservant l'aparell fotosintètic el màxim de temps possible abans de morir. Al mantenir funcional l'aparell fotosintètic durant més temps, aquestes plantes produeixen més poder reductor que el passa a la RUBISCO, generant més hidrats de carboni, i a la seva vegada passant-los al gra (Thomas and Howarth 2000)³⁵

6.1.3.-Els diversos fenotips d' stay-green

Les varietats de plantes amb retards en el procés de senescència es van anomenar Stay-green van ser objecte d'estudi i es van classificar en diferents grups. En el grup de Tipus A, la senescència comença tard, però aleshores segueix el procés amb normalitat, obtenint una

correlació ajustada entre la taxa fotosintètica neta i la fixació de carboni. El grup de tipus B, té una senescència que comença amb aparent normalitat i segueix el patró programat com la resta, però el desenvolupament transcorre de forma més lenta. El comportament del grup de tipus C, aconsegueix retenir més o menys a la clorofil·la, però mesures fisiològiques de la seva capacitat fotosintètica revelen, que l'efecte és més aviat cosmètic, ja que la planta es manté verda, però no hi ha major fixació de carboni. El grup de tipus D, són aquelles plantes que després d'un tractament per congelació, assecat o bullit es mantenen verdes. Òbviament, aquestes plantes perden totalment la capacitat de fixació de carboni. Les plantes del grup de tipus E, contenen fulles que són més verdes en la fase tardana de la senescència, que les fulles de genotip inicial. Una explicació seria que les fulles contenen una proporció més elevada de color verd (clorofil·la), però segueixen el mateix patró de senescència que la resta, és a dir, disminució de l'activitat fotosintètica i de fixació de carboni. Així doncs la classificació incloïa 5 grups de mutants, en què el A i B tenien un interès al poder augmentar la producció i els C, D i E no.

6.1.4.-El gen SGR i la regulació dels processos de senescència

Durant la senescència s'activen els mecanismes que permeten la degradació de la clorofil·la i generalment comença mitjançant una clorofil·lase que degrada a la **clorofil·la a** donant lloc a una **clorofil·lida a** patint una defitilació. Perdent un Mg²⁺ passa a **feoforbida a** (Pheide a) (figura 36) A partir d'aquí l'enzim Pao (feoforbida a oxigenasa), catabolitz la **feoforbida a** cap a un compost vermell de la clorofil·la anomenat Red Chlorophyll Catabolic (**RCC**). La **clorofil·la b** passa primer a **clorofil·la a**, mitjançant una clorofil·la b reductasa. A partir d'aquí una RCCR (Red Chlorophyll Catabolic Reductase) acaba d'eliminar l'anell de porfirina i la fulla perd el color verd característic (Sato *et al.*, 2007)²⁷⁶ (Aubry *et al.*, 2008)²⁷⁷.

Una planta que endarrereix la senescència, té una major capacitat d'omplir el gra, per tant hi ha un augment substancial de producció. S'han trobat alguns genotips del gènere *Sorghum* que presenten aquesta resposta diferent davant la senescència. No només es mantenen verds, sinó que les llavors contenen un contingut de carbohidrats en tija i en llavor, major que la resta (Mcbee *et al.*, 1983)²⁷⁸. Per altra banda, s'han trobat altres efectes beneficiosos per la planta en els fenotips Stay-green, com són una major resistència a l'estrès (Park *et al.*, 2007)²⁷⁹.

Tot i així, el fenotip stay-green engloba a un grup molt gran de mutants, amb respostes similars, però amb un origen genotípic divers.

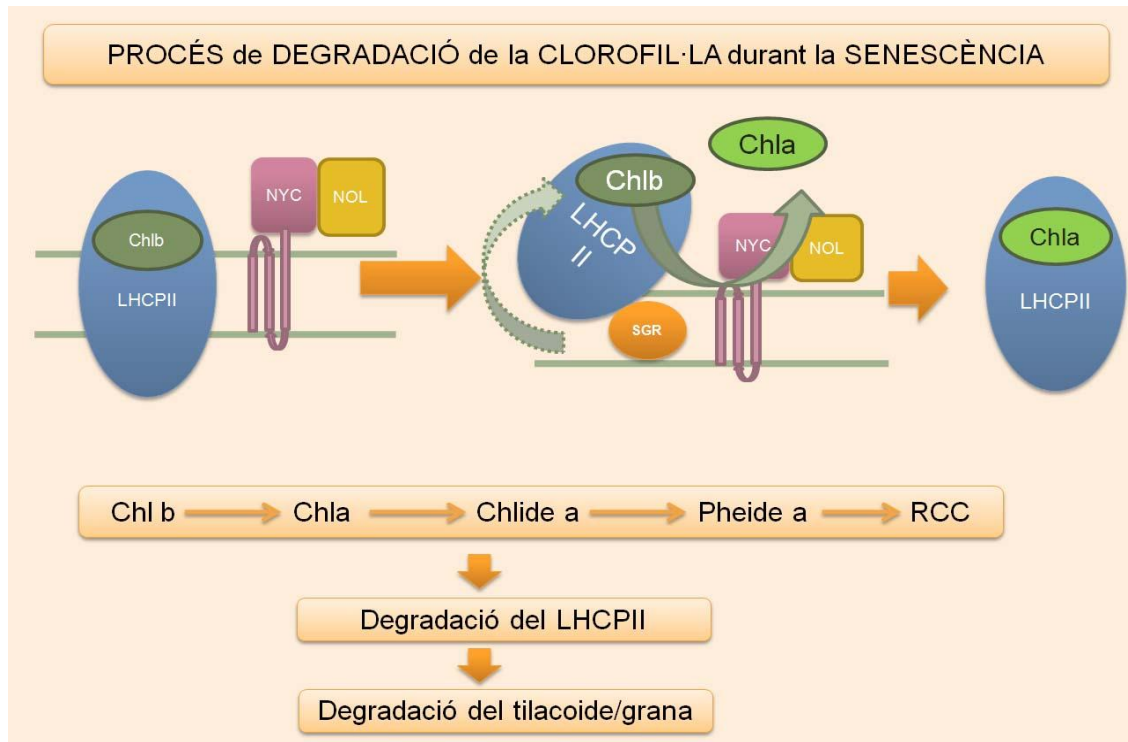


Figura 36. Esquema de la via de degradació de clorofil·la durant la senescència

Durant el procés de senescència la presència de la proteïna *SGR*, separa el complex antena de la membrana del til·lacoide. Les clorofil·les del complex queden exposades a l'atac de *NYC/NOL*, que degrada la clorofil·la b reduint-la a clorofil·la a. A partir d'aquí, altres proteïnes estaran encarregades de seguir degradant a la clorofil·la i a la resta de components del tilacoide i del grana.

Chlb: Clorofil·la tipus B. **Chla:** Clorofil·la tipus A. **Chlide a:** Clorofil·lida a.

Pheide a: feoforbida a. **RCC:** Catabolisme de clorofil·les vermelles (Red chlorophyll catabolism).

LHCPII: Light Harvesting Chlorophyll Protein II. **NYC:** Non yellow coloring dehidrogenasa/reductasa.

NOL: NyC-like, proteïna semblant a NYC1. **SGR:** gen Stay green.

Esquema a partir de Sato *et al.*, 2009 i Park *et al.*, 2007

Els primers estudis sobre el gen *SGR* es remunten als principis de la genètica on Mendel (1866)⁴⁹ va estudiar la transmissió genètica d'un caràcter en concret, el color verd o groc de les baines del pèsol. Després de 141 anys, el grup de Amstead van trobar que el fenotip era causat per una mutació en el gen *SGR*, utilitzant una aproximació basada en la comparació dels gens homòlegs entre 3 espècies (*Festuca pratensis*, *Arabidopsis thaliana* i *Pisum sativum*) (Amstead *et al.*, 2007)²⁸⁰. El fenotip *SGR* estava relacionat directament amb la degradació de la clorofil·la durant la senescència, i les fulles de plantes *sgr* mostren una senescència retardada i romanen verdes durant més temps, sota condicions d'estrès hídric o de calor. L'aplicació pràctica d'aquest gen va fer que molts grups s'interessessin per trobar un individu mutant en l'espècie *Oryza sativa* var japonica (Jiang *et al.*, 2007)²⁷⁵ (Kusaba *et al.*, 2007)²⁸¹, (Park *et al.*, 2007)²⁷⁹ (Sato *et al.*, 2007)²⁷⁶ (Sato *et al.*, 2009)²⁸².

El gen *SGR* codifica per una proteïna de 274 aminoàcids amb senyal de localització cloroplàstica però sense domini o motiu funcional conegut. No obstant, la seqüència de la proteïna es altament conservada en monocotiledònies i en dicotiledònies, així com en gimnospermes (Aubry *et al.*, 2008)²⁷⁷ L'expressió de *SGR* s'indueix durant l'inici de la senescència, tot i que el funcionament de la proteïna no esta gens clar. Per altra banda s'ha demostrat que interactua directament amb el LHCP I (in vitro) i LHCP II (in vitro i in vivo) i podria estar involucrat en el seu desassemblament. *SGR* està també relacionat d'alguna forma amb l'estabilitat del fotosistema II (Figura 35), ja que separa el LHCP (figura 36) de la membrana del tilacoide (Park *et al.*, 2007). L'equip de Sato va demostrar que el gen *SGR* no te activitat catabòlica en el LHCP (Sato *et al.*, 2009)²⁸²

NYC i *NOL* son dos proteïnes homologues de tipus SDR (short-chain dehydrogenase reductase) que formen part d'un complex amb activitat Clorofil·la b reductasa (Kusaba M. *Et al.*, 2007)²⁸¹ Sato ha suggerit que *SGR* controla l'activitat de les proteïnes *NYC* (non yellow coloring) i *NOL* (*NYC* one like), sense aclarir no obstant com funcionaria aquesta regulació. La transcripció de *NYC* i *NOL* no es veu alterada en els mutants *sgr*, i per tant la regulació no es produeix a nivell de l'expressió gènica (Sato *et al.*, 2007)²⁷⁶.

El nivell de proteïna *NOL* no varia ni entre els mutant *nyc* i *sgr* ni en la planta silvestre, per tant la mutació *sgr* no afecta a la traducció o la estabilitat de *NOL* (Sato 2009)²⁸² Els nivells de *NYC* tampoc es veuen afectats en mutants *nol*, *sgr* i la planta silvestre, per aquest motiu una mutació en *sgr* no afectarà tampoc en la traducció i la estabilitat de *NYC* (Morita *et al.*, 2009)²⁸³ Pot ser que la hipòtesis més probable sigui que la *SGR*, interactua amb LHCP, fent accessible la clorofilla b als enzims *NYC* i *NOL* (Figura 36)

S'ha trobat també, que *SGR* davant l'estímul de canvis de fotoperíode, promig de temperatura diürna/nocturna (Hwei-Hwang *et al.*, 1983)²⁸⁴, o processos d'estrès lumínic, es pot activar la senescència, bàsicament com a resposta un estrès. A partir d'aquí els processos de desestabilització dels fotosistemes i de degradació de la clorofil·la actuen d'una forma ràpida i sense parar.

6.1.5-Objectius

Segons la informació disponible el gen SGR intervé en desestabilitzar el complex antena fent accessible la clorofil·la a les proteïnes NYC/NOL que la degraden. L'objectiu principal d'aquest projecte serà trobar un mutant pel gen SGR, que retardi la degradació de la clorofil·la . Després d'establir una població d'arròs mutant a partir de mutagènesis química de call es garbellarà la població per tal de localitzar l'individu/s mutant/s utilitzant la tècnica de detecció de desaparellaments per endonucleases a partir d'un extracte vegetal. Un cop localitzat un mutant, es buscarà la descendència de tipus homozigot i es comprovarà la seva eficàcia a nivell fenotípic, tenint en compte la productivitat i el rendiment.

Així doncs els esforços en aquest garbellat estaran centrats en buscar un o varis mutants que evitin la degradació de la clorofil·la i aconseguir incrementar el pes de la llavor.

6.2.-Resultats

6.2.1.-Determinació de l'estructura i composició del gen SGR.

En arròs el gen per a Stay-Green (SGR) té el codi Os09g0532000, anomenat per NCBI com NC_008402.1, format per tres exons. El cDNA format pels 3 exons és de 825 parells de bases, que es tradueixen en una proteïna de 274 aa. En aquest garbellat s'ha analitzat els dos primers exons generant un fragment de 927 parells de bases, ja que inclou regió intrònica.

Els primers dissenyats i les condicions de PCR per amplificar el fragment del gen SGR estan descrites en el capítol de materials i mètodes (apartat 7.5.6)

6.2.2.-Garbellat molecular: localització i identificació dels mutants

El garbellat va consistir en agrupar en pools el DNA de 4 individus i localitzar mutacions emprant la tècnica de l'endonucleasa de l'extracte de fonoll tal com està explicat en l'apartat 7.5.3- 7.5.10

6.2.2.1.- Garbellat molecular en pools i localització de l'individu mutant

Es van garbellar 5000 plantes en pools formats per grups de 4 plantes tal i com es detalla en l'apartat 7.4 del capítol de material i mètodes.

Com a resultats per aquest garbellat es van trobar 2 mutacions, representades en la següent .

Candidat	Canvi de base	Aminoàcid	Abreviat	Resultat mutació
854s1	G->A	INTRÓ		SILENCIOSA
389s2	G->A	VAL 127 MET	V127M	EFFECTIVA*

Taula 11: Mutacions trobades en el garbellat molecular per al fen SGR.

*Efectivitat teòrica segons SIFT

A partir de la informació obtinguda per la digestió de l'heterodúplex, es van detectar talls en els gels d'acrilamida, tal i com es pot apreciar en la figura de sota (Figura 37) marcat per fletxes vermelles). Un cop trobats els talls, es va seqüenciar el fragment per tal de poder confirmar la mutació de la mostra.

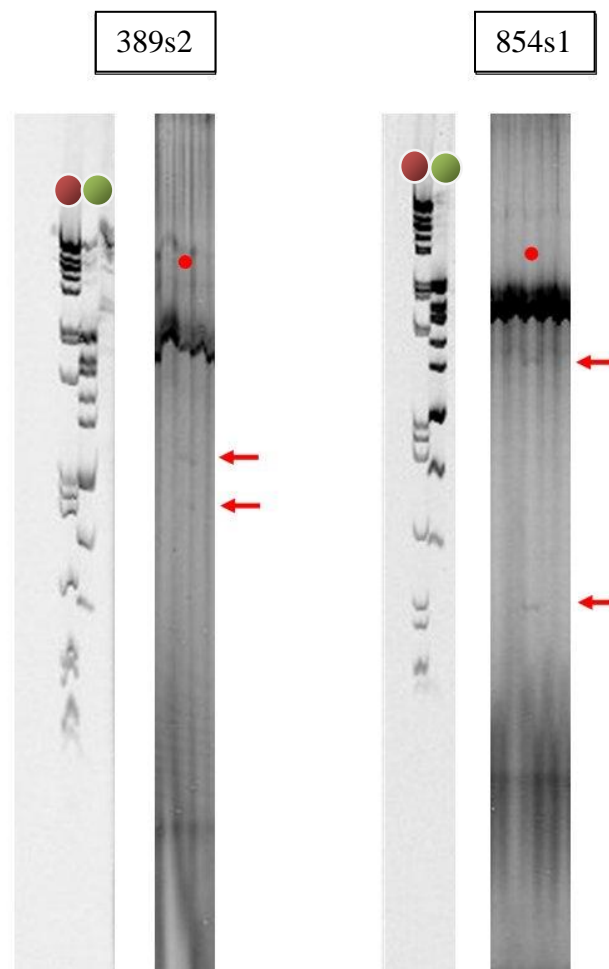
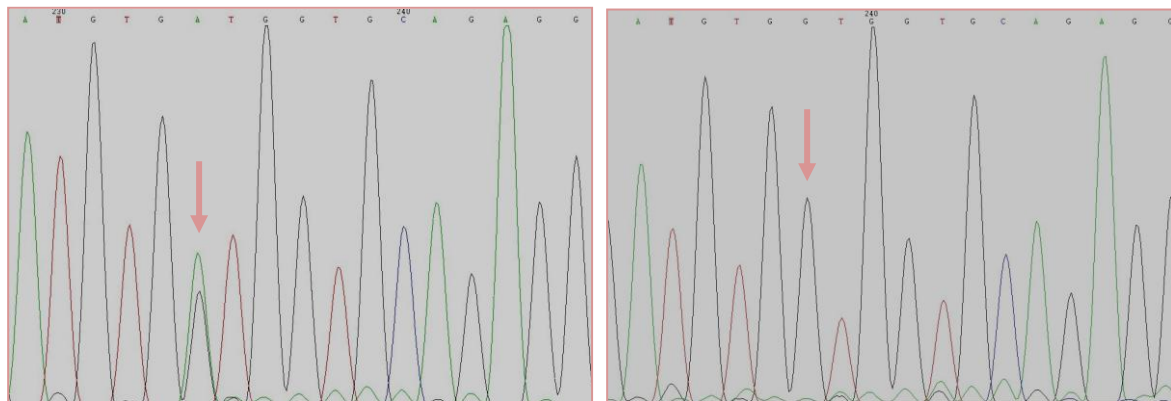


Figura 37: Gels d'acrilamida de la digestió d'heterodúplex corresponents a candidats mutants, 485s1 i 893s2.

- λ Pst: 11501, (5077, 4749, 4507), 2556, 2443, 2140, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 247
- 100bp: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400 parells de bases

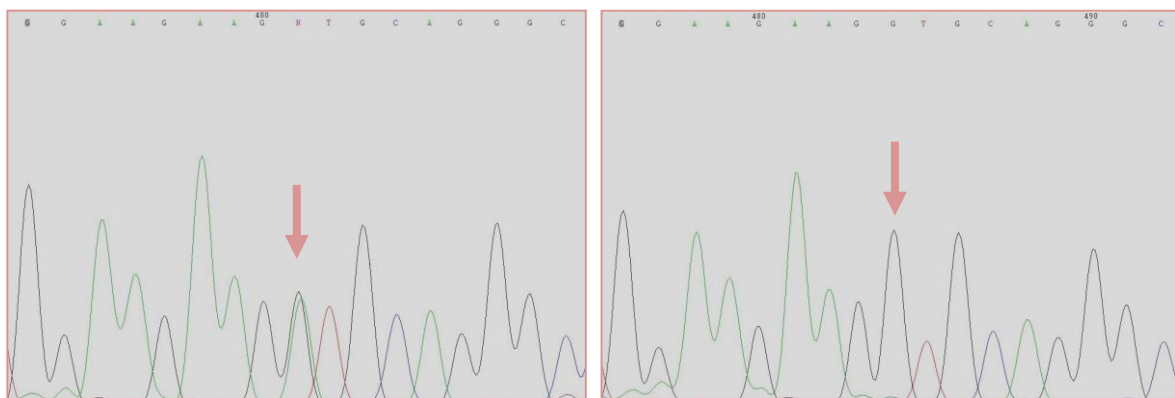
6.2.2.2.-Confirmació del candidat individual per seqüenciació

Per la seqüenciació es va utilitzar el mètode SANGER, comparant les mostres control (la varietat sense mutagenitzar) i la mostra mutant en la mateixa posició i així poder localitzar la mutació i estudiar el seu efecte.



(854s1 SGR Forward)

(Control SGR Forward)



(398s2 SGR Forward)

(Control SGR Forward)

6.2.2.3.-Predicció estructural

Per decidir l'efecte de la mutació es va emprar la informació de les eines bioinformàtiques del programa SIFT (Kumar *et al.*, 2009)²⁸⁵ i el programa d'alineament de seqüències CLUSTAL W (Larkin *et al.*, 2007)²⁸⁶. El programa CLUSTAL simplement fa un alineament per similitud entre seqüències d'aminoàcids, sense fer cap tipus de predicció, però a nosaltres ens serà útil per trobar el percentatge de conservació de "clusters" funcionals. El programa SIFT utilitza un algoritme que relaciona les seqüències consens entre múltiples alineaments per tal de predir l'estructura secundària, però tal i com conclouen ells, és una eina de predicció orientativa. Per

tal de conèixer una mica més com es relacionen els diferents residus entre ells es necessari un estudi més complex.

A partir de la informació disponible en les base de dades del NCBI sobre la seqüència d'aminoàcids de SGR, es calculà com la mutació va afectar a l'estructura secundària utilitzant el programa de predicció SIFT^{287 288 289}. El programa detectà que hi ha una incompatibilitat amb la Valina en la posició 127, amb una tolerància del 2% per la metionina. Això vol dir que segons el programa, la mutació ha caigut en una regió lleugerament conservada i que el canvi de aminoàcid pot alterar el funcionament de la proteïna.

6.2.3.- Anàlisis genotípic i fenotípic de la descendència

6.2.3.1.- Anàlisis genotípic de la descendència i amplificació de llavor.

Totes les plantes del garbellat van créixer dins d'un hivernacle amb calefacció i amb llums de sodi durant la temporada final de l'hivern i l'inici de la primavera, amb l'objectiu d'obtenir llavors per la campanya d'estiu en camp.

De les llavors produïdes per 398s2 M1, es van sembrar 16 llavors i dues setmanes després de la germinació de les plantes es va recollir mostra per tal de poder detectar la segregació seguint el protocol de l'apartat 7.5.11 inclòs en el capítol de material i mètodes.

Tal i com es pot observar en la Figura 38 apareixen les bandes esperades en el gel d'acrilamida corresponents als heterozigots formats entre el control i el mutant que conté el canvi d'aminoàcid Metionina per valina en la posició 127. En la taula 12 es resumeix la proporció de cada dotació cromosòmica de la descendència.

Segregació a la M2		
AA	Aa	aa
4	7	5

Taula 12: Resum de la segregació de la descendència del mutant 398s2

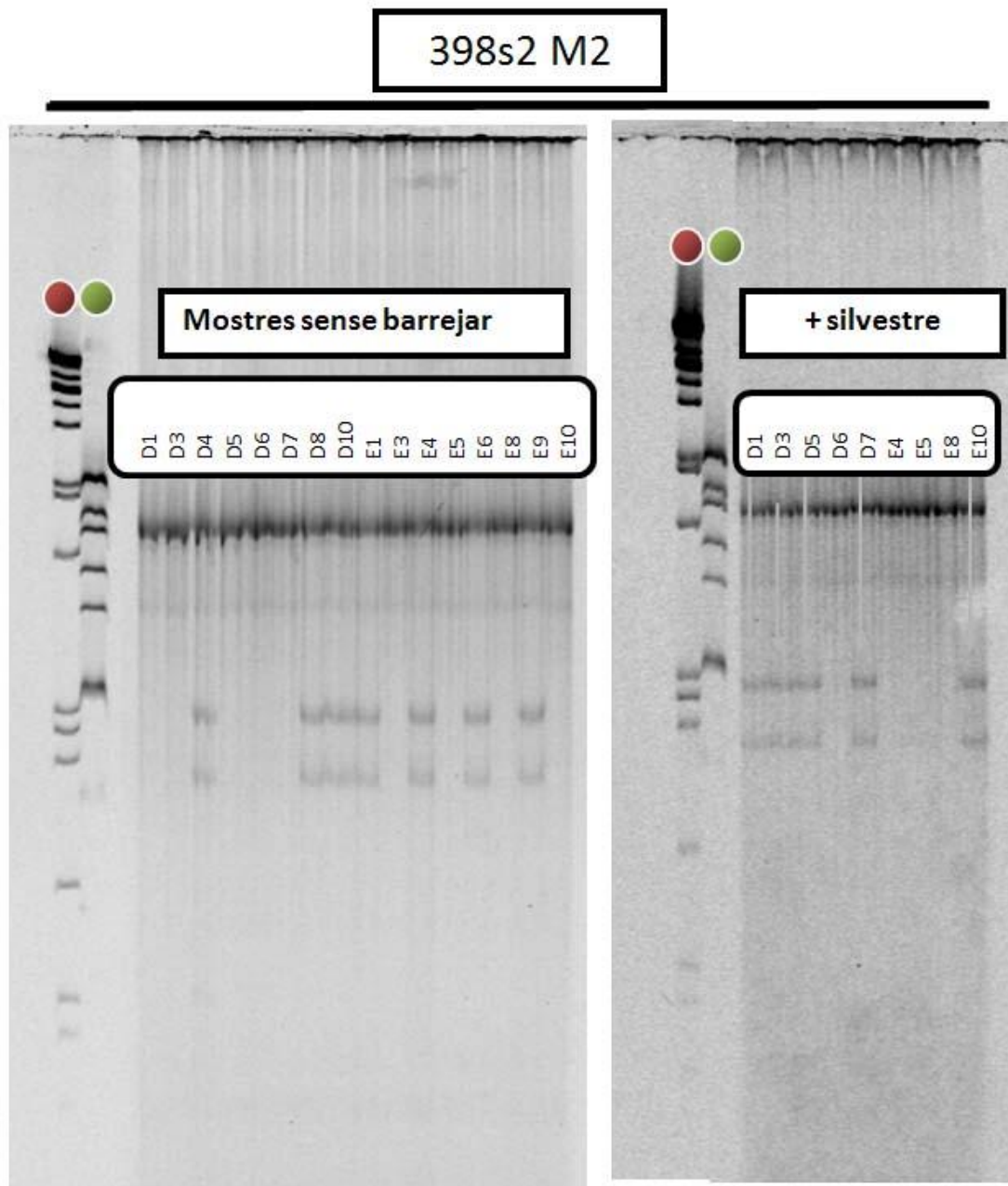


Figura 38 : Detecció de la dotació cromosòmica de la mutació VAL 127 MET pel gen SGR. Gel d'acrilamida de les mostres de la M2 de 398s2. Les mostres en blanc corresponen als heterozigots per la mutació, i les mostres en verd son els homozigots mutants

- λ Pst: 11501, (5077, 4749, 4507), 2556, 2443, 2140, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 247
- 100bp: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400 parells de bases

Les plantes sembrades en la temporada d'hivern no van demostrar cap fenotip obvi, però cal tenir en compte que el fenotip d'arròs pot ser molt diferent quan creix en hivernacle durant

l'hivern o l'estiu, o quan es creix en camp. Es van trobar 5 individus en la descendència de M2 que eren homozigots per la mutació. Les soques trobades foren la D1, D3, D5, D7 i E10.

6.2.3.2.- Anàlisi fenotípic de la població M3 de la descendència de 398s2

A partir de les llavors descendents de les plantes homozigotes del mutant progenitor 398s2 per la mutació Metionina 127, es van sembrar llavors per tal de testar en assaigs de camp.



Figura 39: Plantes 398s2SP D5 (centre) i Plantes Arròs control (esquerra i dreta)



Figura 40 : Plantes 398s2SP D7 (centre) i Plantes Arròs control (esquerra i dreta)

Per tal d'observar l'efecte entre les plantes control i les mutants, es van sembrar les plantes de forma intercalada tal i com es pot observar en la Figura 39 i Figura 40.

Durant l'assaig de camp de la població M3 del mutant 398s2, es van observar que les línees D5 i D7 (Figura 39 i Figura 40), presentaven fulles bandera més erectes i més amples comparades amb els controls junt amb un augment de biomassa.

6.3.-Discussió

En el capítol previ, es va descriure com la estratègia d'aconseguir mutants en arròs amb una senescència endarrerida tipus staygreen mitjançant la mutagènesi del l'homòleg més semblant al gen ACS6 de *Zea mays*. Els mutants en el gen OsACS1, eren inservibles ja que a diferència de ZmACS6, OsACS1 es indispensable per la gametogènesi en l'arròs.

En aquest capítol es va enfocar l'esforç a l'obtenció de mutants de un dels gens "downstream" de ACS clau en el procés de la degradació de la clorofil·la i la senescència; el gen Staygreen (SGR). Mutacions en SGR en *Arabidopsis* i en arròs generen plantes amb endarreriment en la senescència, i està descrit que mutacions en SGR podrien ajudar a la planta a augmentar la seva resistència/tolerància a l'estrès abiòtic (Cha *et al.*, 2002)²⁷¹

Els mutants sgr d'arròs descrits en la literatura es van identificar en les varietats asiàtiques *Oryza sativa* cv. Huazhiwu i en *Oryza sativa* japonica cv, Hwacheong-wx, i el gen es va clonar per primera vegada en per l'equip de Jiang (Jiang *et al.* 2007)²⁷⁵ i Park (Park *et al.*, 2007)²⁷⁹ i tot i que el seu mode d'acció no es del tot clar, SGR està implicat en el procés de degradació de la clorofil·la.

La producció del arròs està molt lligada a l'ús de varietats ben adaptades al seu entorn. Per obtenir mutants sgr en varietats autòctones d'Espanya, existeixen dos aproximacions: introduir la característica desitjada mitjançant creuaments i retrocreuaments o generar noves mutacions mitjançant la mutagènesi. En aquest treball, hem seguit la última aproximació i hem aconseguit mutants de sgr en una varietat d'arròs autòctona.

En el camp els mutants sgr obtingut presentaven fulles bandera més erectes i més amples, i un augment de biomassa en comparació amb els controls. La mida, llargada i angle de la fulla bandera és una de les característiques més desitjades de l'ideotip de planta d'arròs, lligada a una major producció (Donald 1968)²⁹⁰ Una fulla bandera erecta, ampla i llarga permet l'entrada de llum a les fulles inferiors de la planta augmentant la taxa fotosintètica que és tradueix en un augment de síntesi de sucres (Duncan 1971)²⁹¹ (Sakamoto *et al.*, 2006)²⁹² Per altra banda, altres estudis sobre la fulla bandera han demostrat que mantenir erecta la fulla

bandera durant la senescència repercuteix en un augment de la producció (Zhenying Shi *et al.*, 2007)²⁹³

6.4.-Conclusió

Els mutants sgr obtingudes son viables i la primera avaluació en camp ha estat positiva, ja que les plantes exhibeixen canvis fenotípics que estan descrits com a positiu per la producció. Futurs estudis de camp mes grans permetran comparar la productivitat (el pes de llavors per hectàrea) i el rendiment (el pes de llavors obtingut després de tots els tractaments) de les plantes controls i el nostre mutant sgr.

Materials i mètodes

7.-Materials i mètodes

7.1. Recull de Preparacions

Medi 1: YPD Agar placa: Extracte de llevat, Peptona, Dextrosa i Agar

- 10g d'Extracte de llevat (Pronadisa)
- 20g Peptona (Pronadisa)
- 20g Agar Bacteriològic Europeu (Pronadisa)
- 900 ml Aigua

Autoclavar i posteriorment afegir abans de repartir les plaques de petri (90x14mm Sterillin), un 2% de Glucosa 20% (Sigma). Es dissolen 20gr. de Glucosa en 100 ml d'aigua i s'esterilitza mitjançant un filtre (Millipore). Remenar bé i repartir al voltant de 25 ml a cada placa.

Medi 2: YPD líquid: Extracte de llevat, Peptona, Dextrosa i Agar

- 10g d'Extracte de llevat (Pronadisa)
- 20g Peptona (Pronadisa)
- 900 ml Aigua

Autoclavar i posteriorment afegir abans de repartir les plaques, un 2% de Glucosa 20% (Sigma). Es dissolen 20gr. de Glucosa en 100 ml d'aigua i s'esterilitza mitjançant un filtre (Millipore). Remenar bé. Enrasem fins a 1000ml.

Medi 3: OryCIM Calli induction Medium

- 3,9 gr N6 Sals (Duchefa)
- 30gr Sacarosa (Duchefa)
- 500 mg Bacto Casaminoàcids (BD)
- 1g Prolina (Duchefa)
- 125 mg Àcid Ascòrbic (Duchefa)
- 125 mg Àcid Cítric (Duchefa)
- 500 mg MES (Duchefa)
- 2,4-D (2mg/L) (Duchefa)
- 4,5g Gelrite (Duchefa)
- Volum final de 1000ml i pH de 5,8

Autoclavar i repartir 25 ml en plaques de petri (90x14mm Sterillin).

Medi 4: YNB (medi mínim per llevat) 10x

- 33,5g YNB-
- 500 ml H₂O

Filtrar per millipore (0,22 µm porus)

Medi 5: L-Metionina (15mg/ml)

- 1,5g. L-metionina
- 100ml H₂O
- Filtrar per millipore (0,22 µm porus)
- Guardar a T°C ambient i a la foscor

Medi 6: L-Histidina (20mg/ml)

- 2g. L-Histidina
- 100ml H₂O
- Guardar a 4°C i a la foscor

7.-Materials i mètodes

Medi 7: L-Leucina (10mg/ml)

1g. L-Leucina
100ml H₂O
Guardar a T°C ambient i a la foscor

Medi 8: Uracil (2mg/ml)

200mg Uracil
100ml NaH CO₃ (marca)
Guardar a T°C ambient i a la foscor

Medi 9: L-triptofan (2 mg/ml)

200mg. L-triptòfan
80ml H₂O
2,4 ml KOH 4M
Enrasar a 100ml
Guardar a T°C ambient i a la foscor

Medi 10: Adenina hemisulfat (4mg/ml)

400mg. Adenina hemisulfat
80ml H₂O
1,25 ml HCl 4N
Enrasar a 100ml
Guardar a T°C ambient i a la foscor

Medi 11: OryCIM líquid

3,9 gr N6 Sals (Duchefa)
30gr Sacarosa (Duchefa)
500 mg Bacto Casaminoàcids (BD)
1g Prolina (Duchefa)
125 mg Àcid Ascòrbic (Duchefa)
125 mg Àcid Cítric (Duchefa)
500 mg MES (Duchefa)
Volum final de 1000ml i pH de 5,7
Autoclavar i repartir 25 ml en plaques de petri (90x14mm Sterillin).

Medi 12: MEDI de Regeneració MSM

4,4 g Sals MS + vitamines (Duchefa)
30 g Sacarosa (Duchefa)
1 g. Hidrolitzat de caseïna (Duchefa)
3 g/L Kinetina (Duchefa)
0.5g/L BAP (Duchefa)
0.5 g/L NAA (Duchefa)
4.5g Gelrite (Duchefa)
Volum final de 1000ml i ph 5,8
Autoclavar i repartir 25 ml en plaques de petri (90x14mm Sterillin).

Medi 13: Medi D'arrelament RM

4,4 g Sals MS + vitamines (Duchefa)
30 g Sacarosa (Duchefa)
500 mg MES (Duchefa)
2 g Gelrite (Duchefa)
Volum final de 1000ml i pH 5,7
Autoclavar i repartir 25 ml en plaques de petri (90x14mm Sterillin).

7.-Materials i mètodes

Medi 14: LB Agar Placa : Bactotripton, Extracte de llevat, NaCl

10g Bactotripton (Pronadisa)
5g Extracte de llevat (Pronadisa)
10g NaCl (Panreac)
20g Agar Bacteriològic Europeu (Pronadisa)
Enrasar fins a 1000 ml Aigua

Autoclavar i afegir 25 ml de medi a cada placa de petri (90x14mm Sterillin)

Medi 15: LB líquid: Bactotripton, Extracte de llevat, NaCl

10g Bactotripton (Pronadisa)
5g Extracte de llevat (Pronadisa)
10g NaCl (Panreac)
Enrasar fins a 1000 ml Aigua

Autoclavar

Medi 16: LB Agar Placa +antibiòtic

Bactotripton, Extracte de llevat, NaCl

10g Bactotripton (Pronadisa)
5g Extracte de llevat (Pronadisa)
10g NaCl (Panreac)
20g Agar Bacteriològic Europeu (Pronadisa)
Enrasar fins a 995 ml Aigua

Autoclavar. Esperar que el medi baixi la temperatura fins a 55°C i afegir l'antibiòtic.

1ml de Kanamicina (30µg/ml) o Ampicilina (50µg/ml). Agitar suaument i afegir 25 ml de medi a cada placa de petri (90x14mm Sterillin)

Solució 1: TSS 2x (solució de transformació i d'enmagatzemament)

10 ml 1M MgCl₂ (Sigma)
20 ml LB 5x
50 ml PEG 8000 al 40% (SIGMA)
10 ml H₂O
10ml DMSO (PANREAC)

Autoclavar-ho, i afegir posteriorment el DMSO, fins a un volum final de 100ml

Solució 2: SOLUCIÓ I (lisis alcalina) Miniprep

2,5 ml 1M TRIS pH8 (ROCHE)
2ml 0.5M EDTA pH8 (SIGMA)
133µl RNAasa (afegir abans d'utilitzar)
Volum final 100ml

Solució 3: SOLUCIÓ II (lisis alcalina) Miniprep

1g. Lauryl sulfat (1% SDS; SIGMA)
0.8g. NaOH (SIGMA)
Volum final 100ml

Solució 4: SOLUCIÓ III (lisis alcalina) Miniprep

60ml Acetat potàssic 5M (SIGMA)
11,5 ml Àcid Acètic Glacial (CARLO ERBA)
Volum final 100 ml

Solució 5: SOLUCIÓ I LiAc 0,1M 1X TE

1ml LiAc 1M ph 7,5*
1ml TE 10X**
8 ml H₂O estèril

* 1M LiAc : 6,56g. LiAc (SIGMA) + 95ml i ajustar el pH amb acid acètic. Enrasar fins a 100ml. Autoclavar.

7.-Materials i mètodes

**10X TE (100mMTRIS, 10mM EDTA): 10ml 1 M TRIS-HCl pH 7,5 (ROCHE), 2ml 500mM EDTA pH8 (SIGMA). Volum final 100 ml. Autoclavar.

Solució 6: Esperma de salmó

200mg de High Molecular Weight DNA (Deoxyribonucleic acid Sodium Salt Type II from Salmon Testes; SIGMA)
25ml TE 1X estèril

Barrejar-ho bé, pipetejant varies vegades. Barrejar-ho amb un estirer magnètic durant 2 o 3 hores. Si fes falta es pot deixar tota la nit barrejant-se en una càmera freda a 4°C.

Aliquotar i enmagatzemar a -20°C.

Just abans d'utilitzar, es posa l'esperma de salmó en aigua bullint i es deixa 5 minuts. Ràpidament es passa la mostra en gel. (si repetim aquesta operació un parell de vegades, calentar i refredar, millora, substancialment l'eficiència de la transformació).

Solució 7: SOLUCIÓ II-LiAc PEG

1ml 1M LiAc pH 7,5*
1ml TE 10x**
8ml PEG 4000 (5%)***

Volum final de 10 ml

* 1M LiAc : 6,56g. LiAc (SIGMA) + 95ml i ajustar el pH amb àcid acètic. Enrasar fins a 100ml. Autoclavar.

** 10X TE (100mMTRIS, 10mM EDTA): 10ml 1 M TRIS-HCl pH 7,5 (ROCHE), 2ml 500mM EDTA pH8 (SIGMA). Volum final 100 ml. Autoclavar.

*** PEG 4000 50%: 50g de polietilenglicol 4000 (FLUKA) en 35 ml d'aigua destilada i autoclavada.

Barrejar bé utilitzant un stirer (es necessitarà més o menys 30 minuts), s'enrasa fins a 100ml. S'ha de tenir en compte que és una substància força viscosa, per tant, s'esterilitza mitjançant un filtre de 0,45µm (NALGENE) connectat a una bomba de buit.

Solució 8: TAMPÓ D'EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA

100ml TRIS HCl 1M pH7,7 (10 mM Final)
1ml Fenilmetanosulfonil fluorida o PMSF (175mg + 10ml isopropanol)
899ml H₂O

TRIS HCl (ROCHE), PMSF (Sigma), Isopropanol (PANREAC)

Solució 9: TAMPÓ D'EXTRACCIÓ DNA de LLEVAT

5ml Tris HCl 1M pH8 (10 mM Final)
1ml EDTA 0,5M pH8 (1 mM Final)
10ml NaCl 5M (100mM final)
25ml SDS 20% (1%)
10ml Triton X-102 (2%)
Volum Final: 500 ml

Tris HCl (Roche), EDTA (Sigma), NaCl (Panreac), SDS (Lauryl Sulfat) (SIGMA), Triton X-102 (SIGMA).

Solució 10: TE 1X (tampó)

10ml TRIS HCl 1 M pH8 (10mM Final)
2ml EDTA 0,5M pH8 (1mM final)
Volum final de 1000 ml

TRIS HCl (Roche), EDTA (Sigma)

Solució 11: TAMPÓ D'EXTRACCIÓ D'ARRÒS

50 ml TRIS HCl 1M pH 8 (100mM FINAL)
50 ml EDTA 0.5M pH8 (50 mM FINAL)
50 ml NaCl 5M (500 mM FINAL)
500 ml Volum final

7.-Materials i mètodes

Solució 12: SDS 20%

200 g de Lauril Sulfat
1000 ml d'aigua

Solució 13: Tampó de Reacció de FCE (x10)

4ml TRIS HCl 1M pH 7,5 (ROCHE)
5ml KCl 1M
4ml MgCl₂ 1M
7ml H₂O estèril

Volum final 20 ml

Solució 14: SOLUCIÓ STOP X5

400µl TRIS HCL 1M pH8 (ROCHE)
400µl EDTA 0,5M (SIGMA)
5ml Glicerol 50%
4,2 ml H₂O
10ml Sybr Gold-DMSO
1mg Bromofenol Blue (0,05% pes/volum) (CARLO ERBA)

Volum final de 20ml . Fer un vòrtex abundant i aliquotar en una placa de 96 pous de 200µl/pou.

Solució 15: Bis Acrilamida 19:1 (4%)

50ml TBE 10X pH 8,3
50ml Bis Acrilamida 19:1 aquosa (40%) (National diagnostics)
Volum final 500 ml. Filtrar el producte i guardar a 4°C

Solució 16: TBE 10X pH 8,3

282.20g Tris Base (Roche)
123.66g Acid Bòric (Sigma-Aldrich)
14.88g EDTA (Sigma-Aldrich)
Volum final 2 L. Ajustar el pH amb HCl 1N (Carlo Erba)

Solució 17: TAE 50x

242.28g TRIS Base (Roche)
37,2 g EDTA
57,1 ml Àcid Acètic (CARLO ERBA)
Volum final 500ml. Afegir 20ml per cada litre de tampó d'electroforesi

7.2.-Assaig d'eficiència de l'enzim FCE en la detecció de mutacions

7.2.1.-Obtenció d'extracte vegetal cru.

Es van preparar extractes crus de les fulles i del tall de l'api (*Apium vulgare*), del fonoll (*Foeniculum vulgare*), de les bledes (*Beta vulgaris var. Cicla*), de les fulles dels espinacs (*Spinacia oleracea*) i del julivert (*Petroselinum crispum*). El material es va rentar amb aigua per eliminar les restes de terra i finalment es va fer un rentat amb aigua desionitzada. Les extraccions es van realitzar dins d'una cambra a 4°C per tal d'evitar al màxim la degradació de les proteïnes. Després d'assecar bé la mostra de teixits, 150 gr de material fresc i sec es va tallar en trossos petits i es va deixar reposar uns minuts dins d'un vas de precipitats amb 50ml tampó d'extracció de proteïna fred (Solució 8) i es va procedir a triturar tot el material utilitzant un batedora elèctrica domèstica (MOULINEX), evitant que el material s'escalfés massa. Un cop triturat tot el material fins a formar una massa homogènia, es va filtrar tota la mostra utilitzant gasses de farmàcia estèrils de tipus estàndard. A l'extracte sense polpa, es va afegir un 10% 1M TRIS HCL pH 7,7 i un 5% de glicerol que es va aliquotar en eppendorfs en volums de 200 µl d'extracte de fonoll llestos per guardar al congelador de -80°C.

7.2.2.-Anàlisi de l'eficiència de tall de desaparellaments dels extractes crus

Per tal de detectar l'eficiència dels diversos extractes crus extrets en l'anterior apartat, es va dissenyar un fragment que contenia un desaparellament d'una base. Es fragment estava format a partir de dos oligonucleòtids autocomplementaris marcats per fluorescència pels dos extrems 5'. Es van mesclar els dos oligonucleòtids escalfant la mostra a 96°C i després deixant baixar la temperatura fins a 20°C. Seguidament es va procedir a digerir 1 µl del fragment (100ng/µl) amb 3 µl de cada extracte cru de cada espècie, més 1 µl de tampó de digestió (Solució 13) en un volum final de 10 µl a 45°C durant 30 minuts.

Nom de la seqüència	Fluoròfor	Modificació	Seqüència
Yeung upper strand I	Cy5	fosforotioat	c*actttatcgttccggctccgctcatgtgtggaattgtga
Yeung lower strand	Cy3	fosforotioat	t*cacaattccacacatgacgggagccggaacgataaagtg

La guanina subratllada en vermell indica la base desaparellada

Es va parar la reacció amb 2 µl de solució TRIS -EDTA (Solució 14) i es va córrer el material en un gel d'electroforesis d'acrilamida: Bis Acrilamida (19:1) al 20% i com a element desnaturalitzant és va utilitzar Urea 7M. El gel va córrer dins d'un tampó TBE 1x (Solució 16). Es va llegir els resultats en escàner tipus Typhoon (GE Healthcare) en els canals de Cy3 i Cy5.

7.-Materials i mètodes

7.2.3.-Comparació de l'eficiència de detecció d'un desaparellament entre l'extracte cru d'api i fonoll.

Es va analitzar l'eficiència de l'extracte cru de fonoll en la detecció d'un desaparellament en un fragment de 2 kilobases. Per aquest experiment es va utilitzar els extractes crus d'Api i fonoll de l'apartat 7.2.1 i l'enzim comercial Surveyor (Transgenòmics). El fragment de 2kb fou generat a partir de l'amplificació de fragments de dues variants del plàsmid pCK GFP S65C.

Nom de la seqüència	Fluoròfor	Modificació	Seqüència
Cy5 SH M13 Forward	Cy5	fosforotioat	g*taaacgacggccagt
SH M13 Reverse	Cy3	fosforotioat	c*aggaaacagctatgac

Amb aquest primers es va amplificar 1854pb de dues varietats del plàsmid pCK GFP S65C, la (+) i la (-) que contenia dos nucleòtids (TA) de diferència. El fragment obtingut d'amplificar el pCK GFP S65C (+) es va anomenar **Plus** i el fragment resultat d'amplificar el pCK GFP S65C (-), es va anomenar **Minus**. La mescla d'ambdós fragments generava un desaparellament tipus TA loop en la posició 934.

Es va mesclar els dos tipus de fragments amb unes proporcions de 1:5 i 5:1 de plus i minus i pujant la temperatura fins a 96°C i deixant que s'equilibrés fins a temperatura ambient permetent la unió de les dues cadenes generant el desaparellament.

1 µl del fragment (200ng/µl) amb el loop TA, 2kb-M13 va ser digerit en un volum final de 10µl, utilitzant 0.75, 1.5, 3 i 6 µl de cada extracte cru, i 1 µl de tampó de reacció Solució 13. Pels control de DNA sense desaparellament, anomenat Match (consistent en un fragment plus sense la deleció de les bases TA) es va digerir amb el màxim volum de cada extracte cru, 6 µl. Pel control de l'enzim surveyor es va utilitzar els dos tipus de fragments, amb i sense desaparellaments digerits en 1 µl de Surveyor (Transgenòmics) i 1 µl de tampó de reacció Solució 13. Les digestions es va carregar en un gel d'agarosa al 1,5%, amb un tampó TAE 1x (solució 17) sense agents desnaturalitzants a un voltatge de 120V durant 1 hora.

7.2.4.-L'efecte de la tiofosforilació de fragments davant la digestió amb l'extracte cru de fonoll

Per tal de detectar si podíem limitar l'activitat nucleasa inespecífica de l'extracte cru de fonoll es va realitzar un anàlisi digerint fragments amb i sense extrems protegits. Per aquest anàlisi es va partir d'una barreja de fragments de DNA del gen *Met10* del material genòmic de les espècies *Saccharomyces cerevisiae* (CER) i *Saccharomyces carlbergensis* (CARL) emprant següents proporcions 1:0, 0:1, 1:1, 1:4, 1:8 i 1:16 (concentració final de 100ng/µl)

7.-Materials i mètodes

Nom de la seqüència	Modificació	Seqüència
MET10 CF SIN	No	GGCCAAAAATGCAACTTCAC
MET10C R 3Kb	No	CCAAGTAGGGCCACACAAGT
MET10 CF	fosforotioat	G*GCCAAAAATGCAACTTCAC
MET10C R END	fosforotioat	T*CCTCGCGCTTTAGCC

El programa utilitzar per amplificar un fragment de 2994 pb fou:

	94	5 minuts	
	94	1 min	
	65	1 min	35 cicles
	72	3:00	
	72	10 min	
	4°C	5 min	

Després de la reacció d'amplificació de fragments es va generar l'heterodúplex seguint el programa de l'apartat 7.5.5. La digestió d'un μl de fragment ($100\text{ng}/\mu\text{l}$) ha estat a 45°C durant 30 minuts amb $1\ \mu\text{l}$ de extracte cru de fonoll (FCE), $1\ \mu\text{l}$ del tampó de reacció (Solució 13) tal i com es descriu en l'apartat 7.6.8 i s'ha llegit els resultats en un gel d'acrilamida segons el protocol de l'apartat 7.6.9.

7.2.5.-Assaig de límit de detecció de mutació en Heterodúplex

Per analitzar el límit de detecció d'un desaparellament per l'extracte cru de fonoll, s'ha generat un mescla de DNA genòmic de dues espècies de llevat, per gen *Met10* en *Saccharomyces cerevisiae* (CER) i *Saccharomyces carlbergensis* (CARL) amb unes proporcions que van des de 1:0 (com a control negatiu CER), 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512.

Per amplificar s'han utilitzat les condicions de PCR pel gen *Met10 C* de l'apartat 7.5.4 i 7.5.5. La digestió del DNA amplificat ha estat a 45°C durant 30 minuts amb $1\ \mu\text{l}$ de FCE, segons el protocol 7.5.6 i s'ha llegit els resultats en un gel d'acrilamida segons el protocol 7.5.7.

7.2.6.-Assaig de detecció d'al·lels mutants en Heterodúplex

Per amplificar les barreges de DNA s'ha partit de mostres individuals d'arròs (*Oryza sativa*) del mutant 398s2 homozigots i heterozigots per una mutació (veure capítol 3) i DNA d'Arròs de la varietat japònica salvatge. Per l'amplificació de les diverses proporcions es va utilitzar els primers SGR ATG9 F2xR2 i les condicions següents:

7.-Materials i mètodes

Nom de la seqüència	Seqüència
SGR9 i2 ATG F2	CTACCAAACCGAGCCAAAAT
SGR9 i2 ATG R2	ACAGATGGATGGATGCCAAT

96°C	5 minuts	
96	1 min	
60	1 min	35 cicles
72	3:00	
72	10 min	
4°C	5 min	

Prèviament s'ha calculat la concentració inicial de DNA i utilitzant l'espectofotòmetre de precisió el Nanodrop 1000 (Thermoscientific). A partir d'aquesta s'han ajustat els volums per aconseguir 100 ng/ µl.

Els desaparellaments entre els fragments del gen SGR mutant 398s2 heterozigot i la varietat salvatge han seguit una proporció 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:0 i 0:1. La mateixa proporció de desaparellaments es va utilitzar entre els fragments pel gen SGR mutant 398s2 homozigot i el salvatge. Cada proporció generada s'ha sotmès al programa de generació d'heterodúplex (descriu en l'apartat 7.6.7)

Tipus de DNA	ng/µl
398s2 Heterozigot	159
398s2 Homozigot	179,1
Wild Type	230

La digestió d'un µl de fragment de cada proporció (100ng/µl) ha estat a 45°C durant 30 minuts amb 1 µl de extracte cru de fonoll (FCE), 1 µl del tampó de reacció (Solució 13) tal i com es descriu en l'apartat 7.6.8 i s'ha llegit els resultats en un gel d'acrilamida segons el protocol de l'apartat 7.6.9.

7.2.7- Assaig del límit de detecció de deleccions

Durant els assaigs d'eficiència de l'extracte cru de fonoll, es va voler testar la seva capacitat de detecció de deleccions i el límit de mida dels loop generat pel desaparellament. Per tal de testar la capacitat de detecció de deleccions es van generar fragments artificials de diverses mides.

7.2.7.1- Amplificació d'un fragment del plàsmid pBluescript KS (+)

7.-Materials i mètodes

Per generar fragments artificials amb una deleció es va partir del plàsmid pBluescript KS (+)
Es van utilitzar els següents primers i les condicions de PCR amb 0.2 µl de l'enzim Taq polimerasa i 0,32 µl de dNTP's (12,5 mM).

Nom de la seqüència	Fluoròfor	Modificació	Seqüència
pBSKS+ Forward	No	fosforotioat	t*ttagagcttgacgggaaa
pBSKS+ Reverse	No	fosforotioat	c*ctgacgagcatcaca

96 5 minuts			
96	1 min		
58	1 min	35 cicles	
72	1:00		
72	10 min		
4°C	5 min		

7.2.7.2- Digestió del plàsmids amb enzims de restricció.

Per tal de generar els fragments amb deleccions es va tallar el fragment amplificat amb dos enzims de restricció diferents. En l'esquema següent s'indica la paella d'enzims utilitzada i la mida de la deleció que es genera.

Aatcggaaccctaaaggagccccga**tttagagcttgacgggaaa**gccggcgaaactggcgagaaaggaaggaagaaagcgaaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgctaaccaccacacccgccgcttaatgcgcccctacagggcgctcccattcgccattcaggctcgcgaactgttgggaagggcgatcggtcgggctcttcgctattacgccagctggcgaagggggatgtgctgcaaggcgattaagtggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgtaaaacgacggcagtgagcgcgtaata

cgactcactatagggcgaattg**gagctc**caccgcggtggcggccgctctagaactagt**gatcccccggg**
 |||||
 gctgagtgatatcccgcttaac**ctcga**gtggcgccaccgccggcgagatcttgatca**ctaacggggccc**

Ctgcaggaattcgatatc**agctt**atcgatacc**ctgacccga**ggggggccc**ggtacc**cagcttttgt
 |||||
gacgtccttaagctatag**ctcga**tagctatgg**ctgctgagct**cccccggg**ccatgg**gtcgaaaaca

tccttttagtggggttaattgcgcttgccgtaatcatggtcatagctgttctgtgaaattggtatccgctcacaattccacacaacatcagagcggaaagcataaagtgtaaagcctgggtgcctaagtagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgaggagagggcttgcgtattggcgctctccgcttctcgtcactgactcgtcgcgctcggctgttcgctcggcgagcggatcagctcactcaaaaggcgttaatacggttatccacagaatcaggggataacgaggaagaacatgtgagcaaaa
ggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccggttgctggcgttttccataggctccgcc**ctgacgagcatcaca**aaatcgacgct

Relació d'enzims de restricció utilitzats per generar els fragments utilitzats en l'estudi i el nombre de bases de deleció.

7.-Materials i mètodes

G/AATC: EcoRI	C/TCGAG: XhoI
CTGCA/G: PstI	GAT/ATC: EcoRV
A/AGCTT: HindIII	CCC/GGG: SmaI
GAGCT/C: SacI	G/TCGAC: SalI
GGTAC/C: KpnI	G/GATCC: BamHI

EcoRI-EcoRV : 4	EcoRI-HindIII: 8	EcoRI-SacI :54
EcoRI-BamHI : 14	EcoRI-XhoI : 29	SacI-KpnI : 106

Per tal de generar-los es van fer 2 digestions consecutives, on es van omplir/eliminar els extrems cohesius utilitzant els enzims Klenow i T4 polimerasa. Finalment es van lligar els extrems del plàsmid amb l'enzim T4 lligasa.

Per fer la 1ª digestió es va partir del plàsmid pBSKS+ purificat amb el kit Zymoclean, on es van digerir 10µl del plàsmid amb l'enzim EcoRI i uns 3µl de mostra amb l'enzim SacI. Tots es digeriren a 37°C durant 2h (mínim). Els tampons emprats per la digestió son de Fermentas a excepció de XhoI que és de la casa comercial New England Biolabs (NEB)

- **Eco RI:** 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.02%, Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA
- **SacI:** 10 mM Bis-Tris Propane-HCl (pH 6.5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA
- **Eco RV:** (tampó Red) 10 mM Tris-HCl (pH 8.5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA
- **HindIII:** (tampó Red) 10 mM Tris-HCl (pH 8.5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA
- **XhoI:** 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9 @ 25°C. BSA (100µg/ml)
- **BamHI:** 10 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 37°C), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.02% Triton X-100, 1 mM 2-mercapthoethanol, 0.1 mg/ml BSA
- **KpnI:** 10 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA

Un cop acabada la digestió es carregà tota la mostra, s'aïllà i recuperà la banda del gel utilitzant un kit de purificació (Zymoclean). A partir de la 1ª digestió es van digerir per segona vegada amb els altres enzims (EcoRV, BamHI, Hind III, XhoI, SacI i KpnI). Es van utilitzar 5µl de digestió purificada en un volum final de 20µl. La digestió fou de 2 hores a 37°C, i

7.-Materials i mètodes

posteriorment es van passar totes les mostres per les columnes de purificació (Microcon), per eliminar els petits fragments i impedir que es tornessin a unir al plàsmid durant la lligació.

7.2.7.3-Generació d'extrems roma per lligar el plàsmid.

Després dels talls amb els dos enzims es generarà un fragment lineal amb els extrems cohesius, sense correspondència. Per poder lligar i recircularitzar el plàsmid, s'han d'omplir els espais buits o bé tallar-los depenent del tipus de digestió i eliminant el lloc de restricció per evitar que l'enzim pugui tallar de nou. S'utilitzarà 10µl de mostra més 0.5 µl de dNTP's (12,5 mM), 2µl de tampó klenow (10x), 1µl de l'enzim Klenow (10u/µl) que funciona com a polimerasa 5'-3'. Per altra banda es va utilitzar 10 µl de mostra més 0.5 µl l'enzim T4 DNA polimerasa (0.5u/µl) que funciona 5'-3' i a la vegada com a endonucleasa 3'-5' més 4 µl de tampó T4. En un volum final de 20 µl es va fer la reacció a 37°C durant 2hores.

Un cop utilitzada la reacció s'han de desactivar els enzims augmentant la temperatura a 75°C durant 10 minuts. Es purifiquen les mostres amb columnes Microcon, per eliminar la resta de petits fragments que quedin lliures i s'empalmen els fragments amb l'enzim T4 lligasa (Fermentas) durant tota la nit a 16°C.

7.2.7.4.-Transformació de cèl·lules competents amb els plàsmids delecionats.

Totes les construccions amb delecions es van insertar en cèl·lules competents DH5α (veure apartat 7.3.3) que es van sembrar en medi LB+Amp+Xgal (Medi 16). Només aquelles colònies que van sobreviure en ampicil·lina eren les que havien aconseguit incorporar el constructe i s'hauran transformat, però no necessàriament contindran el plàsmid amb la delecio adequada. Posteriorment es realitzaran comprovacions per verificar que realment s'hagin digerit i lligat correctament.

7.2.7.5.-Amplificació del fragment amb delecio

Utilitzant els primers pBSKS+ Forward i reverse (veure apartat 7.2.7.1) amplificarem un fragment de 945 pb a partir d'una barreja del plàsmid amb la delecio i el plàsmid original, en proporció 1:1, 1:4 i 1:8 respectivament i com a controls negatius utilitzarem cada plàsmid amb delecio sense barrejar més el plàsmid pBSKS+ original. Com a controls positius de digestió s'utilitzaran els primers Met10CF , Met10CR6 End , el DNA de la soca CARL, CER i les mescles CER:200 en proporció 1:4 i 1:8.

7.-Materials i mètodes

7.2.7.6.-Digestió dels fragments amb FCE

Finalment es realitzarà la digestió 1µl de fragment dels diferents tipus de motlles que contenen les respectives mutacions (100ng/µl) a 45°C durant 30 minuts amb 1 µl de extracte cru de fonoll (FCE), 1 µl del tampó de reacció (Solució 13) tal i com es descriu en l'apartat 7.6.8 i es carregarà en un gel d'acrilamida (veure apartat 7.6.9)

7.3.-Generació d'una cèl·lula indicadora

Pel disseny d'una cèl·lula indicadora, es va elegir 2 tipus de plàsmids que contenen dos tipus de proteïnes fluorescent i sobre la qual treballarem. Els dos plàsmids elegits son el pKT 103 (pFA6a-link-yEVENUS-Kan) i el pKT127 (pF6a-link-yEGFP-Kan), que s'amplificaran insertant-los en una E-Coli tipus DH5α competent.

Per la construcció d'aquesta soca es va utilitzar la tècnica de SFH-PCR (Short Flanking Homology-PCR), en què a partir del plàsmid de llevat pFA6a-link-yEVENUS-KAN (EUROSCARF) com a base del marcador de fluorescència optimitzat per llevat (yVENUS) i un marcador de contraselecció, el gen Kan^R, que va consistien un marcador de resistència a la Geneticina en llevats i a la Kanamicina en *E.coli*. Aquests foren emprats per verificar que s'havia insertat la construcció.

El plàsmid consta de d'un linker d'unió per fusionar la GFP a la proteïna de la ORF, la pròpia proteïna fluorescent, un terminador de llevat (ADHI), un gen de resistència a la geneticina per seleccionar aquelles colònies de llevat que porten l'insert de les que no han recombinat. Es van dissenyar un parell de primers de 70-mer aproximadament que per una banda amplificaven la regió del plàsmid que contenia tota la informació necessària per fusionar la GFP més el gen de resistència a GENETICINA i per altra banda el primer contenia la seqüència per insertar-se dins la ORF del llevat, eliminant en la regió 5', l'últim codó de l'ORF que correspon a l'STOP, ja que és indispensable per tal que durant la transcripció, es formin correctament les dues proteïnes fusionades

7.3.1.-Elaboració de cèl·lules competents DH5α

Per l'elaboració de cèl·lules competents es va partir d'un vial comercial guardat a -80°C que es diposità en un recipient amb neu carbònica, per tal d'evitar que es degradés. Es sembrà amb un bastó estèril una placa de LB (Medi 14) sense antibiòtic i es deixà créixer tota la nit a 37°C. Al dia següent un cop creixeren les colònies sense contaminacions, es posà un cultiu de 5 ml de LB líquid (Medi 15) a 37°C i agitant a 250 rpm/min. El dia següent s'utilitzà 0.5 ml de cultiu saturat en 50 ml LB líquid en un erlenmeyer de 250ml a 250 rpm i 37°C durant 2 hores i 10

7.-Materials i mètodes

minuts. Es parà el cultiu i es llegí l'absorbància a O.D 600 i al estar entre 0,3 i 0,4 començà l'elaboració de les cèl·lules competents. Es va Centrifugar (Beckman Coulter TJ-25) a 1000g durant 10 minuts a 4°C, en un falcon els 50 ml de medi. Es descartà el sobrenedant i es resuspengué el "pellet" en 5 ml de **TSS 2x (Solució 1)** i es van preparar alíquotes de 100µl. Guardar a -80°C.

7.3.2-Comprobació de la competitivitat de les cèl·lules

Es van treure dues alíquotes del congelador de -80°C i es van posar en gel (una es transformà i l'altra fou el control), per deixar-les descongelar. Es Pipetejà de 10-100pg del vector de DNA puc19 al tub. Es barrejà lentament i s'incubà en gel durant 30 minuts. S'afegí 900µl LB sense antibiòtic a l'ependorf. S'Incubà 2 minuts a 42°C (Heat Shock) i seguidament es deixà reposar 2 minuts en gel. S'Incubà 1 hora a 37°C a 250rpm. Es centrifugà (Eppendorf 5415D) els eppendorfs 30 s. a Vmax. Es va extreure tot el sobrenedant excepte 100µl per poder plaquejar. S'afegí 100µl de DNA a una placa de LB + l'antibiòtic específic, depenent del DNA amb que haguem transformat (Medi 16) Es repetí exactament tot el procediment per la mostra control, però aquesta no tenia DNA per transformar.

Es posà a créixer les colònies a 37°C tota la nit. El dia següent es feu un recompte de l'alíquota transformada i de la que no. L'eficiència en la transformació es mesurà de la següent forma:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ colonies}}{\text{transformats}} * \frac{106\text{pg}}{100\mu\text{l plaquejat}} \times \frac{1000\mu\text{l total volum de transformació}}{\mu\text{g plàsmid DNA}} = \frac{\text{transformants pg DNA}}{\mu\text{g plàsmid DNA}}$$

La eficiència de transformació ha de ser major que $1 \cdot 10^6$ cfu/µg plàsmid

7.3.3.-Preparació dels plàsmids

Els plàsmids que foren utilitzats son una millora del plàsmid pFA6a i presentaven una proteïna de fusió amb un fluoròfor de tipus YVenus i GFP, el pkt103 i el pkt127 respectivament. Per tal de tenir bona quantitat d'aquests plàsmids, transformarem *E.coli* (DH5α).

Es pipetejà de 10-100pg del plàsmid pkt103 i del pkt127 en dos eppendorfs. Després de barrejar lentament, s'incubà en gel durant 30 minuts. S'afegí 900µl LB sense antibiòtic al eppendorf. S'Incubà 2 minuts a 42°C (Heat Shock) i seguidament es posà 2 minuts en gel. S'incubà 1 hora a 37°C a 250rpm. Es centrifugà (Eppendorf 5415D) els eppendorfs durant 30s. a velocitat màxima. Es va extreure tot el sobrenedant excepte 100µl per plaquejar. S'afegí 100µl de DNA i LB a una placa de LB + antibiòtic (Medi 16) (l'específic, dependrà del DNA amb que

7.-Materials i mètodes

s'hagi transformat). Es va repetir exactament tot el procediment per la mostra control, però aquesta no portà DNA per transformar. Es va posar a créixer les colònies a 37°C tota la nit

7.3.4.-Miniprep per obtenir DNA plasmídic a partir d'E. coli transformada

Utilitzarem un protocol modificat a partir dels mètodes descrits per Birnboim and Doly (Birnboim *et al.*, 1979)²⁹⁴ i Ish-Horowicz and Burke (Ish-Horowicz *et al.*, 1981)²⁹⁵.

Es va utilitzar 1,5ml de LB amb les cèl·lules transformades. Es centrifugà la mostra durant 30 segons a Velocitat màxima i a 4°C. S'eliminà el sobrenedant i es guardà el "pellet" en gel. Ens vam assegurar d'eliminar tot el medi LB + kanamicina

S'afegí 150 µl de la Solució I (Solució 2) (guardada en fred) i s'aplicà un vòrtex intens.

S'afegí 150µl de la Solució II,(Solució 3) invertint suaument els tubs per tal d'evitar que es fes malbé el DNA plasmídic. Es guardà els tubs en gel. Es va afegir 150µl de Solució III (Solució 4) (guardada en fred) i es va agitar suaument fins que es barrejà bé. Es va deixar 5-10 minuts en gel. Passat el temps es va centrifugar de 10 a 15 minuts a Velocitat màxima (13000 rpm) i a 4°C. Es va passar el sobrenedant a un tub eppendorf nou i es va deixar a 4°C. Es va afegir 2 volums d'Etanol 96% i es va deixar en fred 20 minuts. Es va centrifugar a velocitat màxima a 4°C durant 10 minuts.

Es va descartar sobrenedant i es va afegir 200µl de Etanol 70%. Es va centrifugar a 4°C durant 2 minuts a velocitat màxima. Es va eliminar tota la resta d'etanol amb una pipeta i es va deixar els tubs a l'aire lliure esperant que s'evaporés tot l'etanol i es va resuspendre el precipitat amb 20-50µl l'aigua estèril miliQ.

7.3.5.-Amplificació de DNA de plàsmid per transformar

Es va dissenyar oligonucleòtids que permetessin l'amplificació des del plàsmid d'ambdós marcadors i que estessin flanquejats per una seqüència homòloga de 60 nucleòtids (Short Flanking Homology). La homologia per la banda de 5' del primer Forward, correspon al locus diana ZWF1 i l'homologia de la banda 5' del primer reverse correspon al locus diana ATG2.

A partir del plàsmid, es va amplificar una part del DNA per tal de poder realitzar una recombinació homòloga. Part del primer té una seqüència específica per amplificar del plàsmid (en groc) i una altra part s'utilitzarà per fer la recombinació homòloga amb el genoma del llevat (en verd).

Els gen amplificat a partir del plàsmid pkt103 codifica per una proteïna de fusió YVenues que s'excita a 502nm i emet a 532nm, a partir dels plàsmid pkt127 el fluoròfor yEGFP que s'excita

7.-Materials i mètodes

a 476nm i emet a 512 nm obtingut a partir dels primers **ZWF1pFATAG F i R**. Aquest fragment amplificat s'insertà en la regió de la ORF del gen ZWF1 que corresponia a un Glucosa 6 fosfat deshidrogenasa. Per la recombinació homòloga es va fer créixer les soques de *Saccharomyces cerevisiae* haploide (W303) i diploide (S288C) fins a $1 \cdot 10^7$ cel/ml i seguint el mètode de Protocol de transformació de llevat

Nom de la seqüència	Seqüència
ZWF1pFATAG F	gcacccttacgcttggcccgtagtaagccagaagatacgaaggataatggtgacggtgctggttta
ZWF1pFATAG R	tttttcagacgtggaatggtgggaaagccaaaatgtcactgaccgcggttcgatgaattcgagctcg

Les condicions de PCR son les següents:

96	5 minuts
96	1 min
58	0:45 min 25 cicles
72	3:30 min
72	10 min
4°C	5 min

7.3.6.-Transformació de cèl·lules de llevat pel mètode de l'acetat de liti

Per la transformació de cèl·lules de llevat es va utilitzar un protocol de transformació adaptat a partir dels mètodes de (Schiestl *et al.*, 1989)²⁹⁶; (Gietz *et al.*, 1992)²⁹⁷; (Bartel *et al.*, (1993)²⁹⁸

Per començar a transformar es necessita un cultiu de llevats frescs (provinents d'una única colònia) que s'havia posat el dia anterior a créixer agitant a 250rpm, 2-3 ml a 30°C fins arribar a saturació. Es va necessitar saber el nombre de cèl·lules, per tant es van recomptar amb la càmera de Neubauer fins a aconseguir de $2 \cdot 4 \cdot 10^6$ cel/ml. Necessitàrem uns 10ml per poder transformar, per tant es calculà quin volum de YPD+llevat saturat era necessari afegir en un falcon per tenir uns $2 \cdot 4 \cdot 10^7$ cel totals. S'enrasarà el cultiu fins a 10 ml amb YPD. Es deixà créixer a 30°C i 250 rpm, generalment de 2 a 3 hores depenen de l'espècie de llevat.

Un cop arribat a $1 \cdot 10^7$ cel/ml del cultiu, centrifuguem a 4°C i 2500 rpm, el falcon, per tal de recuperar el "pellet". Es resuspengué amb 10 ml d'aigua destil·lada estèril, i mescllem bé. Centrifuguem de nou a 4°C i 2500 rpm. S'eliminà el sobrenedant, i es resuspengué amb 1 ml d'aigua destil·lada estèril i ho es centrifugà en una microcentrífuga fent un tap-spin.

S'eliminà el sobrenedant i es resuspengué amb 1ml de la Solució I- LiAc, (Solució 5) s'agità bé i es feu un tap-spin centrifugant. S'eliminà el sobrenedant i es resuspengué amb 50µl de la **Solució I-LiAc**, (s'ha de tenir en compte que volem un volum final de 50µl, i com que les

7.-Materials i mètodes

cèl·lules també ocupen volum, es preferible resuspendre amb 25µl i comprovar que el volum final sigui 50µl). Finalment es recuperà $2 \cdot 10^9$ cel/ml en 0,1 M LiAc-TE 1X.

S'afegí 5µl de Esperma de Salmó (Solució 6) (SS-Salmon Sperm 10mg/ml) als 50 µl de cèl·lules de llevat i s'afegí 1-2µg de plàsmid o de DNA (ha de ser >5µl). S'afegí 300µl de Solució II LiAc-PEG (Solució 7) i s'homogenitzà la mescla. S'incubà la mostra a 30°C durant 30 minuts i en un agitador a 250 rpm.

Afegir un 10% DMSO (Carlo Erba), i es barrejà abundantment utilitzant el vòrtex a mitja potència o barrejant per immersió repetides vegades.

Donar un xoc de calor a 42°C durant 15 minuts, i ràpidament deixar reposar en gel la mostra durant 5 minuts. Es va fer un tap-spin un cop passat aquest temps i aspirà el sobrenedant. Es resuspengué les cèl·lules en un volum adequat de TE 1X pH 7,5 per poder sembrar una placa concentrada i una placa diluïda 10 cops.

En aquest cas la placa de YPD-agar (Medi 1) conté un antibiòtic de selecció, la geneticina (G418), per tant es recomanable, sembrar les cèl·lules en una placa amb YPD i posteriorment sembrar un replicat en una placa amb l'antibiòtic de selecció. Per altra banda, es pot resuspendre la mostra en medi líquid YPD (Medi 2) i deixar-lo créixer durant 3 hores abans de plaquejar-lo en placa de cultiu agar/geneticina YPD(Medi 1)/G418

Incubar les plaques a 30°C durant 3 o 4 dies. Les colònies haurien de ser visibles dins d'aquest període de temps.

7.3.7.-Comprovació generació de proteïna de fusió

Per tal de comprovar que s'ha generat la proteïna de fusió s'utilitzaran uns primers externs al constructe per analitzar la mida del producte de PCR. Tal i com s'ha explicat en la introducció la mida de la banda amplificada determinarà la presència o absència.

Combinant els primers A2+B, podem detectar si s'ha realitzat correctament la recombinació homòloga tan en organismes diploides com en els haploides.

Nom de la seqüència	Seqüència
ZWF1KOCHKF (A2)	TCCAGAGGCTTACGAGGTGT
ZWF1KO/TAGCHK R (B)	CTTCACCGGGAGATCACAAC

7.-Materials i mètodes

Les condicions de PCR son les següents:

	94	5 minuts	
	94	45 sec	
	65	1 min	5 cicles
	72	3:20	
	94	45 sec	
	55	1 min	35 cicles
	72	3:20	
	72	10 min	
	4°C	5 min	

Si la seqüència que ha de generar la proteïna de fusió s'ha insertat correctament esperem unes bandes específiques que en soques de llevat haploide seran de 3164pb i si no s'ha insertat serà de 944pb. En les soques de llevat diploides, esperem una banda de 944pb i una de 3164pb en les soques que hagin insertat el fragment.

7.3.8.-Mutagènesi de les soques indicadores

La mutagènesi de les soques de *Saccharomyces cerevisiae* W303 (haploide) amb la proteïna de fusió yVENUS (yGE01) la soca S288C (diploide) amb la proteïna de fusió GFP (yGE02) van ser mutagenitzades seguint el protocol de l'apartat 7.4. Juntament a la mutagènesi, es va fer créixer les mateixes soques sense el mutagen per calcular la genotoxicitat i la citotoxicitat.

7.4.-Generació d'una població mutant de llevat

7.4.1.-Creixement del llevat

En la mutagènesi de llevat es va testar l'eficiència del mutagen en les soques indicadores de *Saccharomyces cerevisiae* haploide YGE01 i diploide YGE02, i a la vegada es va mutagenitzar-la soca cervesera industrial *Saccharomyces carlbergensis*.

Es partí d'un d'stock glicerinat conservat a -80°C de cada una de les 3 soques. Per tal d'observar la seva eficiència al créixer, els vam sembrar primer en una placa de YPD (**Medi 1**). Un cop aïllada una colònia de cada, es sembrà en 50 ml medi de cultiu líquid de YPD líquid (Medi 2) a 30°C, per tal d'obtenir una concentració de $2 \cdot 10^8$ cel/ml en un erlenmeyer de 250 ml

7.-Materials i mètodes

7.4.2.-Mutagènesis

La mutagènesis es va realitzar utilitzant un 2,6% (v/v) del mutagen EMS (etil-metanosulfonat) de Sigma, a diversos temps d'exposició. El producte és pot desactivar utilitzant 5% de tiosulfat de sodi, o bé Hidròxid de sodi 1,2 N.

Es partí de 10ml del cultiu de cada soca de llevat (concentració de $2 \cdot 10^9$ cel/ml) i es centrifugà durant 15 minuts a 2500 rpm. S'eliminà el sobrenedant i es resuspengué les cèl·lules en 10 ml d'aigua. Es resuspengué agitant el tub varis cops. Centrifuguem de nou 15 minuts a 2500 rpm. S'eliminà el sobrenedant i es resuspengué amb 10 ml de 10mM KPO_4 (fosfat de potassi monobàsic; Sigma) pH 7.0. Fer un vòrtex al Falcon, centrifugar de nou a 2500 rpm durant 10 minuts. Eliminar el sobrenedant. Es resuspengué en 40 ml de 10mM KPO_4 per tal d'aconseguir $5 \cdot 10^7$ cel/ml. S'aliquotà 5 ml d'aquesta suspensió en un tub Falcon de 15ml que es posà en gel durant 10 minuts. Seguidament s'esterilitzà el sonicador amb alcohol (Etanol al 70%). Passats els 10 minuts es sonicà la mostra durant 8 segons, amb una amplitud del 28% i 1 cicle.

A partir d'aquest moment es treballà en el laboratori de reactius especials ja que treballem amb un producte molt nociu.

Es van fer 3 alíquotes de cada una de les soques a testar (YGE01, YGE02 i *Saccharomyces carlbergensis*), numerades com a A, B i C (aquest darrer fou el control de nombre de cèl·lules de partida).

En la mostra **A**, s'afegí 1,75 ml d'alíquota de cèl·lules amb 10 mM KPO_4 i tot i no entrar en contacte amb el mutagen ens serví per calcular la citotoxicitat del producte, al comparar el creixement amb la mostra tipus B.

La mostra **B**, conté 1,75ml d'alíquota de cèl·lules amb 10mM KPO_4 + 45 μ l de EMS (100%). Tots els objectes que toquin a l'EMS es tiraran en un contenidor especial, i a ser possible es desactivarà amb tiosulfat de sodi (5%). El temps òptim d'exposició al mutagen de la mostra **B** en la soca *Saccharomyces carlbergensis* serà el que utilitzarem durant el garbellat.

En el control **C**, s'afegí 250 μ l de la solució de cèl·lules amb 10 mM KPO_4 en 750 μ l de YPD fred, que utilitzarem com a mostra control. S'esperà un nombre de cèl·lules d'aproximadament $1,23 \cdot 10^7$ cel/ml.

Tant la Mostra **A** i **B**, s'aliquotarà en 6 tubs de 2ml afegint 250 μ l de cada solució. Cada grup de tubs estarà exposat al mutagen durant 20, 40, 60, 80, 100 i 120 minuts, a 30°C i agitant-se en un shaker. Després de cada temps, es parerà la reacció afegint 1ml. de tiosulfat de sodi (5%), tan en les mostres que han entrat en contacte amb el mutagen com en les control.

7.-Materials i mètodes

Es centrifugarà la mostra a velocitat mitja (5000rpm) durant 1 minut. Llencem el sobrenedant a un contenidor especial per a productes contaminats que conté 100ml de NaOH 1,2N.

Rentarem les cèl·lules amb 1ml d'aigua destil·lada estèril. Fem un vòrtex, i centrifuguem de nou les mostres, s'eliminà les restes d'aigua i EMS al contenidor de productes contaminats. Rentem les cèl·lules amb medi YPD 1X. Fem vòrtex i centrifuguem de nou. S'eliminà el sobrenedant al contenidor de productes contaminats. En aquest moment s'han de deixar les cèl·lules en gel.

A partir d'aquest moment es pot traslladar les cèl·lules a un laboratori de tipus 2, normal, i seguir la resta de protocol. Es resuspengué les cèl·lules amb 1 ml de YPD líquid i amb la pipeta i una punta amb filtre homogeneïtzem el cultiu. Finalment s'esperà una densitat de $1,25 \cdot 10^7$ cel/ml més o menys.

Es sembrà 100µl del medi del cultiu líquid A i B, i es feu un banc de dilucions en que a cada dilució es sembrà 100µl fins aconseguir tenir plaques que contenen de 10^4 cel, 10^3 cel i 10^2 cel. Cada placa de petri amb YPD+Agar contenia de 4 a 5 boles de vidre estèril de 4mm (MERCK), que van servir per plaquejar i distribuir uniformement el cultiu per la placa. Es deixà el cultiu a 30°C de 2 a 5 dies fins que es pogueren comptar.

7.5.-Generació d'una població mutant d'arròs

7.5.1.-Generació de call mitjançant cultiu *in vitro*

Per la generació de call a partir de llavor, s'ha de començar esterilitzant llavors d'arròs. En el nostre cas es va utilitzar llavors de la varietat d'arròs de tipus japònica. S'elimina les cobertes exteriors de la llavor corresponents a la lema i la pala mitjançant acció mecànica. Les llavors pelades es posen agrupades en saquets de tela porosa i es renten en alcohol 70% durant 1 minut. Durant un minut més, es submergeixen en aigua estèril per eliminar les restes d'alcohol. Tot seguit es deixen en un vas de precipitats amb un agitador magnètic rentant-se durant 30 minuts en una solució de 16mg de HClO₂/L és a dir, un dilució al 30% del llegiu comercial (que conté uns 50mg/L HClO₂ aproximadament) i una gota de tween 20 que serveix per trencar la tensió superficial i permetre que el llegiu penetri fins a zones menys accessibles.

A partir d'aquest moment es treballa sota condicions d'esterilitat, és a dir, dins d'una campana de flux laminar. Després es fan 3 rentats amb aigua destil·lada cada 10 minuts. Les llavors es sembren en una placa de OryCIM (Calli Induction Medium) complementat amb 2,4D (Medi 3. Després de 2 o 3 setmanes en aquest medi i en fosc ja s'ha format call embriogènic que servirà per mutagenitzar.

7.-Materials i mètodes

7.5.2.-Mutagènesis

Per realitzar la mutagènesis es va seguir un protocol molt estricte de seguretat. Aquest comprenia la realització total de la reacció de mutagènesis en un laboratori químic especialitzat en treballar amb substàncies perilloses. L'equip personal consistia en protecció individual amb guants de nitrovinil units a la bata utilitzant cinta i a sobre d'aquests, guants de làtex intercanviables cada cop que s'entrava en contacte amb el producte mutagenitzant, bata, ulleres de protecció. Contenedors especials per eliminar els productes de rebuig propis com el mutagen i utensilis que hagin entrat en contacte amb ell.

La mutagènesis de call, comença utilitzant calls embriogènics de 2 a 3 setmanes utilitzant el medi ORYZIM + 2,4-D. Es recullen els call que son més òptims per mutagenitzar, és a dir, els que son friables. Si tenim en compte que cada call regenerarà una plàntula i que no tots ho acabaran fent, hem d'utilitzar un gran nombre d'aquests per tal d'assegurar-nos una bona població mutant.

Els calls es dipositaran a agitar durant 12 hores en un recipient tipus Easyflask (NUNC) de 375 ml amb un volum de 90ml de OryCIM (Medi 11) líquid (com a màxim de 110ml de medi de cultiu per mutagenitzar), sense hormona 2,4-D i amb antioxidants

El mutagen utilitzat fou una mescla de més 2% de EMS (W/V) o 2mg en 100 ml de OryCIM i afegir 10ml de la solució EMS/medi a cada Easyflask. Un cop tapat el Easyflask, es cobreix amb paper d'alumini comercial per evitar que la llum pugui afectar al compost i a continuació, es diposita en l'agitador dins d'una campana d'extracció per evitar l'emissió de gasos. Els flascs i el seu contingut es mantindran en suspensió durant 2 hores a 150 rpm mitjançant un agitador horitzontal. Passades les dues hores, s'elimina el sobrenedant amb molta cura dins d'un contenidor especial per a productes tòxics. Es netegen els calls amb una solució de 200 ml OryCIM líquid fins 10 cops (deixant entre 2-5 minuts entre rentat). Cada rentat s'elimina el sobrenedant al contenidor de líquids. Tot i que després dels nombrosos rentats dins la campana es pot assegurar que s'ha eliminat la totalitat del producte, qualsevol precaució és necessària. Els calls mutagenitzats un cop estan nets de mutagen s'han de tractar amb la mateixa cura, que si encara continguessin part del producte, ja que d'aquesta forma s'evitaran accidents. Un cop acabada la neteja es sembren 14 calls en un medi OryCIM en fosc amb 4,5 g de Gelrite (Duchefa) i sense 2,4-D durant 15-30 dies.

7.5.3.-Regeneració de plàntules a partir de call mutagenitzat

Passades 4 setmanes es transfereixen els calls a un medi de regeneració MSM (Medi 12) en llum que conté varies hormones com l'auxina àcid Naftalenacètic i la combinació de les Citoquines Bezilaminopurina i Kinetina que estimularan al call a formar estructures tals com arrels, fulles. Teòricament, en 6 dies aproximadament, dels calls surten cèl·lules fotosintètiques que indiquen diferenciació, i comencen a fabricar fulles i arrels. Un cop s'estan formant aquestes estructures, es podrà passar la plàntula a un medi d'arrelament RM (Medi 13) entre 2 i 5 setmanes i posteriorment quan tingui les estructures del tot formades i una mida de 10-15 cm. es podran passar a l'hivernacle.

Un cop estan regenerades les plantes s'han de posar en una càmera amb una alt contingut d'humitat (entre el 60-70%), per tal d'aclimatar-la des del 95-100% d'humitat de l'interior dels tubs en medis RM al 40-50% d'humitat d'un hivernacle. Aquest pas progressiu és vital per la supervivència de la planta i dura al voltant de 1 i 2 setmanes. En el cas de l'arròs la resposta generalment és bona, i ràpidament comença a fabricar fulles amb epidermis més dura, presència de cutícula amb ceres, i una disminució del contingut estomàtic. Un cop la planta regenerada s'aclimata a l'hivernacle, perd les primeres fulles que s'han format dins del tub, ja que aquestes presenten una epidermis molt fina, a causa del procés de regeneració dins d'un ambient amb una humitat de quasi el 90%. Però posteriorment la plàntula es desenvoluparà amb normalitat, formant llavors un cop hagi aconseguit una biomassa que ho faci possible. Les plàntules es passen dins d'uns tests d'uns 200 cm³ que tot i semblar poc volum de terra permet el correcte desenvolupament de la planta i fins i tot la producció de llavors.

7.6.- Garbellat Molecular

7.6.1.-*Sembra en placa de les colònies de llevat mutants*

Les colònies mutagenitzades s'han sembrat en plaques de 25 ml de medi YPD sòlid i s'han re- sembrat de forma ordenada sobre plaques de 100ml de medi on es van disposar fins a 85 colònies. A partir d'aquestes plaques es van sembrar els cultius líquids amb els quals es va treballar.

7.6.2.-*Extracció de DNA de llevat mutant*

Per tal d'extreure suficient quantitat de DNA es feu créixer les cèl·lules en tubs de 15 ml (Tub Greiner) inoculant de 2 a 3 ml de medi YPD líquid (Medi 2) (sempre s'han de deixar 4/5 parts del tub amb oxigen). Es deixà tota la nit a 30°C agitant-se a 250 rpm.

El dia següent es recollí 1 ml de cultiu i es transferí a una tira de 8 tubs d'1,1 ml. Per fer les extraccions es treballà amb caixes de 96 mostres (12 tires de 8 tubs). Es centrifugà a 3000 rpm (1200g) en una centrífuga de plaques (Allegra) a temperatura ambient. S'eliminà el sobrenedant i es resuspengué el "pellet" amb 500 µl d'aigua destil·lada, fent un vòrtex. Es centrifugà de nou a 3000 rpm (1200 g) durant 5 minuts. S'eliminà el sobrenedant S'afegí a cada tub un volum de 200µl de perles de vidre de 425-600µm (SIGMA), més 200µl de tampó d'extracció ADN (Solució 9) a cada tub i després s'afegí 200 µl fenol:cloroform:isoamil alcohol (25:24:1) (SIGMA). Es va fer un vòrtex a la caixa durant 5 minuts.

Un cop es triturà la mostra s'afegí 200µl de TE 1X (Solució 10), i es va fer un vòrtex i es disposà en una centrífuga de plaques a 2500 rpm durant 15 minuts a temperatura ambient.

Es recuperà de 300-350µl de la fase superior en una placa NUNC i es guardà a 4°C.

7.6.3.-*Sembra de material vegetal d'arròs*

En el cas del garbellat en arròs, els calls mutagenitzats després d'haver regenerat, es transplantaren en multipots (Soparco 54x31x4,6 cm) de 12x8, amb un total de 96 plantes per safata. Durant una o dues setmanes es deixen les safates en un túnel d'acimatació, que consisteix en una estructura de plàstic (dins de l'hivernacle) que permet mantenir una alta humitat. Cada safata va enumerada seguint un ordre per tal de poder identificar i localitzar individualment a cada planta un cop es trobi un mutant. En aquest cas es van aclimatar unes 5000 plantes de cultiu in vitro, en multipots de 35cm³ de terra.

7.-Materials i mètodes

7.6.4.- Extracció de DNA d'arròs

Per tal d'extreure el material genètic de l'arròs, utilitzarem una tècnica lleugerament diferent que en llevat. La recollida de mostres a l'hivernacle es realitza en caixes de 96 pous disposades dins d'una caixa de poliestiré expandit amb gel (per evitar que es comenci a degradar el DNA per les DNAses). A cada tub de 8 hi posarem uns 50-100 µg de quars(Merck) i 2 boles de vidre de 4mm (Merck).

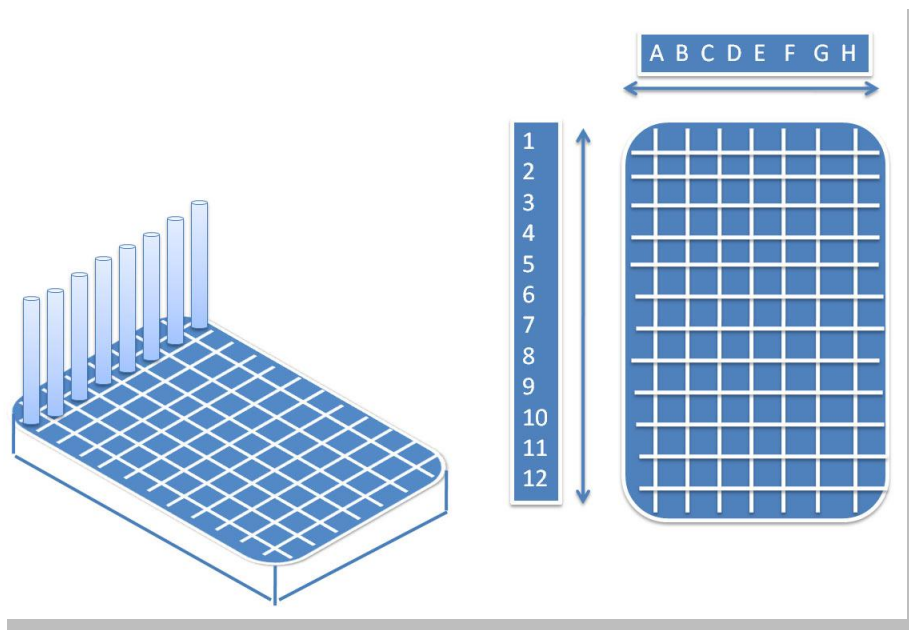


Figura 41: Caixes d'extracció de 96 pous per extreure material vegetal d'arròs. A la dreta hi ha la disposició amb les coordenades necessàries per identificar el DNA mutant i a la planta corresponent.

El material un cop s'ha recollit es congela. En el moment que es vulgui fer l'extracció es treu la caixa del congelador i es diposita a la màquina Mixer Mill (Retsch), i el deixa 1 minut a 30s de freqüència. Un cop triturat el material, s'ha d'observar que estigui del tot homogeni. Utilitzant la multicanal s'afegeix 200µl de TAMPÓ d'Extracció D'ARRÒS (solució 11) + SDS 20% (solució 12) i es deixa 30 minuts a 65°C. Un cop passat el temps es neteja la caixa d'aigua i s'afegeix 200µl de fenol:cloroform:isoamil alcohol. Es fa un vòrtex lleuger i es centrifuga el material a 3000 rpm durant 15 minuts. Es recull 220µl de DNA per evitar emportar-nos la fase intermitja que és on hi ha restes vegetals i fenol:cloroform. Es carreguen 10µl de DNA en un gel d'agarosa del 1%.

7.-Materials i mètodes

7.6.5.-Generació de Pools i precipitació

Per tal de reduir la feina, agruparem les mostres en grups de 4 i les diluïrem de 20 a 40 cops. D'aquesta forma, generarem 3 plaques NUNC de 80 pools que contindran aproximadament el DNA de 1000 mostres de llevat. A cada pou de la placa NUNC afegirem uns 50ng de DNA de cada planta i ho portarem fins a 180µl de volum final. Un cop tenim la placa NUNC amb els pools fets, utilitzem 100µl de DNA i els afegim a una altra caixa de tires de 8 tubs, a més de 200µl d'isopropanol (CARLO ERBA). Barregem suaument les mostres i les deixem en repòs durant tota la nit. Centrifugem durant 30 minuts a 3000 rpm a temperatura ambient (Beckman Coulter Allegra). Traiem els taps de les tires de 8 i s'eliminà el sobrenedant. Després girem els tubs cap per avall a tocar amb paper absorbent i els deixem sota la campana d'extracció esperant que s'assequin del tot. Podem esperar entre 1 i 2 hores. Passat el temps resuspendrem en 100µl d'aigua estèril, tapem els tubs amb les tires de taps i deixem en repòs entre 1 i 2 hores i ja podem passar les mostres en una caixa NUNC.

7.6.6.- Reacció d'amplificació de fragment per PCR i heterodúplex

Per amplificar els fragments s'emprarà una reacció de PCR (Polimerase Chain Reaction) utilitzant un volum de 0.32 µl de dNTP's (12,5µM) i una concentració de primers de 10µM. Depenent del fragment a amplificar utilitzem una polimerasa 0.2 µl deTaq o bé una 0.1 µl Pfu polimerasa (que és més acurada a l'amplificar però més lenta) en un volum final de 10 µl.

Met10 B

Nom de la seqüència	Seqüència
Met10B F	CCACTAGCCCAAACATCTGAAG
Met10B R	ATCTAAAGATGCTAAAGAAAGGGGT

	94	5 minuts	
	94	45 sec	
	65	1 min	5 cicles
	72	2:30	
	94	45 sec	
	60	1 min	35 cicles
	72	2:30	
	72	10 min	
	4°C	5 min	

7.-Materials i mètodes

Met10C

I uns primers per la versió *Saccharomyces cerevisiae* pel mateix gen. Ambdós excloents en l'altra espècie, per tal d'evitar amplificació creuada.

Nom de la seqüència	Seqüència
Met10C F	ATACCATTACCTGAGACCTCTGAGA
Met10C R	GGCTAAAGACGCCGAGGA

94	5 minuts
94	45 sec
65	1 min
72	2:30
94	45 sec
60	1 min
72	2:30
72	10 min
4°C	5 min

ACS Exó 123

Pel garbellat del gen ACS, es va dividir el gen en dos fragments. El primer fragment anomenat ACS123, englobava els 3 primers exons, amplificat per la parella de cebadors següents:

Nom de la seqüència	Seqüència
NomsACC123F	AAGGTTGGACGAGCTGCTTA
ACC123R	CAGTGCACGGGTACGATCT

94	5 minuts
94	1 min
65	1 min
72	2:30
94	1 min
60	1 min
72	2:30
72	10 min
4°C	5 min

ACS Exó 4

El 4 exó era amplificat per la parella de cebadors :

Nom de la seqüència	Seqüència
ACC4.2F	CTCATCCCCACCCATACTA
ACC4.2R	CCCAAATGTGGGAGTGGTAG

7.-Materials i mètodes

	96	5 minuts	
	96	1 min	
	60	1 min	35 cicles
	72	1:10	
	72	10 min	
	4°C	5 min	

SGR9 i2 ATG

Pel garbellat molecular del gen SGR (stay Green), es va amplificar utilitzant dos tipus de cebadors

Nom de la seqüència	Seqüència
SGR9 i2 ATG F1	TAAGAGATCCGAGGGAGCAG
SGR9 i2 ATG R2	ACAGATGGATGGATGCCAAT

	96°C	5 minuts	
	96	1 min	
	60	1 min	35 cicles
	72	3:00	
	72	10 min	
	4°C	5 min	

7.6.7.- Reacció d'heterodúplex

Totes les PCR, amplifiquen el fragment per al qual han estat dissenyats els primers. Dins de tot el conjunt de fragments que s'amplifiquen, n'hi ha una part que provenen de la seqüència mutant i d'altres que no. Per tal de poder detectar la mutació s'ha de barrejar el DNA amplificat que contingui la mutació amb el que no la conté, per tal de formar un desaparellament que l'enzim detectarà i tallarà. A cada PCR s'afegeix al final, una sèrie de cicles per generar aquests desaparellament. L'anomenem reacció de generació d'Heterodúplex Consisteix en una reacció que comença a 95°C i a cada cicle que passa es baixa un grau la temperatura. Cada cicle té un temps determinat i una temperatura un grau menor que l'anterior.

	95°C	5 min	
	94	0:50 min	15 cicles
	79	1:40 min	56 cicles
	23	0:30 min	9 cicles
	13	0:20 min	4 cicles

7.-Materials i mètodes

7.6.8.-Digestió de l'heterodúplex per FCE

La pedra angular del garbellat molecular, és la detecció del desaparellament entre la seqüència mutant i la seqüència salvatge (silvestre). El desaparellament es forma en la reacció d'heterodúplex durant la reacció de PCR (explicat en el darrer apartat), però es detecta mitjançant l'ús de l'enzim FCE (Fennel Crude Extract), una mononucleasa extreta del fonoll.

Utilitzem al voltant de 80ng de DNA amplificat per a cada reacció de digestió. El volum dependrà de la quantitat de DNA, per tant el volum d'aigua a afegir a la reacció també dependrà (volum final aigua= 8µl – volum DNA). Afegirem 1µl Tampó de Reacció de FCE (Solució 13) i 1µl de FCE i la digestió es farà a 45°C durant 30 minuts. Per parar la reacció s'afegeix 2µl de solució STOP (Solució 14)

Durant el garbellat treballarem amb plaques de 96 pous per optimitzar el temps. Per altra banda treballarem amb pipetes multicanal de 12, per tal de facilitar la feina.

7.6.9.-Detecció de la mutació mitjançant gel de poliacrilamida

El tall que provocarà l'enzim FCE, generarà varis tipus de fragments de diferents mides. Depenent de la mida, només podrem observar-lo en un gel que tingui una resolució superior. És a dir, que es pugui detectar fragments de fins a 200-300 pb amb una resolució òptima. Per aquest motiu utilitzem els gels d'acrilamida, ja que ens permeten veure fragments de fins a 15-200 pb. S'ha de tenir en compte que l'enzim no talla completament tot el DNA, per tant al gel observarem la banda completa, i la banda tallada i depèn de si hi ha un o dos mutacions, les combinacions entre bandes tallades i no tallades son varies.

Cada gel de poliacrilamida està elaborat a partir de la polimerització entre dos vidres d'una solució de 20ml de acrilamida: Bis Acrilamida (19:1) al 4% (Solució 15) , 40µl de TEMED (Fluka) i 100µl Persulfat d'Amoni 10% (SIGMA). Deixar polimeritzar el gel uns 25 minuts. Subjectar els espaiadors i la pinta on aniran les mostres amb unes pinces. Un cop el gel ha polimeritzat, netejarem d'acrilamida l'espai delimitat per carregar les mostres, amb tampó TBE 1X (Solució 16). Subjectarem els dos vidres amb l'acrilamida al suport de plàstic mitjançant dues pinces i omplir les dues cubetes amb TBE 1X. Un cop la zona on carregarem les mostres estigui coberta de TBE 1X, posarem la pinta (de 54 pous aproximadament) amb cura enfonsant-la suaument a l'acrilamida evitant formar deformacions a la superfície. Un cop està preparat el gel, es carregaran les mostres per ordre, i sempre precedides per dos mostres de marcadors moleculars de DNA amb bandes de mida conegudes. L'electroforesis s'efectuarà a 300V durant 1,5hores i amb un amperatge de 15-20 mA. Passat aquest temps es netejarà els vidres de

7.-Materials i mètodes

possibles restes de TBE i s'analitzaran els resultats en un scanner tipus Typhoon (GE Healthcare) a 526nm (Filtre fluoresceïna) per tal de detectar la senyal del Sybr-Gold.

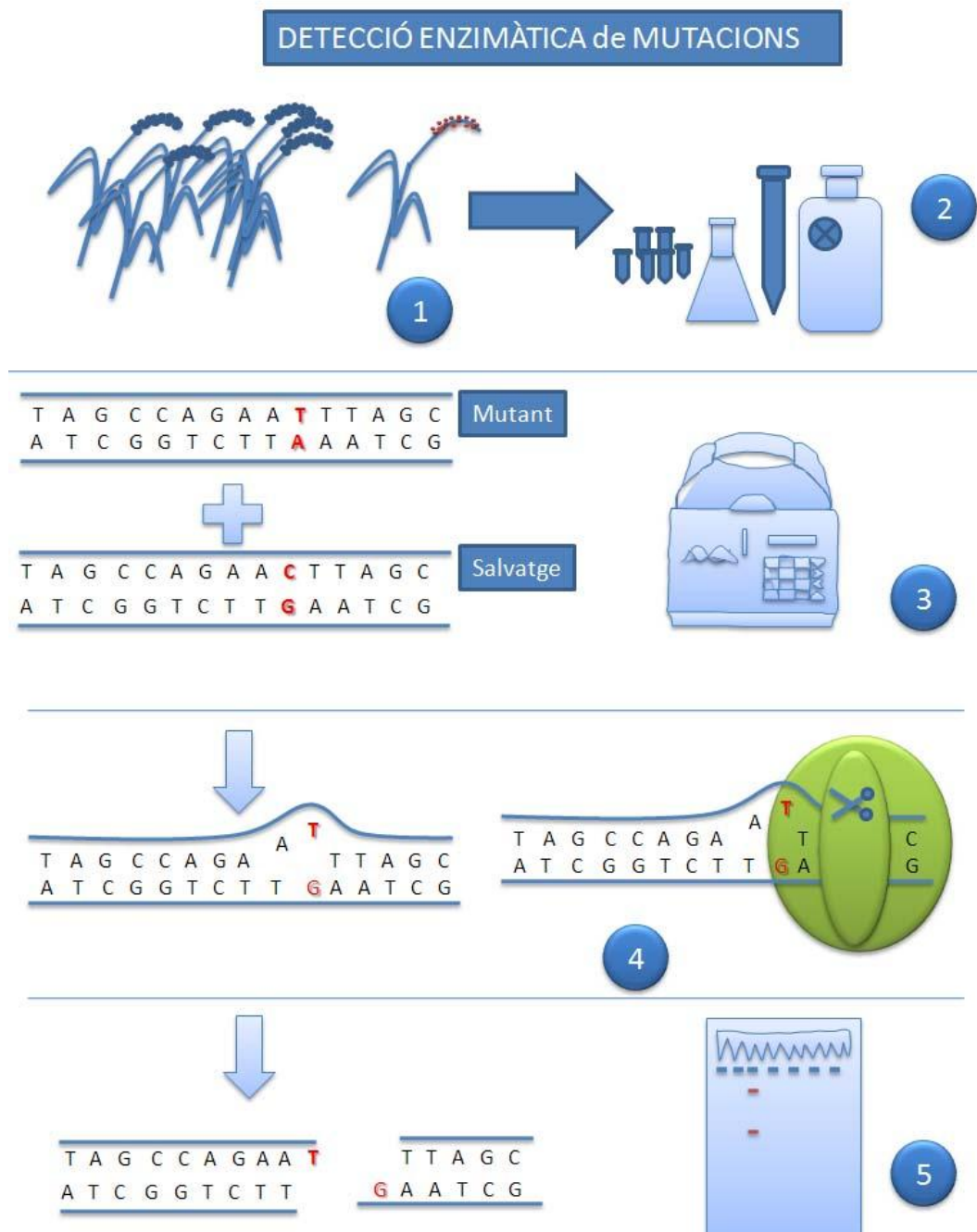


Figura 42: Esquema bàsic de la tècnica de detecció de desaparrellaments per heterodúplex per endonucleasa. **1:** Generació d'una població Mutant **2:** Extracció de DNA **3:** Amplificació del gen d'interès mitjançant PCR i reacció d'Heterodúplex **4:** Tall del desaparrellament mitjançant l'extracte vegetal que conté l'endonucleasa. **5:** Electroforesis en gel d'acrilamida i lectura dels resultats en un escàner de laser.

7.-Materials i mètodes

7.6.10.-Verificació de candidat mitjançant seqüenciació

Qualsevol candidat detectat per electroforesi en el gel d'acrilamida s'ha de verificar per seqüenciació.

Per a cada reacció de seqüenciació s'utilitzarà una quantitat determinada de DNA en funció de la mida de la seqüència (de 5-40 ng). El DNA per la reacció de seqüenciació ha d'estar lliure de nucleòtids i primers, per tant purificarem les mostres utilitzant un filtre tipus Microcon. La reacció de seqüenciació s'utilitzarà 4,2µl de Terminator polimerase (Applied Biosystems), 0,8 µl de primer i el volum d'aigua serà de 15µl menys el volum de DNA necessari per utilitzar de 5 a 40ng.

En la reacció de seqüenciació s'utilitzaran les següents condicions:

	94°C	3 min	
	96	0:10 min	24 cicles
	56	0:15 min	
	60	4:00 min	
	4	5:00 min	

Les mostres s'ha analitzat amb un seqüenciador de DNA per electroforesi capil·lar ABI Prism 3700 Applied Biosystems (96 capil·lars).

7.6.11.- Anàlisis de la descendència

Per tal de determinar l'herència del caràcter, es pot fer un seguiment de les plantes filials a través de dos anàlisis moleculars simultanis. La primera digestió es realitza sobre de material amplificat amb PCR del fragment a analitzar. D'aquesta forma trobarem el heterozigots, ja que durant la reacció d'heterodúplex, formen un desaparellament les còpies dels dos al·lels per la mutació. La segona digestió es realitza per tal de detectar els homozigots mutants, però el material amplificat té la diferència que la reacció d'heterodúplex, es realitza després de la PCR barrejant el DNA dels candidats a analitzar més la mateixa quantitat de fragment d'un control sense mutagenitzar (proporció 1:1). D'aquesta forma, els dos al·lels mutants es barregen amb el fragment control i generen un desaparellament que es fa amb digestió enzimàtica (apartat 7.6.8) i es detecta per acrilamida (apartat 7.6.9). Comparant els talls que apareixen en la 1ª digestió (heterozigots) amb els de la 2ª digestió (Heterozigots i homozigots) i les mostres que no presenten talls, es pot fer el seguiment de la descendència.

7.-Materials i mètodes

7.6.12.-Generació d'una soca deficient pel gen Met10

Amplificant un fragment del plàsmid pFA6a que corresponia al gen de resistència a la geneticina. Mitjançant uns cebadors compostos per una part que servien per amplificar el gen de resistència a la geneticina (G418) i l'altra part que corresponia a la regió del gen Met10, que utilitzant la tècnica de la recombinació homòloga es substituïria el gen Met10. La soca utilitzada per substituir el gen fou la W303, que només conté una còpia del gen.

Nom de la seqüència	Seqüència
Met10C FAKO F	aggtcacccaaatatacaacgagatgccagttgagtttgctaccaatcctttggcgagggtgacggtgctggttta
Met10C FAKO R	agcagcgccgatgtgtgataatacctgcatcttgaagcctcctcgatgaattcgagctcg

	96	5 minuts	
	96	1 min	
	50	30 sec	10 cicles
	72	3:00	
	96	1 min	
	54	30 sec	20 cicles
	72	3:00	
	72	10 min	
	4°C	5 min	

Seguint el protocol de transformació de l'apartat 7.3.6 es va substituir el gen Met10. Les colònies positives es van seleccionar fent créixer les colònies transformades amb geneticina al medi YPD (Medi 1)+ G418 (100mg/L)

Per tal de comprovar la inserció del fragment i comprovar l'eliminació del gen met10, es va amplificar la soca W303 KO amb els primers

Nom de la seqüència	Seqüència
MET10CKOCHK_F:	agcacgtgaccacaattcac
MET10CKOCHK_R	ccaagtagggccacacaagt

	96	5 minuts	
	96	1 min	
	65	1 min	5 cicles
	72	3:40	
	96	1 min	
	55	1 min	35 cicles
	72	3:40	
	72	10 min	
	4°C	5 min	

7.-Materials i mètodes

Aquesta soca, juntament amb la soca mutant 616, la soca de *Saccharomyces carlbergensis* i la soca haploide de *Saccharomyces cerevisiae*, es van fer créixer en dues plaques de medi mínim YNB complementat amb i sense metionina. A partir de 21ml d'aigua MiliQ més 0,5g d'agarosa, s'autoclava i quan la temperatura és aproximadament menor de 60°C s'afegeix 2,5 ml del medi mínim YNB- 10x (Medi 4) i complementat amb 0,25 ml de Histidina (Medi 6), Leucina, (Medi 7), Uracil (Medi 8), Triptòfan (Medi 9), Adenina (Medi 10) i metionina (Medi 5), pel medi YNB-Met+ en un volum final de 25 ml

Per altra banda es repeteix el mateix medi, però sense afegir metionina pel medi YNB-Met- i s'obté un volum final de 25 ml.

Cada placa es va dividir en 4 seccions sembrant a partir d'una sola colònia i es va deixar la placa a temperatura ambient durant 3-4 dies fins a veure's les primeres colònies.

7.6.13.-Anàlisi de creixement en llevat en medi auxotròfic amb i sense metionina

Durant la comprovació de l'eficiència de la mutagènesis en llevat, es van obtenir mutants per la soca cervesera industrial. Concretament es van obtenir mutants pel gen Met10, en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Per tal de saber si s'havia desactivat totalment el gen, i partint de la informació prèvia, que aquest gen tenia una còpia desactivada, es va voler testar l'eficiència en el creixement en un medi mínim auxotròfic per la metionina, ja que sabem que la soca amb el gen Met10 desactivat és incapaç de sintetitzar metionina. A partir de 25 ml del medi mínim YNB- 10x (Medi 4) i complementat amb 2,5 ml de Histidina (Medi 6), Leucina,(Medi 7), Uracil (Medi 8), Triptòfan (Medi 9), Adenina (Medi 10) i metionina (Medi 5), pel medi YNB-Met+ en un volum final de 250 ml i 25ml de YNB- 10x (Medi 4) sense metionina amb un volum final de 250ml de YNB

Per fer l'experiment es va partir d'un pre-cultiu en medi YPD (Medi 2) que va créixer durant tota una nit (unes 14 hores). Es concentrà un nombre de cèl·lules de 10^7 unitats a partir del pre-cultiu sense saturar i per calcular-ho es va sonicar 8 segons al 28% , primer i després es va llegir la densitat òptica amb un espectrofotòmetre (UV mini-1240 CE Shimadzu Corporation) a 600nm. Cada cultiu de cada soca es va rentar amb 500 µl de medi YNB sense Metionina dos cops, centrifugant 2 minuts 1000 rpm.

7.-Materials i mètodes

L'assaig amb Medi mínim YNB, va partir de 9,75 ml de medi YNB amb Metionina i sense, més 0.25ml YNB amb 10^7 unitats de llevat de cada soca. En cada un d'aquests medis es van fer créixer les soques mutants 160, 616, 680, 751, 771, 813, 815 i la soca cervesera com a control negatiu (sense mutagenitzar).

Es va fer un total de 4 lectures cada dues hores en un espectrofotòmetre utilitzant 1ml i sonicant 8 segons al 28% cada cop abans de llegir la densitat òptica a 600 nm en un espectrofotòmetre.

8.-Agraïments

Volia dedicar uns agraïments a totes les persones amb qui he col·laborat durant tots aquests anys de tesis i que a través dels seus consells o de la seva experiència han contribuït en aquest projecte. Gràcies Judith Luque, Iolanda, Sonia que junts vàrem sembrar moltes colònies de llevat. Gràcies Belen Sànchez i Xavi Serrat, per la vostra experiència en cultiu in vitro i de sembres a l'hivernacle. Gràcies Jaume Mercadé i Jordi Segura, per les vostres converses sobre biologia i sobre Astronomia. Merci Toni Espinosa, pels consells, per la ciència, la informàtica i la música, molta música. Merci Elena Aibar i Olga Durany pels vostres coneixements de microarrays i pels consells tècnics de burocràcia administrativa . Thanks Rich for our english-spanish tandems. I learned a lot molecular biology with you. I won't forget Sevilla my friend. Moltes gràcies Manoli Medina, i Teresita Sotolongo pel vostre humor, i pels cops que m'heu solucionat un problema (o més). Volia donar uns agraïments especials per aquests darrers anys que hem col·laborat junts i perquè heu hagut d'aguantar el procés final de redacció d'una tesis, gràcies Tania Vila, Marta Pujol , Sergi Navarro. De vosaltres he après molt i no només en ciència. Merci Ricky Joshi per les xerrades sobre postdocs. Gràcies Marissé, per la teva ajuda a última hora.

Gràcies també pel que he après de Nathalie Guibourt, Eric Lalane i Tamara Maes.

Finalment volia agrair especialment a Arola Fortian, la teva ajuda incondicional durant tot aquest temps. Ara començarem un viatge fantàstic.

Part d'aquest projecte és vostre en certa mesura i demano disculpes si m'he oblidat d'algú en aquests agraïments

9.-Bibliografia

- ¹ Cordain L, Ungar P (2006) Implications of Plio-Pleistocene Hominin Diets for Modern Humans. In: Early Hominin Diets: The Known, the Unknown, and the Unknowable. (Ed.) Oxford University Press, Oxford 363–83.
- ² Morin E (2008) Evidence for declines in human population densities during the early Upper Paleolithic in western Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(1):48-53.
- ³ Reeding RW (1988) A general explanation of subsistence change: From hunting and gathering to food production. *Journal of Anthropological Archaeology* 7(1):56-97.
- ⁴ Kislev ME, Weiss E, Hartmann A (2004) Impetus for sowing and the beginning of agriculture: Ground collecting of wild cereals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (9):2692-2695.
- ⁵ Wang RL, Stec A, Hey J, Lukens L, Doebley J (1999) The limits of selection during maize domestication. *Nature* 398:236-239.
- ⁶ Encyclopaedia Britannica. <http://www.britannica.com>
- ⁷ Sweeney M, McCouch S (2007) The Complex History of the Domestication of Rice. *Annals of Botany* 100:951-957.
- ⁸ Ji HS, Chu SH, Jiang W, Cho YI, Hahn JH, *et al.*, (2006) Characterization and Mapping of a Shattering Mutant in Rice That Corresponds to a Block of Domestication Genes. *Genetics* 173: 995–1005.
- ⁹ Doebley J, Stec A, Wendel J, Edwards M (1990) Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: implications for the origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9888-9892.
- ¹⁰ Dillon S, Shapter FM, Henry RJ, Codeiro G, Izquierdo L *et al.*, (2007) Domestication to crop Improvement: Genetic Resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). *Annals of Botany* 100:975-989.
- ¹¹ Pourkheirandish M, Komatsuda T (2007) The importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective. *Annals of Botany* 100:999-1008.
- ¹² Fuller DQ (2007) Contrasting Patterns in crop Domestication and Domestication rates: Recent Archaeobotanical Insights from the Old World. *Annals of Botany* 100:903-924.
- ¹³ Barceló J, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R (1992) *Fisiología vegetal*. Pirámide Ediciones.
- ¹⁴ Smith BD (1989) Origins of Agriculture in Eastern North America. *Science* 246:1566-1571.
- ¹⁵ Wang H, Nussbaum-Wagler T, Li B, Zhao Q, Vigouroux Y, Faller M, Bomblies-Yant K, Lukens L, Doebley J (2005) The origin of the naked grains of maize. *Nature* 436(7051): 714–719.
- ¹⁶ Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez JG, Buckler E, and John Doebley (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (9):6080-6084.
- ¹⁷ Willcox G (2004) Measuring grain size and identifying Near Eastern cereal domestication: evidence from the Euphrates valley. *Journal of Archaeological Science* 31:145-150

9.-Bibliografia

- ¹⁸ Shulaev V, Korban SS, Sosinski B, Abbott AG, Aldwinckle HS, Folta KM, Iezzoni A, Main D, Arús P, Dandekar AM, Lewers K, Brown SK, Davis TM, Gardiner SE, Potter D, Veilleux RE (2008) Multiple Models for Rosaceae Genomics. *Plant Physiology* 147: 985–1003.
- ¹⁹ Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T (2007) Domestication, Genomics and the Future for Banana. *Annals of Botany* 100: 1073–1084.
- ²⁰ Doebley J, Stec A, Hubbard L (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386:485-488.
- ²¹ Kebrom TH, Burson BL, Finlayson SA (2006) Phytochrome B Represses Teosinte Branched1 Expression and Induces Sorghum Axillary Bud Outgrowth in Response to Light Signals. *Plant Physiology* 140:1109–1117.
- ²² Doust A. (2007) Architectural Evolution and its Implications for Domestication in Grasses. *Annals of Botany* 100: 941–950.
- ²³ Takeda T, Sawa Y, Suzuki M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M, Ueguchi C (2003) The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. *The Plant Journal* 33: 513–520.
- ²⁴ Arnqvist L, Dutta PC, Jonsson L, Sitbon F (2003) Reduction of Cholesterol and Glycoalkaloid Levels in Transgenic Potato Plants by Overexpression of a Type 1 Sterol Methyltransferase cDNA1. *Plant Physiol* 131:1792-99.
- ²⁵ Sánchez-Pérez R, Jørgensen K, Olsen CE, Dicenta F, Møller BL (2008) Bitterness in Almonds. *Plant Physiology* 146: 1040–1052.
- ²⁶ Diamond J (2006) Armas, gérmenes y acero. *Debate Editorial*.
- ²⁷ Sweeney MT, Thomson MJ, Cho YG, Park YJ, Williamson SH, Bustamante CD, McCouch SR (2007) Global Dissemination of a Single Mutation Conferring White Pericarp in Rice. *Plos Genetics* 3(8):1418-1424.
- ²⁸ Ross-Ibarra J, Morrell PL, Gaut BS (2007) Plant domestication, a unique opportunity to identify the genetic basis of adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 :8641–8648
- ²⁹ Pääbo S (1999) Neolithic genetic engineering. *Nature* (1999) 398:194-195.
- ³⁰ Jarvisa DI, Brown AHD, Cuong PH, Collado-Panduro L, Latournerie-Moreno L, *et al.*, (2008) A global perspective of the richness and evenness of traditional crop-variety diversity maintained by farming communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(14): 5326–5331.
- ³¹ Weeden N. (2007) Genetic Changes Accompanying the Domestication of *Pisum sativum*: Is there a Common Genetic Basis to the ‘Domestication Syndrome’ for Legumes? *Annals of Botany* 100: 1017–1025.
- ³² Katsura K, Maeda S, Horie T, Shiraiwa T (2007) Analysis of yield attributes and crop physiological traits of Liangyoupeijiu, a hybrid rice recently bred in China. *Field Crops Research* 103(3):170-177.
- ³³ Waines JG, Ehdai B (2007) Domestication and Crop Physiology: Roots of Green-Revolution Wheat. *Annals of Botany* 100: 991–998.
- ³⁴ Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM *et al.*, (1999) Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400:256-261.

9.-Bibliografia

- ³⁵ Thomas H, Howarth CJ (2000) Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany* 51:329-337.
- ³⁶ Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.
- ³⁷ Widodo, Patterson JH, Newbigin E, Tester M, Bacic A, Roessner U (2009) Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany* 60, (14): 4089–4103.
- ³⁸ Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355(1402): 1517–1529.
- ³⁹ Wei W, Huang J, Hao YJ, Zou HF, Wang HW, *et al.*, (2009) Soybean GmPHD-Type Transcription Regulators Improve Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis Plants. *PLoS ONE* (2009); 4 (9) e7209.
- ⁴⁰ Xie ZM, Zou HF, Lei G, Wei W, Zhou QY, *et al.*, (2009) Soybean Trihelix Transcription Factors GmGT-2A and GmGT-2B Improve Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Transgenic Arabidopsis. *PLoS ONE* 4 (9) e6898.
- ⁴¹ Demirbaç A (2002) Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. *Energy Conversion and Management* 43:2349-2356.
- ⁴² Huber GW, Sara Iborra S, Corma A (2006) Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering. *Chem. Rev.* 106 (9): 4044-4098.
- ⁴³ Khush GS (2001) Green revolution: the way forward *Nature Reviews Genetics* 2:815-822.
- ⁴⁴ Waines JG, Ehdaie B (2007) Domestication and Crop Physiology: Roots of Green-Revolution Wheat. *Annals of Botany* 100: 991–998.
- ⁴⁵ International Rice Research Institute (1967) *Annual Report for 1966*, 59–82.
- ⁴⁶ Spielmeier W, Ellis MH, Chandler PM (2002) Semidwarf (sd-1), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (13): 9043–9048.
- ⁴⁷ FAO. Faostat 2008.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- ⁴⁸ Rice Situation and Outlook Yearbook 2008. Nathan Childs. Economic Research Service, USDA (2009)
<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/RCS-yearbook/RCS-yearbook-02-17-2009.pdf>
- ⁴⁹ Mendel G (1865) Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn, Bd. IV für das Jahr* Abhandlungen, (1966) 3–47
- ⁵⁰ Johannsen WL (1905) *Arvelighedslærens elementer*. Copenhagen.
- ⁵¹ Avery O, MacLeod C, McCarty (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *M J Exp Med* 79 (2): 137–158.
- ⁵² Watson JD (2003) *DNA. The secret of life*. Ed Santillana Ediciones Generales
- ⁵³ Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg AJ (1958) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. I. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from *Escherichia coli*. *Biol. Chem.* 233 (1): 163–170.

9.-Bibliografia

- ⁵⁴ Watson JD, and Crick FHC (1953) A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171:737–738
- ⁵⁵ Matthaei HJ, Jones OW, Martin RG Nirenberg, MW (1962) Characteristics and Composition of RNA Coding Units. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 (4): 666-677.
- ⁵⁶ Matthaei H, Nirenberg (1962) Characteristics and Stabilization of DNAase-Sensitive Protein Synthesis in *E. Coli* Extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 (4): 1580–1588.
- ⁵⁷ Min JW, Haegeman G, Ysebaert M, Fiers W (1972) Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature* 237 (5350): 82–8.
- ⁵⁸ Fiers W, Contreras R, Duerinck F, Haegeman G, Iserentant D, Merregaert J, Jou WM, Molemans F, Raeymaekers A, Berghe A, *et al.*, (1976) Complete nucleotide-sequence of bacteriophage MS2-RNA - primary and secondary structure of replicase gene. *Nature* 260, 500-507.
- ⁵⁹ So M, Boyer HW, Betlach M, Falkow S (1976) Molecular Cloning of an Escherichia coli Plasmid Determinant That Encodes for the Production of Heat-Stable Enterotoxin. *Journal of Bacteriology* 128(1):463-472.
- ⁶⁰ Boyer HW (1984) Clinical Application of Biological Research. *West J Med.* 141(2): 238–239.
- ⁶¹ Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56:341-361.
- ⁶² Mullis KB (1983) Process for amplifying nucleic acid sequences. US Pat Num 4,683,202.
- ⁶³ Bartlett JMS, Stirling D (2003) A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol. Biol.* 226:3-6.
- ⁶⁴ Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265(5596):687-95.
- ⁶⁵ International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- ⁶⁶ Venter C, *et al.*, (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* 5507:1304-1351
- ⁶⁷ Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814):796-815.
- ⁶⁸ International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436(7052):793-800.
- ⁶⁹ Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Rothberg JM, *et al.*, (2005) Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature* 437(7057): 376–380.
- ⁷⁰ A Dictionary of Biology. 2004. *Encyclopedia.com*. <http://www.encyclopedia.com>
- ⁷¹ Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306:234-238.

9.-Bibliografia

- ⁷² Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1073-1080.
- ⁷³ Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1066-1073.
- ⁷⁴ Jetten AM, Yankaskas JR, Stutts MJ, Willumsen NJ, Boucher RC (1989) Persistence of abnormal chloride conductance regulation in transformed cystic fibrosis epithelia. *Science* 1472-1475.
- ⁷⁵ Wilkes D, Shaw J, Anand R, Riley J, Winter P, Wallis J, Driesel AG, Williamson R, Chamberlain S (1991) Identification of CpG islands in a physical map encompassing the Friedreich's ataxia locus. *Genomics* 9(1):90-95.
- ⁷⁶ Maniatis T, Hardison RC, Lacy E, Lauer J, O'Connell C, Sim DQK, Efstratiadis A (1978) The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* 15 (2):687-701.
- ⁷⁷ Hsiao CL, Carbon J (1979) High-frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast ARG4 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76,(8):3829-3833.
- ⁷⁸ Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- ⁷⁹ Culbertson MR (2007) Navigation without a Road map. *Genetics* 177:1-7.
- ⁸⁰ Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814):796-815.
- ⁸¹ *Variation and Variability*. Yale University. 1995.
<http://www.cbc.yale.edu/old/cce/papers/ALife/node2.html>. Retrieved 2007-05-24.
- ⁸² McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 36:344-55.
- ⁸³ McClintock B (1953) Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics* 38:579-99.
- ⁸⁴ Martin C, Carpenter R, Sommer H, Saedler H, Coen ES (1985) Molecular analysis of instability in flower pigmentation of *Antirrhinum majus*, following isolation of the *pallida* locus by transposon tagging. *EMBO. J.* 4(7): 1625-1630.
- ⁸⁵ Coen ES, Carpenter R, Martin C (1986) Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell* 47(2):285-96.
- ⁸⁶ Ballinger DG and Benzer S (1989) Targeted gene mutation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9402-9406.
- ⁸⁷ Kaiser K, Goodwin S (1990) Site-selected transposon mutagenesis in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1686-1690.
- ⁸⁸ Koes R, Souer E, Houwelingen AV, Mur L, Spelt C, Quattrocchio F, Wing J, Oppedijk B, Ahmed S, Maes T, Gerats T, Hoogeveen P, Meesters M, Kloos D, Mol JNM (1995) Targeted Gene Inactivation in *Petunia* by PCR-Based Selection of Transposon Insertion Mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (18) 8149-8153.
- ⁸⁹ Van Sluys MA, Tempe J, Fedoroff N (1987) Studies on the introduction and mobility of the maize Activator element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. *The EMBO Journal* 6 (13):3881 -3889.

9.-Bibliografia

- ⁹⁰ Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Korber H, Redei GP, Schell J. (1989) High-frequency T-dna-mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8467-8471.
- ⁹¹ Weigel D, Ahn JH, Blázquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Fernández C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, *et al.*, (2000) Activation Tagging in Arabidopsis. *Plant Physiology* 122: 1003–1013.
- ⁹² Alonso JM, Stepanova AN, Lisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, *et al.*, (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301 (5633): 653-7.
- ⁹³ Jeong DH, An S, Kang HG, Moon S, Han JJ, Park S, Lee HS, An K, An G. (2002) T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology*. 130 (4):1636-44.
- ⁹⁴ Ayliffe MA, Payota M (2007) A barley activation tagging system. *Plant Molecular Biology*. 64:329-347.
- ⁹⁵ Winterberg KM, Reznikoff WS (2007) Screening Transposon Mutant Libraries Using Full-Genome Oligonucleotide Microarrays. *Methods in Enzymology* 421: 110-125.
- ⁹⁶ Takabatake T, Ishihara H, Ohmachi Y, Tanaka I, Nakamura MM, Fujikawa K, Hirouchi T, Kakinuma S, Shimada Y, Oghiso Y, Tanaka K. (2008) Microarray-based global mapping of integration sites for the retrotransposon, intracisternal A-particle, in the mouse genome. *Nucleic Acids Res.* (2008); 36(10):e59.
- ⁹⁷ Maes T, Gerats T (1999) Method of parallel screening for insertion mutants and a kit to perform this method. Patent WO/1999/027085.
- ⁹⁸ Michiel Vandenbussche, Antoine Janssen, Jan Zethof, Nathalie van Orsouw, Janny Peters, Michiel J.T. van Eijk, Anneke S. Rijpkema, Harrie Schneiders, Parthasarathy Santhanam, Mark de Been, Arjen van Tunen and Tom Gerats (2008) Generation of a 3D indexed Petunia insertion database for reverse genetics *The Plant Journal* 54, 1105–1114.
- ⁹⁹ Marton I, Wullems GJ, Molendijk I, Schilperoort RA. (1979) In vitro transformation of cultured-cells from nicotiana-tabacum by agrobacterium-tumefaciens. *Nature* 277 (5692): 129-131.
- ¹⁰⁰ Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, *et al.*, (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(15): 4803-7.
- ¹⁰¹ Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation *Nature* 304(5922): 184-187.
- ¹⁰² Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303 (5914), 209-13.
- ¹⁰³ Hooykaas-Van Slogteren GMS, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1984) Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with Agrobacterium tumefaciens. *Nature* 311(5988): 763-4.
- ¹⁰⁴ Hernalsteens JP, Thia-Toong L, Schell J, Van Montagu M (1984) An Agrobacterium-transformed cell culture from the monocot Asparagus officinalis. *EMBO Journal* 3(13): 3039-41.
- ¹⁰⁵ Monsanto website: www.monsanto.com
- ¹⁰⁶ AgrEvo website: <http://www.agrevo.de/>

9.-Bibliografia

- ¹⁰⁷ Izant JG, Weintraub H (1984) Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36 (4):1007-1015.
- ¹⁰⁸ Melton DA (1985). Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:144-148.
- ¹⁰⁹ Holt JT, Gopal TV, Moulton AD, Nienhuis AW (1986) Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4794-4798.
- ¹¹⁰ Dias N, Stein CA (2002) Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics* 1:347-355.
- ¹¹¹ Kusaba M (2004) RNA interference in crop plants. *Current Opinión in biotechnology* 15:139-143.
- ¹¹² Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, *et al.*, (2005) Antisense Transcription in the Mammalian Transcriptome. *Science* 309; (5740):1564-1566.
- ¹¹³ Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279–289.
- ¹¹⁴ Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR (1990) Flavonoid Genes in *Petunia*: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. *The Plant Cell*; 2 (4):291-299.
- ¹¹⁵ Ingelbrecht I, Houdt H, Montagu M, Depicker A (1994) Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10502-10506.
- ¹¹⁶ Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996); 93: 8449-8454.
- ¹¹⁷ Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 391:806-811.
- ¹¹⁸ Hamilton AJ, Baulcombe DC. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286(5441):950-952.
- ¹¹⁹ Pandolfini T, Molesini B, Avesani L, Spena A, Polverari A (2003) Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the *rolC* promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. *BMC Biotechnology* 3:7.
- ¹²⁰ Meli VS, Ghosh S, Prabha TN, Chakraborty N, Chakraborty S, Datta A (2010) Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Online edition.
- ¹²¹ Rosalind C, Rhonda L, Feinbaum L, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5), 843-854.
- ¹²² Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E (2008) Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132(1):9-14.
- ¹²³ Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002) Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. *The Plant Cell* 14: 1605–1619.

9.-Bibliografia

- ¹²⁴ Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101(9):2999-3004.
- ¹²⁵ Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD (2007) Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 120(5): 1046–1054.
- ¹²⁶ Ma L, Weinberg RA (2008) Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet*. 24(9):448-56.
- ¹²⁷ Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, Roberts LR, Schmittgen TD (2008) Association of MicroRNA Expression in Hepatocellular Carcinomas with Hepatitis Infection, Cirrhosis, and Patient Survival. *Clin Cancer Res*. 14(2): 419–427.
- ¹²⁸ Muller (1927) Artificial transmutation of the gene. , H. J. *Science*66, 84-87.
- ¹²⁹ Stadler LJ (1928) Mutation in barley induced by X-rays and radium. *Science* 68, 186-187.
- ¹³⁰ Bryson V, Davidson H (1951) Spontaneous and ultra -violet-induced mutations to phage resistance in escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37(12): 784–791.
- ¹³¹ Krieg DR (1963) Ethyl methanesulfonate-induced reversion of bacteriophage T4rII mutants. *Genetics* 48: 561-580 .
- ¹³² Puck TT, Kao FT (1967) Genetics of Somatic Mammalian Cells, V. Treatment with 5-Bromodeoxyuridine and Visible Light for Isolation of Nutritionally Deficient Mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58 (3):1227-1234.
- ¹³³ Oeschger NS, Hartman PE (1970) ICR-Induced Frameshift Mutations in the Histidina Operon of Salmonella. *Journal of Bacteriology* 101 (2): 490-504.
- ¹³⁴ Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse *Genetics* 76 (11): 5818-5819.
- ¹³⁵ Oeschger NS, Hartman PE (1970) ICR-Induced Frameshift Mutations in the Histidine Operon of Salmonella *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2):490-504.
- ¹³⁶ Ames BN, Lee FD, Durston WE (1970) An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70,(3):782-786.
- ¹³⁷ Carlson PS (1970) Introduction and isolation of auxotrophic mutants in somatic Cell Cultures of *Nicotiana tabacum*.. *Science*. 168 (3930) 487-489.
- ¹³⁸ Carlson PS (1973) Methionine Sulfoximine-Resistant Mutants of Tobacco. *Science*. 180 (4093): 1366-1368.
- ¹³⁹ Sung ZR (1976) Mutagenesis of cultured plant cells. *Genetics* 84: 51-57.
- ¹⁴⁰ Christianson ML, Chiscon MO (1978) Use of haploid plants as bioassays for mutagens. *Environ. Health Perspect* 27: 77-83.
- ¹⁴¹ Chaleff RS, Ray TB (1984) Herbicide-Resistant Mutants from Tobacco Cell Cultures

9.-Bibliografia

Science 223(4641):1148-1151.

¹⁴² Carroll BJ, Mcneil DI, Gresshoff PM (1985) Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4162-4166.

¹⁴³ Newhouse KE, Smith WA, Starrett MA, Schaefer TJ, Singh BK (1992) Tolerance to Imidazolinone Herbicides in Wheat. *Plant Physiol.* 100: 882-886.

¹⁴⁴ Eshaghpour H, Crothers DM (1978) Preparative separation of the complementary strands of DNA restriction fragments by alkaline RPC-5 chromatography. *Nucleic Acids Research* 5(1):13-21.

¹⁴⁵ Oefner PJ, Underhill PA (1995) Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet.* 57, A266.

¹⁴⁶ Yu B, Sawyer NA, Caramins M, Yuan ZG, Saunderson RB, Pamphlett R, Richmond DR, Jeremy RW, Trent RJ (2005) Denaturing high performance liquid chromatography: high throughput mutation screening in familial hypertrophic cardiomyopathy and SNP genotyping in motor neurone disease. *Trent. J Clin Pathol* 58:479–485.

¹⁴⁷ Pavan M, Ruiz VF, Silva FA, Sobreira TJ, Cravo RM, Vasconcelos M, Marques LP, Mesquita SMF, Krieger JE, Lopes AAB, Oliveira PS, Pereira AC Xavier-Neto J (2009) ALDH1A2 (RALDH2) genetic variation in human congenital heart disease *BMC Medical Genetics* 10:113.

¹⁴⁸ Lott ST, Chen N, Chandler DS, Yang Q, Wang L, Rodriguez M, Xie H, Balasenthil S, Buchholz TA, Sahin AA, *et al.*, (2009) DEAR1 Is a Dominant Regulator of Acinar Morphogenesis and an Independent Predictor of Local Recurrence-Free Survival in Early-Onset Breast Cancer. *PLoS Medicine* 6 (5). e1000068.

¹⁴⁹ McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S (2000) Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123: 439–442.

¹⁵⁰ Fischer SG, Lerman LS (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16(1):191-200.

¹⁵¹ Fischer SG, Lerman LS (1980) Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(8):4420-4424.

¹⁵² Stekrova J, Reiterova J, Svobodova S, Kebrdlova V, Lnenicka P, Merta M, Viklicky O, Kohoutova M (2009) New mutations in the *PKD1* gene in Czech population with autosomal dominant polycystic kidney disease *BMC Medical Genetics* 10:78.

¹⁵³ Young SR, Pilarski RT, Donenberg T, Shapiro C, Hammond LS, Miller J, Brooks KA, Cohen S, Tenenholz B, DeSai D, *et al.*, (2009) The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 9:86.

¹⁵⁴ Half E, Bercovich D, Rozen P (2009) Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 4:22.

¹⁵⁵ Sugano A, Tsuchimoto H, Cho TC, Kimura M, Asakawa S (2005) Succession of methanogenic archaea in rice straw incorporated into a Japanese rice field: estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. *Archaea* 1, 391–397.

9.-Bibliografia

- ¹⁵⁶ Trifonova R, Postma J, Schilder MT, van Elsas JD (2009) Microbial Enrichment of a Novel Growing Substrate and its Effect on Plant Growth. *Microb Ecol* (2009) 58:632–641.
- ¹⁵⁷ Henco K, Heibey M (1990) Quantitative PCR: the determination of template copy numbers by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6733-6734.
- ¹⁵⁸ Hestekin CN, Barron AE (2006) The potential of electrophoretic mobility shift assays for clinical mutation detection. *Electrophoresis* 27: 3805–3815.
- ¹⁵⁹ Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT (2003) Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. *Clinical Chemistry* 49 (3) :396–406 .
- ¹⁶⁰ Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C (2004) Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons *Clinical Chemistry* 50 (7):1156–1164.
- ¹⁶¹ Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT (2008) High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine. *Exp Mol Pathol.* 85(1): 50–58.
- ¹⁶² Takano EA, Mitchell G, Fox SB, Dobrovic A (2008) Rapid detection of carriers with *BRCA1* and *BRCA2* mutations using high resolution melting analysis. *BMC Cancer* 8:59.
- ¹⁶³ Berggren P, Steineck G, Adolfsson J, Hansson J, Jansson O, Larsson P, Sandstedt B, Wijkström H, Hemminki K (2001) p53 mutations in urinary bladder cancer *British Journal of Cancer* 84(11), 1505–1511.
- ¹⁶⁴ Golubovskaya VM, Conway K, Edmiston SN, Tse CK, Lark AL, Livasy CA, Moore D, Millikan RC, Cance WG (2009) FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer. *Int J Cancer.* 125(7): 1735–1738.
- ¹⁶⁵ Seidelin JB, Broom OJ, Olsen J, Nielsen OH (2009) Evidence for Impaired CARD15 Signalling in Crohn's Disease without Disease Linked Variants *PLoS ONE* 4 (11). e7794.
- ¹⁶⁶ Gogos JA, Karayiorgou M, Aburatani H, Kafatos FC (1990) Detection of single base mismatches of thymine and cytosine residues by potassium permanganate and hydroxylamine in the presence of tetralkylammonium salts. *Nucleic Acids Research* 18 (23):6807.
- ¹⁶⁷ Lu AL, Clark S, Modrich P (1983) Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4639-4643.
- ¹⁶⁸ Han A, Shibata T, Takarada T, Maeda M (2002) Gene mutation assay using a MutS protein-modified electrode. *Nucleic Acids Research Supplement* 2 287-288.
- ¹⁶⁹ Li CZ, Long YT, Lee JS, Kraatz HB (2004) Protein–DNA interaction: impedance study of MutS binding to a DNA mismatch. *Chem. Commun.* 574 – 575.
- ¹⁷⁰ Cho M, Lee S, Han SY, Park JY, Rahman MA, Shim YB, Ban C (2006) Electrochemical detection of mismatched DNA using a MutS probe. *Nucleic Acids Research* 34 e75.
- ¹⁷¹ Vogt VM. (1973) Purification and Further Properties of Single-Strand-Specific Nuclease from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Biochemistry* 33, 192-200.

9.-Bibliografia

- ¹⁷² Kole R, Sierakowska H, Szemplinska H, Shugar D (1974) Mung bean nuclease: mode of action and specificity vs synthetic esters of 3'-nucleotides *Nucleic Acids Research* 1 (5):699-706.
- ¹⁷³ Oleykowski CA, Mullins CRB, Godwin AK, Yeung AT (1998) Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acid Research* 26(20):4597-4602.
- ¹⁷⁴ Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S (2001) High-Throughput Screening for Induced Point Mutations. *Plant Physiology* 126: 480–484.
- ¹⁷⁵ Till BJ, Reynolds SH, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E, Codomo CA, Enns LC, Odden AR, Greene EA, Comai L, Henikoff S(2004) Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biology* 4:12.
- ¹⁷⁶ Till BJ, Cooper J, Tai TH, Colowit P, Greene EA, Henikoff S, Comai L, (2007) Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biology* 7:19.
- ¹⁷⁷ Wienholds E, Van Eeden F, Kosters M, Mudde J, Plasterk RH, Cuppen E (2003) Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res.* 13:2700-2707.
- ¹⁷⁸ Winkler S, Schwabedissen A, Backasch D, Bökel C, Seidel C, Bönisch S, Fürthauer M, Kuhrs A, Cobreros L, Brand M, González-Gaitán M (2005) Target-selected mutant screen by TILLING in *Drosophila*. *Genome Research* 15:718–723.
- ¹⁷⁹ Cooper JL, Till BT, Laport RG, Darlow MC, Kleffner JM, Jamai A, El-Mellouki T, Liu S, Ritchie R, Nielsen N, Bilyeu K, Meksem K, Comai L, Henikoff S (2008) TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biology* 8:9.
- ¹⁸⁰ Vogt VM (1973) Purification and Further Properties of Single-Strand-Specific Nuclease from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Biochemistry* 33, 192-200.
- ¹⁸¹ Till BJ, Burtner C, Comai L, Henikoff S (2004) Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acid Research* 32(8):2632-2641.
- ¹⁸² Southern EM, Maskos U, Elder JK. (1992) Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics* 13(4):1008-17.
- ¹⁸³ Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittman M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* 14:1675-1680.
- ¹⁸⁴ Bellis G, Castiglioni G, Bordoni R, Mezzelani A, Rizzi E, Frosini A, Busti E, Consoladni C, Bernardi LR, Battaglia C (2002) Ligase detection reaction (LDR) and universal array (Zip Code): application to DNA genotyping. *Minerva Biotecnologica* 14:247-252.
- ¹⁸⁵ Syvänen AC, Aalto-Setälä K, Harju L, Kontula K, Söderlund H (1990) A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics* 8(4):684-92.
- ¹⁸⁶ Syvänen AC (1999) From Gels to Chips: "Minisequencing" Primer Extension for Analysis of Point Mutations and Single Nucleotide Polymorphisms. *Human Mutation* 13:1.10 .

9.-Bibliografia

- ¹⁸⁷ Hirschhorn JN, Sklar P, Lindblad-Toh K, Lim YM, Ruiz-Gutierrez M, Bolk S, Langhorst B, Schaffner S, Winchester E, Lander ES (2000) SBE-TAGS: An array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (22):12164–12169.
- ¹⁸⁸ Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvänen AC (2000) A System for Specific, High-throughput Genotyping by Allele-specific Primer Extension on Microarrays. Genome Research 10:1031–1042.
- ¹⁸⁹ Gerry NP, Witowski NE, Day J, Hammer RP, Barany G, Barany F (1999) Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. Journal of Molecular Biology 292 (2):251-262.
- ¹⁹⁰ Jung C, Yim SC, Cho DY, Chang HN, Park HG (2008) Microarray-based detection of Korean-specific BRCA1 mutations. Analytical and Bioanalytical Chemistry 391: 1618-2642.
- ¹⁹¹ Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Rothberg JM, *et al.*, (2005) Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature* 437(7057): 376–380.
- ¹⁹² Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, No. 21 4407-4414.
- ¹⁹³ Rigola D, Oeveren J, Janssen A, Bonne A, Schneiders H, Poel HJA, Orsouw NJ, Hogers RCJ, Both MTJ, Eijk MTJ (2009) High-Throughput Detection of Induced Mutations and Natural Variation Using KeyPoint™ Technology PLoS ONE 4 (3) e4761.
- ¹⁹⁴ Vogt VM (1973) Purification and Further Properties of Single-Strand-Specific Nuclease from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Biochemistry* 33, 192-200.
- ¹⁹⁵ Wiegand RC, Godson NG, Radding CM (1975) Specificity of the S1 Nuclease from *Aspergillus oryzae*. *The Journal of Biological Chemistry* 250(22): 8848-8855.
- ¹⁹⁶ Fujimoto M, Kuninaka A, Yoshino H (1974) Purification of a nuclease from *Penicillium citrinum*. *Agric. Biol. Chem* 38: 777–783.
- ¹⁹⁷ Shenk TE, Rhodes C, Rigby PWJ, Berg P (1975) Biochemical Method for Mapping Mutational Alterations in DNA with S1 Nuclease: The Location of Deletions and Temperature-Sensitive Mutations in Simian Virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72(3): 989:993.
- ¹⁹⁸ Dodgson JB, Wells RD (1977) Action of Single-Strand Specific Nucleases on Model DNA Heteroduplexes of Defined Size and Sequence. *Biochemistry* 16 (11):2374-2379.
- ¹⁹⁹ Yang B, Wen X, Kodali NS, Oleykowski CA, Miller CG, Kulinski J, Besack D, Yeung JA, Kowalski D, and Yeung AT (2000) Purification, Cloning, and Characterization of the CEL I Nuclease *Biochemistry* 39: 3533-3541.
- ²⁰⁰ Pimkin M, Caretti E, Canutescu A, Yeung JB, Cohn H, Chen Y, Oleykowski CA, Bellacosa A, Yeung AT (2007) Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation detection *BMC Biotechnology* 7:29.
- ²⁰¹ Kulinski J, Besack D, Oleykowski CA, Godwin AK, Yeung AT. (2000) CEL I enzymatic mutation detection assay. *Biotechniques* 29(1):44-6, 48.

9.-Bibliografía

- ²⁰² Naka Y , Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, Shimonaga T, Hattori M, Ashikari T (2009) Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid Dna Research 16:115–129.
- ²⁰³ Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. (1996) Life with 6000 genes. Science 274(5287):546, 563-7.
- ²⁰⁴ Elena B. Kabotyanski, Chengming Zhu, Deborah A. Kallickl and David B. Roth (1995) Hairpin opening by singlestrand-specific nucleases. Nucleic Acids Research 23 (19):3872-3881.
- ²⁰⁵ SantaLucia J (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 95:1460-1465.
- ²⁰⁶ Baumann U, Ronald Frank R, Blocker H (1986) Conformational analysis of hairpin oligodeoxyribonucleotides by a single-strand-specific nuclease. Eur. J. Biochem. 161:409-413.
- ²⁰⁷ Kroeker WD, Kowalsky D, Laskowski M (1976) Mung Bean Nuclease I. Terminally Directed Hydrolysis of Native DNA. Biochemistry 15(20): 4463-4467.
- ²⁰⁸ Gao H, Huang J, Barany F , Cao W (2007) Switching base preferences of mismatch cleavage in endonuclease V: an improved method for scanning point mutations. Nucleic Acids Research 35 (1):1-6.
- ²⁰⁹ Hansen J, Kiehlund MC (1996) Inactivation of Met10 in brewer's yeast specifically increases SO₂ formation during beer production. Nature Biotechnology 14: 1587-1591.
- ²¹⁰ Martini AV (1989) *Saccharomyces-paradoxus* comb. Nov., a newly separated species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex based upon nDNA/nDNA homologies. Systematic and Applied Microbiology (1989) 12 (2):179 -182.
- ²¹¹ Directiva 95/02/CE del Parlamento Europeo y del Consejo Superior de 20 de febrero de 1995, relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes.
- ²¹² Poulton JRS (1970) *Die Wynboer*. Chemical protection of wine against oxidation. 466, 22-23
- ²¹³ Ough CS, Crowell EA (1987) Use of sulphur dioxide in winemaking. *J. Food Sci.* 52: 386-389.
- ²¹⁴ Bartowsky EJ, Henschke PA (1995) Malolactic fermentation and wine flavor. The Australian Grapegrower and Winemaker. Annual Technical Issue 83-94.
- ²¹⁵ Tarlo SM, Sussman GL (1993) Asthma and Anaphylactoid reactions to food additives. Canadian Family Physician. 39:1119-1123.
- ²¹⁶ Zamora–Martín F (2005) El anhídrido sulfuroso; algunas reflexiones sobre este aditivo. *Enólogos* (2005); 38.
- ²¹⁷ Martini AV, Kurtzman CP (1985) Deoxyribonucleic Acid Relatedness among Species of the Genus *Saccharomyces Sensu Stricto*. International Journal of Systematic Bacteriology, 508-511.
- ²¹⁸ Yamagishi H, Ogata T (1999) Chromosomal structures of bottom-fermenting yeasts. Syst. Appl. Microbiol. 22:341-353.
- ²¹⁹ PiSkur J, Smole S, Groth C, Petersen RF, Pedersen MB (1998) Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus *Saccharomyces*. International Journal of Systematic Bacteriology 48, 1015-1024.

9.-Bibliografia

- ²²⁰ Montrocher R, Verter MC, Briolay J, Gautier C, Marmeisse R (1998) Phylogenetic análisis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphism of rDNA spacer sequences. *Internacional Journal of Systematic Bacteriology* 48: 295-303.
- ²²¹ Naka Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, Shimonaga T, Hattori M, Ashikari T (2009) Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, and Interspecies Hybrid. *Dna Research* 16, 115–129.
- ²²² Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES (2003) Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423:241-254.
- ²²³ Park H, Bakalinsky AT (2000) SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16(10):881-8.
- ²²⁴ Hanser J, Kielland-Brandt MC (1996) Inactivation of *MET2* in brewer's yeast increases sulfite in beer. *Journal of Biotechnology* 50:75-87.
- ²²⁵ Masselot M, De Robichon-Szulmajster H (1975) Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Genetical analysis of auxotrophic mutants. *Mol Gen Genet* 139(2):121-32.
- ²²⁶ Pauline C, Henikoff S (2006) Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7:61–80.
- ²²⁷ Geourjon C, Deleage G (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci*; 11(6):681-684 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html
- ²²⁸ Kelley LA, Sternberg MJE (2009) Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4 (3):363-371.
- ²²⁹ Campagne F (2000) Clustalnet: the joining of Clustal and CORBA. *Bioinformatics* 16 (7) :606-12.
- ²³⁰ Segal GA. (1984) A review of the genetic effects of ethylmethanesulfonate. *Mut. Res.* 134(2-3):113-42.
- ²³¹ Kaldenhoff R, Fischer M (2006) Aquaporins in plants. *Acta Physiol* 187, 169–176.
- ²³² Schmidt (1924) Histologische studien an phanerogamen Vegetationspunkten. *A. Bot. Arch.* 8: 345-404.
- ²³³ Satina S, Blakeslee AF, Avery AG (1940) Demonstration of the Three Germ Layers in the Shoot Apex of *Datura* by Means of Induced Polyploidy in Periclinal Chimeras. *American Journal of Botany* 27 (10): 895-905.
- ²³⁴ Satina S, Blakeslee AF (1943) Periclinal Chimeras in *Datura* in Relation to the Development of the Carpel. *American Journal of Botany* 30 (7): 453-462.
- ²³⁵ Tax FE, Durbak A (2006) Meristems in the Movies: Live Imaging as a Tool for Decoding Intercellular Signaling in Shoot Apical Meristems. *The Plant Cell* 18:1331–1337.
- ²³⁶ [Elliot Meyerowitz](http://www.its.caltech.edu/~plantlab/) website: <http://www.its.caltech.edu/~plantlab/>
- ²³⁷ Neuffer MG (1957) Additional evidence on the effect of x-ray and ultraviolet radiation on mutation in maize. *Genetics* 273–282.

9.-Bibliografia

- ²³⁸ Amano E, Smith HH (1965) Mutations induced by ethylmethanesulfonate in maize. *Mutation Research* 2: 344–351.
- ²³⁹ Mottinger JP (1970) The effects of X-rays on the bronze and shrunken loci in maize. *Genetics* 64: 259–271.
- ²⁴⁰ Colijn CM, Kool AJ Nijkamp HJJ (1979) An effective chemical mutagenesis procedure for *Petunia hybrida* cell suspension cultures. *Theoretical and Applied Genetics* 55:101-106.
- ²⁴¹ Enciclopedia Britannica (<http://www.britannica.com>)
- ²⁴² Waggoner PE, Dimond AE (1954) Nonspecificity of the Triple Response for Ethylene. *Science* 119 (3082):123-124.
- ²⁴³ Barry CS, Fox EA, Yen HC, Lee S, Tie-jin, Grierson D, Giovannoni JJ (2003) Analysis of the Ethylene Response in the epinastic Mutant of Tomato. *Plant Physiology* 127:58-66.
- ²⁴⁴ Theologis A. (1992) One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70:181-184.
- ²⁴⁵ Jakubowicz M (2002) Structure, catalytic activity and evolutionary relationships of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme of ethylene synthesis in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*. 49:757-774.
- ²⁴⁶ Osborne D (1977) Ethylene and target cells in the growth of plants. *J. Sci. Prog. Oxf* 64:51-63.
- ²⁴⁷ Liberman M, Mapson LW. (1964) Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature*;204:343–5.
- ²⁴⁸ Yang SF, Hoffmann NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35:155–189.
- ²⁴⁹ Tsuchisaka A, Theologis A. (2004) Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology* 136:2982–3000.
- ²⁵⁰ Yamagami T, Tsuchisaka A, Yamada K, Haddon WF, Harden LA, Theologis A. (2003) Biochemical diversity among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. *Journal of Biological Chemistry* 278:49102–49112.
- ²⁵¹ Vandenbussche F, Vriezen WH, Smalle J, Laarhoven LJ, Harren FJ, Van Der Straeten D. (2003) Ethylene and auxin control the Arabidopsis response to decreased light intensity. *Plant Physiology* 133, 517–527.
- ²⁵² Thain SC, Vandenbussche F, Laarhoven LJ, Dowson-Day MJ, Wang ZY, Tobin EM, Harren FJ, Millar AJ, Van Der Straeten D. (2004) Circadian rhythms of ethylene emission in Arabidopsis. *Plant Physiology* 136, 3751–3761.
- ²⁵³ Peng HP, Lin TY, Wang NN, Shih MC. (2005) Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in Arabidopsis during hypoxia. *Plant Molecular Biology*. 58:15–25.
- ²⁵⁴ Chae HS, Faure F, Kieber JJ (2003) The Eto1, eto2, and eto3 Mutations and Cytokinin Treatment Increase Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis by Increasing the Stability of ACS Protein *The plant Cell*. 15:545-559.

9.-Bibliografia

- ²⁵⁵ Murchie EH, Yang J, Hubbart S, Horton P, Peng S (2002) Are there associations between grain-filling rate and photosynthesis in the flag leaves of field-grown rice? *Journal of Experimental Botany* 53 (378): 2217-2224.
- ²⁵⁶ Jiang GH, He YQ, Xu CG, Li XHZhang Q (2004) The genetic basis of stay-green in rice analyzed in a population of doubled haploid lines derived from an indica by japonica cross. *Theor Appl Genet* 108:688–698.
- ²⁵⁷ Young TE, Meeley RB, Gallie DR(2004) ACS synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize *The Plant Journal* 40, 813–825.
- ²⁵⁸ Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 1;36(Web Server issue):W465-9.
- ²⁵⁹ Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797.
- ²⁶⁰ Isshiki M, Tsumoto A, Shimamoto Ko (2006) The serine/Arginine-Rich Protein Family in Rice Plays Important Roles in Constitutive and Alternative Splicing of Pre-mRNA. *The Plant Cell* 18:146-158.
- ²⁶¹ Tarun AS, Lee JS, Theologis A (1998) Random mutagenesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: A key enzyme in ethylene biosynthesis.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9796–9801.
- ²⁶² Gallie DR, Juifen JGL, Jolley CB (2009) Tissue-specific expression of the ethylene biosynthetic machinery regulates root growth in maize. *Plant Mol Biol* 69:195–211.
- ²⁶³ Hirano K, Aya K, Hobo T, Sakakibara H, Kojima M, Shim RA, Hasegawa Y, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M (2008) Comprehensive Transcriptome Analysis of Phytohormone Biosynthesis and Signaling Genes in Microspore/Pollen and Tapetum of Rice *Plant Cell Physiol.* (2008); 49(10):1429–1450.
- ²⁶⁴ De Martinis D, Mariani C. (1999) Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 11(6):1061-72.
- ²⁶⁵ De Martinis D, Cotti G, te Lintel Hekker S, Harren FJ, Mariani C. (2002) Ethylene response to pollen tube growth in *Nicotiana tabacum* flowers. *Planta* 214(5):806-12.
- ²⁶⁶ Mól R, Filek M, Machackova I, Matthys-Rochon E (2004) Ethylene synthesis and auxin augmentation in pistil tissues are important for egg cell differentiation after pollination in maize. *Plant Cell Physiol.* 45(10):1396-405.
- ²⁶⁷ Llop-Tous I, Barry CS, Grierson D (2000) Regulation of Ethylene Biosynthesis in Response to Pollination in Tomato Flowers. *Plant Physiology* 123:971–978.
- ²⁶⁸ Mercadé J., Espinosa A, Adsuara JE, Adrados R, Segura J, Maes T. (2009) Orymold: ontology based gene expression data integration and analysis tool applied to rice. *BMC Bioinformatics* 10: 158.
- ²⁶⁹ USDA National Nutrient Database: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
- ²⁷⁰ Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing.
- ²⁷¹ Cha KW, Lee YJ, Koh HJ, Lee BM, Nam YW, Paek NC (2002) Isolation, characterization, and mapping of the stay green mutant in rice. *Theoretical Applied Genetics* 104:526-532.

9.-Bibliografia

- ²⁷² Mae T (1997) Physiological nitrogen efficiency in rice: Nitrogen utilization, photosynthesis, and yield potential. *Plant and Soil* 196:201-210.
- ²⁷³ Scofield GN, Hirose T, Aoki N, Furbank RT (2007) Involvement of the sucrose transporter, OsSUT1, in the long-distance pathway for assimilate transport in rice. *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3155–3169.
- ²⁷⁴ Murchie EH, Yang J, Hubbart S, Horton P, Peng S (2002) Are there associations between grain-filling rate and photosynthesis in the flag leaves of field-grown rice?. *Journal of Experimental Botany* 53 (378):2217-2224.
- ²⁷⁵ Jiang H, Li M, Liang N, Yan H, Wei Y, Xu X, Liu J, Xu Z, Chen F, Wu G (2007) Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice. *The plant Journal* 52:197-209.
- ²⁷⁶ Sato Y, Morita R, Nishimura M, Yamaguchi H, Kusaba M (2007) Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *PROC. NATL. ACAD. SCI.* 104 (35):14169-14174.
- ²⁷⁷ Aubry S, Mani J, Hörtensteiner S (2008) Stay-green protein, defective in Mendel's green cotyledon mutant, acts independent and upstream of pheophorbide a oxygenase in the chlorophyll catabolic pathway. *Plant Molecular Biology* 67:243-256.
- ²⁷⁸ McBee GG, Waskom RM, Creelman RA (1983) Effect of Senescence on Carbohydrates in Sorghum During Late Kernel Maturity Status *Crop Science*(1983) 23:372-376
- ²⁷⁹ Park SY, Yu JW, Park JS, Li J, Yoo SC, Lee NY, Lee SK, Jeong SW, Seo HS, Koh HJ, Jeon JS, Park YI, Paek NC (2007) The Senescence-Induced Staygreen Protein Regulates Chlorophyll Degradation.. *The Plant Cell* 19: 1649–1664.
- ²⁸⁰ Armstead I, Donnison I, Aubry S, Harper J, Hörtensteiner S, James C, Mani J, Moffet M, Ougham H, Roberts L, Thomas A, Weeden N, Thomas H, King I (2007) Cross-species identification of Mendel's I locus. *Science* 5;315(5808):73.
- ²⁸¹ Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II degradation during senescence. Makoto Kuasaba, Hisashi Ito, Ryouhei Morita, Shuichi Lida, Yutaka Sato, Masaru Fujimoto, Shinji Kawasaki, Ryouichi Tanaka, Hirohiko Hirochika, Minoru Nishimura, and Aymi Tanaka. (2007). *Plant Cell* 19:1362-1375
- ²⁸² Sato Y, Morita R, Katsuma S, Tanaka A, Kusaba M. Two Short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for Chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. (2009). *The Plant Journal*. 57:120-131
- ²⁸³ Morita R, Sato Y, Masuda Yu, Nishimura M, Kusaba M. Defect in non-yellow coloring 3, an a/b hydrolase-fold family protein, causes a stay-green phenotype during leaf senescence in rice. *The Plant Journal* (2009) 59: 940–952
- ²⁸⁴ Chen HH, Li PH, Brenner M (1983) Involvement of Abscisic Acid in Potato Cold Acclimation. . *Plant Physiol.* 71, 362-365
- ²⁸⁵ Kumar P, Henikoff S, Pauline C Ng. (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols* 4(8): 1073-1083
- ²⁸⁶ Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.

9.-Bibliografia

²⁸⁷ SIFT. <http://sift.jcvi.org/>

²⁸⁸ Ng PC, Henikoff S (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function *Nucleic Acids Research* ; 31 (13): 3812–3814.

²⁸⁹ Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols* (2009); 4(8): 1073-1083.

²⁹⁰ Donald CM (1968) The breeding of crop ideotypes. *Euphytica* 17:385–403.

²⁹¹ Duncan WG (1971) Leaf angle, leaf area and canopy photosynthesis. *Crop Science* 11:482–485.

²⁹² Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, Sunohara H, Fujioka S, Ueguchi-Tanaka M, Mizutani M, Sakata K, Takatsuto S, Yoshida S, Tanaka H, Kitano H, Matsuoka M. (2006) Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nat Biotechnol.* 24(1):46-7.

²⁹³ Shi ZY, Wang J, Wan XS, Shen GZ, Wang XQ, Zhang JL (2007) Over-expression of rice OsAGO7 gene induces upward curling of the leaf blade that enhanced erect-leaf habit. *Planta* 226(1):99-108.

²⁹⁴ Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*24; 7(6): 1513–1523.

²⁹⁵ Ish-Horowicz D, Burke JF (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research* 9(13): 2989-2898.

²⁹⁶ Schiestl RH, Gietz RD (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* 16:339-346.

²⁹⁷ Gietz D, Jean AS, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* 20:1425.

²⁹⁸ Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14(6):920-924.