



Universidad
Zaragoza



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

ESTACION EXPERIMENTAL
DE AULA DEI

Trabajo Fin de Grado

Caracterización de la expresión génica en
hojas verdes y albinas de plántulas
obtenidas mediante cultivo in vitro de
anteras de cebada

Autor

David Salcines Cuevas

Director

María Pilar Vallés Brau

Ponente

María Luisa Peleato Sánchez

Estación Experimental de Aula Dei

2015



MINISTERIO
DE ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL
DE AULA DEI



Universidad
Zaragoza

Dña. MARIA PILAR VALLÉS BRAU, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), adscritos a la Estación Experimental de Aula Dei de Zaragoza y Dña. MARIA LUISA PELEATO SÁNCHEZ, Catedrática de Fisiología Vegetal de la Universidad de Zaragoza (UNIZAR):

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado en Biotecnología titulado **“Caracterización de la expresión génica en hojas verdes y albinas de plántulas obtenidas mediante cultivo in vitro de anteras de cebada”** ha sido realizada por DAVID SALCINES CUEVAS en el Departamento de Genética y Producción Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) de Zaragoza bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado en Biotecnología.

Zaragoza, 30 de Noviembre de 2015

Fdo.: María Pilar Vallés Brau

Director

Fdo.: María Luisa Peleato Sánchez

Ponente

ÍNDICE

1.- RESUMEN	1
2.- ANTECEDENTES	2
2.1.- Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	2
2.2.- Plantas doblehaploides	3
2.2.1.- Obtención de plantas doblehaploides	3
2.3.- Albinismo.	5
2.3.1.- Estudios citológicos	6
2.3.2.- Genoma plastidial	6
2.3.3.- Genoma nuclear	7
2.3.4.- Factores fisiológicos	7
3.- OBJETIVOS	8
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1.- Material vegetal.	9
4.2.- Genes analizados.	9
4.3.- Estudios de expresión génica.	10
4.3.1.- Aislamiento de RNA.	10
4.3.1.1.- Homogeneización	10
4.3.1.2.- Extracción	10
4.3.2.- Ajuste de la concentración	10
4.3.3.- Tratamiento con DNAsa I y limpieza del RNA.	10
4.3.3.1.- Tratamiento con DNAsa I.	10
4.3.3.2.- Limpieza del RNA.	11
4.3.4.- Síntesis de cDNA.	11
4.3.5.- PCR semicuantitativa.	11
5.- RESULTADOS	12
5.1.-Clasificación funcional de los genes analizados	12
5.2.-Resultados del análisis de expresión	12
5.2.1.- Genes asociados a la fotosíntesis.	14
5.2.2.- Genes asociados al estrés.	14
5.2.3.- Genes asociados a la expresión génica.	15
5.2.4.- Otros genes.	16
6.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	18
6.1- Las hojas albinas tienen los procesos fotosintéticos alterados y algunas respuestas semejantes a situaciones de estrés	19
6.2- Las hojas albinas sobreexpresan genes asociados a la expresión génica en cloroplastos y a la síntesis de almidón	20
7.- CONCLUSIONES	23
8.- BIBLIOGRAFÍA	24

1.- RESUMEN

La producción de doblehaploides (DH) permite obtener plantas completamente homocigotas en una sola generación acelerando la obtención de nuevas variedades en programas de mejora. En el caso de la cebada (y otros cereales), la producción de DH mediante androgénesis de la microspora tiene como problema asociado la generación de plantas albinas que sobreviven poco tiempo en cultivo in vitro. En este trabajo se pretende estudiar los mecanismos moleculares asociados al albinismo en plantas DH de cebada generada mediante androgénesis. Mediante PCR semicuantitativa se ha medido la expresión de 56 genes, seleccionados en trabajos previos, en dos líneas DH, DH6148 que se caracteriza por un alto porcentaje de embriogénesis y bajo porcentaje de albinismo y DH6183 con bajo porcentaje de embriogénesis y alto porcentaje de albinismo. Los resultados del estudio de la expresión genética han mostrado una disminución de genes asociados a la fotosíntesis en hojas albinas frente a hojas verdes obtenidas mediante cultivo in vitro de la línea DH6183. Por el contrario también se ha observado que genes implicados en la expresión génica en cloroplastos se encuentran sobreexpresados en plantas albinas. Las hojas albinas además parecen presentar una síntesis de almidón activa, esto junto a la deficiencia en mecanismos fotosintéticos indica que los plástidos en plantas albinas presentan características más similares a amiloplastos que a cloroplastos. Las diferencias de expresión no se limitan a las plantas albinas ya que también se han observado respuestas ligadas al estrés debido a las condiciones de cultivo así como diferencias asociadas al genotipo. Estas últimas son de especial relevancia ya que indican la necesidad de tener en cuenta los fenotipos utilizados en el estudio de los mecanismos asociados al albinismo.

1. ABSTRACT

The production of doubled haploids (DH) allows the obtention of completely homozygous plants in a single generation accelerating the development of new varieties in breeding programs. In the case of barley (and other cereals), the DH production by microspore androgenesis has the associated problem of generating albino plants that survive short time in in vitro culture. This work aims to study the molecular mechanisms associated to albinism in DH barley plants generated by androgenesis. Using semiquantitative PCR the expression of 56 genes, selected in previous works, has been measured in two DH lines, DH6148 characterized by a high percentage of embryogenesis and low percentage of albinism and DH6183 that presents a low percentage of embryogenesis and high percentage of albinism. The results of the study have shown a decrease in the expression of genes associated with photosynthesis in albino leaves compared to green leaves obtained by in vitro culture of DH6183. On the contrary, it has also been observed that genes involved in gene expression in chloroplasts are overexpressed in albino plants. Albino leaves also seem to present an active synthesis of starch, this and deficiency in photosynthetic mechanisms indicates that plastids in albino plants are more similar to amyloplasts than chloroplasts. The differences in expression are not limited to albino plants as there have also been observed responses to stress due to growing conditions and differences associated with genotype. The latter are particularly important since they indicate the need to consider phenotypes used in the study of the mechanisms associated to albinism.

2.- ANTECEDENTES

2.1.-CEBADA (*Hordeum Vulgare* L.)

-Características:

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es una planta monocotiledónea de la familia de las gramíneas. Se trata de una planta autógama y diploide con 7 pares de cromosomas.

La planta de cebada presenta raíces fasciculadas, el tallo de la planta está formado por una caña hueca segmentada por nudos (de seis a ocho) de donde nacen las hojas, y tiene una longitud de 50 a 110 centímetros.

En el extremo de cada tallo se encuentra la espiga que está compuesta por un eje llamado raquis donde se insertan las espiguillas. Podemos distinguir dos tipos de cebada dependiendo del número de espiguillas fértiles, si solo las espiguillas centrales son fértiles se denomina de dos carreras, por el contrario si todas las espiguillas son fértiles se denomina de seis carreras (Komatsuda y col. 2007) (Figura 1).



Figura 1: Cebada de dos (2r) y seis (6r) carreras. Foto: Xianmin Chang

-Producción:

Debido a su capacidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales la cebada tiene una distribución geográfica más amplia que otros cereales. Se trata de un cereal de gran importancia económica siendo el cuarto más cultivado a nivel mundial por detrás del trigo, arroz y maíz.

En España la cebada es el cereal con mayor superficie cultivada y mayor producción (Figura 2). La producción en 2013 fue de 10.005.000 toneladas convirtiendo a España en el quinto productor mundial tras Rusia, Alemania, Francia y Canadá (FAOSTATS 2013).

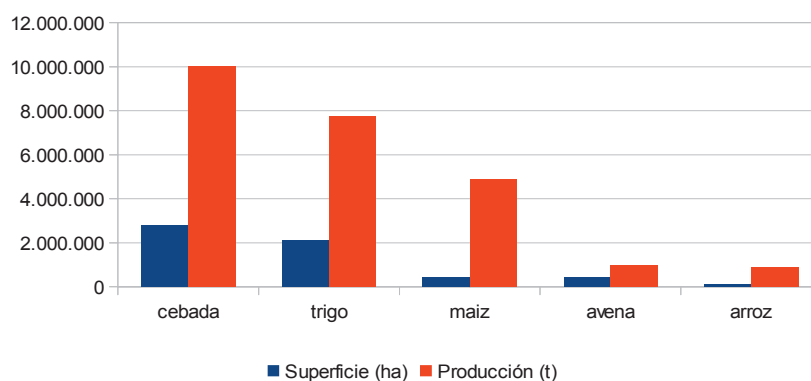


Figura 2: Superficie cultivada (ha) y producción (t) de los principales cereales en España. Fuente: MAGRAMA (Anuario de estadística. Avance 2014)

El principal uso de la cebada, tanto en grano como en forraje, es como alimento para el ganado. En segundo lugar la cebada se utiliza para la producción de bebidas alcohólicas, principalmente la cerveza. Solo una pequeña parte de la cebada producida es utilizada directamente para la alimentación humana.

2.2.-PLANTAS DOBLEHAPLOIDES

Las plantas doblehaploides (DH) se obtienen a partir de plantas haploides, que tienen una dotación cromosómica igual a la gamética, mediante la duplicación cromosómica ya sea espontánea o inducida por métodos químicos. Las plantas DH a diferencia de las haploides son fértiles y además completamente homocigotas.

Los métodos de producción de plantas DH permiten obtener plantas homocigotas en una sola generación, en comparación con otros métodos basados en la autofecundación en los que se necesitan de cinco a seis generaciones (Polci y col. 2010). De este modo, el uso de las plantas DH en programas de mejora permite reducir el tiempo necesario para conseguir nuevas variedades de 4 a 6 años. La producción de plantas DH se puede combinar con técnicas de mutagénesis y transformación permitiendo fijar los caracteres en la primera generación.

2.2.1.-OBTENCIÓN DE PLANTAS DOBLEHAPLOIDES

Si bien las plantas DH pueden generarse *in vivo* de forma espontánea, la frecuencia de inducción es demasiado baja para poder utilizar los DH en los programas de mejora. Por esto, se hace necesario el uso de métodos que permitan la obtención de plantas haploides y doblehaploides de manera más eficiente. Existen distintos métodos para la obtención de plantas DH (Figura 3).

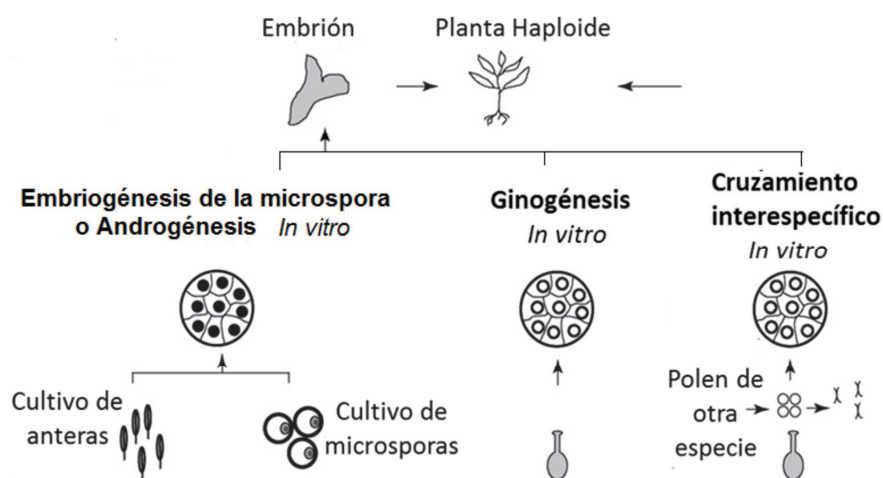


Figura 3: Métodos de producción de plantas haploides (adaptada de Forster y col. 2007): Embriogénesis de la microspora o androgénesis a partir de anteras o microsporas cultivadas *in vitro*; Ginogénesis a partir de óvulos u ovarios cultivados *in vitro*; cruzamiento interespecífico

-Cruzamiento interespecífico:

Consiste en el cruzamiento de la planta de interés con una planta de distinta especie pero del mismo género. La planta de interés se usa como parental femenino mientras que la especie relacionada se usa como parental masculino. Este cruzamiento permite la generación de un embrión haploide por la eliminación de los cromosomas del parental polinizador. En el caso de la cebada, el cruzamiento interespecífico se realiza con *Hordeum bulbosum* (Kasha y col. 1969).

-Ginogénesis:

La ginogénesis *in vitro* se lleva a cabo mediante el cultivo de ovarios o flores completas. Usando condiciones de cultivo apropiadas las células del saco embrionario pueden dar lugar a embriones haploides o doblehaploides.

-Androgénesis:

La androgénesis o embriogénesis de la microspora se basa en el cambio del patrón de desarrollo de la microspora de la vía gametofítica a la esporofítica mediante un tratamiento de estrés. De esta forma la microspora da lugar a un embrión haploide en vez de generar un grano de polen (gameto masculino). La embriogénesis de la microspora se puede realizar mediante el cultivo de anteras o a partir de las microsporas aisladas (Vijay y col. 2014).

Los tratamientos de estrés pueden consistir en cambios de temperatura, tanto con calor como con frío (Touraev y col. 1996, 1997, 2001), cambios de la presión osmótica, inanición por azúcares (Hoekstra y col. 1992), variación del pH (Barinova y col. 2004) o aplicación de inductores químicos como la colchicina (Zhou y col. 2002).

El embrión al generarse a partir de la microspora tiene una dotación cromosómica haploide. La duplicación cromosómica que da lugar a la planta DH puede ocurrir espontáneamente con una alta eficiencia en algunos casos como en cebada con un 70–90%, y con eficiencias más variables y más bajas en otras especies, 25–70% en trigo, 50–60% en arroz, o 50–90% en centeno (Maluszynski y col. 2003). Sin embargo en algunos casos, puede ser necesario el uso de agentes químicos que inhiben la polimerización del huso mitótico como la orizalina, trifluralina o la colchicina, siendo este último el más usado (Germana 2011). Si estos agentes se añaden al medio antes de que el embrión haploide se divida por primera vez se consigue directamente una planta completamente DH.

En el Departamento de Genética y Producción Vegetal de la EEAD-CSIC se ha desarrollado un método basado en la embriogénesis de la microspora a partir del cultivo de anteras para la producción de DH en cebada (Cistué y col. 2003). En este método se aplica un tratamiento de estrés osmótico y por inanición al inocular las anteras en un medio con manitol.

Las anteras tratadas se transfieren a un medio de cultivo donde las microsporas empiezan a dividirse siguiendo la vía esporofítica dando lugar a formaciones de tipo callo (tejido desdiferenciado) o a embriones. Estos embriones son transferidos a un medio de regeneración donde siguen su desarrollo hasta generar plántulas (Figura 4).

Como se ha indicado antes la cebada presenta un alto índice de duplicación cromosómica espontánea lo que permite obtener directamente plantas DH fértiles y completamente homocigotas.



Figura 4: Pasos del proceso de producción de plantas DH mediante cultivo de anteras

2.3. ALBINISMO

Uno de los problemas asociados al cultivo de anteras y microsporas en cereales es la regeneración de plantas albinas que solo sobreviven *in vitro* durante poco tiempo (Figura 5).

El albinismo se produce por la incapacidad que muestran las plantas para producir cloroplastos funcionales y por la tanto de llevar a cabo la fotosíntesis. Este fenómeno ocurre de forma habitual en plantas generadas mediante androgénesis y es especialmente frecuente en cereales incluidos el trigo (Liu y col. 2002), el centeno (Immonen y col. 2000), la avena (Kiviharjuet y col. 2000) y la cebada (Makowska y col. 2014). Dentro de una misma especie algunas variedades son más propensas que otras a mostrar albinismo, así en la cebada el porcentaje de plantas albinas varía del 1 al 99,7% dependiendo del genotipo (Caredda y col. 2000, Castillo y col. 2000).

La causa directa del albinismo en plantas generadas mediante androgénesis es la incapacidad de los protoplástidos para transformarse en cloroplastos funcionales. Pero aún se desconocen los mecanismos que intervienen para crear esta incapacidad. La investigación para entender las causas del albinismo se ha centrado tanto en estudios citológicos como fisiológicos y del genoma plastidial y nuclear.

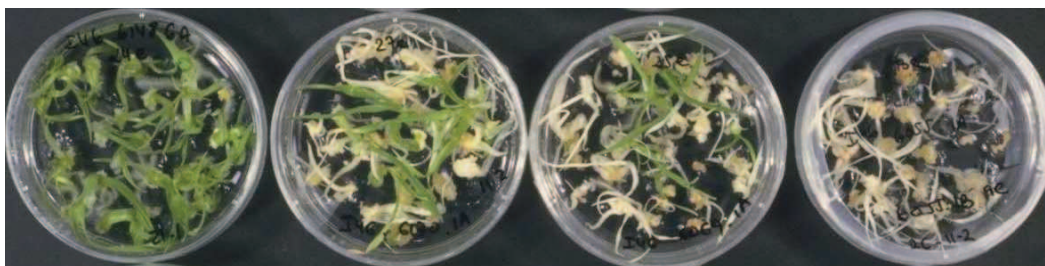


Figura 5: Plántulas verdes y albinas generadas por cultivo de anteras.

2.3.1.-ESTUDIOS CITOLÓGICOS

Los estudios citológicos han analizado los cambios que sufren los plástidos durante el proceso de androgénesis. Se ha propuesto que el estrés utilizado para inducir el cambio en el patrón de desarrollo no afecta a los plástidos, que al no sufrir reprogramación continúan su desarrollo por la vía gametofítica. (Makowska y col. 2014).

En las variedades de cebada Igri y Cork con bajo y alto porcentaje de plantas albinas, respectivamente, se han descrito diferencias morfológicas entre los plástidos de las dos variedades incluso antes del tratamiento de estrés (Careda y col. 1999, 2000, 2004). En la variedad Igri los plástidos presentan un mayor tamaño y eran más abundantes. Estas diferencias parecen indicar que el desarrollo de los plástidos puede estar determinado desde las primeras etapas de la androgénesis. Después del tratamiento de estrés se ha observado una reducción del número de plástidos en las microsporas. Tras unos días de cultivo el número de plástidos observados en Igri fue mucho mayor que en Cork. Además, los plástidos de Cork presentaban una estructura interna menos compleja y acumulaban mayores niveles de almidón, lo que parecía indicar que los plástidos habían derivado a amiloplastos en lugar de cloroplastos, siendo estas características propias de plástidos que no sufren cambio a desarrollo esporofítico.

2.3.2.-GENOMA PLASTIDIAL

Al comparar del genoma plastidial entre plantas verdes y albinas se observó que aunque el genoma plastidial es muy estable, en las plantas albinas había cambios en la estructura, del genoma, principalmente deleciones de entre 10 a 100 kpb (Harada y col. 1992). Estos cambios son especialmente frecuentes en la zona que contiene los genes que codifican para las proteínas de los fotosistemas I y II. Estas deleciones, a su vez, pueden afectar a la conformación del genoma plastidial restante provocando cambios en la transcripción de otros genes (Dunford y col. 1991; Hofinger y col. 2000).

Pese a esto, se han observado también plantas albinas generadas por androgénesis que carecen de estas alteraciones (Dunford y col. 1991; Hofinger y col. 2000), lo que indica que dichas deleciones no son la causa principal del albinismo, si no que pueden ser únicamente una respuesta al estrés (Touraev y col. 2001).

Una observación común entre todas las plantas albinas es la presencia de un patrón de transcripción alterado con niveles especialmente bajos en los genes relacionados con la fotosíntesis o en los genes de RNA ribosomales. (Makowska y col. 2014). Además se han identificado cambios en los niveles de transcripción de genes nucleares que codifican para proteínas de localización plastidial, lo que indicaría que genoma nuclear también intervendría en el funcionamiento anormal de los plástidos (Dunford y col. 1991).

2.3.3.-GENOMA NUCLEAR

Las diferencias en los porcentajes de plantas albinas generadas en las distintas variedades de cebada parecían indicar que el albinismo está, al menos en parte, determinado por factores genéticos.

Mediante el estudio genético de plantas de cebada generadas mediante cruzamiento de variedades propensas al albinismo y variedades poco propensas, se ha observado que los genes causantes de esta característica tienen una herencia mendeliana y que por lo tanto deben ser genes nucleares (Larsen y col. 1991). Para identificar los loci asociados al porcentaje de albinismo se llevó a cabo un estudio en el Departamento de Genética y Producción Vegetal (EEAD-CSIC). En este estudio se identificaron dos QTLs para el porcentaje de plantas verdes situados en los cromosomas 3H y 5H (Muñoz-Amatriaín y col. 2007).

2.3.4.-FACTORES FISIOLÓGICOS

Aunque el albinismo presenta una fuerte dependencia del genotipo, también está influenciado por factores fisiológicos. Así, se han identificado algunos factores tales como el estado de desarrollo de la microspora (He y col. 1984, Liang y col. 1990), el pretratamiento de estrés (Touraev y col. 1996, Kunz y col. 2000), las condiciones de temperatura e iluminación durante la incubación (Huang 1987, Ekiz y col. 1997), el medio de cultivo (Liang y col. 1990) y la duración del cultivo (Cistué y col. 1995, Puolimatka y col. 2000) que pueden influir en la generación de plantas albinas mediante androgénesis.

3.-OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la determinación de las diferencias en la expresión génica entre hojas verdes y albinas en plantas de cebada obtenidas mediante cultivo *in vitro* de anteras. Para ello se han utilizado dos variedades de cebada con distinto porcentaje de regeneración de plantas verdes y albinas.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Identificación de las diferencias en los niveles de expresión génica entre plantas verdes y albinas regeneradas por cultivo de anteras de variedades con alto porcentaje de albinismo.
2. Identificación de cambios en los patrones de expresión debidos a tratamientos de estrés térmico, oscuridad y al propio cultivo *in vitro* que están asociados a las diferencias de expresión entre hojas verdes y albinas.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- MATERIAL VEGETAL

Para este trabajo se utilizaron las líneas doblehaploides de cebada DH6148 y DH6183. Estas líneas se diferencian por el alto porcentaje de embriogénesis y bajo porcentaje de albinismo de la línea DH6148 frente al bajo porcentaje de embriogénesis y alto porcentaje de albinismo de la línea DH6183.

De cada línea se analizaron cuatro tipos de muestras diferentes (Tabla 1). De las dos líneas se tomaron dos muestras de hojas de plantas obtenidas de semilla: (HVP) hoja verde de plántula crecida a 4°C y (HVB) última hoja verde desarrollada en planta crecida en condiciones normales (hoja bandera). Las dos muestras restantes se obtuvieron a partir de plantas obtenidas mediante cultivo *in vitro* de anteras: (HVCA) hoja verde en las dos líneas DH; (HVOCA) hoja verde crecida en la oscuridad (etiolada) de la línea DH6148 y (HACA) hoja albina de la línea DH6183.

Tabla 1: Acrónimos y procedencia de las muestras utilizadas

DH6148		DH6183	
HVP	Hoja verde de planta	HVP	Hoja verde de planta
HVB	Hoja bandera	HVB	Hoja bandera
HVCA	Plantas verdes cultivo <i>in vitro</i>	HVCA	Plantas verdes cultivo <i>in vitro</i>
HVOCA	Plantas etioladas cultivo <i>in vitro</i>	HVACA	Plantas albinas cultivo <i>in vitro</i>

4.2.- GENES ANALIZADOS

Para este estudio se disponía de tres colecciones de genes (CL, QTL-Alb, Ax-Alb). Dos colecciones (CL y QTL-Alb) se habían seleccionado a partir de datos previos del grupo de trabajo:

-Colección CL: compuesta por 30 genes que se inducían en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora y estaban asociados al componente celular plastídico (Vallés y col. resultados no publicados).

-Colección QTL-Alb: compuesta por 17 genes localizados en regiones cromosómicas en las que se habían mapado QTLs asociados al carácter de albinismo en cultivo de anteras de cebada (Muñoz-Amatriain y col. 2008).

-Colección (Ax-Alb): compuesta por 20 genes que se seleccionaron del estudio de Svensson y col. (2006), ya que presentaban distinto nivel de expresión génica entre mutantes albinos de cebada.

4.3.- ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

4.3.1-AISLAMIENTO DEL RNA

4.3.1.1.-HOMOGENEIZACIÓN

Las muestras de hojas se encontraban almacenadas en tubos Eppendorf a -80°C. Para homogeneizar los tejidos se utilizó el Molino Mezclador MM 301 RETSCH con el Kit criogénico. A cada tubo con las muestras congeladas se le añadieron tres bolitas de acero y se colocaron en los bloques criogénicos manteniendo estos en nitrógeno líquido.

Los bloques se acoplaron al Molino mezclador y la homogenización se realizó en dos tandas de 2min a 1.800rpm, sumergiendo brevemente los bloques en nitrógeno líquido entre las tandas para mantener la temperatura. Al terminar los bloques se mantuvieron en nitrógeno líquido.

3.3.1.2.-EXTRACCIÓN

Para la extracción del RNA se utilizó el reactivo Trizol® (Invitrogen) que permite el aislamiento de los ácidos nucleicos mediante una separación de fases obteniendo un volumen final para cada muestra de 100µl. Para la extracción se siguieron las indicaciones de la casa comercial. El protocolo de extracción se puede encontrar en el Anexo I.

4.3.2-AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS

Utilizando del equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) se midió la concentración de RNA en cada muestra en µg/µl y se determinó su pureza midiendo la relación de absorbancias a 260/280, que refleja la presencia de proteínas y la relación a 260/230 que nos indica la presencia de sales.

Con los valores de las concentraciones se realizó una dilución de cada muestra en agua DEPC para obtener 10µg de RNA en un volumen total de 100µl.

4.3.3.- TRATAMIENTO CON DNASA I Y LIMPIEZA DEL RNA

4.3.3.1.-TRATAMIENTO CON DNASA I

A cada dilución preparada anteriormente se le añadió 1µl de DNAsa I y se incubaron en bloque seco durante 10min a 37°C para que actuar a la enzima, tras esto se incubaron durante 15min a 65°C también en bloque seco, para inactivar la enzima.

4.3.3.2-LIMPIEZA DEL RNA

Para la limpieza de las diluciones de RNA se utilizó el kit RNeasy MinElute Cleanup de Qiagen con el fin de eliminar los contaminantes arrastrados durante el proceso de extracción quedando un volumen final de 20 µl. El protocolo de limpieza se puede encontrar en el Anexo II.

4.3.4- SÍNTESIS DEL cDNA

Para la síntesis de cDNA, a cada tubo que contenía los 20µl de RNA se le añadió 1µl de Oligo (dT)₂₀ y se incubó a 70°C durante 10min.

La mezcla de la reacción para la síntesis de cDNA se preparó en un volumen final de 30µl (Anexo III). El volumen final de la reacción para cada muestra fue de 50µl (30µl de Mezcla de reacción + 20µl de RNA). Las reacciones se centrifugaron 10s y se incubaron 1h a 42°C en bloque seco.

Una vez completada la retrotranscripción se realizó una dilución 1:40 de las muestras tomando 4µl de cada muestra en 156µl de agua miliQ.

4.3.5- PCR SEMICUANTITATIVA

Para comprobar las diferencias de expresión de los genes de interés entre las distintas muestras se utilizó la técnica de la PCR semicuantitativa. Esta técnica consiste en la amplificación de los fragmentos de cDNA correspondientes a los genes estudiados utilizando cebadores específicos para a continuación visualizar las muestras amplificadas en un gel de agarosa. La secuencia de los cebadores y sus temperaturas de amplificación se pueden consultar en el Anexo V.

La cantidad de DNA presente en cada muestra tras la amplificación es proporcional a la cantidad de cDNA de partida y por lo tanto a la cantidad mRNA presente en cada muestra original. Por lo tanto la cantidad de DNA tras la amplificación refleja los niveles de expresión del gen.

Como control se utilizó el gen Hv-Actin2 de expresión constitutiva. Utilizando este gen se ajustaron las concentraciones de cDNA originales para asegurarnos que las diferencias de expresión observadas en los genes objeto de estudio se corresponden con diferencias de expresión y que no se deben a diferencias de concentración en las muestras de cDNA. El protocolo de amplificación se puede consultar en el Anexo IV.

5.-RESULTADOS

5.1.-CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES ANALIZADOS

La determinación de la función de los genes analizados se realizó mediante la búsqueda de homologías de secuencia en el programa HarvEST Barley v.2.26. Este programa determina la homología de nuestros genes con otros genes conocidos usando las bases de datos UniProt de carácter general, MSU de arroz y TAIR de *Arabidopsis* y Phytozome Bradi de *Brachipodium*. Se seleccionaron aquellas homologías que presentaban una mayor similitud (*e-value*) de todas las bases de datos consultadas. En el Anexo VI se muestran las homologías de todos genes analizados, así como el acrónimo utilizado.

Al estudiar los procesos en los que intervenían los genes seleccionados, se pudo determinar que la mayor parte de los genes de la colección CI estaban asociados a mecanismos ligados a la regulación de la expresión génica, mientras que en la colección QTL-Alb predominaban los genes asociados a la regulación celular, en particular por regulación proteica. Finalmente en la colección Ax-Alb predominan los genes asociados a la fotosíntesis y a la respuesta al estrés.

De los 67 genes disponibles fueron analizados 56 seleccionados a partir de un trabajo anterior. De estos 56 genes analizados 23 estaban asociados a la regulación de expresión génica, 7 a la fotosíntesis, 6 a la respuesta al estrés y 20 tenían distintas funciones no relacionadas con los grupos anteriores.

5.2.-RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

El análisis de la expresión génica de las distintas muestras de hoja de las líneas DH6148 y DH6183 se realizó mediante PCR semicuantitativa como se detalla en el apartado 4.3.5 de la sección de Materiales y Métodos. Tras el análisis de los 56 genes, se seleccionaron 20 que presentaban diferencias de expresión significativas entre las muestras de hoja verde (HVCA) y hoja albina (HACA) de plántulas obtenidas por cultivo de anteras de la línea DH6183. Los resultados para la colección completa de genes se pueden encontrar en el Anexo VII.

El análisis de la expresión génica de estos 20 genes seleccionados se detalla a continuación, para ello los genes se han agrupado en cuatro grupos según la función asignada tras la búsqueda de homologías. Estos cuatro grupos corresponden a: genes asociados a la fotosíntesis, genes asociados a la respuesta a estrés, genes asociados al control de la expresión génica y por último un grupo de genes con diversas funciones no relacionadas con los otros grupos.

5.2.1.-GENES ASOCIADOS A LA FOTOSÍNTESIS

De los 20 genes seleccionados 6 de ellos se clasificaron, de acuerdo a su función, como asociados a la fotosíntesis (Tabla 2).

Tabla 2: Acrónimo y nombre de los genes asociados a fotosíntesis

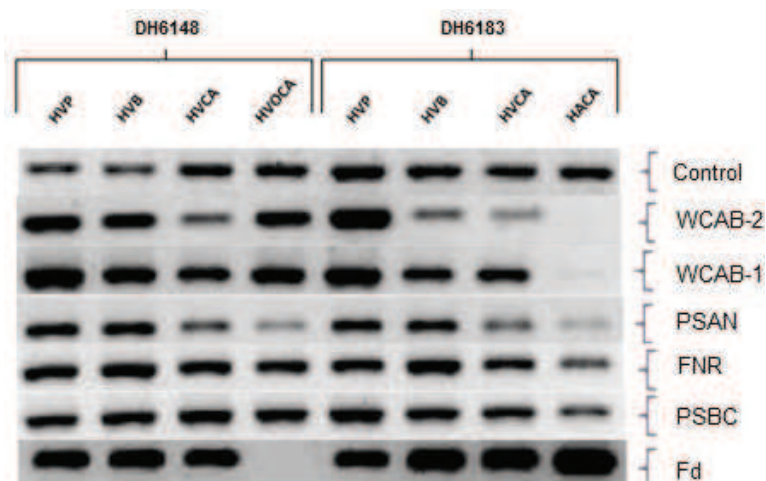
Acrónimo	Código	Gen
<i>WCAB-2</i>	Contig418_at	Chlorophyll a-b binding protein
<i>WCAB-1</i>	Contig828_s_at	Chlorophyll a-b binding protein
<i>PSAN</i>	Contig3221_at	Photosystem I reaction center subunit N
<i>FNR</i>	Contig2278_at	Ferredoxin--NADP reductase
<i>PSBC</i>	HVSMEb0007O01f_at	Photosystem II reaction center protein C
<i>Fd</i>	Contig1314_s_at	Ferredoxin

Como se observa en la Figura 6, entre los genes asociados a la fotosíntesis, los genes *WCAB-1* y *WCAB-2* presentaban una clara diferencia de expresión entre las hojas verdes (HVCA) y albinas (HACA) de plántulas obtenidas por cultivo de anteras, no expresándose en estas últimas. En todas las otras muestras de hojas analizadas estos genes se expresaban aunque con distintos niveles, observándose el nivel más alto en hojas verdes de plantas procedentes de semilla crecidas a baja temperatura (HVP).

En el caso de los genes *PSBC* y *PSAN* que codifican proteínas asociadas a los fotosistemas y el gen *FNR*, se observa una ligera disminución de la expresión en las hojas albinas. En todas las otras muestras analizadas, estos genes se expresan de forma semejante a HVCA-DH6183 salvo el gen *PSAN*, en el que también se observa una disminución de la expresión en las hojas etioladas (HVOCA).

Por último, en el caso del gen que codifica para la ferredoxina (*Fd*) se observa una mayor expresión en las hojas albinas de DH6183 (HACA) que en las hojas verdes (HVCA). Además, *Fd* se expresa de forma similar en el resto muestras de las dos líneas salvo en las hojas de planta etiolada (HVOCA) de la línea DH6148 las cuales no presentan expresión.

Figura 6: Análisis de la expresión de los genes asociados a la fotosíntesis en hojas verdes de plántulas crecidas a 4°C (HVP), hoja bandera (HVB) y en las muestras obtenidas mediante cultivo *in vitro* de anteras: hojas de plántula verde (HVCA), hojas de plántula verde etiolada (HVOCA) de la línea DH6148 y hoja albina (HACA) de la línea DH6183. Como control se utilizó el gen que codifica para la proteína Hv-Actina2 de expresión constitutiva.



5.2.2.-GENES ASOCIADOS AL ESTRÉS

El segundo grupo de genes consta de 3 genes que de acuerdo a su función se han clasificado como asociados a la respuesta ante el estrés (Tabla 6).

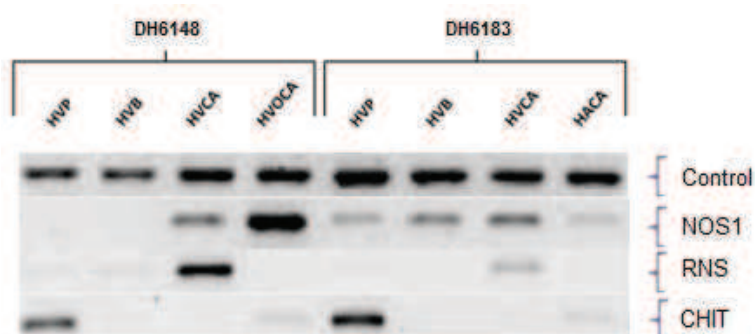
Tabla 3: Acrónimo y nombre de los genes asociados a l estrés

Acrónimo	Código	Gen
<i>NOS1</i>	Contig24914_at	Nitric oxide synthase 1
<i>RNS</i>	Contig5059_s_at	Ribonuclease T2
<i>CHIT</i>	Contig2992_s_at	Chitinase II

Los patrones de expresión en los genes asociados a la respuesta a estrés presentan una gran variabilidad y no se aprecian patrones comunes (Figura 7). Los genes *NOS1* y *RNS* en la línea DH6183 presentan una mayor expresión en las muestras de hoja verde procedente de cultivo *in vitro* (HVCA) que en las hojas albinas (HACA). Pero en el caso del gen *RNS*, además solo se observa expresión en las muestras de hoja verde procedente de cultivo *in vitro* (HVCA) de ambas líneas. En el patrón de expresión del gen *NOS1* se aprecian diferencias de comportamiento entre las dos líneas, ya que en la línea DH6148 únicamente se expresa en las muestras procedentes de cultivo *in vitro* (HVCA y HVOCA) mientras que en DH6183 se expresa en todas las muestras.

Por último, el gen CHIT no se expresa en la hoja verde procedente de cultivo *in vitro* (HVCA) pero sí en la hoja albina (HACA) de la línea DH6183. El nivel de expresión es bajo y similar al de hoja etiolada (HVOCA) de la línea DH6148. Sin embargo, los niveles de expresión son altos en hojas verdes de plántulas crecidas a 4°C (HVP) de ambas líneas.

Figura 7: Análisis de la expresión de los genes asociados al estrés en hojas verdes de plántulas crecidas a 4°C (HVP), hoja bandera (HVB) y en las muestras obtenidas mediante cultivo *in vitro* de anteras: hojas de plántula verde (HVCA), hojas de plántula verde etiolada (HVOCA) de la línea DH6148 y hoja albina (HACA) de la línea DH6183. Como control se utilizó el gen que codifica para la proteína Hv-Actina2 de expresión constitutiva.



5.2.3- GENES ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN GÉNICA

Un tercer grupo está formado por los genes asociados al control de expresión génica y constituyen el grupo más numeroso de los genes seleccionados con un total de 7 genes (Tabla 3).

Tabla 3: Acrónimo y nombre de los genes asociados a la expresión génica

Acrónimo	Código	Gen
<i>CRS1</i>	Contig14691_at	Chloroplastic group IIA intron splicing facilitator
<i>PTAC6</i>	Contig13277_at	Plastid transcriptionally active 6
<i>Hv-ALB3</i>	Contig19088_at	UDP-N- acetylglucosamine diphosphorylase activity
<i>EF-P</i>	Contig17155_at	Elongation factor P
<i>PDE324</i>	Contig23344_at	Plastid transcriptionally active 3
<i>RPL28</i>	Contig4380_s_at	Ribosomal protein L28 protein
<i>SIG</i>	HVSMEm0013103r2_at	RNA polymerase sigma factor

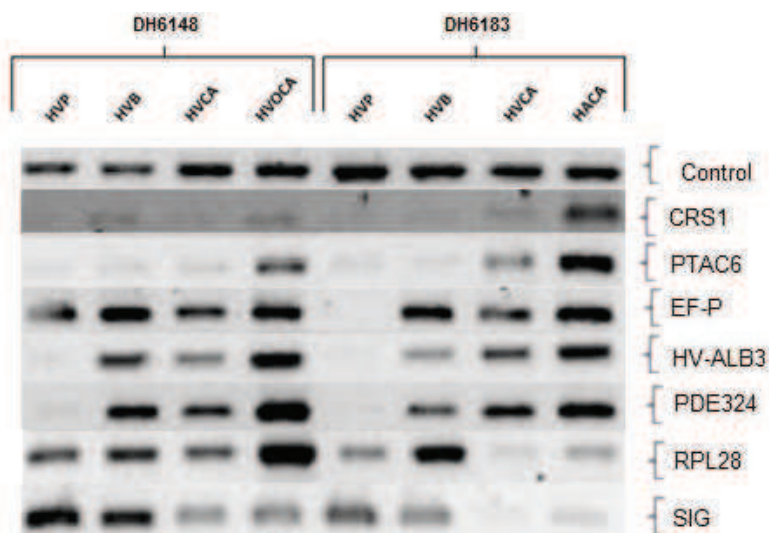
En este grupo observamos que todos los genes presentan mayor expresión en hojas albinas (HACA) que en verdes (HVCA) de la línea DH6183, pero la diferencia en los niveles de expresión varía entre los distintos genes. La mayor diferencia entre hojas albinas (HACA) y verdes (HVCA) se observa en los genes *CRS1* y *PTAC6*. En el resto de las muestras se observan patrones de expresión semejantes en estos dos genes, ya que solo presentan niveles de expresión claros en hoja etiolada (HVOCA) de la línea DH6148 aunque en caso de *PTAC6* el nivel de expresión es más alto.

En el caso del gen *EF-P* su patrón de expresión se caracteriza, además de las diferencias entre hoja verde (HVCA) y albina (HACA), por que este gen no se expresa en la muestra de hoja verde de plántulas crecidas a 4°C (HVP) de la línea DH6183 pero sí en el resto de muestras.

Los genes *PDE324* y *Hv-ALB3* presentan un patrón de expresión muy similar, en ambos casos la expresión en las muestras de hoja albina de cultivo *in vitro* de la línea DH6183 (HACA) es ligeramente superior a la de hoja verde (HVCA). Además estos dos genes se expresan en todas las muestras salvo en las de hojas verdes de plántulas crecidas a 4°C (HVP) de ambas líneas, presentando la mayor expresión en las hojas albinas de la línea DH6183 y en las hojas etioladas de la línea DH6148.

Por último en los genes *RPL28* y *SIG* la expresión en la hoja albina (HACA) es ligeramente superior a la hoja verde (HVCA). Estos dos genes se expresan en todas las muestras pero con un patrón distinto. *RPL28* presenta los mayores niveles de expresión en las hojas etioladas (HVOCA) de la línea DH6148 y en las hoja bandera (HVB) de la línea DH6183, mientras que *SIG* se expresa más en las muestras de hoja bandera (HVB) y en hoja verde de plántulas crecidas a 4°C (HVP) de la líneas DH6148.

Figura 8: Análisis de la expresión de los genes asociados a la expresión génica en hojas verdes de plántulas crecidas a 4°C (HVP), hoja bandera (HVB) y en las muestras obtenidas mediante cultivo *in vitro* de anteras: hojas de plántula verde (HVCA), hojas de plántula verde etiolada (HVOCA) de la línea DH6148 y hoja albina (HACA) de la línea DH6183. Como control se utilizó el gen que codifica para la proteína Hv-Actina2 de expresión constitutiva.



5.2.4.-OTROS GENES

El cuarto y último grupo está formado por aquellos genes que no han podido asociarse con ninguno de los grupos anteriores, está formado por 4 genes (Tabla 4).

Tabla 4: Acrónimo y nombre de los genes

Acrónimo	Código	Gen
<i>GH16</i>	Contig12692_s_at	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase
<i>SBE</i>	Contig16389_at	Starch Branching Enzyme
<i>PHT6</i>	Contig7944_at	Phosphate transporter 6
<i>ARC5</i>	Contig16148_at	Dynamamin family protein ARC5

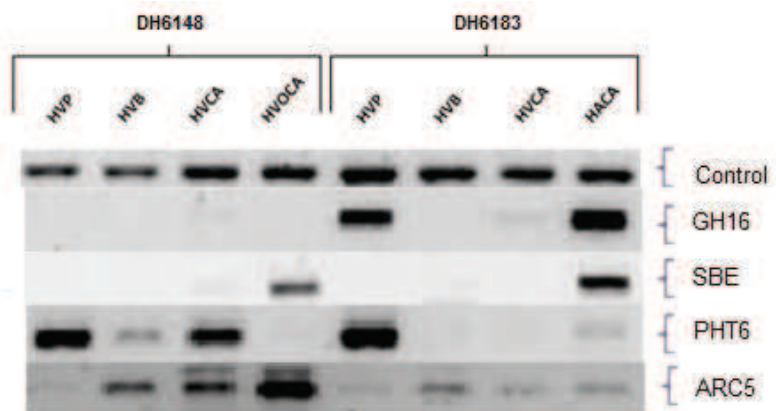
En este grupo de genes observamos patrones muy diversos. En los genes *GH16* y *SBE* las muestras de hoja albina (HACA) presentan una expresión muy clara, y sin embargo no se expresan en las hojas verdes (HVCA) en DH6183. En el caso de *GH16*, este gen no se expresa en ninguna de las muestras de la línea DH6148 y en DH6183 únicamente en las de hojas verdes de plántulas crecidas a 4°C (HVP). Por su parte, *SBE* también se expresa en las hojas etioladas de la línea DH6148 aunque con menor intensidad.

El gen *PHT6*, se expresa en hoja albina (HACA) pero no en hoja verde (HVCA) de la línea DH6183. En las dos líneas este gen muestra expresión fuerte en hojas verdes de plántulas crecidas a 4°C (HVP), pero en la línea DH 6148 también se expresa en las otras muestras salvo en la hoja etiolada (HVOCA).

El gen *ARC5* presenta una expresión en hoja de plántula verde (HVCA) menor que en hoja albina (HACA) en la línea DH6183 aunque esta diferencia es pequeña. También se observan diferencias en el patrón de expresión entre las líneas, siendo más baja en general en la línea DH6183, y destacando la alta expresión en la línea DH6148 en la hoja

etiolada (HVOCA). En las dos líneas los niveles más bajos de expresión se observa en las hojas verdes de plántulas crecidas a 4°C (HVP), con un nivel similar en ambas líneas.

Figura 9: Análisis de la expresión de otros genes seleccionados en hojas verdes de plántulas crecidas a 4°C (HVP), hoja bandera (HVB) y en las muestras obtenidas mediante cultivo *in vitro* de anteras: hojas de plántula verde (HVCA), hojas de plántula verde etiolada (HVOCA) de la línea DH6148 y hoja albina (HACA) de la línea DH6183. Como control se utilizó el gen que codifica para la proteína Hv-Actina2 de expresión constitutiva.



6.-DISCUSIÓN

Como se ha descrito en la Introducción de este trabajo, los mecanismos asociados al fenómeno del albinismo en la embriogénesis de la microspora son poco conocidos. La imposibilidad de producir cloroplastos funcionales capaces de realizar la fotosíntesis en las plantas albinas se ha asociado a un fallo en la reprogramación durante el proceso de androgénesis.

Para determinar las diferencias en la expresión génica entre hojas verdes y albinas en plantas de cebada obtenidas mediante cultivo *in vitro* de anteras, se disponía de 67 genes de tres colecciones (CL, QTL-Alb, Ax-ALb). En el análisis se utilizaron dos líneas de cebada, la línea DH6148 que se caracteriza por un alto porcentaje de embriogénesis y bajo porcentaje de albinismo, y la línea DH6183 que presenta bajo porcentaje de embriogénesis y alto porcentaje de albinismo. Además de la comparación directa entre hoja verde y albina de plántulas procedentes de cultivo de anteras, también se han analizado hojas verdes de plantas generadas a partir de semilla en condiciones normales o de estrés. Estas dos muestras nos permiten determinar si los cambios de expresión en plantas albinas se deben al cultivo *in vitro* o como respuesta a estrés. Finalmente, también se incluyeron en el análisis hojas verdes de plántulas de cultivo de anteras crecidas en la luz o en la oscuridad (etiolada), para determinar qué cambios de expresión dependen del genotipo de la planta, o de la presencia de pigmentos fotosintéticos e inducción por luz.

Atendiendo a la expresión de los genes entre hojas verdes (HVCA) y albinas (HACA) de plantas obtenidas por cultivo de anteras de la línea DH6183 de cebada, clasificamos los genes en tres grupos: genes que presentan una mayor expresión en hojas verdes que en las albinas (7 genes); genes que se expresan más en hojas albinas que en las verdes (13 genes) y un grupo de genes que se expresan de forma muy similar en hojas verdes y albinas (36 genes).

Nuestro interés se ha centrado en los dos primeros grupos ya que son los que nos indican que mecanismos moleculares determinan el albinismo. La asociación, por homología de secuencia, de estos genes con su funcionalidad se detalla en la Tabla 9. Según esta clasificación se observan diferencias claras entre los genes que presentan mayor expresión en hojas verdes que en las albinas y el grupo de los que se expresan más en hojas albinas. Estas diferencias se detallan a continuación:

Tabla 9: Clasificación funcional de los genes de expresión diferencial entre hojas de plantas verdes y albinas obtenidas por cultivo de anteras de la línea DH6183 de cebada

	Asociados a la fotosíntesis	Asociados a al estrés	Asociados a la expresión génica	Otros genes
Mayor expresión en plantas HVCA que en HACA	WCAB-2, WCAB-1, PSAN, FNR, PSBC	NOS1 RNS	-	-
Mayor expresión en HACA que en HVCA	Fd	CHIT	CRS1, PTAC6, Hv-ALB3, EF-P, PDE324, RPL28, SIG	SBE, GH16, PHT6, ARC5

6.1- LAS HOJAS ALBINAS TIENEN LOS PROCESOS FOTOSINTÉTICOS ALTERADOS Y ALGUNAS RESPUESTAS SEMEJANTES A SITUACIONES DE ESTRÉS

Las hojas de plantas albinas presentan una menor expresión de 7 genes, de los cuales 5 están asociados a la fotosíntesis y 2 a la respuesta al estrés. Hay que destacar que de los genes asociados a fotosíntesis que presentan una expresión diferencial entre hojas de plantas verdes y albinas (6) la mayoría (5) presentan una expresión más baja en hoja albina.

Entre los 7 genes identificados, la diferencia de expresión más significativa se ha observado en los genes *WCAB-1* y *WCAB-2* (*CHLOROPHYLL a-b BINDING PROTEIN*). Estos genes codifican para proteínas de unión entre las moléculas de clorofila de tipo A y B (Klimmek y col. 2006, Aghdasi y col. 2012) y están asociados a la fase luminosa de la fotosíntesis. Aunque estos genes no se expresan en las hojas albinas si lo hacen en el resto de muestras analizadas, es especialmente significativo que se expresen en las hojas etioladas, que no ha recibido el estímulo de la luz y no producen clorofila. Estos resultados parecen indicar que en las hojas albinas la falta de pigmentos no se debe solo a los procesos de síntesis de clorofila o la percepción de la luz como en las hojas etioladas, si no que habría otras deficiencias añadidas.

El gen *RNS*, asociado a la respuesta a estrés, al igual que los dos anteriores tampoco se expresa en las hojas de plantas albinas. Este gen, codifica para una proteína con actividad de ribonucleasa (*RIBONUCLEASE T2*) (Bariola y col. 1994) implicada en liberación de P en condiciones de estrés. Su patrón de expresión es muy específico ya que se expresa únicamente en hojas verdes procedentes de cultivo de anteras de ambas líneas. Por lo tanto, su función parece estar ligada a las condiciones de estrés debidas al cultivo *in vitro* en iluminación ya que tampoco expresa en la muestra etiolada.

El resto de genes a diferencia de los anteriores se expresan en las plantas albinas, pero con un nivel menor que en las hojas HVCA. En el caso del gen *PSAN* (*PHOTOSYSTEM I REACTION CENTER SUBUNIT N*), que codifica para una proteína del fotosistema I asociado a la fase luminosa de la fotosíntesis (Haldrup y col. 1999), el nivel de expresión en las hojas albinas es similar a las etioladas. Este resultado indicaría una disminución en la expresión de genes del fotosistema I en hojas que no realizan la fotosíntesis. También se observa una disminución en las hojas verdes en plántulas procedentes de cultivo *in vitro*, que podría ser debida a una menor tasa fotosintética de las plántulas asociada a las intensidades luminosas que se utilizan en las cámaras de crecimiento.

Los genes *PSBC* (*PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER PROTEIN C*), que codifica para es una proteína del fotosistema II (Bricker y col. 2002), y *FNR* (*FERREDOXIN-NADP(+)-OXIDOREDUCTASE*) que participa en el transporte de electrones de ferredoxina a NADP (+) (Shin y col. 1963), presentan un patrón de expresión similar. En ambos casos las diferencias en el nivel de expresión entre hojas albinas y verdes es menor que en los ejemplos anteriores, y por otra parte, en el resto de muestras ambos genes presentan un nivel de expresión constante. Por ello, se puede deducir que en las hojas albinas parece estar más afectado el fotosistema I que el fotosistema II y la cadena de transporte de electrones.

Por último, el gen *NOS1*, (*NITRIC OXIDE SYNTHASE 1*), que codifica para una GTPasa plastidial no directamente relacionada con la síntesis de NO y con funciones asociadas a la biogénesis de cloroplastos (Zhang y col. 2006), presenta grandes diferencias en su patrón de expresión entre las dos líneas DH estudiadas. En la línea DH6148 su patrón podría estar asociado al estado de desarrollo funcional de los plástidos en las plantas de cultivo *in vitro* y en particular de los etioplastos. Sin embargo, en la línea DH6183 el patrón de expresión parece concordar más con una menor biogénesis de plástidos en plantas albinas como en hojas verdes sometidas a condiciones de estrés.

6.2- LAS HOJAS ALBINAS SOBREENPRESAN GENES ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CLOROPLASTOS Y A LA SÍNTESIS DE ALMIDÓN

En este grupo, formado por 13 genes, destacan los genes asociados al control de la expresión génica (7), que constituyen el total de los asociados a esta función seleccionados por su expresión diferencial entre hojas verdes y albinas.

Hay que resaltar también el patrón de expresión del gen que codifica para la Ferredoxina (Fd), implicada en la cadena de transporte de electrones, ya que es el único gen asociado a la fotosíntesis cuya expresión es ligeramente superior en las hojas albinas respecto a las hojas verdes. Contrasta especialmente con el gen de la *FNR*, implicado en la transferencia de electrones desde la Ferredoxina al NADPH el cual tiene una expresión disminuida en la hoja albina. Además este gen se expresa en todas las muestras con un nivel similar, salvo en las hojas etiolada donde no se expresa, lo que indicaría que su expresión depende de la exposición de la planta a la luz, aún en ausencia de pigmentos fotosintéticos.

Dos de los genes seleccionados no se expresan en hojas verdes pero si lo hacen fuertemente en las hojas albinas. Estos genes son los que codifican para la SBE (STARCH BRANCHING ENZYME) una enzima de ramificación del almidón (McCue y col. 2002), y para la GH16 una hidrolasa de enlaces glucosídicos β -1,4 y β -1,3 en glucanos y galactanos. Aunque los dos genes presentan un patrón de expresión muy específico, parecen estar relacionados con procesos distintos. La expresión del gen *SBE*, que también se expresa con claridad en la hoja etiolada, parece estar asociada a la síntesis activa de almidón, que se correspondería con la presencia de plástidos con características de amiloplastos más que de cloroplastos (Rahman y col. 2001). Por otra parte el gen *GH16* se expresa también de forma intensa en las hojas verdes de plantas crecidas a baja temperatura pero únicamente en la línea DH6183, indicando de nuevo una asociación entre la respuesta al estrés y el albinismo.

Los genes *PTAC6* y *CRS1* implicados en el control de la expresión génica, también presentan un nivel de expresión significativamente más alto en las muestras albinas. El gen *PTAC6* (*PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMOSOME PROTEIN 6*), factor implicado en el control de la transcripción en los plástidos (Pfalz y col 2006), presenta una mayor expresión en hojas con plastidos funcionalmente menos activos. El gen *CRS1* (*Chloroplast RNA Splicing 1*) codifica para un factor de splicing de origen nuclear que tiene como diana en el cloroplasto el gen *atpF* del complejo ATP sintasa (Ostersetzer. y col. 2005). Se ha observado que el gen *atpF*, implicado en la fotosíntesis,

presenta un nivel de expresión reducida en plantas albinas mutantes de *Arabidopsis* (Tseng y col. 2012), así la sobreexpresión de *CRS1* podría ser como respuesta a una bajo nivel de *atpF*. Este tipo de factores se han asociado con el control por parte del núcleo de las funciones del cloroplasto entre ellas la biogénesis del aparato fotosintético (Barkan 1989).

Los genes *PDR324*, *EF-P* y *Hv-Alb3*, asociados al control de la expresión génica, también se expresan con más intensidad en las hojas albinas, además los tres presentan un patrón de expresión similar en las otras muestras, ya que se expresan en todas salvo en las hojas verde de plántulas crecidas a baja temperatura, destacando su alta expresión en hoja etiolada. *PDE324* (*PIGMENT DEFECTIVE 324*) es un factor necesario para la transcripción dependiente de la PEP polimerasa e implicado en la diferenciación de los cloroplastos a partir de plástidos inmaduros (Yagua y col. 2012), y *Hv-Alb3* está implicado en el procesamiento del 16S rRNA. Estos resultados indican una presencia de estas proteínas en desarrollo normal de las hojas verdes y una mayor necesidad en hojas con cloroplastos no funcionales, pero que en las hojas bajo estrés podrían ser sustituidos por otros factores. Por otra parte el gen *EF-P* (*ELONGATION FACTOR P*), es un factor de elongación que mejora la traducción de proteínas que contienen secuencias de poli-prolinas (Lassak y col. 2015). Este gen se expresa con un patrón muy semejante a los dos anteriores salvo que también se aprecia en plántula a baja temperatura del genotipo DH6148.

También el gen *RPL28* (*RIBOSOMAL PROTEIN L28*), que codifica para una proteína ribosomal (Takacova y col. 2002), presenta una expresión ligeramente mayor en hojas albinas pero dependiente de las condiciones de cultivo *in vitro* y del genotipo. Este comportamiento es semejante al del gen *SIG3* (*SIGMA FACTOR 3*), correspondiente con el factor sigma 3 de la PEP RNA polimerasa, que transcribe específicamente el gen *psbN* (*PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER N*) (Zghidi y col. 2007). Su patrón de expresión contrasta con el hecho de que haya genes que codifican para proteínas de los fotosistemas como *PSAN* o *PSBC* que tienen una expresión disminuida en plantas albinas. La dependencia de la expresión de estos genes de distintos factores hace difícil la interpretación de su asociación con el albinismo.

Los tres genes restantes presentan una diferencia de expresión entre hoja verde y albina muy pequeña. El gen *PHT6* (*PHOSPHATE TRANSPORTER 6*) que codifica para un transportador de fosfato, presenta cierta asociación entre hoja albina y hoja verde en condiciones de estrés pero únicamente de forma clara en la línea DH6183. En gen *ARC5* (*ACCUMULATION AND REPLICATION OF CHLOROPLAST 5*) que codifica para una GTPasa de la familia de las dinaminas que facilita la separación de los cloroplastos después de la división (Gao y col. 2003), se expresa en todas las muestras con máximos en hoja etiolada y mínimo en hojas en condiciones de estrés. Por último, en el caso del gen *CHIT* (*CHITINASE II*) que codifica para una quitinasa asociada a la respuesta al estrés, de nuevo parece indicar la asociación entre condiciones de estrés y albinismo, aunque la expresión en hojas albinas es mucho menor que en las hojas estresadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los estudios que describen que el albinismo está asociado a cambios en los niveles de transcripción de genes de localización plastidial (Dunford y col. 1991). Pero también hay genes nucleares asociados a los cloroplastos que presentan una expresión deferencial, lo que estaría de acuerdo con las observaciones de que los genes que controlan el albinismo son genes nucleares (Larsen y col. 1991)

En este estudio las hojas albinas procedentes de cultivo de anteras se caracterizan, principalmente, por una disminución de la expresión de genes asociados a la fotosíntesis y un aumento de expresión de genes asociados al control de expresión génica en cloroplastos. Entre los genes asociados a la fotosíntesis hay una disminución de la expresión en genes que codifican a proteínas de unión a clorofila así como de proteínas que forman parte de los fotosistemas I y II. Sin embargo en el caso de genes implicados en el transporte de electrones los resultados son contradictorios. Hay que destacar que entre los genes asociados al control de la expresión génica en cloroplastos que se encuentran sobreexpresados en las hojas albinas también hay genes directamente implicados en el control de genes asociados a la fotosíntesis

También llama la atención que en plantas albinas parece estar activa la síntesis de almidón. Si sumamos este hecho a que los mecanismos asociados a la fotosíntesis no están presentes, los resultados parecen indicar que los plástidos en hojas albinas tienen características similares a los amiloplastos. Esto concuerda con estudios anteriores en los que se señalaba que los cloroplastos continuarían su desarrollo por la vía gametofítica que conduce a la diferenciación a amiloplastos y finalmente a su degeneración (Makowska y col. 2013).

Cabe destacar que en muchos casos los cambios de expresión asociados al albinismo están también asociados a las condiciones de cultivo y el genotipo. La dependencia del genotipo aunque ya descrita (Careda y col. 2000, Castillo y col. 2000), se ha confirmado a nivel molecular en este trabajo, siendo un factor que hay que tener en cuenta a la hora de realizar estudios sobre el albinismo.

También parece existir una relación entre albinismo y respuesta a estrés que confirmaría resultados anteriores en los que se describía como factor fisiológico que condiciona el albinismo el pretratamiento de estrés que se aplica a las anteras (Touraev y col. 1996a, Kunz y col. 2000).

7.- CONCLUSIONES

1. Se ha seleccionado una colección de 20 genes que presentan una expresión diferencial entre hoja verde y albina de plántulas obtenidas por cultivo de anteras del mismo genotipo.
2. Las hojas albinas presentan una disminución de la expresión de genes implicados en la fotosíntesis, especialmente los asociados a los Fotosistemas I y II y a las proteínas de unión a clorofila.
3. Las hojas albinas presentan un aumento de la expresión de genes implicados en el control de la expresión génica en cloroplastos, en algunos casos de genes implicados directamente en la expresión de genes que participan en la fotosíntesis.
4. Los plástidos en hoja albina presentan características de plástidos similares a los amiloplastos como la síntesis activa de almidón.
5. Se observa variación en la expresión de genes implicados en el albinismo asociadas a las condiciones de cultivo *in vitro*, a situaciones de estrés asociadas y principalmente al genotipo, las cuales son necesarias tener en cuenta en futuros estudios.

7.- CONCLUSIONS

1. It has been selected a collection of 20 genes exhibiting a differential expression between green and albino plants obtained by anther culture of the same genotype.
2. Albino leaves show decreased expression of genes involved in photosynthesis, especially those associated with the photosystems I and II and chlorophyll binding proteins.
3. Albino leaves have increased expression of genes involved in the control of gene expression in chloroplasts, sometimes directly involved in gene expression of genes that participate in photosynthesis.
4. Plastids in albino leafs have characteristics similar to amyloplasts like an active starch synthesis.
5. Variation is observed in the expression of genes involved in albinism associated with *in vitro* culture conditions, situations of stress and mainly associated to the genotype, which are necessary to take into account in future studies.

8.-BIBLIOGRAFÍA

- Aghdasi, M., Fatahi, S. y Sadeghipour, H. R. (2012). Identification and Characterization of *LHCB1* Co- Suppressed Line in *Arabidopsis*. Biological Sciences, Vol. 2, No. 1: 40-49.
- Bariola, A.P., Howard, C.J., Taylor, C.B., Verburg, M.T., Jaglan, V.D. y Green, P.J. (1994). The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. The Plant Journal 6: 673-685.
- Barinova, I., Clement, C., Martiny, L., Baillieul, F., Soukupova, H., Heberle-Bors, E. y Touraev, A. (2004). The regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. Planta 219:141–156.
- Barkan A.(1989). Tissue-Dependent Plastid RNA Splicing in Maize:Transcripts from Four Plastid Genes are Predominantly Unspliced in Leaf Meristems and Roots. The Plant Cell, Vol. 1 , 437-445
- Bricker, T.M. y Frankel, L.K. (2002). The structure and function of CP47 and CP43 in Photosystem II. Photosynthesis Research 72: 131–146,
- Careda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S. y Clément, C. (1999). Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. Protoplasma 208: 248-256.
- Careda, S., Doncoeur, C., Devaux, P., Sangwan, R.S. y Clément, C. (2000). Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). Sexual Plant Reproduction 13: 95-104.
- Careda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S., Proult, I. y Clément, C. (2004). Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. Plant cell tissue and organ culture 76: 35-43.
- Castillo, A.M., Vallés, M.P. y Cistué, L. (2000). Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. Euphytica 113:1-8.
- Cistué, L., Ziauddin, E., Simion, E. y Kasha, K.J. (1995). Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42:163-169.
- Cistué, L., Vallés, M.P., Echávarri, B., Sanz, J.M. y Castillo, A.M. (2003). Barley anther culture. En: Doubled Haploid. Production in Crop Plants. Malupszynski M, Kasha K, Foster B (eds). FAO/IAEA Division, Wien, A Manual, pp 29-35.
- Dunford, R. y Walden, R.M. (1991). Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. Curr Genet 20: 339-347.
- Ekiz, H. y Konzak, C. (1997). Effects of light regimes on anther culture response in bread wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50:7-12.
- FAOSTATS, (2012). Statistics Division. Food and Agriculture Statics global.
- Germana M.A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Tissue Cell Culture 104: 283–300
- Forster, B.P. y Powell, W. (1997). Haploidy in barley. En *In vitro* haploid production in higher plants, Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds). Kluwe, Dordrecht. 99-115.
- Gao H., Kadirjan-Kalbach D., Froehlich J.E., Osteryoung K.W. (2003)ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants is part of the chloroplast division machinery. PNAS vol. 100 no. 7: 4328–4333
- Haldrup, A., Naver, H. y Scheller, H. V. (1999). The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI- N subunit of photosystem I. The Plant Journal, 17: 689-698.
- Harada, T., Ishikawa, R., Niizeki, M., y Saito, K. (1992). Pollen-derived rice calli that have large deletions in plastid DNA do not require protein synthesis in plastid for growth. Mol. Gen. Genet. 233: 145–150.
- Hofinger, B. (2000). Molecular genetic analysis of plastid deficiencies in anther culture-derived albino plants of wheat (*Triticum aestivum*). Diploma thesis, University of Vienna, Vienna.-He, D.-G. y Ouyang, J.-W. (1984). Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages. Plant Science Letters 33:71-79.
- Hoekstra, S., van Ziderveld, M.H., Louwerse, J.D., Heidekamp, F. y van der Mark F. (1992). Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. Plant Science 86: 89-96.
- Huang, B. (1987). Effects of incubation temperature on microspore callus production and plant regeneration in wheat anther cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 9: 45-48.
- Immonen S, Anttila H. (2000). Media composition and anther plating for production of androgenetic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.). Journal of Plant Physiology 156: 204–210.
- Kasha, K.J. Y Kao, K.N. (1969). High frequency haploid production in barley. Nature 225, 874-876
- Kiviharju E, Puolimatka M, Saastamoinen M, Pehu E. (2000). Extension of anther culture to several genotypes of cultivated oats. Plant Cell Reports 19:674–679
- Klimmek, F., Sjödin, A., Noutsos, C., Leister, D. y Jansson, S. (2006). Abundantly and Rarely Expressed *Lhc* Protein Genes Exhibit Distinct Regulation Patterns in Plants. Plant Physiology, 140: 793–804.

- Komatsuda T., Pourkheirandish ., He C., Azhaguvel P., Kanamori H., Perovic D., Stein N., Graner A., Wicker T., Tagiri A., Lundqvist U., Fujimura T., Matsuoka M., Matsumoto T. y Yano . (2007) Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 104(4): 1424–1429.
- Kunz C., Islam S.M.S., Berberat J., Peter S.O., Büter B., Stamp P. y Schmid J.E. (2000). Assesment and improvement of wheat microspore derived embryo induction and regeneration. *Journal of Plant Physiology* 156:190-196.
- Larsen, E.T., Tuveesson, I.K.D. y Andersen SB (1991). Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics*. 82: 417-420.
- Lassak J., Wilson D.N. y Jung K. (2015).Stall no more at polypoline stretches with the translationelongation factors EF-P and IF-5A. *Molecular Microbiology: Micro Review*.
- Liang, G.H., Qi, J. y Hassawi, D.S. (1990). A direct-regeneration system for wheat haploid production. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Bajaj, Y.P.S. (ed) Wheat. Springer Verlag 13: 425-434.
- Liu W, Zheng MY, Polle EA, Konzak CF. (2002) Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Science* 42:686–692
- Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. y Szarejko, I. (2003). *En Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Kluwer, Dordrecht.
- Makowska K., Oleszczuk S. (2014) Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Reports* 33:385–392
- McCUE, K.F., Hurkman, W.J., Tanka, C.K. y Anderson, O.D. (2002). Starch-Branching Enzymes Sbe1 and Sbe2 From Wheat (*Triticum aestivum* cv. Cheyenne): Molecular Characterization, Developmental Expression, and Homoeologue Assignment by Differential PCR. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 191a–191m
- Muñoz-Amatriaín M., Castillo A., Chen X., Cistué L. y Vallés M. (2008). Identification and validation of QTLs for green plant percentage in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Molecular Breeding* DOI: 10.1007/s11032-008-9161-y.
- Muñoz-Amatriaín, M., Svensson, J.T., Castillo, A.M., Cistué, L., Close, T.J.y Vallés, M.P. (2009b). Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Functional & Integrative Genomics* 9:311–323.
- Ostersetzer O., Cooke A.M., Watkins K.P., y Barkan A. (2005). CRS1, a Chloroplast Group II Intron Splicing Factor, PromotesIntron Folding through Specific Interactions withTwo Intron Domains. *The Plant Cell*, Vol. 17, 241–255
- Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz KJ, Oelmüller R. (2006).TAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell*.18:176-97.
- Polci, P., Conti, V., Miranda, R. Y Gear, N. (2010). *Bioteconología y mejora vegetal II*. ArgenBio, 297-310.
- Puolimatka, M. y Pauk, J. (2000). Effect of induction duration and medium composition on plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Journal of Plant Physiology* 156:197-203.
- Rahman S., Regina A., Li Z., Mukai Y., Yamamoto M., Kosar-Hashemi B., Abrahams S., y Morell M.K. (2001). Comparison of Starch-Branching Enzyme Genes Reveals Evolutionary Relationships AmongIsoforms. Characterization of a Gene for Starch-Branching Enzyme IIa from the Wheat D Genome Donor *Aegilops tauschii* .*Plant Physiology* 125(3): 1314–1324
- Shin M., Tagawa K. y Arnon DI (1963).Crystallization of ferredoxin-TPN reductase and its role in the photosynthetic apparatus ofchloroplasts. *Biochemische Zeitschrift*.338: 84–96.
- Svensson, J.T., Crosatti, C., Campoli, C., Bassi, R., Stanca, A.M., Close,T. y Cattivelli, L.(2006).Transcriptome Analysis of Cold Acclimation in Barley Albina and Xantha Mutants.*Plant Physiology* 141: 257–270.
- Takacova M.,Sklenar P., Gbelska Y., Breunig K., Subik J. (2002)Isolation, heterological cloning and sequencing of the *RPL28* gene in *Kluyveromyces lactis*. *Current Genetic* 42: Issue 1:21-26
- Tseng C., Jen Lee C., Chung Y., Sung T., • Hsieh M. (2013) Differential regulation of Arabidopsis plastid gene expression and RNA editing in non-photosynthetic tissues. *Plant Molecular Biology* 82:375–392
- Touraev, A., Pfosser, M., Vicente, O. y Heberle-Bors, E. (1996). Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Planta* 200:144-152.
- Touraev A, Vicente O, Heberle E (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci* 2: 297–302
- Touraev A, Pfosser M, Heberle-Bors E (2001) The microspore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*. 35: 53–109.
- Vijay, K.M. Y Rachna, G. (2014). Haploid Production in Higher Plant. *IJCBS VOL. 1.* 2349–2724
- Yagia Y., Ishizakic Y., Nakahirac Y., Tozawad Y. y Shiina T. (2012) .Eukaryotic-type plastid nucleoid protein pTAC3 is essential for transcription by the bacterial-typeplastid RNA polymerase. *PNAS* 109 No 19: 7541–7546
- Zghidi W., Merendino L., Cottet A., Mache R. y Lerbs-Mache S (2007). Nucleus-encoded plastid sigma factor SIG3 transcribes specifically the psbN gene in plastids. *Nucleic Acids Research* . 35 No. 2: 455–464
- Zhang, L., Wang, Y., Zhao, L., Shi, S. y Zhang L. (2006). Involvement of nitric oxide in light mediated greening of barley seedlings. *Journal of Plant Physiology* 163:818—826.
- Zhou WJ, Hagbery P, Tang GX .(2002). Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicinetreatment of isolated microspores in spring Brassica napus. *Euphytica* 128: 27–34