



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Programa Oficial de Postgrado en Biotecnología

**Regulación espacio-temporal de la homeostasis del
cobre en *Arabidopsis thaliana***

Memoria presentada por
Ana Perea García
Para optar al título de Doctora
por la Universidad de Valencia

Directora: Dra Lola Peñarrubia Blasco

Valencia, 4 de Octubre del 2013

LOLA PEÑARRUBIA BLASCO, Doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática de Universidad del *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular* de la *Universitat de València*.

CERTIFICA: que la Licenciada en Biología **ANA PEREA GARCÍA** ha realizado, bajo su dirección y en el *Laboratorio de Plantas* del mencionado departamento, el trabajo titulado “REGULACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LA HOMEOSTASIS DE COBRE EN *ARABIDOPSIS THALIANA*”.

Y para que así conste, firmo la presente.

Fdo. Lola Peñarrubia Blasco

Este trabajo ha sido realizado en el *Laboratorio de Plantas* de la Universitat de València, gracias a la beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) *BES-2009-015290* asociada al proyecto *BIO2008-02835* del Ministerio de Economía y Competitividad.

Agradecemos a los siguientes investigadores, laboratorios y servicios la ayuda prestada en diferentes partes del trabajo experimental del presente trabajo:

- *Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE)* de la Universitat de València, por el servicio de Invernadero y Secuenciación.
- *Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Castelló*, por su servicio de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo.
- Drs. Sergi Puig y Amparo Sanz del *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* (CSIC, Valencia) y de la Universitat de València, respectivamente, por su participación en los ensayos desarrollados en este trabajo. Así como a todos los miembros de los grupos de *Homeostasis de Cu y Fe* y *Homeostasis de Cu en Arabidopsis thaliana* que han contribuido en este trabajo.
- Drs. Teresa Lafuente y Paco Romero del *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* (CSIC, Valencia) por su ayuda en la determinación de ácido abscísico mediante un ensayo de ELISA indirecto.
- Drs. Miguel Ángel Pérez Amador y Francisco Vera del *Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas* (CSIC, Valencia), por su colaboración en los experimentos de micromatrices de DNA.
- Drs. Miguel Blázquez y Verónica Arana del *Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas* (CSIC, Valencia), por su ayuda en la medición de la longitud de hipocotilos.
- Dr Peter Huijser y los miembros de su grupo de Investigación, del *Instituto Max Planck de Colonia*, por permitir mi estancia en su laboratorio para desarrollar el trabajo realizado a partir de su colección de mutantes de *Arabidopsis*.
- Drs Paloma Más y Seth Davis del *Centre de Recerca en Agrigenòmica* de la Universitat de Barcelona y del *Instituto Max Planck de Colonia*, respectivamente, por su ayuda en los ensayos de ritmo circadiano.
- Drs Isabelle Carré e Hirohaki Yamasaki de la *Universidad de Warwick* de Reino Unido y de la *Universidad de Kyushu* de Japón, por facilitarnos las plantas *PLHY:LUC* y el mutante *spl7*, respectivamente.

Agradecimientos:

A mi directora Lola, por permitirme formar parte de su grupo y por su excelente dirección estos años. Por todo lo que me ha enseñado y porque la admiro por su modo de entregarse y disfrutar la ciencia.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Plantas, porque en este tiempo he conocido a grandes personas y siempre los conservaré como buenos amigos. Porque han sido y son muchísimos los momentos vividos junto a ellos. A todos gracias por este maravilloso tiempo a vuestro lado.

Al resto de compañeros y profesores del departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Con ellos he compartido gestos de complicidad y vivencias que me han permitido conocerlos mejor y de los que guardo un muy grato recuerdo. Así mismo a los miembros de administración y a los técnicos de mantenimiento y de limpieza, por su comprensión e inagotable ayuda.

A mis amigos y amigas fuera del laboratorio por apoyarme en mis decisiones y por compartir conmigo tantas cosas. Todos ellos me han ayudado a ver las cosas desde otro punto de vista.

A Fran por cambiarme la vida y por endulzámela.

A toda mi familia, a mi hermano y en especial a mis padres, a los que quiero y debo mucho. Siempre han estado y están a mi lado con sus buenos consejos y su completa disposición.

*“Después de todo esto...
...nos damos un premio”*

Lola Peñarrubia

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vii
FIGURAS	xiii
TABLAS	xix
INTRODUCCIÓN	1
1. BIOQUÍMICA DEL COBRE Y DEL HIERRO	4
1.1. Esencialidad del cobre.....	5
1.1.1. <i>Patología y sintomatología asociada a la deficiencia de cobre</i>	6
1.2. Esencialidad del hierro.....	8
1.2.1. <i>Patología y sintomatología asociada a la deficiencia de hierro</i>	9
1.3. Toxicidad del cobre y del hierro.....	9
1.4. Consecuencias del exceso de cobre.....	11
2. RED HOMEÓSTATICA DEL COBRE	13
2.1. Distribución intracelular en <i>Arabidopsis</i>	13
3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POSTRANSKRIPCIONAL	17
3.1. Los miRNAs y el estrés abiótico.....	17
3.1.1. <i>Los miRNAs en deficiencia de Cu</i>	19
3.2. Los miRNAs y las transiciones de fase en el desarrollo.....	20
3.3. Familia SPL.....	21
3.3.1. <i>Regulación postranscripcional de SPLs</i>	22
3.4. Regulación transcripcional en deficiencia de cobre.....	23
3.5. Regulación transcripcional en deficiencia de hierro.....	27
4. RELOJ BIOLÓGICO CIRCADIANO EN <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
4.1. Características del reloj circadiano.....	28
4.2. Bioquímica del reloj.....	29

4.3. <i>Inputs y outputs</i> del reloj.....	31
4.4. El estado nutricional y el reloj circadiano.....	33
5. CARACTERÍSTICAS DE LOS TRANSPORTADORES COPTs Y EFECTOS DE LAS ALTERACIONES DE SU EXPRESIÓN.....	34
OBJETIVOS.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	47
1.1. Manipulación de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
1.1.1. <i>Cultivo en maceta</i>	48
1.1.2. <i>Cultivo en placa</i>	49
1.1.3. <i>Cultivo en sistema hidropónico</i>	50
1.1.4. <i>Obtención de plantas transgénicas</i>	51
1.2. Manipulación de bacterias <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
1.2.1. <i>Condiciones de cultivo y transformación de Escherichia coli</i>	52
1.2.2. <i>Condiciones de cultivo y transformación de Agrobacterium tumefaciens</i>	52
1.3. Diseño de construcciones al gen <i>chivato luciferasa</i>	53
2. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	54
2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos.....	54
2.1.1. <i>Obtención de DNA genómico de Arabidopsis thaliana</i> ...	54
2.1.2. <i>Obtención de RNA total de Arabidopsis thaliana</i>	55
2.1.3. <i>Aislamiento de DNA plasmídico de bacteria</i>	56
2.2. Análisis de ácidos nucleicos.....	56
2.2.1. <i>Electroforesis de DNA y purificación de bandas</i>	56
2.2.2. <i>Reacciones enzimáticas: restricción, desfosforilación y ligación</i>	57
2.2.3. <i>Electroforesis de RNA</i>	57
2.2.4. <i>Síntesis de cDNA</i>	58
2.2.5. <i>RT-PCR semicuantitativo (sqPCR)</i>	59
2.2.6. <i>RT-PCR cuantitativo a tiempo real (qPCR)</i>	60

2.2.7. Micromatrices de DNA.....	62
3. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	63
3.1. Extracción de proteínas totales.....	63
3.2. Electroforesis de proteínas y tinción del gel.....	64
3.3. Transferencia de geles de proteínas a membrana e inmunodetección.....	64
3.4. Medida del contenido de ABA y apertura estomática.....	65
3.5. Bioluminiscencia.....	66
4. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PLANTAS.....	67
4.1. Medida del peso fresco y de la longitud de la raíz de plántulas.....	67
4.2. Medida de la actividad SOD.....	67
4.3. Determinación del contenido endógeno de cobre y hierro en plántulas.....	68
4.4. Determinación del contenido de antocianinas, MDA y clorofilas en plántulas.....	69
4.5. Estudio de la actividad β -glucuronidasa en las plantas <i>PCOPT:GUS</i> y <i>PMIR:GUS</i>	70
4.6. Medida del movimiento foliar.....	70
4.7. Análisis de los datos.....	71
RESULTADOS	73
1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ESTUDIO DEL ESTADO NUTRICIONAL DE COBRE EN <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	75
1.1. Estudio del rango de niveles de cobre a utilizar en diferentes tipos de cultivo.....	75
1.1.1. Crecimiento de plantas en maceta.....	75
1.1.2. Crecimiento de plantas en cultivos hidropónicos.....	77
1.1.3. Crecimiento de plántulas en placas de cultivo.....	79
1.2. Expresión de genes marcadores regulados por exceso y deficiencia de cobre.....	82
1.2.1. Expresión génica en exceso de cobre.....	82
1.2.2. Expresión génica en deficiencia de cobre.....	84
1.2.3. Cinéticas de la percepción de los cambios en los niveles de cobre del medio.....	87
1.3. Efecto de la sobreexpresión del factor transcripcional SPL3 sobre la respuesta a la deficiencia de cobre.....	90

1.4. Regulación postranscripcional de la deficiencia de cobre.....	98
2. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE ALTA AFINIDAD DE COBRE COPT2, EN DEFICIENCIA DE HIERRO.	101
2.1. Efecto de las deficiencias de cobre y de hierro en la regulación de la expresión de <i>COPT</i>	101
2.2. Caracterización de la línea mutante <i>copt2-1</i> en condiciones de deficiencia de cobre y hierro.....	104
2.3. Efectos de la deficiencia de hierro en la respuesta a la deficiencia de cobre.....	114
2.4. Análisis global de los cambios de expresión génica en las plantas <i>copt2-1</i>	120
3. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS SOBREENPRESORAS DE COPT1.....	135
3.1. Efectos de la sobreexpresión del transportador de alta afinidad de cobre COPT1, en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	135
3.2. Sensibilidad de las plántulas sobreexpresoras de COPT1 a diferentes tipos de iluminación.....	137
3.3. Análisis global de los cambios de expresión génica en deficiencia y exceso de cobre en las plantas sobreexpresoras de COPT1.....	139
3.4. Apertura estomática y contenido en ABA en plantas con diferente contenido en cobre y hierro.....	151
4. REGULACIÓN TEMPORAL DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE.....	169
4.1. Análisis teórico de la secuencia promotora de los genes de homeostasis del cobre y del reloj circadiano.....	169
4.2. Estudio de la regulación temporal de genes del reloj circadiano y de la homeostasis del cobre.....	172
4.3. Estudio del efecto del cobre sobre parámetros circadianos.....	182
4.4. Fenotipos de las plantas sobreexpresoras de COPT1 y COPT3 de <i>Arabidopsis</i> en condiciones continuas.....	185
4.5. Las alteraciones en el contenido de cobre en <i>Arabidopsis</i> influyen en la expresión de los componentes del reloj circadiano <i>LHY</i> y <i>CCA1</i>	190
4.6. Influencia de la luz en los genes de respuesta cíclica a la deficiencia de cobre.....	192

DISCUSIÓN.....	201
1. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO EN COBRE, EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA SEÑALIZACIÓN POR ÁCIDO ABSCÍSIKO.....	203
2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL TRANSPORTE DE COBRE.....	209
3. RELACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE CON LA DE OTROS NUTRIENTES.....	212
4. ASPECTOS TEMPORALES DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE Y SU RELACIÓN CON LOS RITMOS CIRCADIANOS.....	217
CONCLUSIONES.....	227
BIBLIOGRAFÍA.....	231

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	ácido abscísico
ABAR	<i>ABA-related gene</i>
ACT	<i>actin</i>
AHA	<i>Arabidopsis H⁺-ATPase</i>
ANOVA	análisis de la varianza
AOX	<i>alternative oxidase</i>
AP	<i>apetala</i>
aRNA	RNA antisentido
AROS	conjunto de cebadores de matrices
ATP	trifosfato de adenosina
ATX1	<i>antioxidant protein 1</i>
BCS	ácido 2, 9-dimetil-4,7-difenil-1, 10-fenantrolina-disulfónico
bHLH	tipo básico alfa-hélice-alfa
BHT	hidroxitolueno butilado
BRASS	sistema de software de análisis de ritmo biológico
BSA	albúmina de suero bovino
BUB	<i>budding unhibited for benzimidazol</i>
CaMV35S	promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
C2	línea complementada de <i>copt2-1</i>
CCA1	<i>circadian clock associated 1</i>
CCS	<i>copper chaperone for superoxide dismutase</i>
CCH	<i>copper chaperone</i>
cDNA	DNA complementario
CNR	<i>colorless non-ripening</i>
COL	columbia
COL	<i>constans like</i>
COM	comercial
COPT	<i>copper transporter</i>
Cox	cytochromo c oxidasa
COX17	<i>cytochrome oxidase 17</i>

CRR1	<i>copper response regulator</i>
CSD	<i>Cu/Zn superoxide dismutase</i>
CSPL7	línea complementada de <i>spl7</i>
Ct	ciclo umbral
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
CTR	<i>copper transporter</i>
Ctrl	control
Cu/ZnSOD	superóxido dismutasa de cobre y zinc
CuRE	elemento de respuesta a cobre
Cy	cianina
Cys	cisteína
DDHC	oscuridad oscuridad calor frío
DDHH	oscuridad oscuridad calor calor
DE	desviación estándar
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EE	elemento vespertino
<i>ELF</i>	<i>early flowering</i>
ELISA	ensayo inmunoenzimático
<i>ETR</i>	<i>ethylene response 1</i>
<i>EXPB3</i>	<i>expansin B3</i>
<i>FER</i>	<i>ferritine</i>
FeSOD	superóxido dismutasa de hierro
<i>FIT</i>	<i>Fe-deficiency induced transcription factor</i>
<i>FRO</i>	<i>ferric reductase oxidase</i>
<i>FSD</i>	<i>Fe superoxide dismutase</i>
FTT-NLLS	transformada rápida de Fourier - mínimos cuadrados no lineales
gDNA	DNA genómico
<i>GDH</i>	<i>glutamate dehydrogenase</i>
<i>GDPD</i>	<i>glycerol phosphodiesterase</i>
<i>GLN3.1</i>	<i>glutamine synthetase</i>
GUS	β -glucuronidasa
HA	epítipo de la hemaglutinina humana del virus influenza

His	histidina
HMA	<i>heavy metal ATPases</i>
HYP	hipótesis
IATA	Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos
IBMCP	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
ICP-MS	espectroscopia de masas con plasma de acoplamiento inductivo
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IRT	<i>iron transporter</i>
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LB	medio Luria-Bertani
LB-ERG	LB espectinomicina/rifampicina/gentamicina
LC	luz continua
LDHC	luz oscuridad calor frío
LDHH	luz oscuridad calor calor
LHCB	<i>light harvesting chlorophyll binding</i>
LHY	<i>late elongated hypocotyl</i>
LPR	<i>low phosphate response</i>
LSU	<i>low sulphate</i>
LUC	luciferasa
LUX	<i>lux arrhythmo</i>
LLHC	luz luz calor frío
LLHH	luz luz calor calor
M.I.	membranas intracelulares
M.P.	membrana plasmática
MDA	malondialdehido
ME	elemento de mañana
MES	ácido 4-morfolino-etano-sulfónico
miRNA	microRNA
MnSOD	superóxido dismutasa de manganeso
MoCo	cofactor del molibdeno
MOPS	ácido 3-morfolino-propano-sulfónico
MRE	elemento de respuesta a miRNA
mRNA	RNA mensajero
MS	medio Murashige-Skoog
MSG	MS gentamicina

MTs	metalotioneína
NA	nicotianamina
NAC	no meristemo apical
NAS	<i>nicotianamine synthase</i>
NBT/BCIP	cloruro de nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
NG/ NGR	número de genes/genes de referencia
NRAMP	<i>natural resistance associated macrophage protein</i>
OD₆₀₀	densidad óptica 600
PEG	polietilenglicol
P.F.	peso fresco
P.S.	peso seco
p/v	peso/volumen
PAA	<i>P-type ATPase of Arabidopsis</i>
pb	pares de bases
PBX	caja de proteína
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PC	plastocianina
PCs	fitoquelatinas
Pi	fosfato inorgánico
PINA	<i>pineal night-specific ATPase</i>
PMSF	fluoruro de fenilmetanosulfonilo o fenil sulfonil fluoruro de metilo
PRR	<i>pseudo-response regulators</i>
PVP	polivinilpirrolidona
qPCR	PCR cuantitativa
RAN	<i>responsive-to-antagonist 1</i>
RBOHI	<i>respiratory burst oxidase</i>
RNA	ácido ribonucleico
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
RT-PCR	retrotranscripción
RVE	<i>reveille</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAP	fosfatasa alcalina de gamba
SBP	proteína de unión a SQUAMOSA
SBX	caja de almidón

SDH	<i>succinate dehydrogenase</i>
SDS	sulfato dodecil de sodio
SEM	error estándar de la media
SMZ/ SNZ	del alemán <i>schlafmutze/ schnarchzapfen</i>
SOD	superóxido dismutasa
SORLIP	secuencia sobrerrepresentada en promotores inducidos por la luz
SPL	<i>SQUAMOSA protein-like</i>
SPX	proteína que contiene el dominio (SYG1/Pho81/XPR1)
sqPCR	PCR semicuantitativa
T1/T2/T3	transformantes
TAE	tris-acetato-EDTA
TAIR	fuentes de información de <i>Arabidopsis</i>
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBS	solución salina tamponada con Tris
TBX	caja telo-específica de noche tardía
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildinamina
TF	factor de transcripción
TIC	<i>time for coffee</i>
TMD	dominio transmembrana
TNG/ TNGR	número total de genes/ genes de referencia
TOCI	<i>timing of CAB expresión 1</i>
TOE	<i>target of eat</i>
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
TTBS	solución salina tamponada con Tris-Tween
UBQ	<i>ubiquitine</i>
UPB	<i>upbeat</i>
UTR	región no traducible
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
WT	silvestre
YSL	<i>yellow stripe-like</i>
ZIP	<i>ZRT/IRT related protein</i>
ZTL	<i>zeitlupe</i>

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura I.1.	Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.....	10
Figura I.2.	Componentes de la homeostasis del Cu en <i>Arabidopsis thaliana</i> a nivel subcelular.....	14
Figura I.3.	Resumen de la acción de miRNAs asociados al desarrollo y a estrés en <i>Arabidopsis</i>	18
Figura I.4.	Dominios de las proteínas CRR1 y SPLs.....	24
Figura I.5.	Regulación de la expresión génica en deficiencia de Cu	26
Figura I.6.	Modelo del oscilador central del reloj circadiano de <i>Arabidopsis</i>	31
Figura I.7.	La familia COPT de transportadores de Cu de <i>Arabidopsis</i>	36

RESULTADOS

Figura R.1.1.	Síntomas de las plantas adultas de <i>Arabidopsis</i> cultivadas en maceta con diferentes niveles de Cu.....	76
Figura R.1.2.	Cultivos hidropónicos de <i>Arabidopsis</i> en cultivadas en suficiencia y deficiencia de Cu.....	77
Figura R.1.3.	Pigmentación de la cubierta de semillas de plantas de <i>Arabidopsis</i> en suficiencia y deficiencia de Cu.....	78
Figura R.1.4.	Plántulas de <i>Arabidopsis</i> procedentes de semillas de plantas cultivadas en deficiencia y suficiencia de Cu....	79
Figura R.1.5.	Contenido en MDA y clorofila en plántulas de <i>Arabidopsis</i> cultivadas en medio con diferentes concentraciones de Cu.....	81
Figura R.1.6.	Expresión de genes inducidos por el exceso de Cu.....	83
Figura R.1.7.	Expresión de genes inducidos en deficiencia de Cu.....	85
Figura R.1.8.	Cinéticas de expresión de los genes <i>COPT2</i> y <i>FSD1</i> tras la transferencia de deficiencia a suficiencia en Cu..	88
Figura R.1.9.	Cinéticas de la expresión de los genes <i>COPT2</i> y <i>FSD1</i> tras la transferencia de suficiencia a deficiencia severa de Cu.....	89
Figura R.1.10.	Expresión de genes marcadores de deficiencia de Cu en plántulas <i>SPL3</i> ^{OE}	92
Figura R.1.11.	Expresión de genes marcadores de deficiencia de Cu en plántulas <i>SPL8</i> ^{OE}	93
Figura R.1.12.	Expresión del gen <i>SPL3</i> en diferentes concentraciones de Cu.....	94

Figura R.1.13.	Expresión del gen <i>SPL3</i> en plántulas WT y <i>spl7</i>	95
Figura R.1.14.	Fenotipo de plantas <i>SPL3</i> ^{OE} en diferentes condiciones de Cu.....	96
Figura R.1.15.	Fenotipo de plántulas <i>SPL3</i> ^{OE} en deficiencia severa de Cu.....	97
Figura R.1.16.	Detección de la actividad GUS en plantas transgénicas <i>PMIR156:GUS</i>	99
Figura R.1.17.	Expresión de los <i>miR156</i> y <i>miR172</i> en diferentes concentraciones de Cu.....	100
Figura R.2.1.	Expresión de <i>COPT2</i> en deficiencia de Fe y Cu en plántulas.....	102
Figura R.2.2.	Detección de la actividad β-glucuronidasa en plántulas <i>PCOPT2:GUS</i>	103
Figura R.2.3.	Patrón de expresión de <i>COPT2</i> en plántulas <i>PCOPT2:GUS</i> con diferente contenido en Cu.....	104
Figura R.2.4.	Fenotipos de plántulas <i>copt2-1</i> cultivadas en deficiencia de Cu y Fe.....	105
Figura R.2.5.	Contenido en clorofila total en plántulas cultivadas en deficiencia de Fe.....	106
Figura R.2.6.	Peso fresco y expresión de <i>LHCBI.1</i> en plántulas <i>copt2-1</i>	107
Figura R.2.7.	Contenido en clorofila y expresión génica de plántulas <i>copt2-1</i> complementadas cultivadas en deficiencia de Cu y Fe.....	109
Figura R.2.8.	Fenotipos de plántulas <i>copt1</i> cultivadas en deficiencia de Cu y de Fe.....	110
Figura R.2.9.	Fenotipo de plantas <i>copt2-1</i> cultivadas en cultivo hidropónico.....	112
Figura R.2.10.	Contenido endógeno de Fe en plántulas WT y <i>copt2-1</i> .	113
Figura R.2.11.	Contenido endógeno de Cu en plántulas WT y <i>copt2-1</i> .	114
Figura R.2.12.	Análisis de la expresión de <i>COPT1</i> en plántulas <i>copt2-1</i>	115
Figura R.2.13.	Análisis de la expresión de <i>FSD1</i> y <i>CSD2</i> en plántulas <i>copt2-1</i>	116
Figura R.2.14.	Actividad SOD de plántulas <i>copt2-1</i> en diferentes niveles de Cu y de Fe.....	117
Figura R.2.15.	Fenotipo de plántulas <i>copt2-1</i> en diferentes condiciones de estrés oxidativo.....	118
Figura R.2.16.	Análisis de la expresión de <i>FRO2</i> e <i>IRT1</i> en plántulas <i>copt2-1</i>	119
Figura R.2.17.	Análisis de la expresión de <i>COPT2</i> y <i>ZIP2</i> en plántulas <i>copt2-1</i>	121

Figura R.2.18.	Diagramas de Venn para genes inducidos y reprimidos en plántulas <i>copt2-1</i>	122
Figura R.2.19.	Análisis de la expresión de <i>AT4</i> y <i>SPX1</i> en plántulas <i>copt2-1</i>	124
Figura R.2.20.	Fenotipo de plántulas <i>copt2-1</i> de <i>Arabidopsis</i> en ayuno de Pi.....	125
Figura R.2.21.	Actividad GUS de plántulas <i>copt2-1</i> en condiciones de ayuno de Pi.....	126
Figura R.3.1.	Sobreexpresión del transportador COPT1 en plantas de <i>Arabidopsis</i>	136
Figura R.3.2.	Expresión del gen <i>COPT1</i> en plántulas COPT1 ^{OE}	137
Figura R.3.3.	Fenotipo de las plántulas COPT1 ^{OE} en diferentes condiciones de iluminación.....	138
Figura R.3.4.	Expresión del gen <i>COPT1</i> en plántulas COPT1 ^{OE}	139
Figura R.3.5.	Diagramas de Venn de genes inducidos y reprimidos en plántulas COPT1 ^{OE} en deficiencia y exceso de Cu...	140
Figura R.3.6.	Expresión de los genes <i>AOX1D</i> y <i>LSU1</i> en plántulas COPT1 ^{OE}	144
Figura R.3.7.	Expresión de los genes <i>UPB1</i> y <i>FER1</i> en plántulas COPT1 ^{OE}	145
Figura R.3.8.	Expresión del gen <i>NAC87</i> en plántulas COPT1 ^{OE}	148
Figura R.3.9.	Expresión del gen <i>NAC87</i> en diferentes concentraciones de Cu.....	149
Figura R.3.10.	Expresión del gen <i>NAC87</i> en condiciones de exceso de diferentes metales.....	150
Figura R.3.11.	Expresión del gen <i>NAC87</i> en condiciones de deficiencia de diferentes metales.....	151
Figura R.3.12.	Contenido total ABA en función del contenido en Cu...	152
Figura R.3.13.	Contenido total de la hormona vegetal ABA en deficiencias de Fe y de Cu.....	153
Figura R.3.14.	Apertura estomática de plantas WT y en el mutante <i>sp17</i>	154
Figura R.4.1.	Expresión de los genes <i>COPT2</i> , <i>FSD1</i> , <i>LHY</i> y <i>CCA1</i> en diferentes concentraciones de Cu.....	173
Figura R.4.2.	Expresión diurna de <i>LHY</i> y <i>CCA1</i> en bajo y alto contenido de Cu.....	174
Figura R.4.3.	Expresión diurna de <i>COPT2</i> y <i>FSD1</i> en bajo y alto contenido de Cu.....	175
Figura R.4.4.	Actividad luciferasa en diferentes concentraciones de Cu.....	176
Figura R.4.5.	Regulación por Cu de la actividad luciferasa dirigida por el promotor <i>LHY</i>	177

Figura R.4.6.	Expresión de los genes <i>FSD1</i> y <i>LUC</i> en función del contenido de Cu.....	179
Figura R.4.7.	Regulación por Cu de la actividad luciferasa dirigida por los promotores <i>COPT2</i> y <i>FSD1</i>	180
Figura R.4.8.	Regulación por Cu de la actividad luciferasa dirigida por los promotores <i>COPT2</i> , <i>FSD1</i> y <i>FSD1(4GTAC)</i>	181
Figura R.4.9.	Estudio del efecto del Cu sobre la fase por Cu de la actividad luciferasa dirigida por el promotor <i>LHY</i>	182
Figura R.4.10.	Regulación por Cu de la actividad luciferasa dirigida por el promotor <i>LHY</i>	183
Figura R.4.11.	Regulación por Cu de la expresión génica de componentes del reloj y genes de respuesta al reloj.....	184
Figura R.4.12.	Efecto de la ausencia de ciclos de luz y temperatura en plántulas <i>COPT1^{OE}</i> y <i>COPT3^{OE}</i>	185
Figura R.4.13.	Efecto de la ausencia de ciclos de luz y temperatura sobre la longitud de las raíz en plántulas <i>COPT1^{OE}</i> y <i>COPT3^{OE}</i>	186
Figura R.4.14.	Efecto de la ausencia de ciclos de luz y temperatura sobre el peso fresco, contenido en clorofila, MDA y antocianinas en plántulas <i>COPT1^{OE}</i> y <i>COPT3^{OE}</i>	187
Figura R.4.15.	Efecto de la ausencia de ciclos de luz o temperatura en plántulas <i>COPT1^{OE}</i> y <i>COPT3^{OE}</i>	189
Figura R.4.16.	Regulación de la expresión génica de los componentes del reloj circadiano y genes de respuesta del reloj en las plántulas <i>COPT1^{OE}</i> y <i>COPT3^{OE}</i>	191
Figura R.4.17.	Regulación de la expresión génica por Cu y por la luz..	193
Figura R.4.18.	Regulación de la expresión génica por Cu y por la luz..	194
Figura R.4.19.	Regulación de la expresión génica por Cu y por la luz..	195
Figura R.4.20.	Regulación de la expresión génica por Cu y por la luz..	196
Figura R.4.21.	Patrón de expresión <i>in silico</i> del factor transcripcional <i>SPL7</i>	197
Figura R.4.22.	Período y amplitud del movimiento de los cotiledones del mutante <i>spl7</i>	198

DISCUSIÓN

Figura D.1.	Esquema de la relación entre el estrés oxidativo y la homeostasis del Cu.....	206
Figura D.2.	Esquema de la regulación transcripcional mediada por SPL7 y de la regulación postranscripcional de SPL3....	210
Figura D.3.	Regulación de la expresión de <i>COPT2</i> , <i>FSD1</i> y <i>COPT1</i> según el estado nutricional de Fe y Cu.....	213
Figura D.4.	Modelo de la expresión de <i>COPT2</i> en condiciones de deficiencia de Cu, Fe y Pi.....	215
Figura D.5.	Circuitos de retroalimentación del transporte de Cu y el reloj circadiano en <i>Arabidopsis</i>	219
Figura D.6.	Esquema de la oscilación de las plántulas <i>PLHY:LUC</i> ..	220
Figura D.7.	Fenotipos de las plantas <i>COPT1</i> ^{OE} asociados al ritmo circadiano.....	221
Figura D.8.	Modelo global de bucles de retroalimentación interconectados con el oscilador circadiano.....	225

TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla I.1.	Resumen de las principales características distintivas de la familia COPT.....	37
------------	--	----

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M.1.	Líneas transgénicas empleadas en el presente trabajo.....	47
Tabla M.2.	Cebadores utilizados para la clonación de los promotores <i>COPT2</i> y <i>FSD1</i>	54
Tabla M.3.	Cebadores utilizados para la síntesis de cDNA.....	59
Tabla M.4.	Cebadores utilizados para la sqPCR.....	60
Tabla M.5.	Cebadores utilizados para la qPCR.....	61

RESULTADOS

Tabla R.1.1.	Resumen de las condiciones de estudio de <i>Arabidopsis</i> según el contenido en Cu endógeno.....	80
Tabla R.1.2.	Resumen de las categorías funcionales preponderantes en función de la condición de Cu.....	82
Tabla R.1.3.	Resumen de la expresión de los <i>miR156</i> y <i>miR157</i> en raíces de plantas en diferentes estadios del crecimiento....	98
Tabla R.2.1.	Preponderancia de la categoría funcional de ayuno de fosfato en plántulas <i>copt2-1</i>	122
Tabla R.A1.	Genes diferenciales reprimidos en plántulas <i>copt2-1</i>	127
Tabla R.A2.	Genes diferenciales inducidos en plántulas <i>copt2-1</i>	133
Tabla R.3.1.	Procesos biológicos preponderantes entre los genes reprimidos en las plántulas COPT1 ^{OE}	141
Tabla R.3.2.	Compartimentos celulares preponderantes entre los genes reprimidos en las plántulas COPT1 ^{OE}	142
Tabla R.3.3.	Genes representativos de las distintas categorías funcionales entre los genes inducidos y reprimidos en las plántulas COPT1 ^{OE}	143
Tabla R.3.4.	Factores transcripcionales diferencialmente regulados en las plántulas COPT1 ^{OE} de <i>Arabidopsis</i>	146
Tabla R.A3.	Genes diferenciales inducidos en plántulas COPT1 ^{OE}	155
Tabla R.A4.	Genes diferenciales reprimidos en plántulas COPT1 ^{OE}	166

Tabla R.4.1.	Análisis teórico de los promotores de los componentes de la homeostasis de Cu.....	171
Tabla R.4.2.	Análisis teórico de los promotores de los componentes nucleares del reloj circadiano.....	171

INTRODUCCIÓN

El cobre (Cu) y el hierro (Fe) son nutrientes esenciales para los seres vivos aerobios y sus potenciales redox son utilizados en las reacciones de transferencia de electrones. Sin embargo, esta capacidad redox resulta tóxica cuando los metales de transición entran en contacto con intermediarios del metabolismo aerobio, conocidos como ROS (*reactive oxygen species*) (Halliwell and Gutteridge, 1984). Los organismos aerobios han desarrollado estrategias homeostáticas para mantener los niveles de los metales adecuados en la célula y distribuir, espacial y temporalmente, los procesos de transporte y tráfico intracelular de metales para minimizar el daño oxidativo al resto de procesos celulares. En este sentido, recientemente se ha demostrado la interacción recíproca entre la homeostasis metálica y el reloj circadiano en *Arabidopsis thaliana*, como medio para organizar en el tiempo el transporte de metales, adecuándolo a los periodos en que resulte menos tóxico y como forma de traducir las señales ambientales en información temporal. El reloj circadiano influye sobre las oscilaciones endógenas en la expresión de los genes, en la síntesis, degradación y modificación postraduccional de las proteínas y en los cambios rítmicos en la estructura de la cromatina (McClung, 2006; Harmer, 2009; Más and Yanovsky, 2009; Haydon et al., 2011). El objetivo final de esta interacción recíproca, entre los metales y el reloj, sería el de coordinar rítmicamente el metabolismo y la fisiología y adecuarlos a las condiciones ambientales para optimizar la eficiencia de procesos clave para las plantas, como el crecimiento, el desarrollo y la reproducción.

En este contexto, nuestro interés se ha centrado en profundizar en el conocimiento de la homeostasis del Cu en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Para ello, hemos estudiado los cambios globales de la expresión génica y la regulación espacio-temporal de los componentes de la homeostasis del Cu. Por último, hemos analizado su interacción con la de otros metales,

como el Fe, cuando se alteran los niveles de Cu en el medio o la expresión de sus transportadores en plantas transgénicas.

1. BIOQUÍMICA DEL COBRE Y DEL HIERRO

El Cu y el Fe son metales de transición que presentan una configuración electrónica que les permite formar complejos de coordinación con moléculas orgánicas o con las cadenas laterales de aminoácidos, lo que los convierte en cofactores esenciales en numerosas proteínas con diferentes actividades celulares (Lippard and Berg, 1994; Puig et al., 2007). Según las series de Irving-Williams, que hacen referencia a la estabilidad relativa de los complejos formados por iones metálicos, el Cu^{2+} sería el metal más estable en la formación de dichos complejos (Lippard and Berg, 1994).

En el origen de la vida en la Tierra, dónde la atmósfera primitiva era anóxica, probablemente el Fe fue el elemento empleado como cofactor por las proteínas partícipes de la transferencia electrónica, debido a la elevada presencia de Fe^{2+} en disolución en los océanos primitivos. Sin embargo, tras la conversión de la atmósfera en oxidante, mediante la acción de los primeros organismos fotosintéticos, el Fe pasó a ser insoluble en su forma oxidada (Fe^{3+}), ya que se encuentra generalmente presente en forma de hidróxidos y óxidos. Al mismo tiempo, el Cu, que en su forma reducida (Cu^+) es insoluble, pasó a la forma oxidada (Cu^{2+}), que es soluble y, por tanto, accesible para las reacciones redox orgánicas, iniciándose su utilización por parte de los seres vivos y la sustitución de algunas funciones previamente desarrolladas por el Fe (Crichton and Pierre, 2001).

El Cu y el Fe son elementos traza o micronutrientes, ya que se necesitan en cantidades pequeñas para el crecimiento, desarrollo y fisiología de un organismo, pero a concentraciones por encima de las óptimas resultan tóxicos. Existen diferentes mecanismos de absorción, distribución y excreción de los

micronutrientes en función de la abundancia del elemento en el medio o de su distribución en los tejidos durante el desarrollo. Estos procesos no son independientes para cada micronutriente, ya que el exceso o déficit de un elemento puede influir en la regulación de otro, así como desencadenar alteraciones directas o indirectas en otros procesos. Estas consideraciones ponen de manifiesto la complejidad con la que se enfrentan los seres vivos para asegurarse el abastecimiento de un determinado micronutriente y evitar su toxicidad.

1.1 Esencialidad del cobre

Entre las características del Cu que permiten su uso en cuproproteínas, con diferentes tipos de centros de Cu y funciones biológicas en plantas, destacan las siguientes:

- Plastocianina, que transfiere electrones en la cadena de transporte fotosintética entre el citocromo f del complejo del citocromo b6f del fotosistema II y el centro P700 del fotosistema I. Se encuentra asociada a la cara luminal de la membrana tilacoidal de los cloroplastos (Weigel et al., 2003).
- Oxidasas, que catalizan la oxidación de moléculas pequeñas, reduciendo al O₂ o a algún derivado, a estados intermedios de oxidación. La mayoría de las oxidasas son, o bien proteínas integrales de membrana, como la citocromo c oxidasa (COX) mitocondrial (Cobine et al., 2006; Gredilla et al., 2006), o bien se encuentran en compartimentos como el espacio extracelular, el periplasma o el lumen tilacoidal. Otras oxidasas, como las superóxido dismutasas (SOD), son enzimas importantes en la defensa antioxidante. La SOD de Cu y Zn tiene tres isoformas diferentes, localizadas en el citosol (codificada por el gen *CSD1*, *Cu/Zn superoxide dismutase 1*), el estroma del cloroplasto (codificada por *CSD2*) y el espacio peroxisomal (codificada por *CSD3*). Además, la FeSOD y la MnSOD, están localizadas en el

cloroplasto y la mitocondria, respectivamente (Kliebenstein et al., 1998). Por otro lado, las ascorbato oxidasas funcionan en la expansión celular (Pignocchi et al., 2003; Yamamoto et al., 2005) y las amino oxidasas participan en la diferenciación de la pared celular (Kumar et al., 1996). Por último, las lacasas son proteínas que siguen la ruta de secreción y que participan en el remodelado de la pared celular y en el metabolismo de compuestos fenólicos (Gavnholt and Larsen, 2002; Cai et al., 2006).

- Cofactor del molibdeno (MoCo, *molybden cofactor*), que necesita Cu para su biosíntesis, ya que el Cu ocupa temporalmente el sitio para la inserción del Mo en la unión al sustrato molybdopterina. Entre los enzimas que requieren del cofactor MoCo hay algunos implicados en los procesos de asimilación de nitrógeno y en la biosíntesis de ácido abscísico (ABA) (Kuper et al., 2004; Mendel and Schwarz, 2011).
- Plantacianina, que está localizada en el apoplasto del polen, donde interviene en dirigir el tubo polínico por el estigma (Kim et al., 2003; Dong et al., 2005).
- Receptor del etileno (codificado por *ETR1*, *ethylene response 1* entre otros), que es una proteína localizada en el retículo endoplasmático, donde ha de unir el Cu de manera adecuada para la percepción de esta hormona gaseosa (Chang and Shockey, 1999; Chen et al., 2002). *RANI* codifica la ATPasa transportadora de Cu, que facilita el bombeo del metal al lumen del retículo y la llegada del metal al receptor *ETR1*, en el que hay un sitio de unión al Cu por homodímero. La unión del etileno altera la química de coordinación del Cu, activando cambios conformacionales en el receptor, que inician la cascada de señalización (Guo and Ecker, 2004).

1.1.1. Patología y sintomatología asociada a la deficiencia de cobre

Las condiciones severas de deficiencia y exceso de Cu son poco habituales en los suelos de forma natural. Sin embargo, es común una ligera deficiencia tras el lavado de suelos arenosos pobres en Cu, que también se

puede ocasionar debido a un exceso de cal o por un aumento en el pH del suelo. Además, la presencia de materia orgánica o la adición de estiércoles que retienen el metal, así como la existencia de nutrientes que restrinjan la absorción del Cu, en favor de la de otros minerales, también dificultan o impiden la asimilación del metal (Märschner, 2002). Los síntomas de deficiencia de Cu varían en función de la planta, pero una de las características más habituales es la alteración del desarrollo reproductivo. A nivel anatómico, las plantas deficientes en Cu desarrollan anteras más pequeñas y con un escaso número de granos de polen (Graham, 1975; Jewell et al., 1988). Otros síntomas son la reducción global del crecimiento y de la actividad fotosintética, ya que se altera el funcionamiento de las cadenas de transporte electrónico, tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos, debido a la escasez de cuproproteínas funcionales, como la citocromo c oxidasa y la plastocianina, respectivamente. Por tanto, la deficiencia de Cu afecta a la productividad de las plantas, lo que provoca pérdidas económicas y disminuye el valor nutricional de los cultivos. En último término, la alimentación humana se ve afectada, ya que las plantas forman parte del primer eslabón de las cadenas tróficas y son la principal fuente de nutrientes en la dieta animal (Linder et al., 1998). En humanos, existen diferentes causas que pueden provocar el déficit de Cu en el organismo, como la ingesta insuficiente, la deficiencia en su absorción y algunos trastornos hereditarios. Entre estos últimos se encuentra la enfermedad de Menkes, causada por una mutación en el gen que codifica la ATPasa de Cu, (ATP7A) (Schlief et al., 2006). Las consecuencias de la deficiencia de Cu en humanos van desde la anemia, a efectos neurológicos o anomalías en la pigmentación (Linder et al., 1998).

1.2 Esencialidad del hierro

El Fe, que se incorpora a las proteínas mediante diferentes cofactores, desempeña funciones clave en diferentes vías metabólicas. Se conocen múltiples ferroproteínas con diferentes tipos de centros de Fe y funciones biológicas, entre las que destacan las siguientes:

- Hemoproteínas, que son proteínas que contienen un grupo prostético tipo hemo en cuya parte central se encuentra el Fe. Los citocromos son hemoproteínas capaces de aceptar y donar electrones en las cadenas de transporte de electrones fotosintéticas y respiratorias. Otras hemoproteínas son las peroxidasas y catalasas que catalizan la oxidación de peróxidos y H_2O_2 , compuestos tóxicos para los organismos (Drazkiewicz et al., 2004; Dietz et al., 2006).
- Centros Fe-S. Son complejos con grupos de Fe y S, que participan como cofactores en múltiples funciones como donadores y aceptores de electrones en una amplia variedad de reacciones biológicas. Por ejemplo, la ferredoxina contiene un centro Fe-S que interviene en la fotofosforilación durante la fotosíntesis. Además, los centros Fe-S pueden actuar como sensores de las condiciones ambientales o intracelulares para regular la expresión génica y participan en actividades enzimáticas implicadas en funciones como la reparación de daños en el DNA (Lill and Mühlhoff, 2008) y la traducción de proteínas (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005).
- Ferritina, que es la principal forma de almacenamiento del Fe en los tejidos en los vertebrados y en plantas. Éstas últimas, retienen el Fe principalmente en los cloroplastos, y lo liberan de acuerdo con las necesidades metabólicas de la planta (Van Der Mark et al., 1983; Briat, 1996).

1.2.1. Patología y sintomatología asociada a la deficiencia de hierro

La baja disponibilidad de Fe en el suelo es relativamente frecuente de forma natural y provoca graves síntomas en las plantas, entre ellos la clorosis foliar, que empieza en los tejidos jóvenes, y la reducción de la fertilidad. Muchas causas provocan la deficiencia de Fe, por ejemplo el intercambio con otros iones metálicos, como el Cu (Abdel-Ghany et al., 2005; Pilon et al., 2006; Puig et al., 2007). El exceso de fosfatos en el suelo, que forman complejos con el Fe, también afecta a su disponibilidad para la planta (Zhou et al., 2008). Además, los suelos calcáreos y arenosos muy lavados, así como la baja solubilidad de nutrientes debido al pH, también provocan que el Fe sea menos accesible para las plantas (Alloway, 1995).

En humanos, la deficiencia de Fe es uno de los desórdenes nutricionales más extendidos y comunes. Según la organización mundial de la salud, la anemia por deficiencia de Fe (anemia ferropénica) afecta al 25 % de la población (<http://www.who.int/es/>). Además, se han descrito alteraciones en la homeostasis del Fe que producen enfermedades humanas como la hemocromatosis y enfermedades neurodegenerativas como la ataxia de Friedrich o la aceruloplasminemia (Andrews, 2002; Puig et al., 2002).

1.3. Toxicidad del cobre y del hierro

Una de las principales causas de toxicidad es la sustitución metálica, que provoca el desplazamiento de los iones esenciales de las metaloproteínas por otros metales que impiden su función biológica (Ochiai, 1995; Koch et al., 1997; Desideri and Falconi, 2003; Yang et al., 2006). Por otro lado, las mismas propiedades redox que hacen del Cu y el Fe dos elementos esenciales en el metabolismo aerobio, los convierten en importantes agentes citotóxicos, por su alta capacidad de incrementar y acelerar la producción de radicales hidroxilo a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Figura I.1).

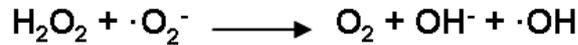
**Reacción Fenton****Reacción Haber-Weiss**

Figura I.1. Reacciones de Fenton y de Haber-Weiss. Los iones Cu^{2+} y Fe^{3+} se reducen en presencia del radical superóxido y los iones Cu^+ y Fe^{2+} contribuyen a generar el ión y el radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton. El balance neto, conocido como reacción de Haber-Weiss, genera de nuevo el perjudicial radical hidroxilo.

La citotoxicidad del radical hidroxilo reside en su extremadamente baja vida media, dada su alta velocidad de la reacción con las moléculas biológicas adyacentes al sitio de producción, por lo que no existen mecanismos de defensa antioxidativa. Efectivamente, reacciona rápidamente con las bases púricas y pirimidínicas del DNA y el RNA, con los aminoácidos de las proteínas, como la metionina y la cisteína, y con las cadenas de ácidos grasos, provocando peroxidación lipídica (Halliwell and Gutteridge, 1984). Sin embargo, otros ROS, como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, no son tan peligrosos ya que son menos reactivos, lo que les permite su difusión fuera del sitio donde se producen y su eliminación por las defensas antioxidantes (Halliwell and Gutteridge, 1984).

En *Arabidopsis*, diferentes tipos de ROS actúan como importantes moléculas señales y se ha analizado la especificidad de la señalización y la respuesta a cada tipo de ROS (Gadjev et al., 2006). En este trabajo, se engloban diferentes análisis transcriptómicos realizados en condiciones de estrés oxidativo causado por distintos tipos de ROS y en mutantes que muestran un aumento en la producción de los mismos. Estas comparaciones globales

permiten agrupar los genes cuya expresión se asocia al aumento en la producción de cada tipo de ROS, así como distinguir la localización subcelular mayoritaria (Gadjev et al., 2006).

Las células han desarrollado diferentes mecanismos de prevención y defensa para combatir el estrés oxidativo. En primer lugar, para prevenir daños oxidativos, existen sistemas redox, tales como las tiorredoxinas y las glutarredoxinas (Fernandes and Holmgren, 2004; Hanke and Mulo, 2013). En plantas, las tiorredoxinas participan de la desintoxicación de los daños producidos por ROS mediante la interacción y reducción de grupos disulfuro específicos en las proteínas diana (Buchanan and Balmer, 2005; Hanke and Mulo, 2013). La participación de compuestos antioxidantes no enzimáticos, como el ascorbato y el glutatión, y de sistemas enzimáticos de desintoxicación, tales como las superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas, es también clave en la defensa antioxidativa en plantas (Drazkiewicz et al., 2004).

1.4. Consecuencias del exceso de cobre

En agricultura el abuso de los tratamientos que contienen Cu, principalmente usados como antifúngicos, está aumentando notablemente los niveles del metal en el medio ambiente. Las plantas han desarrollado distintos sistemas, tanto extracelulares como intracelulares, para disminuir los niveles de Cu libre, y así reducir su fitotoxicidad. Existen dos tipos de polipéptidos ricos en cisteína que se encargan de secuestrar el Cu: las metalotioneínas (MTs), que se acumulan principalmente en los tricomas de las hojas, y las fitoquelatinas (PCs), que son específicas de plantas y de algunos hongos (Rauser, 1999; Sharma and Dietz, 2006). En la actualidad se están invirtiendo muchos recursos para la descontaminación de los metales presentes en el suelo, haciendo uso, entre otras estrategias, de plantas hiperacumuladores de Cu (fitorremediación),

con el objetivo de incorporar y transportar el metal a la parte aérea y de ese modo eliminarlo del suelo (Krämer, 2010).

Normalmente, el exceso de Cu en humanos se produce por exposición industrial y por enfermedades hereditarias como la enfermedad de Wilson, causada por mutaciones en el gen de la proteína ATP7B, homóloga a la ATPasa de la enfermedad de Menkes (Reddy et al., 2000; Schlieff et al., 2006). Además, otras patologías asociadas a alteraciones de cuproproteínas causan enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer o la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Crouch et al., 2007; Westergard et al., 2007).

Curiosamente, la administración de melatonina, secretada por la glándula pineal, sincroniza los ritmos circadianos en humanos y una ATPasa pineal (PINA), variante de la proteína de la enfermedad de Wilson, muestra una expresión 100 veces mayor durante la noche que por el día (Borjigin et al., 1999). PINA es capaz de revertir los defectos en el transporte de Cu en cepas deficientes en el mismo en *Saccharomyces cerevisiae* (Borjigin et al., 1999). Por otro lado, la ausencia de expresión de los priones, a los que se ha implicado en el metabolismo de Cu, provoca alteraciones de los ciclos sueño-vigilia y en las oscilaciones hormonales (Tobler et al., 1996). Estos dos ejemplos ponen de manifiesto la posible relación de la homeostasis del Cu y los ritmos circadianos en mamíferos.

Dado que gran parte de los componentes de la homeostasis metálica están conservados en eucariotas, el conocimiento de los mecanismos que los diferentes organismos utilizan para adquirir, utilizar y regular el metabolismo del Cu y el Fe, podría contribuir al avance en el desarrollo de estrategias para tratar de forma más eficiente un elevado número de patologías provocadas por las alteraciones de la homeostasis de los metales.

2. RED HOMEÓSTATICA DEL COBRE

Los organismos han desarrollado estrategias moleculares para mantener el Cu a unos niveles adecuados en la célula. La homeostasis del Cu a nivel celular implica el uso de diferentes proteínas encargadas de su transporte y distribución a las proteínas diana. Los componentes básicos de esta red proteica se encuentran conservados en todos los organismos eucariotas, siendo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* el sistema modelo donde más se han estudiado (Puig et al., 2002; Puig et al., 2007).

2.1 Distribución intracelular en *Arabidopsis*

En nuestro laboratorio, se ha elaborado una base de datos con todos los componentes de la homeostasis del Cu en *Arabidopsis* que han sido descritos hasta el momento en la bibliografía, con el objetivo de tener accesible la información de forma ordenada y conjunta (<http://www.uv.es/cuatlab/>) (Andrés-Colás et al., 2013) (Figura I.2). Estos componentes se han organizado por categorías funcionales en: transportadores, chaperonas, quelantes, cuproproteínas diana y elementos reguladores de la homeostasis de Cu. Dentro de cada grupo, se dividen en subcategorías formadas por las diferentes familias de proteínas que las constituyen. Para facilitar la accesibilidad de la información de la que se dispone para cada uno de los componentes de la homeostasis del Cu, se ha incluido un listado de los genes dentro de las subcategorías, con su código MIPS y con enlaces a diferentes bases de datos con múltiples herramientas.

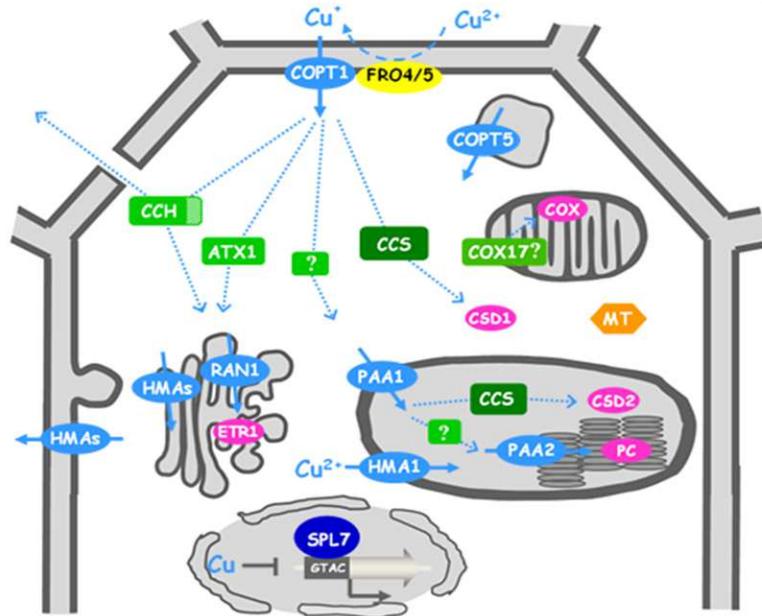


Figura I.2. Componentes de la homeostasis del Cu en *Arabidopsis thaliana* a nivel subcelular. Los transportadores de membrana están representados por óvalos azules claro; los factores de transcripción, por óvalos azul oscuro; las carabinas moleculares, por rectángulos verdes; las metalotioneínas, por hexágonos naranjas; las reductasas, por óvalos amarillos y las cuproproteínas diana, por óvalos fucsia. Las flechas indican el sentido del transporte de iones y las líneas punteadas indican posibles rutas de transferencia de Cu. (<http://www.uv.es/cuatlab/figures.html>). Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

El primer paso para la adquisición de Fe y Cu implica la reducción del metal, llevada a cabo por reductasas de Fe y Cu de la familia FRO (Figura I.2). Se han caracterizado 8 miembros de la familia de reductasas de Fe. FRO2 y FRO3, son los componentes responsables de la adquisición del Fe en raíces (Wu et al., 2005; Mukherjee et al., 2006). FRO3 también participa en la adquisición de Fe y Cu desde el suelo (Wu et al., 2005; Mukherjee et al., 2006). Recientemente se ha descrito la inducción de las reductasas *FRO4* y *FRO5* en deficiencia de Cu y su funcionamiento en la reducción de Cu a nivel subcelular (Bernal et al., 2012). FRO6 es específico de tejidos verdes y presenta en su

promotor elementos reguladores que median la activación de genes de respuesta a la luz (Feng et al., 2006).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado varias familias de transportadores de Cu (Figura I.2):

- La familia COPT (*copper transporters*): homólogos de transportadores de Cu de alta afinidad de la familia CTR de levadura. Dada su relevancia en este trabajo, se describirán con detalle en el Apartado 5.
- La familia ZIP (*ZRT/IRT related proteins*): transportadores de iones metálicos divalentes de baja especificidad (Guerinot, 2000). Están ampliamente distribuidos en eucariotas y en *Arabidopsis* esta familia la constituyen 14 miembros (Maser et al., 2001). Las proteínas ZIP1, 2 y 3 están implicadas en el transporte de zinc (Zn) (Grotz et al., 1998; Wintz et al., 2003), mientras que ZIP2 y ZIP4 podrían presentar cierta especificidad por Cu (Wintz et al., 2003). El transportador IRT1, pertenece a la familia ZIP y aunque el sustrato preferente es el Fe, este transportador también es capaz de incorporar Cu, manganeso (Mn), Zn y cadmio (Cd) (Eide et al., 1996; Korshunova et al., 1999).
- La familia NRAMP (*natural resistance-associated macrophage protein*): transportadores de iones metálicos de amplio espectro. NRAMP3/4 participan en la movilización de las reservas de Fe de semillas de *Arabidopsis* (Thomine et al., 2003; Lanquar et al., 2005).
- La familia de transportadores YSL: se han descrito como transportadores de metales, conjugados con nicotianamina, de Fe, Cu, Zn, Mn, cobalto (Co) y níquel (Ni) (Curie et al., 2009).

Una vez en el citosol, diferentes metalocarabinas se encargan de distribuir el Cu a sus distintos destinos intracelulares (Figura I.2):

- CCS (*copper chaperone for superoxide dismutase*) se encarga de transportar el Cu hasta la Cu/Zn SOD citosólica y cloroplástica (La Fontaine et al., 2002; Pilon et al., 2006).
- CCH y ATX1 se ocupan del transporte de Cu a ATPasas de tipo P localizadas en las membranas de compartimentos de la ruta de secreción (Himmelblau et al., 1998; Mira et al., 2001; Puig et al., 2007).
- COX17 (*cytochrome c oxidase 17*) que proporciona Cu al complejo citocromo c oxidasa (COX) en la mitocondria (Balandin and Castresana, 2002).

- Las ATPasas de tipo P, localizadas en diferentes membranas celulares, se encargan de transportar el Cu fuera del citosol. En *Arabidopsis thaliana* se conocen 4 miembros de esta subfamilia: RAN1/HMA7, RAN2/HMA5, PAA1/HMA6 y PAA2/HMA8 (Figura I.2):
 - a. RAN1/HMA7 se encarga de suministrar Cu al receptor del etileno, codificado por genes como *ETR1* (Hirayama et al., 1999).
 - b. RAN2/HMA5 interviene en procesos de desintoxicación y exportación al exterior celular en condiciones de exceso de Cu (Andrés-Colás et al., 2006).
 - c. PAA1/HMA6 y PAA2/HMA8 son importantes en la distribución de Cu al cloroplasto. PAA1 media la transferencia de Cu a través de la membrana del cloroplasto, para ser transportado hasta la plastocianina y la Cu/ZnSOD en el estroma. Por otro lado, PAA2 bombea Cu a través de las membranas tilacoidales, mediando el transporte de Cu hasta la plastocianina (Shikanai et al., 2003; Abdel-Ghany et al., 2005; Pilon et al., 2006; Bernal et al., 2012).

3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POSTRANSCRIPCIONAL

3.1 Los miRNAs y el estrés abiótico

Los micro-RNAs (miRNAs) son moléculas pequeñas de RNA que contribuyen a la regulación postranscripcional de la expresión de genes específicos, induciendo la degradación por fragmentación de los mRNA diana. Esta regulación tiene lugar a través de diferentes procesos como la degradación directa del mRNA diana mediante el sistema DICER-RISC o la inhibición de la traducción (Bonnet et al., 2004; Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Xie et al., 2005). Algunos de los miRNAs en plantas están implicados en la respuesta al estrés como por ejemplo el control del estatus nutricional de fosfato y sulfato y en una amplia variedad de procesos del desarrollo tales como la elongación del hipocotilo, la raíz y la transición de fase vegetativa a reproductiva (Yamasaki et al., 2007; Buhtz et al., 2010).

El *miR395* se induce en ayuno de sulfato y la homeostasis de fosfato está parcialmente controlada por el *miR399*. Ambos miRNAs podrían actuar como transmisores de la información a larga distancia, gracias a su transporte a través del floema desde el brote hasta la raíz, para así degradar sus mRNA dianas (Buhtz et al., 2010). Además, la privación de fosfato regula la expresión de otros miRNAs, induciendo a los *miR156*, *399*, *778*, *827* y *2111*, mientras que reprime la expresión de los *miR169*, *395* y *398* (Meng et al., 2010) (Figura I.3).

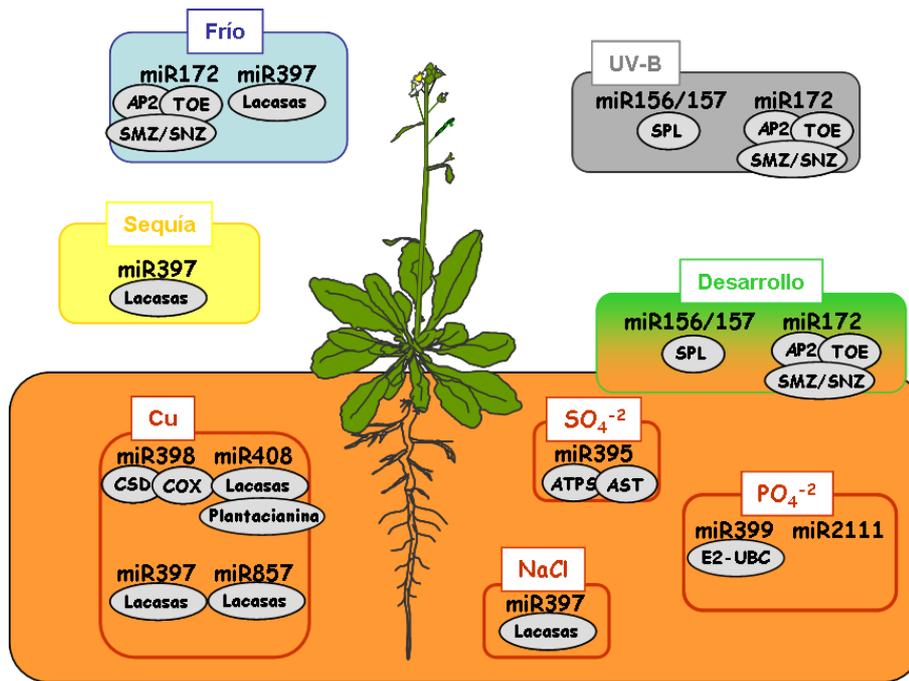


Figura I.3. Resumen de la acción de miRNAs asociados al desarrollo y al estrés en *Arabidopsis*. Los miRNAs se agrupan según el tipo de proceso en el que están implicados. Éstos a su vez, se representan en rectángulos blancos y las dianas de cada uno de los miRNAs por óvalos grises. Modificado de (Martin et al., 2010). Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

Además de la deficiencia de nutrientes, numerosos estreses abióticos inducen la expresión de miRNAs, como la luz UV-B (*miR156/157* y *172*) y el estrés por frío (*miR172* y *397*) (Martin et al., 2010) (Figura I.3). Muchos de los miRNAs son inducidos por diferentes estreses, entre ellos el *miR397*, cuyas dianas son lacasas en *Arabidopsis* y *Brachypodium* (Martin et al., 2010) (Figura I.3). Este hecho pone de manifiesto que las rutas de señalización tienen elementos comunes que conducen a la inducción de dichos miRNAs y que comparten las respuestas derivadas de la acción de los mismos, lo que explica parte de las interacciones y respuestas cruzadas entre estreses abióticos.

3.1.1 Los miRNAs en deficiencia de Cu

A diferencia del ayuno de sulfato y fosfato, en que los miRNAs se dirigen contra los transportadores y diferentes enzimas (Martin et al., 2010), en deficiencia de Cu los miRNAs se encargan de degradar a los mRNAs de los genes de cuproproteínas. Estos incluyen los *miRNAs* 397, 408 y 857, que participan en la regulación de proteínas de Cu, como la plastocianina y las lacasas (Burkhead et al., 2009; Pilon et al., 2009). Junto a estos, el *miR398* también se induce en deficiencia de Cu y tiene como dianas las Cu/ZnSOD (*CSD1*, *CSD2*), su cuprocarabina *CCS* y la *Cox5b-1*, subunidad de la citocromo c oxidasa. Curiosamente, la expresión del *miR398*, y como consecuencia la de sus dianas *CSD1* y *CSD2*, sufren una oscilación diurna con patrones complementarios (Siré et al., 2009). Se considera que la unión del Cu a sus proteínas diana es tan fuerte que, en condiciones de deficiencia del metal, hay que eliminar la expresión de dichas cuproproteínas como único medio para evitar el consumo de Cu por las mismas, reservando así el metal para las cuproproteínas imprescindibles como la plastocianina.

La deficiencia de Fe produce una reducción de la expresión de los miRNAs sensibles a la deficiencia de Cu y al ayuno de fosfato (Buhtz et al., 2010). De este modo, los *miRNAs* 397, 398, 399, 408 y 2111 disminuyen notablemente durante la deficiencia de Fe, mostrando una respuesta opuesta a la observada en deficiencia de Cu. Un análisis más detallado de la expresión de los miRNAs por tejidos (raíces, hojas y haces vasculares) reveló que el *miR397* y el *miR408* presentan una mayor expresión en el floema. El *miR397* también se acumula en raíces y permanece indetectable en hojas, mientras que el *miR408* responde a la inversa. El *miR398* se detecta en los haces y en las hojas pero no en las raíces (Buhtz et al., 2010). Estos resultados indican la complejidad del estudio de la función de los miRNAs en las respuestas a la deficiencia de nutrientes y resaltan la importancia que los patrones espaciales y temporales de sus expresiones cumplen en dicha función.

3.2 Los miRNAs y las transiciones de fase en el desarrollo

Los miRNAs desempeñan funciones cruciales en un amplio rango de procesos relacionados con el desarrollo en las plantas. Se ha detectado la expresión de múltiples miRNAs en la germinación de las semillas y en plántulas de *Arabidopsis*. Algunos de estos miRNAs están involucrados en la regulación de procesos del desarrollo mediados por hormonas, tales como el ABA y las auxinas (Liu et al., 2007; Martin et al., 2010). Otros miRNAs participan en el control del crecimiento de la raíz y están implicados en la señalización por auxinas y respuestas al estrés (Meng et al., 2010). Por último, las transiciones de fase vegetativa a reproductiva también están mediadas por la acción ejercida por miRNAs (Schwab et al., 2005).

A su vez, muchos procesos del desarrollo están controlados por el reloj endógeno en plantas (Dowson-Day and Millar, 1999; Yazdanbakhsh et al., 2011; Ruts et al., 2012). Por ejemplo, el proceso de la floración de *Arabidopsis* es dependiente del fotoperíodo y se acelera en condiciones de día largo, mientras que se retrasa en condiciones de día corto (Roden et al., 2002). La floración en *A. thaliana* también está controlada por los miRNAs 156 y 157, que se expresan fuertemente en la transición de fase vegetativa a reproductiva y en la inflorescencia (Schwab et al., 2005). Muchas de las dianas son factores de transcripción, lo que incrementa el potencial de su regulación. Por ejemplo, 11 de los 17 genes de la familia de factores de transcripción SPL (ver el siguiente Apartado) son dianas de los miRNAs reguladores de la floración (Rhoades et al., 2002). Por otro lado, el *miR172* promueve la floración a partir de la regulación postranscripcional de diferentes factores de transcripción (Aukerman and Sakai, 2003) y sus niveles están regulados por la duración del día. Por tanto, la floración implica la represión de los *miR156* y *157* y la inducción del *miR172*. Curiosamente, a pesar de su función en la transición de la fase vegetativa a la reproductiva, se ha descrito que los *miR156* (a, g y h) de *Arabidopsis* se

expresan más en raíz que en hojas o haces vasculares de planta adulta (Buhtz et al., 2010).

3.3 Familia SPL

En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado una familia génica que se denomina SPL (*SQUAMOSA promoter-binding protein-like*), constituida por 17 genes, que codifican proteínas con el dominio conservado de unión al DNA SBP (*SQUAMOSA promoter-binding proteins*) (Cardon et al., 1997; Cardon et al., 1999; Kropat et al., 2005). El dominio SBP se une a promotores de genes que participan en procesos fundamentales del desarrollo, principalmente asociados a la reproducción (Cardon et al., 1997; Unte et al., 2003). Se ha descrito la unión específica del dominio SBP *in vitro* a motivos presentes en el promotor del gen *SQUAMOSA*, implicado en el desarrollo del meristemo floral de *Antirrhinum majus*, y a su ortólogo en *Arabidopsis thaliana* *APETALA1*, *API* (Huijser et al., 1992; Klein et al., 1996). La secuencia consenso de unión del dominio SBP contiene el motivo de 4 nucleótidos GTAC. Para algunos miembros de la familia SPL se han descrito motivos más extensos de unión al DNA que contienen esta secuencia. Por ejemplo, SPL14 reconoce el motivo CCGTAC(A/G) y SPL3, el motivo CGTAC (Birkenbihl et al., 2005; Liang et al., 2008; Nagae et al., 2008).

Los genes con dominio SBP se pueden agrupar por filogenia o por las características de su expresión génica. De acuerdo con su tamaño y su patrón de expresión, se pueden clasificar en:

- SPLs de mayor tamaño y expresadas constitutivamente: SPL1, SPL7, SPL12, SPL14 y SPL16.
- SPLs de tamaño medio y reguladas espacio-temporalmente: SPL2, SPL6, SPL8, SPL9, SPL10, SPL11, SPL13a, SPL13b y SPL15.

- SPLs de menor tamaño y reguladas espacio-temporalmente: SPL3, SPL4 y SPL5.

Según la filogenia se subdividen en 9 subfamilias o clados (Preston and Hileman, 2013). La disponibilidad de genomas completamente secuenciados ha permitido, a partir de patrones de duplicación génica, la reconstrucción filogenética de la familia SPL (Guo et al., 2008; Salinas et al., 2012; Preston and Hileman, 2013). El factor SPL3 es el ortólogo de *SBP1* de *Antirrhinum majus* y recientemente se ha descrito que también lo es del gen *CNR* de *Solanum lycopersicum* (Salinas et al., 2012).

3.3.1 Regulación postranscripcional de SPLs

Los miembros de la familia SPL de tamaños mediano y pequeño están regulados en diferentes estadios, que van desde la transición vegetativa al crecimiento reproductivo y desarrollo floral. Con la excepción de algunos miembros, como por ejemplo SPL8 y SPL14, los componentes de estas dos subfamilias son dianas de los *miR156* y *157* (Rhoades et al., 2002; Wu and Poethig, 2006; Gandikota et al., 2007). De acuerdo con esto, la región 3'UTR de los SPL dianas contiene un motivo funcional de respuesta a miRNAs que es complementario a los *miR156* y *157*. Se han generado plantas sobreexpresoras de SPL3 con la región que comprende el elemento de respuesta a miRNAs (MRE) interrumpida, lo que permite la detección de la proteína SPL3. Como consecuencia de la sobreexpresión de SPL3, y de la ausencia de un MRE funcional, dichas plantas tienen exacerbado el fenotipo de floración temprana (Wu and Poethig, 2006; Gandikota et al., 2007).

3.4. Regulación transcripcional en deficiencia de cobre

En *Chlamydomonas* se ha demostrado que la secuencia palindrómica GTAC, denominada CuRE (*copper-response element*), es esencial para la expresión de los genes de respuesta a deficiencia de Cu, ya que la alteración de cualquiera de los cuatro nucleótidos en los promotores de los genes diana impide su expresión (Cardon et al., 1999; Birkenbihl et al., 2005; Kropat et al., 2005; Yamasaki et al., 2007; Andrés-Colás et al., 2013). CRR1 (*Cu response regulador 1*) es el factor de transcripción con dominio SBP que participa en dicha regulación (Kropat et al., 2005).

El dominio SBP es el único dominio común en toda la familia y está formado por unos 78 aminoácidos, entre los que se encuentran 6 Cys y 2 His muy conservadas que dan lugar a dos estructuras de dedos de zinc (Zn) necesarias para la unión eficiente del dominio al DNA (Birkenbihl et al., 2005). En condiciones de deficiencia de Cu, los lugares de unión del Zn en el dominio SBP están ocupados por Zn y la proteína se localiza en el núcleo, donde interacciona con los componentes del aparato transcripcional, gracias al dominio adicional con las repeticiones de anquirina (motivos de 33 aminoácidos repetidos en tándem) y activa la expresión de los genes diana. El Cu y el Hg inhiben la unión al DNA *in vitro* y dicha unión también se reduce por mutaciones en el residuo conservado de His del dominio SBP (Kropat et al., 2005; Sommer et al., 2010).

Por otro lado, el extremo carboxi-terminal de la proteína CRR1 podría actuar como sensor de los niveles de Cu ya que es rico en Cys. Sin embargo, la delección de este dominio no produce alteraciones en la señalización nutricional por Cu (Kropat et al., 2005; Sommer et al., 2010).

En la familia SPL de *Arabidopsis*, SPL7 es el miembro cuyo dominio SBP presenta el mayor grado de identidad con el del regulador de deficiencia de Cu CRR1 de *Chlamydomonas* (Kropat et al., 2005; Yamasaki et al., 2007)

(Figura I.4). A nivel global, los miembros de mayor tamaño (SPL1, 12, 14 y 16), junto a SPL7, presentan mayor homología con CRR1. Como se muestra en la Figura I.4, SPL1 y 12 comparten con CRR1 todos los dominios descritos. SPL3 contiene en su secuencia, junto a las SPL1, 7 y 12, una región con homología al dominio SBP o *extended region SBP* (Kropat et al., 2005; Preston and Hileman, 2013) (Figura I.4).

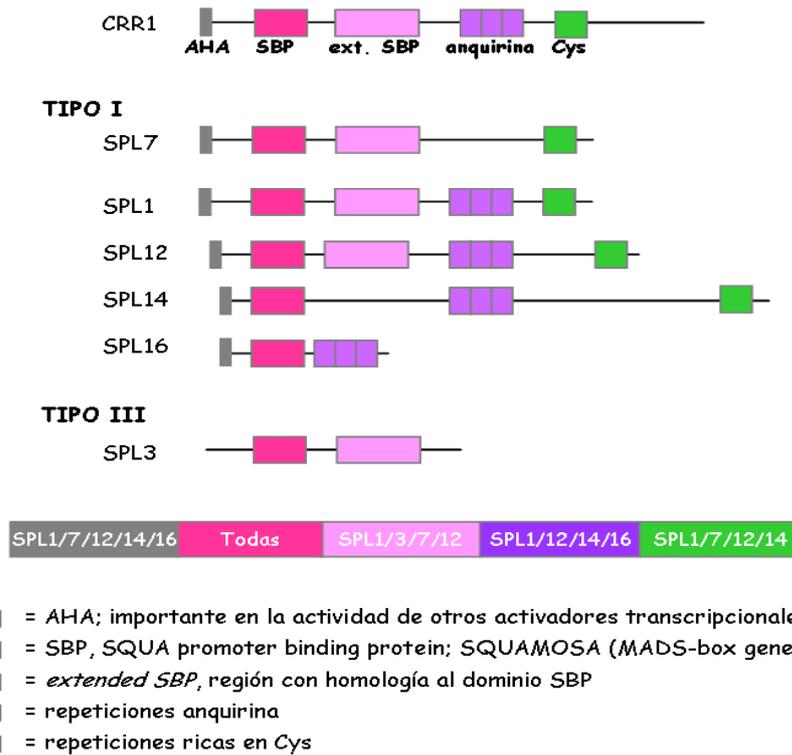


Figura I.4. Dominios de las proteínas CRR1 y SPLs. Los rectángulos indican los dominios: AHA, importante en la actividad de otros activadores transcripcionales (rectángulo gris); SBP, *SQUAMOSA promoter binding protein*, de unión al DNA (rectángulo fucsia); *extended SBP*, región con homología al dominio SBP (rectángulo rosa); repeticiones anquirina (rectángulo morado); repeticiones ricas en Cys (rectángulo verde). Las proteínas SPL se han agrupado por tamaño en los tipos I y III. Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

Las secuencias *cis* reconocidas por SPL7 contienen motivos GTAC y se encuentran en los promotores de genes que se expresan en deficiencia de Cu (Nagae et al., 2008; Yamasaki et al., 2009). En estas condiciones, el mutante *spl7* no induce la expresión de los genes de los transportadores *COPT1*, *COPT2*, *COPT6*, *ZIP2* y *YSL2*, el de las reductasas *FRO3*, *FRO4* y *FRO5*, el de las metalocarabinas *CCH* y *CCS* y el de la *FSD1*, así como tampoco expresa los *miR398*, *miR397*, *miR408* y *miR857* (Burkhead et al., 2009; Pilon et al., 2009; Yamasaki et al., 2009; Bernal et al., 2012; Garcia-Molina et al., 2013). Por lo tanto, SPL7 se considera un componente central y necesario en la regulación de genes de respuesta a deficiencia de Cu, ya que su unión directa a motivos GTAC de los promotores desencadena:

- I. El aumento en la incorporación de Cu exógeno a partir de la expresión de sus propios transportadores.
- II. La eliminación de cuproproteínas no esenciales (como las lacasas o la plantacianina, CuSOD y CCS) dianas de los miRNAs inducidos en deficiencia de Cu.
- III. La sustitución de metaloproteínas con funciones similares, como las SOD de Cu/Zn que se sustituyen por la de Fe (Figura I.5).

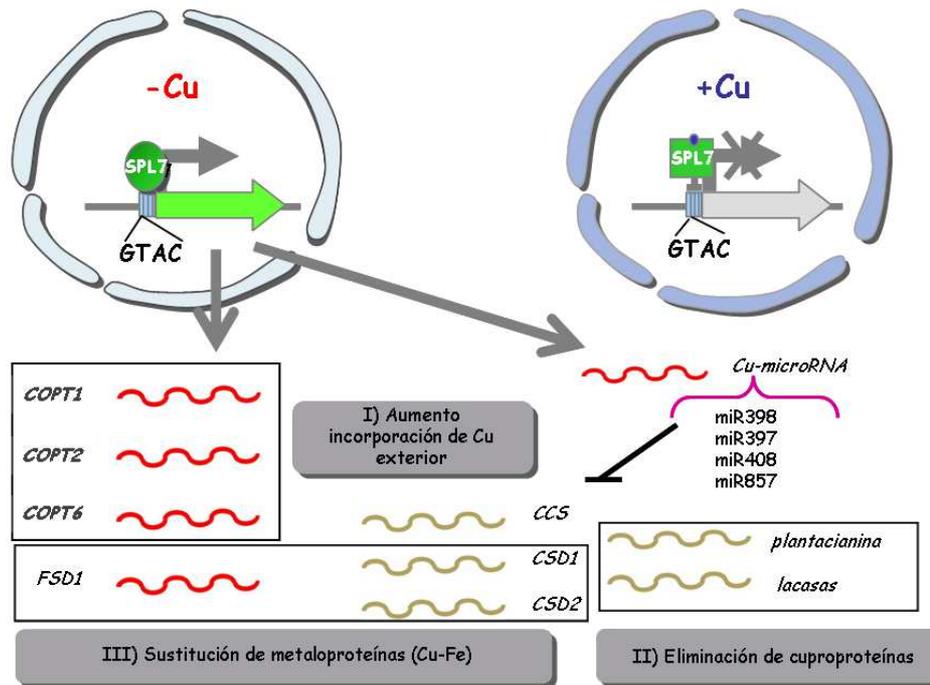


Figura I.5. Regulación de la expresión génica en deficiencia de Cu. La regulación por deficiencia de Cu desencadena tres estrategias: I) Aumento de la incorporación del Cu tras la activación de la familia COPT; II) Eliminación de cuproproteínas vía la acción de los miRNAs; y III) Sustitución de las metaloproteínas. Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

Se considera a los cloroplastos como los mayores consumidores de Cu de la célula y la expresión de cuproproteínas esenciales como la plastocianina, no se ven afectadas en deficiencia de Cu por los miRNAs (Yamasaki et al., 2007; Dugas and Bartel, 2008; Beauclair et al., 2010; Bernal et al., 2012; Andrés-Colás et al., 2013). Sin embargo, la expresión de la Cu/ZnSOD cloroplástica *CSD2* es sustituida por la de Fe *FSD1*, con el objetivo de destinar el escaso Cu a la plastocianina. En condiciones de exceso de Cu, este mecanismo se invierte, de manera que la *FSD1* es sustituida por la *CSD2* (Abdel-Ghany et al., 2005; Pilon et al., 2006; Puig et al., 2007).

3.5. Regulación transcripcional en deficiencia de hierro

Entre otros mecanismos, la respuesta primaria de las plantas a la deficiencia de Fe es controlada a través de la maquinaria transcripcional. El estudio de la respuesta a la deficiencia de Fe en mutantes de tomate llevó a la identificación del factor de transcripción FER de tipo alfa-hélice-alfa (bHLH), que controla la inducción de la expresión de la reductasa de Fe *FRO2* y del transportador *IRT1* en la raíz (Ling et al., 2002). El ortólogo de FER en *Arabidopsis* es el factor de transcripción inducido en deficiencia de Fe, FIT1 (Colangelo and Guerinot, 2004). La secuencia consenso de reconocimiento de FIT1 en los promotores de los genes diana, conocida como E-box, es CANNTG. Sin embargo, esta secuencia no se encuentra sobrerrepresentada entre los genes inducidos por FIT1, por lo que la regulación de los genes diana probablemente requiera otros mecanismos adicionales (Colangelo and Guerinot, 2004).

Entre los genes inducidos por FIT1 se encuentran *FER* e *IRT1*, otros transportadores de Fe, como *IRT2* y *NRAMP1* y el transportador de Cu, *COPT2*. Diversos análisis globales de expresión génica indican que, en condiciones de deficiencia de Fe, se inducen los genes que codifican para las reductasas *FRO2* y *FRO3*, el transportador *IRT2*, y *NAS1* y *NAS3* en las raíces (Wintz et al., 2003).

4. RELOJ BIOLÓGICO CIRCADIANO EN *Arabidopsis thaliana*

Recientemente, en diferentes grupos hemos demostrado la interacción recíproca entre la homeostasis metálica y el reloj circadiano en *Arabidopsis thaliana* (Andrés-Colás et al., 2010; Hermans et al., 2010; Chen et al., 2013; Hong et al., 2013; Salome et al., 2013). Se considera que esta interacción es un modo de traducir las señales ambientales en información temporal para

sincronizar la nutrición a las condiciones cíclicas diurnas a fin de coordinar rítmicamente, y en último término, el metabolismo, el desarrollo y la reproducción de las plantas. Se conoce que el reloj circadiano regula al menos al 30 % del transcriptoma de *Arabidopsis* (Michael et al., 2008).

4.1 Características del reloj circadiano

Los efectos de los relojes biológicos se traducen en la existencia de ritmos, ya sean bioquímicos, fisiológicos o de comportamiento en los seres vivos. Un ritmo biológico es una oscilación de un parámetro biológico dependiente de un reloj endógeno y de sincronizadores ambientales. El reloj biológico más conocido es el circadiano (del latín *circa diem*, alrededor de un día), encargado de controlar los ritmos que se repiten con una periodicidad de aproximadamente 24 h. Son ritmos ligados a la rotación de la Tierra y a las consecuencias que lleva consigo principalmente sobre la variación de las condiciones lumínicas y de la temperatura (Bell-Pedersen et al., 2005). Los ritmos están generados endógenamente y son auto-sostenibles, debido a la persistencia de las oscilaciones en condiciones constantes. Se sincronizan con los ciclos ambientales de luz y temperatura y, cuando el reloj se ha estabilizado, el periodo de la oscilación se mantiene constante, dentro del rango de temperaturas fisiológicas (Más, 2008).

Los parámetros que describen los ritmos circadianos son principalmente tres: el periodo, que define la duración de una oscilación, la amplitud, que es el margen de variación de la respuesta observada y la fase, que es el momento del día para cualquier evento dado (McClung, 2006).

Algunos términos empleados en la nomenclatura del reloj circadiano son, por ejemplo, las rutas de entrada (*inputs*), que son secuencias de eventos a través de los cuales la información ambiental es transducida al oscilador y las rutas de salida (*outputs*), que son las señales y los elementos de la transducción

de las mismas que conectan al oscilador con los procesos biológicos controlados. La oscilación rítmica de un proceso, en condiciones constantes de luz y temperatura, se conoce como oscilación libre (*free-running*) y es la principal evidencia de la naturaleza endógena del ritmo. Se produce tras el entrenamiento (*entrainment*) necesario para que el reloj se sincronice con los ciclos ambientales externos de luz y temperatura. La señal externa, que ajusta el ritmo endógeno y las señales ambientales se denomina sincronizador (*zeitgeber*).

4.2 Bioquímica del reloj

Aunque entre los diferentes grupos de organismos no están conservados los principales componentes de los ritmos circadianos, los mecanismos moleculares usados por el oscilador central de los relojes en eucariotas sí lo están, y consisten en circuitos de retroalimentación de regulación transcripcional, postranscripcional y postraduccional interconectados entre los componentes genéticos del reloj (Dunlap et al., 1996).

El modelo propuesto para *Arabidopsis* incluye un oscilador central, con una parte matutina y otra nocturna, al que se suman una compleja red de bucles de retroalimentación adicionales en torno al núcleo del reloj (McClung, 2006; Harmer, 2009; Más and Yanovsky, 2009). El oscilador central del reloj circadiano de *Arabidopsis* está constituido por los genes de los factores de transcripción de tipo *MYB*: *CCA1* (*circadian and clock associated 1*) (Wang and Tobin, 1998) y *LHY* (*late hypocotyl elongated*) (Schaffer et al., 1998), cuyos productos llevan a cabo funciones parcialmente redundantes (Mizoguchi et al., 2002; Lu et al., 2009). Otro componente del núcleo del reloj es *TOC1* (*timing of chlorophyll a/b binding protein 1*) (Makino et al., 2000; Strayer et al., 2000), que pertenece a la familia de reguladores de seudorespuesta, junto con otros cinco miembros (*TOC1* o *PRR1*, *PRR3*, *PRR5*, *PRR7* y *PRR9*). Los mutantes

de pérdida o ganancia de función en alguno de los tres componentes del núcleo del reloj biológico provocan arritmia o alteraciones en el período (McClung, 2006).

Por lo tanto, *CCA1*, *LHY* y *TOC1* constituyen el núcleo del reloj circadiano y forman entre sí un primer bucle de retroalimentación en el que *CCA1* y *LHY* se unen a la misma región promotora de *TOC1*, lo que conduce a la represión transcripcional de *TOC1* (Harmer et al., 2000; Alabadí et al., 2001). Por otro lado, el aumento de la expresión de *TOC1* produce la activación de la transcripción de *CCA1* y *LHY* (Alabadí et al., 2001) (Figura I.6). Por lo tanto, este bucle de retroalimentación de la expresión génica conduce a la oscilación rítmica de la expresión de *CCA1/LHY* y *TOC1*, que resulta en el máximo de expresión de *CCA1* y *LHY* en el amanecer y de *TOC1* en el anochecer. Recientemente, se ha propuesto un modelo más complejo para el núcleo del oscilador central. Este modelo incluye al gen *RVE8*, que codifica para un factor de tipo *MYB*, como *CCA1* y *LHY*, y que participa en la regulación de la expresión de ciertos genes relacionados con el reloj en función del momento del día (Sanchez and Yanovsky, 2013). *RVE8* promueve la expresión de un conjunto de genes que presentan elementos *evening* en su promotor (EE, AAATATCT, (Harmer et al., 2000)), como por ejemplo *TOC1* y *PRR5* (Rawat et al., 2011). A su vez, *PRR5* inhibe la expresión de *REV8* provocando otro bucle de retroalimentación (Rawat et al., 2011) (Figura I.6).

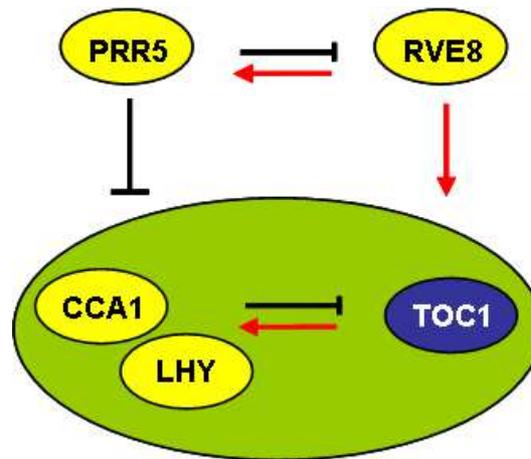


Figura I.6. Modelo del oscilador central del reloj circadiano de *Arabidopsis*. Las flechas indican inducción y las líneas romas represión. Los óvalos amarillos corresponden a genes cuyos máximos de expresión ocurren durante el día; y los óvalos azules, a los de la noche. Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

4.3 Inputs y outputs del reloj

La luz y la temperatura son los factores ambientales o *inputs* cuyos efectos sobre el reloj han sido más ampliamente estudiados. La influencia de la luz sobre el reloj tiene lugar a través múltiples tipos de fotorreceptores. El fotorreceptor ZTL controla la estabilidad de la proteína TOC1, de forma dependiente de la luz azul. Además, la luz roja y la azul afectan al reloj a través la señalización mediada por los fitocromos y criptocromos, respectivamente (Genoud et al., 1998; Devlin and Kay, 2000). Aunque el efecto de la temperatura como *input* del reloj no ha sido tan ampliamente estudiado como el de la luz, la expresión de *CCA1*, *LHY* y *TOC1* es sensible a la temperatura (Gould et al., 2006). Por otro lado, los genes *PRR7* y *PRR9* juegan un papel importante en la compensación del reloj circadiano en plantas sometidas a cambios de temperatura (Salome and McClung, 2005). Las bajas temperaturas (Fowler et al., 2005; Bieniawska et al., 2008; Nakamichi et al., 2009), los

cambios estacionales y procesos como la transición de desarrollo vegetativo a reproductivo y la dormancia, están regulados por el reloj (McClung, 2006; Nozue et al., 2007). Curiosamente, los ritmos circadianos pueden ser detectados incluso en plántulas etioladas no expuestas a ciclos de luz y temperatura (McClung, 2008).

La observación de la periodicidad del movimiento foliar fue uno de los primeros procesos que permitió estudiar la ritmicidad circadiana y su mantenimiento en ausencia de ciclos ambientales externos (Millar et al., 1995). Otros ejemplos de procesos controlados por el ritmo circadiano en plantas son el crecimiento del hipocotilo, la apertura y el cierre de flores, así como la localización subcelular de los cloroplastos y las respuestas frente al estrés biótico (Bhardwaj et al., 2011; Burgess and Searle, 2011; Wang et al., 2011).

La apertura estomática, que también está regulada de modo circadiano, presenta unos circuitos de retroalimentación que controlan a los canales de agua o aquaporinas y a los transportadores de iones, necesarios para regular el potencial osmótico en las células guarda (Moshelion et al., 2002; Siefritz et al., 2004). El calcio es uno de los iones que interviene en la apertura estomática y se han descrito oscilaciones circadianas en los niveles de calcio citosólico en *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana plumbaginifolia*. Sin embargo, el calcio libre del cloroplasto parece únicamente oscilar con un período circadiano en oscuridad y no en luz continua (Johnson et al., 1995). En el caso del Cu, la apertura estomática, controlada principalmente por ABA, se ha relacionado con la formación de peróxido de hidrógeno por una amino oxidasa de Cu en *Vicia faba* (An et al., 2008).

Además, la síntesis de hormonas y las respuestas que inducen son procesos regulados por el reloj (Harmer et al., 2000; Thain et al., 2004; Novakova et al., 2005; Covington and Harmer, 2007). Efectivamente, estudios transcriptómicos globales han permitido la comparación entre los genes que oscilan diurnamente y los genes de respuesta a hormonas. Estos estudios han

desvelado que, un gran número de genes de respuesta a ABA y a jasmonatos oscilan diurnamente de forma dependiente del reloj. Se ha sugerido que la expresión de estos genes podría estar preparando a la planta frente a posibles estreses medioambientales que se producen con más frecuencia a determinadas horas del día, anticipándose a ellos y mejorando así las defensas de la planta (Mizuno and Yamashino, 2008).

A nivel molecular, la relación directa entre el estrés hídrico y el reloj biológico se basa en la unión de TOC1, que actúa como represor, al promotor del gen *ABAR* (Legnaioli et al., 2009). Además, el ABA promueve la expresión de *TOC1* de un modo dependiente del gen *ABAR* (Legnaioli et al., 2009). Recientemente, se ha descrito que *CCAI* podría regular la homeostasis de los ROS a partir de su unión a los elementos *evening* (EE, AAATATCT (Harmer et al., 2000)) presentes en los promotores de los genes diana (Lai et al., 2012). Por tanto, la coordinación temporal de los ROS y el ABA por los genes nucleares del reloj circadiano pone de manifiesto los mecanismos de control de las plantas para anticiparse a las respuestas frente al estrés oxidativo.

4.4. El estado nutricional y el reloj circadiano

Algunos de los transcritos regulados de modo circadiano están implicados en el transporte de carbohidratos, nitrógeno, sulfato, fosfato inorgánico, iones y micronutrientes. La asimilación de nitrógeno y sulfato depende de su incorporación desde el suelo y de su reducción a formas orgánicas para poder ser utilizado por la planta. El gen nuclear del reloj, *CCAI*, es un regulador central del metabolismo del nitrógeno, ya que se une directamente a los promotores de la glutamina sintetasa (*GLN3.1*) y la glutamato deshidrogenasa (*GDH*), que son enzimas que participan en la biosíntesis y catabolismo del glutamato, respectivamente (Gutiérrez et al., 2008). También se ha relacionado la homeostasis del magnesio (Mg) con el

reloj, ya que la deficiencia de Mg, seguida de su suministro a la planta, provoca la alteración en la amplitud de la expresión de genes del reloj circadiano (Hermans et al., 2010). Además, la regulación de *FER1*, que codifica la ferritina, una proteína de almacenaje de Fe altamente expresada en exceso del metal, que participa en la respuesta al estrés oxidativo dependiente de Fe, está controlada por *TIC* (*time for coffee*) (Duc et al., 2009). Recientemente, se ha descrito que la deficiencia de Fe provoca un alargamiento en el período del ritmo circadiano de plantas de *Arabidopsis* (Chen et al., 2013; Hong et al., 2013; Salome et al., 2013). Por otro lado, los genes relacionados con el reloj *CCA1*, *LHY*, *PRR9* y *PRR7* se reprimen en deficiencia de Fe (Chen et al., 2013). Además, algunos de los miembros de las familias de transportadores de Cu citados previamente, como por ejemplo, las ATPasas (*HMA1*, *HMA6/PAA1*) y los transportadores NRAMP (*NRAMP4*), YSL (*YSL1*, *YSL2* y *YSL5*), ZIP (*ZTP29*, *ZIP11*) y COPT (*COPT1* y *COPT2*) presentan un comportamiento circadiano a nivel transcripcional (Haydon et al., 2011). En este sentido, el transporte a larga distancia de nutrientes, también podría ser un proceso controlado por el reloj circadiano.

5. CARACTERÍSTICAS DE LOS TRANSPORTADORES COPTs Y EFECTOS DE LAS ALTERACIONES DE SU EXPRESIÓN

La concentración citosólica de Cu depende del equilibrio entre la entrada y la salida del metal, ya sea hacia fuera de la célula o hacia compartimentos intracelulares. En respuesta a la deficiencia de Cu, los organismos eucariotas activan la expresión de la familia de transportadores de Cu, *CTR*, que median el transporte de alta afinidad de Cu al citosol (Sancenón et al., 2003).

En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado una familia de 6 proteínas, conocida como COPT (*copper transporters*) (Sancenón et al., 2003). Las proteínas COPT contienen tres segmentos transmembrana (TMD), con el extremo amino-terminal en el espacio extracitosólico y el extremo carboxi-terminal en el citosol (Figura I.7a). Algunas proteínas tipo CTR contienen en el extremo amino-terminal dominios ricos en metioninas que forman centros de unión a Cu (Figura I.7b). Tras su unión a estos motivos, el metal es transportado a través del poro generado por el homotrímero del TMD2 rico en metioninas (Figura I.7c) y llevado hasta los residuos de Cys, en el extremo carboxi-terminal citosólico. Una vez allí, el Cu es adquirido por metalocarabinas solubles que lo transportan hasta las cuproproteínas diana.

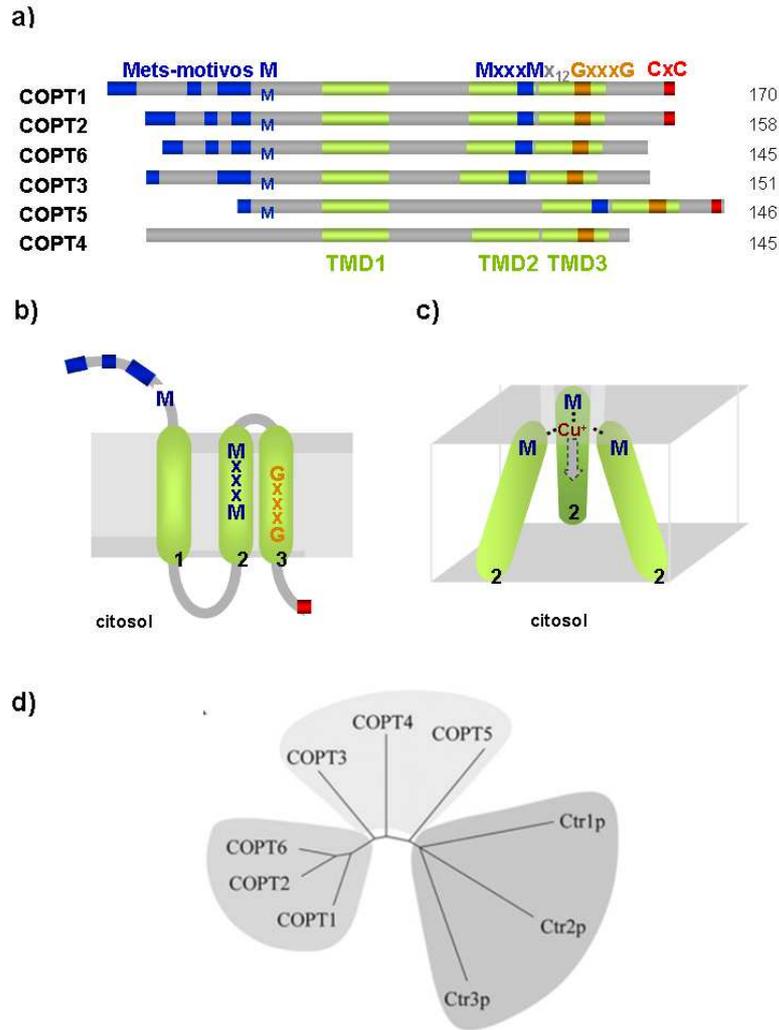


Figura I.7. La familia COPT de transportadores de Cu de *Arabidopsis*. a) Alineamiento de los transportadores de Cu tipo CTR de *Arabidopsis*. Los dominios transmembrana se representan en rectángulos verdes; los motivos ricos en metioninas y MxxxM, en rectángulos azules; los motivos GxxxG, en rectángulos naranjas; y los motivos cisteína CxC, en rectángulos rojos. La longitud de la secuencia de aminoácidos se muestra a la derecha. b) Estructura topológica de las proteínas CTR/COPT. c) Disposición espacial del TMD2 en el complejo Ctr1 en humanos. <http://www.uv.es/cuatlab/research.html>. (Peñarrubia et al., 2010). d) Árbol filogenético de las proteínas de la familia COPT de *A. thaliana* y CTR de *S. cerevisiae* (Jung et al., 2012). Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

Tabla I.1. Resumen de las principales características distintivas de la familia COPT. M.P.: membrana plasmática; M.I.: membranas intracelulares.

	COPT1	COPT2	COPT3	COPT4	COPT5	COPT6
Regulación transcripcional por Cu	Si	Si	No	No	No	Si
Localización subcelular	M.P.	M.P.	M.I.	-	M.I.	M.P.
Complementación en levadura	Si	Si	No	-	No	Si

La caracterización de los miembros de la familia COPT se ha realizado a partir de diferentes aproximaciones experimentales (Figura I.7d y Tabla I.1), entre ellas:

1. La regulación transcripcional por Cu, mediante análisis por sqPCR y qPCR de los niveles de expresión, revela que los miembros de la familia *COPT1*, *COPT2* y *COPT6* se inducen a nivel transcripcional en deficiencia de Cu, mientras que *COPT3* y *COPT5*, no lo hacen (Sancenón et al., 2003). De acuerdo con lo anterior, el factor transcripcional *SPL7* es esencial para la regulación de *COPT1*, *COPT2* y *COPT6*, debido a la presencia de motivos de regulación por Cu (GTAC), próximos al inicio transcripcional, en las secuencias promotoras de estos genes (Yamasaki et al., 2009; Bernal et al., 2012; Garcia-Molina et al., 2013; Perea-García et al., 2013).
2. La localización subcelular en protoplastos de *Arabidopsis* permite la división de la familia COPT en transportadores de la membrana plasmática (*COPT1*, *COPT2* y *COPT6*) y transportadores de compartimentos intracelulares (*COPT3* y *COPT5*) (Andrés-Colás et al., 2010; Garcia-Molina et al., 2011; Garcia-Molina et al., 2013; Perea-García et al., 2013).
3. La complementación funcional en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en la asimilación de Cu divide la familia COPT en:

- a. COPT1, COPT2 y COPT6, que participan en la importación del Cu extracelular a través de la membrana plasmática, ya que revierten completamente el fenotipo de la correspondiente cepa mutante de la levadura (Sancenón et al., 2003; Sancenón et al., 2004; Andrés-Colás et al., 2010; Garcia-Molina et al., 2013; Perea-García et al., 2013).
 - b. COPT3 y COPT5, que participan en el transporte intracelular, ya que ambos revierten parcialmente el fenotipo de la cepa mutante de levadura (Sancenón et al., 2003; Sancenón et al., 2004; Garcia-Molina et al., 2011).
 - c. COPT4, que resulta tóxico para la levadura y, además, no contiene los motivos ricos en metioninas, por lo que se postula que no transporta Cu, aunque podría realizar una función reguladora si interacciona con otros COPT (Sancenón et al., 2003; Puig et al., 2007).
4. La localización tisular a partir del gen chivato GUS, que permite distinguir la especificidad del patrón de expresión de cada gen.
 - a. COPT1 fue el primer miembro de la familia caracterizado funcionalmente en *Arabidopsis*, donde juega un papel importante en la asimilación de Cu, crecimiento de las raíces y desarrollo del polen (Kampfenkel et al., 1995; Sancenón et al., 2004). Como se ha comentado, las estructuras reproductivas de las plantas superiores son las partes más susceptibles a la deficiencia de Cu (Graham, 1975), lo que ha sido también corroborado en plantas transgénicas defectuosas en el transporte de Cu a través de COPT1 (Sancenón et al., 2004).
 - b. COPT2 se expresa en raíces, hojas jóvenes, cotiledones, meristemo apical, tricomas y anteras (Perea-García et al., 2013). COPT1 y COPT2 muestran la mayor similitud detectada entre dos miembros de la familia COPT (77 % de identidad en su secuencia de aminoácidos).
 - c. COPT6 presenta alrededor de un 61 % de identidad con la secuencia de COPT1 y de un 73 % con COPT2. Es un transportador de Cu expresado en su mayoría en la parte aérea, especialmente, en haces vasculares y tejidos reproductivos y

ausente en las raíces primarias. COPT6 desempeña una función importante en la distribución de Cu de la planta a las hojas y semillas cuando el metal es limitante (Jung et al., 2012; Garcia-Molina et al., 2013).

- d. COPT5 comparte un 23 % de identidad con COPT1 y un 20 % con COPT2. A nivel tisular se localiza principalmente en los haces vasculares de la raíz y en las silicuas. Aunque en menor grado, también se detecta en tricomas, meristemo apical, haces vasculares de hojas y cotiledones y en los órganos reproductivos, pero no en el polen (Garcia-Molina et al., 2011). En condiciones severas de deficiencia de Cu, los mutantes *knockout copt5* desarrollan clorosis derivada de los problemas en la transferencia fotosintética de electrones. Además, muestran defectos en la elongación de las raíces, lo que dificulta el crecimiento vegetativo (Sancenón et al., 2003; Garcia-Molina et al., 2011; Klaumann et al., 2011). Por último, los estudios del contenido del metal sugieren que COPT5 funciona en la distribución de Cu a los tejidos reproductivos (Klaumann et al., 2011).

En condiciones de deficiencia de Cu, la familia COPT participa en el suministro del metal al citosol celular, hasta que se alcancen niveles suficientes de Cu y no se requiera su función. Este efecto de auto-regulación del Cu sobre sus propios transportadores podría ocasionar una oscilación en la concentración del Cu citosólico (Peñarrubia et al., 2010). En el presente trabajo hemos abordado el estudio de aspectos espaciales y temporales de la homeostasis del Cu, con el objetivo de alcanzar una mayor comprensión que nos permita integrar el transporte de Cu con otros procesos, tanto internos como externos, que afectan a las plantas.

OBJETIVOS

Con la finalidad general de estudiar determinados aspectos espacio-temporales de la regulación transcripcional y postranscripcional de la homeostasis de Cu en *Arabidopsis thaliana*, así como las interrelaciones con otros procesos, fundamentalmente, los esfuerzos de esta Tesis se centran en cuatro objetivos particulares:

1. Determinar nuevos marcadores moleculares del estatus de cobre, así como su relación con el estrés oxidativo y estudiar los factores que afectan a la regulación transcripcional y postranscripcional de la respuesta a la deficiencia de cobre.
2. Caracterizar el transportador COPT2 y su función en la homeostasis del Cu mediante el análisis del fenotipo y de los cambios globales de expresión génica del mutante de inserción de T-DNA *copt2* en condiciones con diferente contenido de Cu y Fe en el medio de cultivo.
3. Estudiar los efectos que provoca la desregulación del transporte de Cu mediante la caracterización fenotípica y el análisis de los cambios globales de la expresión génica de plantas transgénicas que sobreexpresan de forma constitutiva el transportador COPT1.
4. Analizar la posibilidad de que exista una regulación recíproca entre la homeostasis del Cu y el ritmo circadiano, evaluando el carácter temporal de la homeostasis del Cu mediante el seguimiento de la expresión de forma continua de genes marcadores de la deficiencia de Cu, así como de genes del oscilador central del reloj.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente trabajo se han usado plantas *wild-type* (WT) y diferentes líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo *Columbia* (Col 0) (Tabla M.1). También se han utilizado células competentes de *Escherichia coli* (*One Shot Top 10 Competent Cells, Invitrogen*) y de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58).

Tabla M.1. Líneas transgénicas empleadas en el presente trabajo.

tipo	nombre	origen
Pérdida de función por inserción de T-DNA	<i>copt1</i> <i>copt2-1</i> <i>spl7</i>	Andrés-Colás, 2007 Perea-García et al., 2013 Yamasaki et al., 2009 y Bernal et al., 2012
Sobreexpresión constitutiva dirigida por el promotor CaMV35S	COPT1 ^{OE} COPT3 ^{OE} SPL3 ^{OE} SPL8 ^{OE}	Andrés-Colás et al., 2010 Andrés-Colás et al., 2010 Cardon et al., 1999 Zhang et al., 2007
Actividad β -glucuronidasa dirigida por el promotor endógeno	<i>PCOPT2:GUS</i> <i>PMIR156:GUS</i> <i>PMIR157:GUS</i>	Perea-García et al., 2013 Xing et al., 2010 Xing et al., 2010
Actividad luciferasa dirigida por el promotor endógeno	<i>PCOPT2:LUC</i> <i>PFSD1:LUC</i> <i>PFSD1(4GTAC):LUC</i> <i>PLHY:LUC</i>	Presente trabajo Presente trabajo Presente trabajo Song and Carre, 2005

1.1. Manipulación de las plantas de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas de *A. thaliana* se cultivaron en cámaras de crecimiento con una humedad relativa del 50-60 %. La intensidad lumínica, generada por los tubos de luz blanca fluorescente es de alrededor de 65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; mientras que

el fotoperíodo y la temperatura utilizadas varían según el tratamiento aplicado a las plantas. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

- a) día largo, 16 h de luz a 23 °C y 8 h de oscuridad a 16 °C.
- b) día corto, 8 h de luz a 23 °C y 16 h de oscuridad a 16 °C.
- c) día intermedio o neutro, 12 h de luz a 23 °C y 12 h de oscuridad a 16 °C (LDHC).
- d) condiciones continuas de luz y/o temperatura:
 - luz y temperatura continuas, 24 h de luz a 23 °C de temperatura (LLHH).
 - oscuridad y temperatura continuas, 24 h de oscuridad a 23 °C de temperatura (DDHH).
 - luz continua y ciclo de temperatura, 24 h de luz y 12 h a 23 °C y 12 h a 16 °C (LLHC).
 - ciclo de luz y temperatura continua, 12 h de luz y 12 h de oscuridad y 24 h a 23 °C de temperatura (LDHH).
 - oscuridad continua y ciclo de temperatura, 24 h de oscuridad y 12 h a 23 °C y 12 h a 16 °C (DDHC).

Las plantas se cultivaron en distintos tipos de soporte, según se indica a continuación:

1.1.1. Cultivo en maceta

Las semillas se sembraron en macetas con una mezcla de turba, arena y vermiculita en relación 2:1:1, se cubrieron con plástico transparente y se estratificaron durante 2 d a 4 °C para sincronizar la germinación. Posteriormente, las macetas se trasladaron a una cabina de crecimiento (*Sanyo MLR-350*) bajo diferentes fotoperíodos, según el ensayo a realizar. Para la obtención de semillas en los estadíos finales de secado de las silicuas, las plantas se trasladaron a una cabina de invernadero equipada con sistemas de calefacción y refrigeración fijados a 22°C durante el día y 17°C durante la

noche. Las plantas se regaron una vez por semana. Con el objetivo de estudiar el efecto del Cu sobre plantas adultas, se aplicaron tres tratamientos, variando la concentración del metal en la solución de riego utilizada:

- a) solución nutritiva ½ MS casero: macronutrientes (NH_4NO_3 10 mM, KNO_3 9.4 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.37 mM, KH_2PO_4 0.62 mM y CaCl_2 1.13 mM), micronutrientes (H_3BO_3 50 μM , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 36.6 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 μM , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.57 μM y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 μM), Fe-EDTA 50 μM , KI 0.25 mM, MES 0.05 % y sacarosa 1 %; ajustado a pH 5.7 con KOH.
- b) solución nutritiva ½ MS casero suplementado con Cu 2.5 μM .
- c) solución nutritiva ½ MS casero suplementado con Cu 100 μM .

1.1.2. Cultivo en placa

Este sistema de cultivo se utilizó para evaluar la sensibilidad de plántulas de 7-20 d a la disponibilidad de Cu en el medio. Para ello, las semillas se desinfectaron de manera superficial con lejía comercial al 30 % (v/v) y Triton X-100 0.02 % (v/v), se lavaron 4 veces con H_2O estéril y se resuspendieron en fitoagar 0.1 % (p/v) estéril. A continuación, las semillas se estratificaron a 4 °C durante 2 d para favorecer una germinación sincronizada y se sembraron en placas con:

- a) medio estándar de crecimiento ½ MS comercial (Murashige and Skoog, 1962) [mezcla de sales MS (*Sigma*) 2.15 g/L; sacarosa 1 % (p/v); MES 0.5 % (p/v), KOH pH 5.7; fitoagar 0.8 % (p/v) y vitaminas en la cantidad recomendada por el fabricante (*Sigma*)]. Para generar la suficiencia de Cu se añadió 0.5 μM de CuSO_4 a la disolución anterior.
- b) medio ½ MS comercial suplementado con las concentraciones indicadas de las sales sulfato de los otros iones metálicos estudiados para ver sus efectos en exceso.

- c) medio ½ MS comercial suplementado con paraquat 0.1 µM o con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 500 µM, en el caso de estudiar otros estreses oxidativos.
- d) medio ½ MS casero preparado con los componentes por separado, según la casa comercial (*Sigma*), sin la adición del elemento de estudio: macronutrientes (NH₄NO₃ 10 mM, KNO₃ 9.4 mM, MgSO₄·7H₂O 0.37 mM, KH₂PO₄ 0.62 mM y CaCl₂ 1.13 mM), micronutrientes (H₃BO₃ 50 µM, MnSO₄·H₂O 36.6 µM, ZnSO₄·7H₂O 15 µM, NaMoO₄·2H₂O 0.57 µM y CoCl₂·6H₂O 0.05 µM), Fe-EDTA 50 µM, KI 0.25 mM, CuSO₄ 1 µM, MES 0.05 %, sacarosa 1 % y fitoagar 0.8 % (*DUCHEFA*); ajustado a pH 5.7 con KOH, para evaluar la sensibilidad a deficiencias metálicas.
- e) medio ½ MS suplementado con los quelantes de Cu extracelular BCS, ácido 2, 9-dimetil-4,7-difenil-1, 10-fenantrolina-disulfónico 50-100 µM, o de Fe, ferrozina 300 µM, para generar deficiencias severas en Cu o Fe, respectivamente.
- f) medio fitoagar-agua al 0.8 %.
- g) medio ½ MS comercial sin sacarosa, después de 48 h a 4° C en oscuridad, las plántulas se expusieron a luz blanca 3 h y posteriormente a 24 h en oscuridad a 23° C. Por último, las plántulas se crecieron 2 d más a 23° C en condiciones de oscuridad (DDHC) o luz roja continua (1µmol/m²/s).

1.1.3. Cultivo en sistema hidropónico

Los cultivos hidropónicos se obtuvieron a partir de la transferencia de plántulas crecidas durante 2 semanas en medio ½ MS comercial (Apartado 1.1.2) sin sacarosa para evitar contaminaciones, al sistema Araponics®. Este sistema consta de cajas de plástico negro con los soportes adecuados para el crecimiento de 12 plantas/caja. Las cajas se llenan con disolución de riego, que se cambia semanalmente para evitar variaciones bruscas de pH, posibles contaminaciones, agotamiento de nutrientes y condiciones anaeróbicas. Con el objetivo de evaluar la respuesta a deficiencia de Cu y/o Fe se aplicaron diferentes tratamientos variando la solución de riego utilizada:

- a) Hoagland 0.5X a partir de las disoluciones originales [K_2SO_4 0.44 mM, KH_2PO_4 0.125 mM, NaCl 10 μM , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, Fe-EDTA 20 μM , H_3BO_3 10 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 μM , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 μM , MoO_3 0.1 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 μM], tampón MES 0.05 % (p/v) y pH 5.7-5.8 con KOH (Arnon and Hoagland, 1938).
- b) la misma solución de riego mencionada anteriormente, pero sin la adición de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 μM y/o Fe-EDTA 20 μM .

1.1.4. Obtención de plantas transgénicas

Las plantas de *A. thaliana* se transformaron siguiendo el procedimiento descrito por (Clough and Bent, 1998). Para ello, los brotes florales se sumergieron en una suspensión celular durante 5 s. Ésta se preparó mediante la inoculación de un pre-cultivo de 3 mL de medio de selección LB-ERG (Apartado 1.2.1 y 1.2.2) a partir de una colonia de clones positivos de *Agrobacterium tumefaciens* y se incubó a 28 °C con 190 rpm de agitación durante 12 h. Posteriormente, se tomó una alícuota de 0.2 mL en 30 mL de medio selectivo LBE y, al alcanzar la fase exponencial, se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio de infiltración [sacarosa 5 % (p/v) y Silwet L-77 (*Lehle Seeds*) 0.05 % (v/v)] a una OD_{600} de 0.8. Las plantas se cultivaron hasta finalizado el ciclo reproductivo de la planta, momento en el que se recogieron las semillas producidas. La selección de semillas transgénicas se realizó en placas de MSG ($\frac{1}{2}$ MS + gentamicina 75 mg/L). Las semillas de los transformantes de primera generación (T1) se transfirieron a sustrato vegetal (Apartado 1.1.1) y se dejaron autopolinizar. Las semillas de la segunda generación (T2) se sembraron nuevamente en placas MSG y se analizó la segregación de la resistencia a gentamicina. Al menos 6 plantas resistentes de la T2 se transfirieron a sustrato vegetal y las homocigotas se seleccionaron por el crecimiento del 100 % de su descendencia (T3) en MSG.

1.2. Manipulación de las bacterias *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

*1.2.1. Condiciones de cultivo y transformación de *Escherichia coli**

Las cepas de *E. coli* (*One Shot Top 10 Competent Cells, Invitrogen*) se cultivaron a 37 °C en agitación, utilizando el medio general para bacterias Luria-Bertani (LB) líquido [triptona (*Pronadisa*) 1 % (p/v), extracto de levadura (*Pronadisa*) 0.5 % (p/v) y NaCl (*Prolabo*) 1 % (p/v)] o sólido [la misma composición con agar bacteriológico (*Pronadisa*) 1.5 % (p/v)]. Los medios para la selección de transformantes se suplementaron con espectinomicina (1 µg/ml; LBE).

Para las transformaciones por choque térmico, se utilizaron células competentes comerciales (*One Shot Top 10 Competent Cells, Invitrogen*). Se recuperaron las células y se añadieron de 3 a 5 µL de ligación (Apartado 2.2.2). A continuación, se aplicó un choque térmico de 30 s a 42 °C. Después, las células se resuspendieron con 1 mL de medio LB atemperado y se incubaron durante 1 h a 37 °C, con agitación a 190 rpm, para que se exprese el gen de selección. Por último, se cultivaron con el medio de selección correspondiente durante toda la noche, hasta que aparecieron los transformantes.

*1.2.2. Condiciones de cultivo y transformación de *Agrobacterium tumefaciens**

La cepa C58 de *A. tumefaciens* (resistente a rifampicina) se cultivó a 28 °C en medio LB líquido o sólido, suplementado con 1 µg/mL de espectinomicina en el caso de los medios para la selección y cultivo de transformantes.

Para preparar las células competentes, se realizó un cultivo de *A. tumefaciens* en LB líquido con rifampicina (0.25 µg/mL) y gentamicina (15 µg/mL) hasta una OD₆₀₀ de 0.5-1.0, en ese momento las células se recogieron, se lavaron con NaCl 150 mM y se resuspendieron en CaCl₂ 20 mM. La transformación se efectuó incubando las células competentes con 1 µg de DNA plasmídico a 28 °C durante 4 min, congelándolas rápidamente en N₂ líquido y recuperándolas a 28 °C en LB líquido durante 3 h. Finalmente, se sembraron en placas Petri en medio de selección con antibiótico y se cultivaron durante 2-3 d hasta que aparecieron los transformantes.

1.3. Diseño de construcciones al gen chivato luciferasa

Los productos de PCR obtenidos con cebadores específicos (Tabla M.2), a partir de las construcciones realizadas previamente en el laboratorio *PCOPT2:GUS:NOS* (Garcia-Molina, 2010) y *PFSDI:GUS:NOS* y *PFSDI(4GTAC):GUS:NOS* (Mayo, 2007) en el vector pFP101:GUS:NOS, se subclonaron entre el sitio de restricción HindIII del vector binario pPZPXomegaL+, cedido por el Dr. Steve Kay (University of California, San Diego).

De este modo, en el caso de *PCOPT2* se subclonó un fragmento de 1246 pb, en el caso del *PFSDI* se subclonó un fragmento de 1193 pb, y por último, en el caso de *PFSDI(4GTAC)*, se subclonó un fragmento de 1128 pb, equivalente al anterior, excepto por la ausencia de una región de 65 nucleótidos (389 a 324 pb aguas arriba del inicio traduccional, región que incluye 4 de las 6 cajas GTAC del promotor). Este promotor, con esa región delecionada, se obtuvo previamente en el laboratorio por técnicas de PCR inversa (Mayo, 2007).

Tabla M.2. Cebadores utilizados para la clonación de los promotores *COPT2* y *FSD1*. El sitio de restricción se indica en letra cursiva en la secuencia.

nombre	secuencia (5'-3')
COPT2-1200F-HindIII	GTGGTGTAAAGCTTTTGCAACAA
COPT2-ATG-R-HindIII	CATAAGCTTGATACTAATGTTAATAGGGTTTATGAT
FSD1 HindIII F	TTAAAGCTTGGAGTGAAGCTATATATA
FSD1 HindIII R	TTAAAGCTTAGCAGCCATTCTTTGTAATTGA

2. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

2.1.1. Obtención de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana*

Se recogieron alrededor de 3 hojas de plantas adultas y se trituró el material con micropistilos (*Sigma*), añadiendo 0.3 mL de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) 2X [CTAB 2 % (p/v); Tris HCl 100 mM pH 8; EDTA 20 mM pH 8; NaCl 1.4 M y PVP 1 % (p/v)]. Una vez triturado, se incubó a 65 °C durante 5 min en agitación. A continuación, se añadieron 0.3 mL de cloroformo y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo vial con 40 µL de CTAB 10X [CTAB 10 % (p/v) y NaCl 0.7 M] y 0.4 mL de cloroformo. Se repitió la centrifugación. El nuevo sobrenadante se transfirió a tubos con 0.3 mL de tampón de precipitación CTAB [CTAB 1 % (p/v); Tris HCl 50 mM pH 8; EDTA 10 mM pH 8]. Se agitó y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento. Posteriormente, se añadieron 0.3 mL de tampón TE con una alta concentración de sales [Tris HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8 y NaCl 1M) y 0.6 mL de etanol al 90 %. Las muestras se dejaron a -20 °C durante 20-30 min para su precipitación y después, se centrifugaron a 4 °C durante 15 min a máxima velocidad. Finalmente, se lavó el sedimento con

etanol al 70 %, se volvió a centrifugar y se resuspendió en 100 μ L de agua destilada.

2.1.2. Obtención de RNA total de *Arabidopsis thaliana*

El material recogido se lavó con EDTA 20 μ M y H₂O Milli-QPLUS (*Millipore*), se congeló con N₂ líquido y se guardó a -80 °C hasta su utilización en los diferentes ensayos. Las extracciones de RNA total se realizaron con el reactivo Trizol Reagent (*Invitrogen*), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se pesaron alrededor de 100 mg de tejido, y una vez congelado se trituró con micropistilos, agregando 1 mL de reactivo Trizol. Después, se centrifugó a 4 °C durante 10 min a máxima velocidad. Posteriormente, se mezcló el sobrenadante con 200 μ L de cloroformo y se volvió a centrifugar, con lo que se obtuvo la fase acuosa, que contiene los ácidos nucleicos. Dicha fase acuosa se mezcló con un volumen de isopropanol (1:1), durante 20 min a -20 °C, para precipitar el RNA. El precipitado se recogió después de centrifugar a máxima velocidad durante 10 min a 4 °C y se lavó con etanol 70 %. El sedimento se resuspendió en 100 μ L de H₂O precalentada a 65 °C. Las muestras se incubaron a esa temperatura durante 10 min más. Para acabar, se centrifugaron las muestras durante 5 min a 8000 rpm a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Para la cuantificación, se tomó una alícuota de 1 μ L del sobrenadante y se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*). La extracción de RNA, para su posterior uso en la hibridación de las micromatrices, se realizó usando el kit *RNeasy Plant Mini* (*Qiagen*) y para la extracción específica de miRNAs se utilizó el kit *mirVana* (*Ambion*), ambos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La calidad del RNA se comprobó mediante un gel de electroforesis para RNA (Apartado 2.2.3), en función de la integridad de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales. Por último, para eliminar el DNA, las muestras se trataron con DNAsa libre de RNAsa (*Invitrogen*) a 25 °C

durante 15 min y posteriormente a 65 °C durante 10 min para desactivarla con 1 µl de EDTA 25 mM.

2.1.3. Aislamiento de DNA plasmídico de bacterias

Para el aislamiento a pequeña escala de plásmidos de *E. coli*, se realizaron cultivos de 3 ml de LB con el antibiótico correspondiente para seleccionar el plásmido. El DNA plasmídico se aisló de las células recuperadas usando el kit *Perfectprep Plasmid Mini (Eppendorf)*, basado en el método de la lisis alcalina. Las minipreps obtenidas se comprobaron mediante el correspondiente ensayo de restricción y el DNA obtenido se envió al Servicio de Secuenciación de DNA (*SCSIE; Universitat de València*) para confirmar la orientación del inserto y la secuencia clonada.

Las colonias obtenidas en la transformación de *A. tumefaciens* se inocularon en un cultivo de 3 mL de medio selectivo. Posteriormente, se tomó 1 mL del cultivo y se calentó a 95 °C durante 5-10 min. Seguidamente, se centrifugó y entre 5-10 µL del sobrenadante resultante se añadieron como molde para la PCR correspondiente.

2.2 Análisis de ácidos nucleicos

2.2.1. Electroforesis de DNA y purificación de bandas

La amplificación del DNA a clonar se realizó mediante la DNA polimerasa termoestable con comprobación de lectura High Expand Fidelity PCR (*Roche*), con la pareja de cebadores correspondiente, el tampón adecuado y 100-200 ng del molde de DNA. Las condiciones generales del programa de PCR fueron: un ciclo de desnaturalización inicial del molde (95 °C 1 min), 35 ciclos de desnaturalización (95 °C 30 seg), hibridación (60 °C 30 seg) y elongación (72 °C 1.5 min) y uno final de elongación (72 °C 1 min).

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TAE [Tris 40 mM; ácido acético glacial 1.14 ml/L y EDTA 20 mM], teñidos con bromuro de etidio 10 µg/ml y separados electroforéticamente con una corriente eléctrica de 100 V. Las muestras se prepararon en tampón de carga 2X [glicerol 50 % (v/v); azul de bromofenol 0.05 % (p/v); EDTA 100 mM]. Las bandas de DNA se cortaron y purificaron a partir del gel con el kit *illustra™ DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare)*.

2.2.2. Reacciones enzimáticas: restricción, desfosforilación y ligación

Los productos de PCR purificados y los vectores se digirieron con las nucleasas de restricción correspondientes (*Roche*) en tampones compatibles. Las reacciones de digestión se incubaron a 37 °C durante 2 h. A continuación, se desfosforiló el vector digerido con *shrimp alkaline phosphatase (SAP; Roche)*, incubándolo durante 15 min a 37 °C. El enzima se inactivó incubando a 65 °C durante 25 min. Las digestiones se precipitaron a -20 °C durante 30 min en una 1/10 parte del volumen final de acetato de sodio 3 M (CH₃COONa) y 2 volúmenes de etanol 96 %. Luego, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min y se lavaron los precipitados con etanol 70 %, antes de ser resuspendidos en tampón de carga 2X (Apartado 2.2.1). Para recuperar el vector y el inserto digeridos, las muestras se separaron en un gel de agarosa, se purificaron las bandas con el kit *Illustra DNA and Gel Band Purification (GE, Healthcare)* y se cuantificaron en el gel de electroforesis. La reacción de ligación se preparó con el kit de ligación rápida de DNA (*Roche*), usando una relación de inserto a vector de 3:1.

2.2.3. Electroforesis de RNA

Los geles de electroforesis de RNA se prepararon a partir de agarosa al 1 % (p/v) en tampón MOPS [MOPS 40 mM, acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0] y formaldehído 2.2 M. Las muestras se solubilizaron con el

tampón de carga correspondiente [formamida desionizada 65 % (v/v) en MOPS 1X, formaldehído 7 % (v/v) y bromuro de etidio 20 µg/mL], se desnaturalizaron a 65 °C durante 10 min y se separaron electroforéticamente a 70-100 V en sistemas de electroforesis (*Biorad*). Finalmente, el gel se visualizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta (*Uvitec*).

2.2.4. Síntesis de cDNA

En primer lugar, se sintetizó el cDNA a partir de RNA (1.5 µg) mediante una reacción de transcripción reversa. Para ello, se añadieron los oligonucleótidos reversos del oligo (dT)₁₅ 50 µg/µL (*Roche*) y del RNA ribosómico 18S 1 µM (Tabla M.3) en un volumen final de 12 µl. El RNA se desnaturalizó a 70 °C durante 10 min y, después de enfriar en hielo, se añadieron 4 µl del tampón RT 5X; 2 µl de DTT 0.1 M (ambos de *Invitrogen*); 1 µl de dNTPs 10 mM (*Promega*) y 1 µl de *SuperScript II reverse transcriptase* 200 U/µl (*Invitrogen*). La reacción se incubó 1 h 30 min a 42 °C y la enzima se inactivó a 70 °C durante 15 min.

En el caso de los miRNAs, la síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de RNA (200 ng), añadiendo los oligonucleótidos reversos del oligo 18S 2 µM y del RT primer miRNA 4 µM (Tabla M.3), específico para cada miRNA, y 10 mM dNTPs en un volumen final de 6.5 µl. El RNA se desnaturalizó a 65° C durante 5 min y, después de enfriar en hielo para el apareamiento, se añadieron 2 µl del tampón RT 5X; 0.5 µl de DTT 0.1 M; 0.5 µl de *RNase OUT* y 0.5 µl de *SuperScript III* (*Invitrogen*). La reacción se incubó durante 30 min a 16° C, para después incubar de nuevo 50 min a 42° C para la síntesis del cDNA y por último, 15 min a 75 °C para su terminación. La reacción se paró añadiendo 190 µl de H₂O.

Tabla M.3. Cebadores utilizados para la síntesis de cDNA.

nombre	secuencia (5'-3')
18S2/ R	CTGGATCCAATTACCAGACTCAA CGAACACTTCACCGGATCATT
miR156 (a-f) RTPRIMER	CGCGAGCTCAGAATTAATACGACTCACTATACGCGGTGCTC
miR172 (ab) RT PRIMER	CGCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATACGCGATGCAGCA

2.2.5. RT-PCR semicuantitativo (*sqPCR*)

El cDNA obtenido se utilizó como molde para amplificar el gen de interés y el gen de control de carga, en reacciones independientes de PCR. La mezcla de reacción contenía, además del cDNA molde, los oligonucleótidos específicos del gen de interés 0.5 μ M (Tabla M.4); 0.5 μ L de dNTPs 10 mM; 2.5 μ L de tampón comercial de PCR 10 x; 0.75 μ L de MgCl₂ (*Bioline*) 1.5 mM y 0.2 μ L BioTaq polimerasa (*Bioline*) 0.5 U, en un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de PCR fueron las indicadas para cada par de oligos (Tabla M.4) (desnaturalización a 94 °C; hibridación según la pareja de cebadores; y elongación a 72 °C). Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis y se fotografiaron.

Con el objetivo de cuantificar la expresión de genes, se utilizó el programa *Image J*, para el densitometrado de bandas de productos de PCR, usándose como referencia el gen ribosomal *18S*.

Tabla M.4. Cebadores utilizados para la sqPCR. La temperatura indicada corresponde al segmento de hibridación de la PCR.

nombre	secuencia (5'-3')	condiciones
ACTINARA1A	GGCGATGAAGCTCAATCCAAAC	25 ciclos
ACTINARA1B	GGTCACGACCAGCAAGATCAAGACG	61 °C
CCA1 rt F1	GTAGCTATGGGTCAAGCGCT	40 ciclos
CCA1 rt R1	CGACTGATAATCTCCTGCAA	55 °C
COPT1 sqRT F (Vic16)	CAATGGATCCATGAACGAAGG	30 ciclos
COPT1 sqRT R Vic17	CCTGAGGGAGGAACATAGTTAG	60 °C
COPT2 sqRT F (Vic18)	ACGTGTCAGTGGCTCAACC	30 ciclos
COPT2 sqRT R (Vic19)	GACGGCGGAAGAAGCTCGGCGG	60 °C
FSD1 rt F1	GCTTCAAGTGCTGTCACC	40 ciclos
FSD1 rt R1	CAAGCCAGGCCAGCCAG	55 °C
LHY rt F1	TTGAATCAGGCGTTCTTGGA	40 ciclos
LHY rt R1	TACCATACCTGAGGGATGAT	55 °C
LUC-F	GGAAGACGCCAAAAACAT	40 ciclos
LUC-R	GTTTTGTCACGATCAAAGGA	50 °C
18S1	TGGGATATCCTGCCAGTAGTCAT	20 ciclos
18S2	CTGGATCCAATTACCAGACTCAA	55 °C

2.2.6. RT-PCR cuantitativo a tiempo real (qPCR)

Para las PCR cuantitativas en tiempo real, los cebadores se diseñaron usando el software *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), considerando la presencia de intrones y el contenido en G/C (Tabla M.5). En primer lugar, se optimizó la concentración de cebadores para cada gen. Se utilizó una concentración de 300 nM para todos los cebadores. A cada pocillo se añadieron 12.5 µL de la mezcla general de reacción *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)*, 1 µL de la muestra a analizar y la mezcla de cebadores directo y reverso, hasta un volumen final de 25 µL. El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de 2 min a 50 °C, para evitar la contaminación con amplicones, un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C e hibridación y elongación a 60 °C, ambos de 30 s. Finalmente, se programó un último ciclo con la curva de disociación (desde 65 a 95 °C, incremento de 0.5 °C por 0.05s).

Los datos obtenidos se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Para ello, se utilizó el gen de referencia *UBQ10* y el valor de Ct para cada gen en particular y se refirió al valor de Ct obtenido con el gen de referencia en esa misma muestra (ΔCt). Posteriormente, este valor se refirió al ΔCt de la muestra de referencia (valores referidos al ΔCt promedio de las muestras de cDNA obtenido) y, de esta manera, se obtuvo el valor $\Delta\Delta Ct$ que se aplicó en la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla M.5. Cebadores utilizados para la qPCR

nombre	secuencia (5'-3')	
	forward	reverse
ACA1	GATGGAAGCTTTGCTGTGGT	CGGAGCAAGGAGGAGTAGTG
AOX1D	TGGATGTCGAGCTATGATGC	GCGCTCTCTCGTACCATTTC
AT4	GAGCGATGAAGATTGCATGA	CCGAAACAAAGTAAACACG
BUB3.2	TTGAAGGGAGGGTTTCAATG	CCTCTGATTTCCGGTGACAT
BUS1	AAACGCCGAAAAACATCATC	CAAGCCAATCTTCAACAGCA
CAS	TGCTTCATCGACCATGGATA	CGGCGTAAGATCACCTTTGT
CCA1	GTTGCAGCTGCTAGTGCTTG	GAAGATCGAGCCTTTGATGC
CCH	AAGTTGGTATGTCATGCCAA	ATATCAATGTCAAATGACTCAA
CCS	TCTCCACGTCTCTTGGGACTTT	AGCTGAGGCATGGCTCGAT
COL1	ACAGTTCCACGGCCACTAAC	CCAATCGAGAAGCCATTGTT
9COPT1	TTGCAATTTTCTCTCTCCCAA	ATGATGGTCGAGGCATT
COPT2	CCTTTTCGTATTTGGTGATGCT	AAACACCTGCGTTAAAGGAC
COPT3	AACAGTCACACCGAGGTCA	TCAACGGGAAACAAGGAAAATAA
CSD1	CATCATTGGTCTCCAGGGCT	GACCTCCTTATTACATCAAT
CSD2	GTCTACAACGTGTAAT	TCCATGAGGCCCTGGAGT
CYP706A1	CTGGATACAGGGGAAGTCCA	AAGAGACGACGATCGCAAGT
EXPB3	CGTGTGGTTACGGTACGTTG	TATGACGGTAACGGCTCTCC
FER1	CACCCAGCTAAGGATGATCG	TCAGAAGCATCTGGTCGAAA
FRO2	GTTGGTTTATAGCCCCGACGA	GGGCCGTAAGGACCTTCTAC
FSD1	ACCGAAGACCAGATTACATA	TGGCACTTACAGCTTCCCAA
GDPD6	ACCGTCTCATGACACCAACA	GTTGCTGAGGCAAAGGAGAC
GRP7	GAGGGAATGAACGGACAAGA	CTCCGTAGCTACCACCTCCA
HDA18	CGGGAGGATGTAATCTGTGG	CAAGCTCCTTCTCCCTCCTT
IRT1	CCAACCAGACGGAAACATCT	TACCAACTGCGTTCTTGCTG
LHCB1.1	TTCCTGGAGACTACGGATG	TCCAAACTTGACTCCGTTCC
LHY	TCGGCCTCTTCTTCACAGTT	ACACCCGAGCAATTCTCATC
LSU1	AGGCGGAAGAGCAACTCTG	TTGATCCATGAGGAAGAGCA
miR156(ab)	TGACAGAAGAGAGT	CGCGAGCTCAGAATTAATACGA
miR172(ab)	AGAATCTTGATGATGC	CGCGAGCACAGAATTAATA
NAC087	CAATCCAACCCCATCATTTT	GTCATGTTTCGCGTTACATC
PRR5	CAACGAGAAGCCGCTTTAAC	TGTGGATTGGACTTGACGAA
RbohI	CACTCAGTGCCTTTTCGATGA	CCAGTGATTCCCACAGGAGT
SDH1.2	AAGACGTGGGACAGTTTTGG	CTTCCCAATACCCCAATGTG

SPL3	TGGAGTTTGTTCAGGTCGAGA	AGCTAAGCGTCTCCTGCAAC
SPL7	CAGGCAGACTGTTCCACCAGA	AGTTTGACGGGACCTGAATG
SPX1	TCAGATCTTCCCTGCTAACGA	GCGGCAATGAAAACACACTA
UBQ10	TAATCCCTGATGAATAAGTGTCTAC	AAAACGAAGCGATGATAAAGAAG
UPB1	AAGACCTTGTCGCGCAATAC	TTTCGGTCAAAACCTGAACC
ZIP2	CGCTTGGAGAAACCTATGGA	CGACACCTATGGGACTCGAT

2.2.7. Micromatrices de DNA

El análisis a gran escala de la expresión génica de *Arabidopsis* en respuesta a diferentes concentraciones de metales en el medio, se realizó mediante micromatrices. Se han utilizado matrices de oligonucleótidos *Galbraith Laboratory Operon Long Oligonucleotide Microarray version 3.0 Platform GPL1775* (<http://www.ag.arizona.edu/microarray>) (*University of Arizona*). Estos chips se producen a partir del *Array-Ready Oligoset* (AROS). El diseño de AROS se basa en *ATH1 release 5.0* de la base de datos *TIGR Arabidopsis genome annotation database* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>), y en *Release 4.0* del *miRNA Registry* en el *Sanger Institute* (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>).

Las micromatrices se hibridaron con los RNAs de plántulas cultivadas en las condiciones a comparar, amplificados y marcados con aminoalilo conjugado a un éster fluorescente diferente para cada muestra (Cy3/mutante y Cy5/WT; *CyTMDye Post-labelling Reactive Dye Pack, GE Healthcare*), mediante el kit comercial *MessageAmp aRNA kit (Ambion)*. Esta combinación de fluoróforos se realiza en dos réplicas biológicas y viceversa en las otras dos réplicas, a las que se aplica posteriormente el cambio de color (*dye-swap*) para tener las cuatro réplicas en las mismas condiciones. Tanto la amplificación como el marcaje se cuantificaron en un espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000*. La hibridación manual se realizó según el siguiente protocolo: las micromatrices se hidrataron, exponiéndolas 3 veces a vapor de agua durante 5 s y, a continuación, se entrecruzaron por irradiación ultravioleta (UV) de 65 mJ en un *UV Stratalinker 1800 (Stratagene)*. Posteriormente, se lavaron 2 veces

con SDS 0.2X y 4 veces con H₂O MilliQPLUS (*Millipore*), y se secaron por centrifugado a 2000 rpm. Seguidamente, se prehibridaron durante 30 min a 42 °C con disolución de prehibridación [BSA 1 % (p/v); SSC 6X y SDS 0.5 % (p/v)]. Se lavaron de nuevo con H₂O MilliQPLUS (*Millipore*) y se secaron por centrifugación. Las micromatrices se hibridaron durante toda la noche a 37 °C con disolución de hibridación [250 pmol de cada uno de los fluoróforos; formamida desionizada 50 % (v/v); SSC 6X; *Denhardt's* 5X y SDS 0.5 % (p/v)]. La disolución de hibridación se desnaturalizó durante 5 min a 95 °C y se inyectó entre la micromatriz y un cubreobjetos *LifterSlipTM* (*Erie Scientific*). Tras la hibridación, las micromatrices se lavaron con SSC y SDS en concentraciones decrecientes y se secaron mediante centrifugado a 2000 rpm. La micromatriz hibridada se analizó con un escáner *GenePix 4000B* (*Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA*) a 532 nm (Cy3) y 635 nm (Cy5). Los valores de expresión se obtuvieron usando el programa *GenePix Pro 6.0 microarray-analysis software* (*Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA*) y se normalizaron con el programa *GenePix Pro 6.0* y *Acuity 4.0 software* (*Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA*). Los datos normalizados se procesaron con el programa *Genecodis 2.0* (<http://genecodis.cnb.csic.es/>) para su clasificación por categorías funcionales (según descritas en la base de datos *Gene Ontology*). Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Pérez Amador (*IBMCP, CSIC-UPV, Valencia*), con la ayuda del Dr. Francisco Vera.

3. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.1. Extracción de proteínas totales

Para la obtención de proteínas totales de la planta, se trituraron unas 3 hojas de planta adulta con tampón de extracción frío [NaCl 100 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, Triton X-100 0.5 % (v/v); DTT 1 mM y PMSF 1 mM]. Tras

una centrifugación a 13000 rpm durante 1 min, el sobrenadante se utilizó como extracto crudo y la cantidad de proteína total se determinó de forma convencional, por el método Bradford (1976), siguiendo el protocolo detallado en (Ausubel et al., 1995).

3.2. Electroforesis de proteínas y tinción del gel

Se mezclaron 20 µg de proteína con disolvente de muestras 2X [Tris-HCl 250 mM, pH 6.8; glicerol 20 % (v/v); SDS 4 % (p/v); β-mercaptoetanol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 0.025 % (p/v)], se desnaturalizaron a 65 °C durante 5 min y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % (p/v) con SDS, según el método descrito inicialmente por Laemmli (1970).

Las proteínas en el gel de poliacrilamida se tiñeron sumergiendo el gel durante 30 min en disolución colorante [azul de Coomassie 0.1 % (p/v); ácido acético 8 % (v/v) y metanol 40 % (v/v)] y, posteriormente, durante 1 h en disolución decolorante [ácido acético 5 % (v/v) y metanol 20 % (v/v)].

3.3. Transferencia de geles de proteínas a membrana e inmunodetección

El análisis de proteínas por *Western blot* se realizó electrotransfiriendo los geles de proteínas sin teñir, a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (*BioRad*) a 40 V durante 2 h, utilizando tampón de transferencia [Tris 25 mM, pH 9.3; glicina 192 mM y metanol 20 % (v/v)]. La inmunodetección en membrana se realizó utilizando los anticuerpos correspondientes a la dilución adecuada para cada uno de ellos en tampón TTBS [Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; NaCl 0.5 M y Tween-20 0.1 % (v/v)]. En primer lugar, se bloqueó la membrana con leche desnatada en polvo al 3 % (p/v) durante 30 min y se lavó con tampón TTBS 5 min. La membrana se incubó con el anticuerpo primario durante 1 h y se lavó con TTBS 4 veces, de 5 min cada una. La incubación con el anticuerpo

secundario correspondiente se realizó durante 30 min y se lavó con TTBS 3 veces, de 5 min cada una, y una última vez con TBS (sin Tween-20). La detección final del complejo antígeno/anticuerpo-peroxidasa se efectuó con el sistema *ECL* (*Amersham*), siguiendo las recomendaciones del fabricante y exponiendo la membrana a películas fotográficas (*Kodak X-Omat*; *Fuji Medical X-RAY Film*). Para la detección final del complejo antígeno-anticuerpo se incubó la membrana con NBT/BCIP (*Sigma*) en tampón [Tris 0.1 M, pH 9.5; NaCl 0.5 M y MgCl₂] hasta la aparición de la señal, parando la reacción con H₂O destilada.

3.4. Medida del contenido de ABA y apertura estomática

La determinación del contenido en ABA se llevó a cabo en plántulas de 7 d. Se pesaron alrededor de 0.2 g de tejido y se almacenaron a -80° C. Se trituró el tejido con un homogeneizador de muestras (*Bertin technologies*) con 5 bolas de acero durante 2 min y se resuspendió con 750 µL de solución de extracción (acetona 80 % v/v, 100 mg/L en hidroxitolueno butilado y 0.5 g/L de ácido cítrico). Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se secó al vacío (7 h). El producto obtenido se resuspendió en 500 µL de TBS (6.05 g/L Tris, 0.20 mg/L MgCl₂ y 8.8 g/L NaCl a pH 7.8).

Se analizaron 3 alícuotas de diluciones de este extracto que entraban en el rango lineal de la curva construida con patrones de ABA (15-250 pg/100 µL), obtenida por el método de ELISA indirecto (Walker-Simmons, 1987). Se utilizaron conjugados ABA-BSA cedidos por la Dra. Teresa Lafuente (*IATA, CSIC*), que habían sido preparados según Weiler (1979) con algunas modificaciones (Norman et al., 1988).

Se determinó el cociente longitud:anchura como medida de la apertura estomática en el envés de hojas de planta adulta (Lawson et al., 1998). Las hojas

se trataron en luz y en una solución de KCl 100 mM o en oscuridad en una solución de CaCl₂ 1 mM.

3.5. Bioluminiscencia

Las semillas *PLHY: LUC* nos las proporcionó la Dra. Isabelle Carré de la Universidad de Warwick, Reino Unido (Song and Carre, 2005). Las plántulas se cultivaron como se describe previamente en el Apartado 1.1.2, bajo fotoperíodo intermedio (LDHC) durante 6 d y después, se transfirieron a una placa blanca multipocillo con medio ½ MS + 3 % sacarosa o el mismo suplementado con 1, 5 or 10 µM CuSO₄ or 100 µM BCS, como se indica en los respectivos pies de las Figuras. A continuación, se añadieron a la disolución y se repartieron en los pocillos 30 µL del sustrato D-luciferina (*Sigma*) (0.42 mg/mL) resuspendido en Triton X-100 0.01 % + 40 µL tampón Tris-acetato 1M pH 7.75. La placa se selló con una cubierta de película óptica *Microseal B# Film (Biorad)*. Después de un ciclo adicional en condiciones LDHC, la placa multipocillo se colocó en condiciones de luz y temperatura continuas (LLHH). La bioluminiscencia se midió con el luminómetro *Luminoskan Ascent* y se expresó como unidades relativas de luz. Los datos fueron procesados con el software *Ascent*, versión 2.6 (*Thermo Scientific*).

El ensayo para evaluar el efecto del Cu sobre la luciferina, se llevó a cabo a partir de una extracción de proteínas totales (Apartado 3.1). La reacción contenía 15 µL del extracto + 100 µL del tampón de ensayo (15 mM MgSO₄; 15 mM KPO₄ pH 7.8; 4 mM EDTA pH 7.8, 2 mM ATP y 2 mM DTT) + 50 µL de luciferina (0.3 mg/mL).

4. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PLANTAS

4.1. Medida del peso fresco y de la longitud de la raíz de plántulas

Para determinar el peso fresco y la longitud de las raíces, se sembraron semillas como se describe en el Apartado 1.1.2., excepto que para cuantificar la longitud de las raíces, las placas se incubaron en posición vertical durante los 7 d de crecimiento de las plántulas. Las medidas de peso fresco se tomaron con una balanza de precisión (*Sartorius research*) y las de longitud de las raíces mediante el programa *Image J* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Las imágenes representativas de los fenotipos observados se tomaron con una cámara de fotos digital acoplada a una lupa estereoscópica (*Motic*) con el software *Motic images 2000 1.1* o con una cámara fotográfica digital (*Nikon*).

4.2 Medida de la actividad SOD

Como material de partida se utilizaron plántulas de 7 d trituradas en N₂ líquido. Las muestras se prepararon según se describe en Bowler et al. (1989), añadiendo tampón de homogeneización [K₂HPO₄/KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.4; BSA 0.1 % (p/v); ascorbato 0.1 % (p/v); β- mercaptoetanol 0.05 % (v/v) y TritonX-100 0.2 % (v/v)], agitando en vórtex y eliminando los restos celulares por centrifugación a 14000 rpm durante 15 min. La cantidad de proteína se determinó por el método Bradford (1976). Alrededor de 20 µg de proteína se mezclaron con disolvente de muestras 2X [Tris-HCl 250 mM, pH 6.8; glicerol 20 % (v/v); SDS 4 % (p/v); β-mercaptoetanol 10 % (v/v) y azul de bromofenol 0.025 % (p/v)], se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min y se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12.5 % (p/v) no desnaturalizante, a 100 V durante 3 h en frío. El gel se tiñó para detectar la actividad SOD, según se describe por Beauchamp and Fridovich (1971), con

NBT 1 mg/ml durante 20 min en oscuridad. Las diferentes isoformas de la SOD se identificaron por inhibición diferencial, incubando con KCN 2 mM (Cu/ZnSOD) (Van Camp et al., 1996) o H₂O sobre la solución R [K₂HPO₄/KH₂PO₄; riboflavina 28 μM y TEMED 28 mM] durante 20 min en oscuridad. La tinción se desarrolló con la exposición a la luz durante 5 min y, una vez alcanzada la tinción adecuada, se paró la reacción con H₂O destilada. Estos experimentos se realizaron con la ayuda de la Dra. Nuria Andrés Colás.

4.3. Determinación del contenido endógeno de cobre y hierro en plántulas

Para determinar el contenido en Cu de plántulas, se lavó el material recogido con EDTA 20 μM y H₂O MilliQPLUS (*Millipore*), se secó, se congeló en N₂ líquido y se liofilizó. Alrededor de 20 mg de tejido liofilizado se digirieron en 0.5 ml de HNO₃ 65 % (v/v) *Suprapur*® durante 12 h a 100 °C. Después de diluir con 2 ml de H₂O MilliQPLUS (*Millipore*), el contenido en Cu de cada muestra se determinó por espectrofotometría de absorción atómica en cámara de grafito (*Zeeman, 4100ZL Perkin Elmer*) e interpolando en una recta de calibrado con patrones de contenido en Cu conocido. Cada medida se tomó por triplicado a partir de 3 experimentos independientes y se representó el valor promedio, normalizado respecto al control WT, con su correspondiente desviación estándar. Las medidas de absorción atómica se realizaron en el SCSIE de la *Universitat de València*.

El análisis por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) se realizó en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Castellón.

4.4. Determinación del contenido de antocianinas, MDA y clorofilas en plántulas

El contenido en antocianinas se determinó como previamente se describe en (Fiorani et al., 2005). De este modo, para la cuantificación de antocianinas, las muestras frescas se trituraron con la ayuda de micropistilos y en presencia de N₂ líquido. Se colocó una alícuota de 0.1 g de la muestra molida en tubos corning de 15 ml, y tras agregar 3 ml de una solución 0.1 % HCl/metanol se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min y se tomó una alícuota de 1 ml, a la cual se agregaron 0.75 ml de agua y 2 ml de cloroformo. Después de la separación de fases, se tomó la fase acuosa y se midió la absorbancia a 536 nm, que es el máximo de absorción de la cianidina-3-O-glucósido.

El contenido de MDA, considerado como indicador de la peroxidación lipídica, se midió según el protocolo descrito en Buege and Aust (1978) Para ello, se pesaron alrededor de 100 mg de tejido fresco y se congelaron a -80 °C. A continuación, se trituraron con un micropistilo, añadiéndoles 1 mL de tampón de reacción (TCA, ácido tricloroacético 0.15 g/L; 2-TBA, ácido tiobarbitúrico 0.037 g/L; 2.4 mL HCl 10M y BHT; hidroxitolueno butilado 0.1 mg/L), para inmediatamente después, incubarlas durante 30 min a 90 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 6000 g durante 15 min a 4 °C, para recuperar el sobrenadante y utilizarlo para medir la absorbancia a 535 y 600.

El contenido en clorofila total en plántulas de *Arabidopsis* se determinó por el método triclorométrico (Parsons and Strickland, 1963). Así, se recogieron alrededor de 50 mg de peso fresco de tejido y se congelaron a -80 °C para su posterior utilización. Se mantuvieron siempre en oscuridad y se trituraron con un micropistilo, añadiéndoles 1 mL de acetona 80 % y se incubaron a 4 °C en agitación durante 24 h. Las muestras así tratadas se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min para recoger el sobrenadante y medir la absorbancia a 664.5 y

647 nm, que corresponden con los máximos de absorción de la clorofila A y B, respectivamente.

4.5. Estudio de la actividad β -glucuronidasa en las plantas *PCOPT:GUS* y *PMIR:GUS*

Las plántulas de líneas transgénicas se dejaron en viales y se embebieron en la disolución de reacción [$K_3Fe(CN)_6$ 0.5 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 0.5 mM, Tritón X-100 0.1 % (v/v), 5-Bromo-4-chloro-3-indolil- β -Dglucurónido ciclohexilamonio (*X-gluc*; *Applichem*) 1 mM, $NaPO_4$ 100 mM pH 7.2, EDTA 10 mM pH 7.2] (Jefferson et al., 1987) y se infiltraron intermitentemente con una bomba de vacío. A continuación, los viales se incubaron en oscuridad a 37 °C hasta que apareció la tinción azul. La reacción se dejó durante toda la noche o se paró a la hora con lavados de etanol a concentraciones crecientes (30- 70 %), que destiñen las clorofilas.

4.6. Medida del movimiento foliar

Para estudiar los ritmos circadianos en plántulas de *Arabidopsis* a partir del movimiento de los cotiledones, se procedió según Edwards and Miller (2007), utilizando plántulas de 7 d en las condiciones continuas descritas en el Apartado 1.1.

Las semillas se desinfectaron y cultivaron en medio $\frac{1}{2}$ MS, como previamente se ha descrito (Apartado 1.1.2). Las placas sembradas se incubaron en fotoperíodo neutro durante 5 d. A continuación, las plántulas fueron transferidas a nuevas placas de 25 pocillos (*Bibby Sterilin Ltd, UK*), a los que previamente se les ha colocado un cm^2 de medio $\frac{1}{2}$ MS 1.5 % fitoagar. Después de 24 h en las cabinas de crecimiento, las placas fueron colocadas delante de

camaras web en condiciones continuas de luz. Se tomaron fotografías cada 30 min durante 6 d.

4.7 Análisis de los datos

Para la colección de datos de la medida del movimiento foliar, se usó el software *MetaMorph* según Edwards and Miller (2007) y el protocolo del fabricante. A continuación, para el análisis de los ritmos en el movimiento foliar y bioluminiscencia, se usó el *MS Excel interface Biological Rhythm Analysis Software System* (BRASS) ((Locke et al., 2005); disponible en <http://millar.bio.ed.ac.uk/PEBrown/BRASS/BrassPage.htm>), a partir de un análisis del periodo, fase y amplitud de los ritmos circadianos, usando el algoritmo FFT-NLLS (Plautz et al., 1997).

El análisis estadístico de la expresión relativa se llevó a cabo comparando la expresión relativa de los genes (RT-PCR) basado en una comparación de pares, fijado en un test de reasignación aleatoria ($p < 0.05$) (Pfaffl et al., 2002). Para el resto de parámetros, se llevó a cabo un análisis ANOVA de dos vías con el test Duncan ($p \leq 0,05$), tras comprobar la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos, utilizando el software *InfoStat*, versión 2010 (<http://www.infostat.com.ar>) (Di Rienzo et al., 2011).

El análisis teórico de la expresión, en función de las condiciones de crecimiento, se realizó mediante la base de datos DIURNAL (<http://diurnal.mocklerlab.org/>) y el análisis teórico de las secuencias promotoras, mediante las bases *PLACE Plant cis-acting regulatory DNA elements* (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/signalscan.html>), y *PATMACH* (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl>).

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ESTUDIO DEL ESTADO NUTRICIONAL DE COBRE EN *Arabidopsis thaliana*

1.1 Estudio del rango de niveles de cobre a utilizar en diferentes tipos de cultivo

En este trabajo se han estudiado principalmente los efectos que tienen las condiciones de deficiencia de Cu en el medio, sobre el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* en diferentes estadios del desarrollo.

1.1.1. Crecimiento de plantas en maceta

En primer lugar, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de Cu en plantas cultivadas en macetas que contienen turba, arena y vermiculita (2:1:1). El crecimiento de las semillas de *Arabidopsis* en maceta, en condiciones de deficiencia del metal, se llevó a cabo regando semanalmente con disolución nutritiva ½ MS sin Cu, preparada en el laboratorio (Murashige and Skoog, 1962). A la misma disolución nutritiva se le añadieron diferentes concentraciones del metal para obtener las condiciones de suficiencia (Cu 2.5 µM) y exceso (Cu 100 µM) del metal. Una vez alcanzada la madurez reproductiva (6 semanas) y tomando como control de crecimiento óptimo, la condición de suficiencia de Cu, los síntomas observados en las plantas en deficiencia y en exceso de Cu son similares. En ambos casos, las plantas presentan clorosis foliar y reducción del tamaño y de la fertilidad (Figura R.1.1).



Figura R.1.1. Síntomas de las plantas adultas de *Arabidopsis* cultivadas en maceta con diferentes niveles de Cu. Las plantas WT se regaron durante 6 semanas con medio $\frac{1}{2}$ MS con diferentes niveles de Cu: deficiencia (sin adición del metal al medio; -Cu), suficiencia ($2.5 \mu\text{M}$ Cu; control) y exceso ($100 \mu\text{M}$ Cu; +Cu).

Los síntomas de las plantas crecidas en maceta en deficiencia de Cu no son muy reproducibles entre distintos experimentos, probablemente debido a la gran variabilidad en el contenido del metal presente en el sustrato. Por ello, con el objetivo de controlar las condiciones de deficiencia de Cu en plantas adultas, se han optimizado las condiciones nutricionales en cultivos hidropónicos. Además, este sistema nos permite disponer de los tejidos de las raíces y del brote de forma separada.

1.1.2. Crecimiento de plantas en cultivos hidropónicos

Para conseguir la deficiencia de Cu en sistemas hidropónicos, se germinaron semillas WT en medio ½ MS comercial sin sacarosa, para reducir las contaminaciones. Tras dos semanas de crecimiento, las plántulas se transfirieron a bandejas de plástico del sistema Araponics® para cultivo hidropónico, que minimizan la contaminación debida al crecimiento de algas. Una vez en el sistema hidropónico, se utiliza medio Hoagland 0.5X sin Cu. La suficiencia de Cu se ha usado como control y se obtiene añadiendo Cu 0.1 µM al mismo medio.

Como se observa en la Figura R.1.2, a simple vista el crecimiento y el aspecto que presentan las plantas en deficiencia de Cu no difieren de los del control crecido en suficiencia.

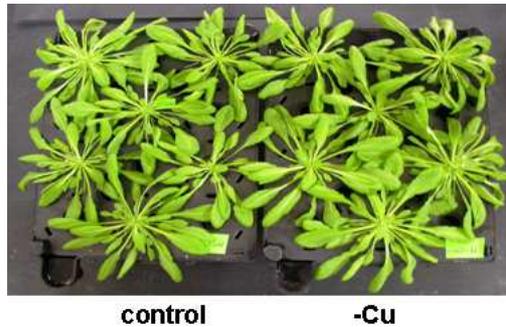


Figura R.1.2. Cultivos hidropónicos de *Arabidopsis* cultivadas en suficiencia y deficiencia de Cu. Las semillas WT se germinan en medio ½ MS comercial sin sacarosa en tubos eppendorfs de 0.5 mL durante dos semanas. Después se transfieren a bandejas negras de plástico del sistema Araponics® donde se cultivan en solución Hoagland 0.5X en suficiencia de Cu (0.1 µM Cu; control) o en deficiencia (sin añadir Cu al medio; -Cu). La solución de riego se renueva semanalmente durante 4 semanas.

Sin embargo, una vez finalizada la fase reproductiva en los cultivos hidropónicos, se observó que la pigmentación de la cubierta de las semillas depende de las condiciones de crecimiento. Las semillas que provienen de

plantas cultivadas en deficiencia de Cu, muestran una cubierta seminal más clara que la de las semillas obtenidas de plantas crecidas en suficiencia de Cu (Figura R.1.3).

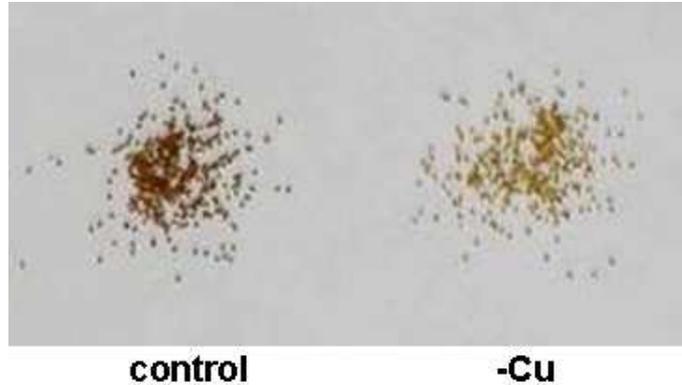


Figura R.1.3. Pigmentación de la cubierta de las semillas de plantas de *Arabidopsis* en suficiencia y de deficiencia de Cu. Fotografía de las semillas obtenidas a partir de plantas WT cultivadas durante 6 semanas en medio Hoagland 0.5X con suficiencia de Cu (0.1 μ M; control) y de deficiencia de Cu (sin adición del metal; -Cu).

Además, las semillas obtenidas de plantas crecidas en suficiencia y deficiencia de Cu se cultivaron durante 6-7 d en placas con fitoagar-agua. Como se observa en la Figura R.1.4a, la tasa de germinación de las semillas que provienen de plantas crecidas en medio deficiente en Cu es menor que la de las semillas de plantas cultivadas en suficiencia de Cu. La cuantificación del peso fresco y la longitud de las raíces de las plántulas germinadas, corroboran la diferencia observada (Figura R.1.4b).

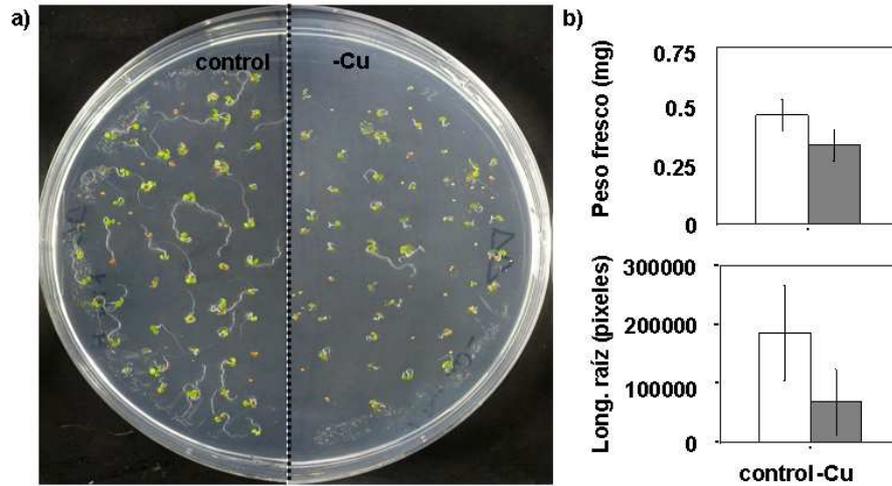


Figura R.1.4. Plántulas de *Arabidopsis* procedentes de semillas de plantas cultivadas en deficiencia y suficiencia de Cu. a) Fotografía representativa de plántulas WT cultivadas durante 7 d en placas con fitoagar-agua. Control: semillas procedentes de plantas WT cultivadas en solución Hoagland 0.5X con suficiencia de Cu (0.1 μ M); -Cu: semillas procedentes de plantas WT cultivadas en solución Hoagland 0.5X con deficiencia de Cu (sin adición del metal al medio). b) Peso fresco y longitud de la raíz de las plántulas mencionadas en el Apartado a); control (barras blancas) y -Cu (barras grises). Las barras representan la media \pm DE de 2 réplicas biológicas.

1.1.3. Crecimiento de plántulas en placas de cultivo

Fundamentalmente, en este trabajo se han utilizado plántulas de *Arabidopsis* de 7 d cultivadas en medio sólido $\frac{1}{2}$ MS, ya que son las condiciones más habituales para el crecimiento de *Arabidopsis* en el laboratorio. Para el estudio de las respuestas a las variaciones en la concentración de Cu en el medio de crecimiento se requiere la elección de un medio control y el establecimiento de los límites de las condiciones de deficiencia y exceso. Con el objetivo de que los cambios nutricionales representen situaciones ambientales realistas, se han elegido las concentraciones de Cu teniendo en cuenta que deben ser suficientemente diferentes de la condición control a nivel molecular, para que la planta pueda detectar la variación y responder a ella, pero sin alterar excesivamente la fisiología de la planta. Previamente, se ha establecido que las

plantas experimentan deficiencia de Cu cuando las concentraciones endógenas son inferiores a 5 $\mu\text{g/g}$ de peso seco y manifiestan el exceso de Cu a concentraciones endógenas superiores a 20-30 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (Märshner, 2002) (Tabla R.1.1). Las plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en el medio $\frac{1}{2}$ MS presentan un contenido endógeno de Cu inferior al límite que se considera deficiencia del metal. Por otro lado, concentraciones de Cu en el medio por encima de 5 μM , implican que el contenido endógeno se sitúe en el rango de exceso del metal.

Tabla R.1.1. Resumen de las condiciones de estudio de *Arabidopsis* según el contenido en Cu endógeno

	Contenido en Cu endógeno ($\mu\text{g/g}$ de peso seco)	Concentración de Cu exógeno (μM)		
		Placa	Hidropónico	Maceta
Deficiencia	< 5	≤ 0.1	0	0
Suficiencia	5-25	0.5-1	0.1	2.5
Exceso	> 25	≥ 5	1	100

Con el objetivo de evaluar a qué concentraciones de Cu en el medio se genera estrés en las plántulas, se cuantificó la peroxidación lipídica y el contenido total de clorofila. Con este fin, se cultivaron plántulas WT durante 7 d en medio $\frac{1}{2}$ MS comercial y el mismo medio con el quelante de Cu extracelular BCS (ácido 2, 9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin disulfónico) 100 μM , para conseguir condiciones de deficiencia de Cu. También se utilizó el medio $\frac{1}{2}$ MS (preparado en el laboratorio) y el mismo medio con concentraciones de Cu de 0.5 a 50 μM para comparar con el medio comercial y para poder controlar la cantidad de Cu del medio.

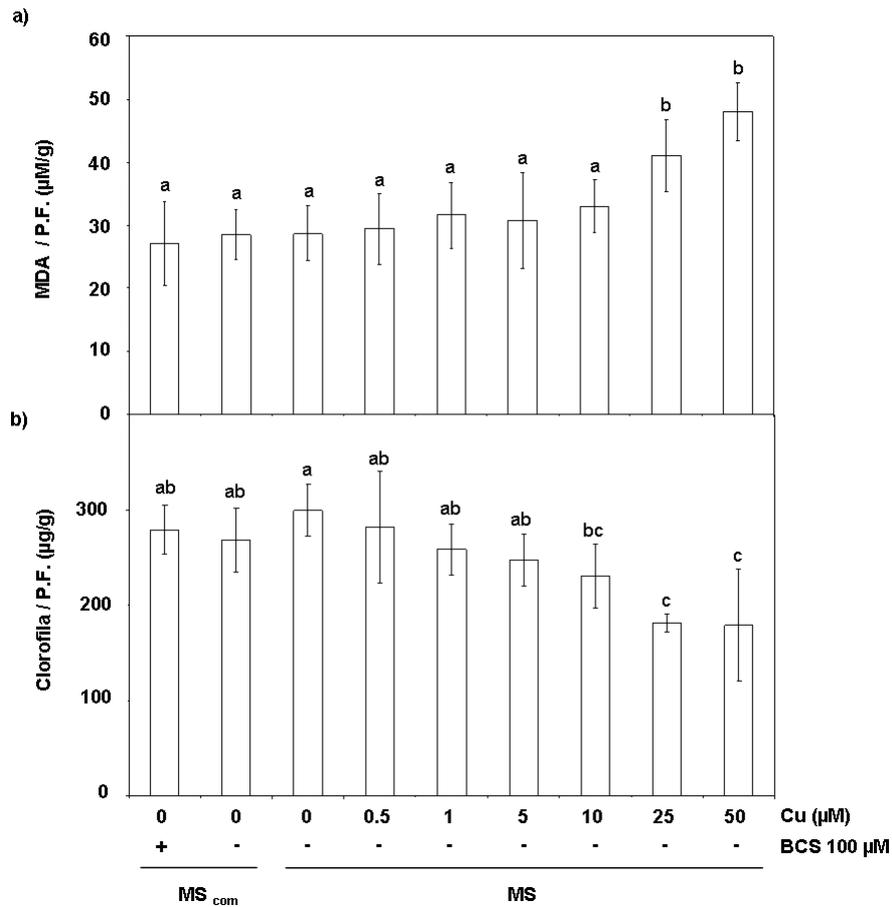


Figura R.1.5. Contenido en MDA y clorofila en plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en medios con diferentes concentraciones de Cu. a) Contenido de MDA y b) Contenido total de clorofila en plántulas WT de 7 d de edad cultivadas en medio $\frac{1}{2}$ MS (com, comercial), y el mismo medio suplementado con BCS (100 μM) o Cu de 0.5 a 50 μM . Las barras representan la media \pm DE de 4 réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La peroxidación lipídica, medida como contenido de MDA (malondialdehído) por unidad de peso fresco, no presenta diferencias significativas desde 0 hasta 10 μM de Cu en el medio. Sin embargo, a concentraciones iguales o superiores a 25 μM de Cu se produce un incremento en la peroxidación lipídica (Figura R.1.5a). El contenido total de clorofila por

unidad de peso fresco también muestra que concentraciones iguales o superiores a 25 μM de Cu en el medio producen un descenso significativo de este parámetro (Figura R.1.5b).

1.2. Expresión de genes marcadores regulados por exceso y deficiencia de cobre

Con el objetivo de identificar nuevos marcadores moleculares asociados a las condiciones nutricionales de exceso y de deficiencia de Cu, se usaron los resultados del análisis global de expresión génica en micromatrices, obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los que se compara la expresión en plántulas cultivadas en deficiencia ($\frac{1}{2}$ MS), con plántulas crecidas en exceso de Cu (10 μM) (Andrés-Colás et al., 2013). Entre las diferentes categorías funcionales preponderantes en el análisis de las micromatrices, se eligieron una serie de genes (Tabla R.1.2) que muestran expresión diferencial, con un valor \log_2 ratio de $\geq |1|$.

Tabla R.1.2. Resumen de las categorías funcionales preponderantes en función de la condición de Cu

Categoría funcional	Exceso	Deficiencia
Homeostasis iónica	<i>CCS</i>	<i>COPT2, CCH</i>
Respuesta a estrés	<i>CSD2, SDHI-2, RbohI</i>	<i>FSD1</i>
Modificación y reparación del DNA/ Metabolismo del azufre	<i>HDA18</i>	<i>CYP79F1, BUS1</i>
División celular/ Crecimiento celular	<i>BUB3.2</i>	<i>GDPD6, EXPB3</i>
Transducción de señales	<i>PRR5, GRP7</i>	<i>ACAI, CAS</i>

1.2.1. Expresión génica en exceso de cobre

Entre los genes seleccionados para validar su expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) se incluyen como controles algunos genes que

participan en la homeostasis iónica, cuya regulación por Cu se ha descrito previamente en la bibliografía (Yamasaki et al., 2009; Bernal et al., 2012; Andrés-Colás et al., 2013). En este sentido, se utilizó como control para el exceso de Cu, la expresión de la chaperona citosólica de Cu, *CCS* (Abdel-Ghany et al., 2005) (Figura R.1.6). Con respecto al estrés oxidativo generado por el exceso de Cu, uno de los mejores representantes de esta categoría es *CSD1*, que codifica la superóxido dismutasa de Cu/Zn (Yamasaki et al., 2007), cuya expresión también se confirma por qPCR en nuestras condiciones (Figura R.1.6).

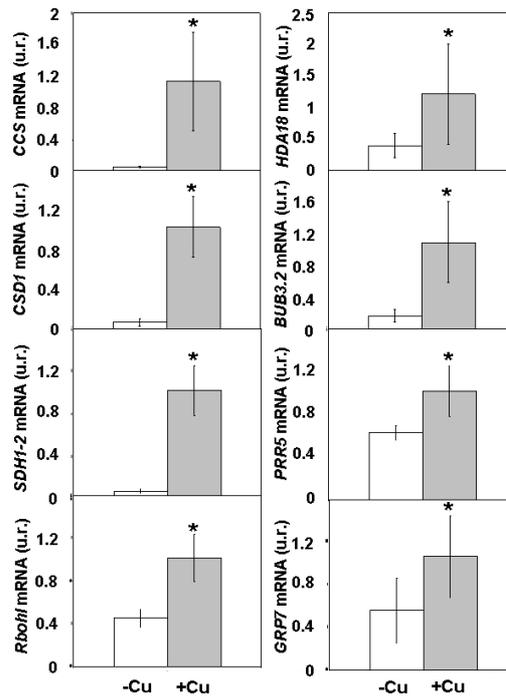


Figura R.1.6. Expresión de genes inducidos en exceso de Cu. Expresiones relativas de los genes *CCS*, *CSD1*, *SDH1-2*, *Rbohl*, *HDA18*, *BUB3.2*, *PRR5* y *GRP7*. Plántulas WT de 6 d se cultivaron en deficiencia de Cu ($\frac{1}{2}$ MS comercial; -Cu, barras blancas) o en exceso de Cu ($\frac{1}{2}$ MS comercial con 10 μ M de Cu; +Cu, barras grises). El gen *UBQ10* se usa como control interno. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos al exceso de Cu. Las barras representan la media \pm DE de cuatro réplicas biológicas. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

En relación con nuevos genes, cuyo aumento de expresión sirva como marcador del exceso de Cu, se ha confirmado la expresión del gen nuclear que codifica para la succinato deshidrogenasa 1-2, *SDHI-2* mitocondrial (Leon et al., 2007). Dicha expresión indica la participación de la mitocondria en la percepción/señalización del exceso de Cu. Además, se observa un cambio en la expresión de la NADPH oxidasa *RbohI* (Suzuki et al., 2011), que aumenta en plántulas cultivadas en altas concentraciones de Cu, lo que apoya que la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) forma parte del proceso de señalización por exceso de Cu. En las categorías funcionales de modificación del DNA y división celular, los genes candidatos elegidos son los que codifican la histona desacetilasa 18, *HDA18* y *BUB3.2* (*budding unhibited for benzimidazol*) (Caillaud et al., 2009), cuyos resultados de qPCR confirman los datos obtenidos en las micromatrices (Figura R.1.6).

Como se verá más adelante (Capítulo 4), hemos postulado la posibilidad de que se produzca una regulación recíproca entre la homeostasis del Cu y el reloj circadiano. En este sentido, hemos analizado la expresión de genes componentes del reloj, como *PRR5*, de la familia de reguladores deseudorrespuesta (Fujimori et al., 2005) y la proteína rica en glicina, *GRP7* (Schöning et al., 2008), que son dos de los mejores representantes de la categoría de señalización y cuyo incremento de expresión en exceso de Cu también se ha corroborado por qPCR (Figura R.1.6).

1.2.2. Expresión génica en deficiencia de cobre

Los genes del transportador *COPT2* y de la SOD de Fe, *FSDI*, son dos de los más representativos en la respuesta a deficiencia de Cu y su expresión depende del factor de transcripción *SPL7* (Yamasaki et al., 2009; Bernal et al., 2012; Andrés-Colás et al., 2013). La expresión de estos genes se ha usado como control en plántulas WT y además, se ha utilizado el mutante *spl7*, cedido por el Dr. Hiroaki Yamasaki de la Universidad de Kyushu de Japón, para comprobar

la dependencia o no de *SPL7* de los genes regulados en deficiencia de Cu (Figura R.1.7).

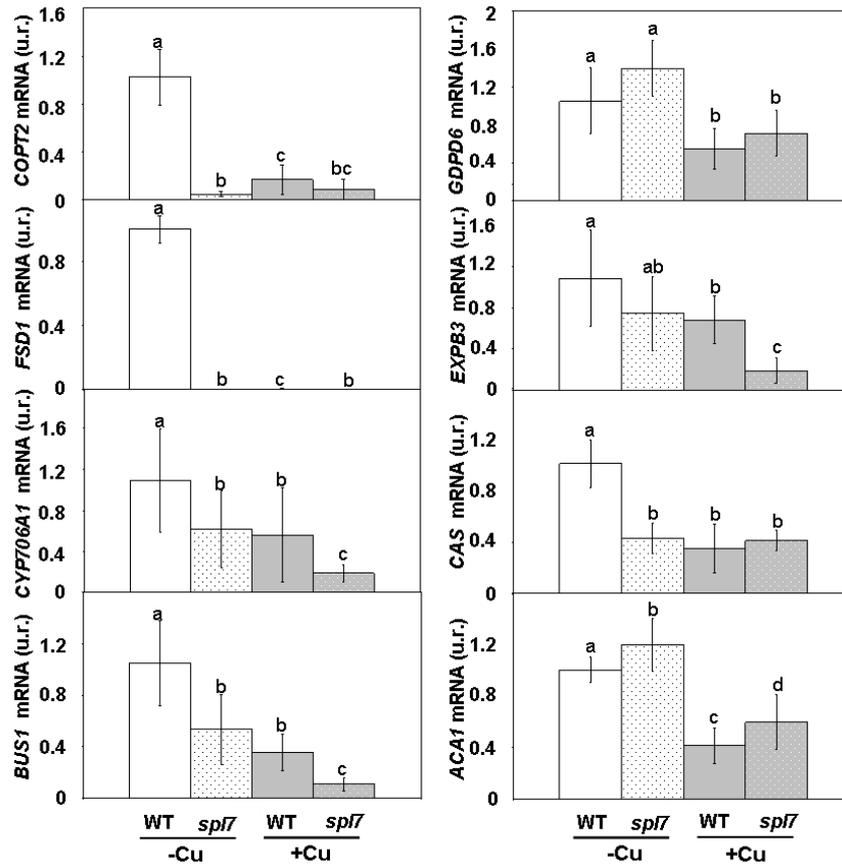


Figura R.1.7. Expresión de genes inducidos en deficiencia de Cu. Expresión relativa de los genes *COPT2*, *FSD1*, *CYP706A1*, *BUS1*, *GDPD6*, *EXPB3*, *CAS* y *ACA1*. Plántulas de 6 d WT (barras lisas) y *spl7* (barras punteadas) se cultivaron en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu, barras blancas) y en exceso de Cu (medio ½ MS comercial suplementado con 10 µM de Cu; +Cu, barras grises). El mRNA de cada gen se analizó por qPCR con cebadores específicos y se normalizó con la expresión del gen *UBQ10*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la condición de deficiencia de Cu. Las barras representan la media ± SD de cinco réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los patrones de expresión de los controles se han comparado con los de los genes obtenidos del análisis global mencionado previamente, pertenecientes a diferentes categorías funcionales (Tabla R.1.2 y Figura R.1.7) (Andrés-Colás et al., 2013). Entre los genes de la categoría de respuesta al estrés se encuentra *CYP706A1*, que codifica un miembro de la familia del citocromo P450. La regulación de la expresión de este gen por Cu se ha corroborado por qPCR y se observa que depende parcialmente de la función de *SPL7* (Figura R.1.7). En la categoría de biosíntesis de compuestos con azufre se ha seleccionado otro miembro de la familia del citocromo P450, *CYP79F1*, también conocido como *BUS1*, relacionado con la vía biosintética de glucosinolatos alifáticos de metionina (Sønderby et al., 2010). La expresión de *BUS1* también es parcialmente dependiente de *SPL7* (Figura R.1.7). En la categoría de expansión celular, los genes que codifican la glicerofosfodiesterasa *GDPD6* y la expansina *EXPB3* están entre los que muestran una mayor expresión diferencial en el análisis de micromatrices y su regulación por Cu se ha confirmado por qPCR (Figura R.1.7). Se observa que, mientras la expresión de *GDPD6* es independiente de la función de *SPL7*, la expresión de *EXPB3* es parcialmente dependiente de *SPL7*. Finalmente, en la categoría de señalización, *CAS* es uno de los mejores representantes (Tabla R.1.2). *CAS* codifica una proteína localizada en el cloroplasto que se considera un transductor primario de la señal del calcio externo y que participa en la regulación de la apertura estomática en respuesta a concentraciones externas elevadas de calcio (Han et al., 2003). El aumento de la expresión de *CAS* en deficiencia de Cu es dependiente de la función de *SPL7*. Además, el gen que codifica la anhidrasa carbónica, *ACA1*, también está relacionado con la señalización por calcio (Hermans et al., 2010) pero en este caso, su expresión es independiente de *SPL7*.

1.2.3 Cinéticas de la percepción de los cambios en los niveles de cobre del medio

Con el objetivo de averiguar el tiempo que necesitan las plántulas para percibir los cambios en los niveles ambientales de Cu se evaluó la cinética de la expresión de los genes marcadores de deficiencia del metal (*COPT2* y *FSD1*) en plántulas cultivadas en deficiencia severa y luego transferidas a suficiencia de Cu y viceversa. Para ello, se cultivaron plántulas WT durante 6 d, bien en medio con deficiencia severa en Cu o en medio con suficiencia del metal. Tras esos 6 d, las plantas se transfirieron al medio de condiciones opuestas, es decir, las plántulas cultivadas en deficiencia severa se pasaron a suficiencia de Cu, y aquellas plántulas cultivadas en suficiencia se transfirieron a deficiencia severa del metal. Se tomaron muestras a diferentes tiempos para el análisis de la expresión génica (Figura R.1.8 y 1.9). El tiempo cero en el eje de la gráfica corresponde al de la transferencia. Las plántulas crecieron en fotoperíodo neutro con ciclos de luz y temperatura de 12 h (LDHC). Las muestras se recogieron a las 0, 6 y 12 h de la etapa de luz durante los 2-3 d de duración del experimento. La fase de oscuridad se representa en las Figuras en fondo gris.

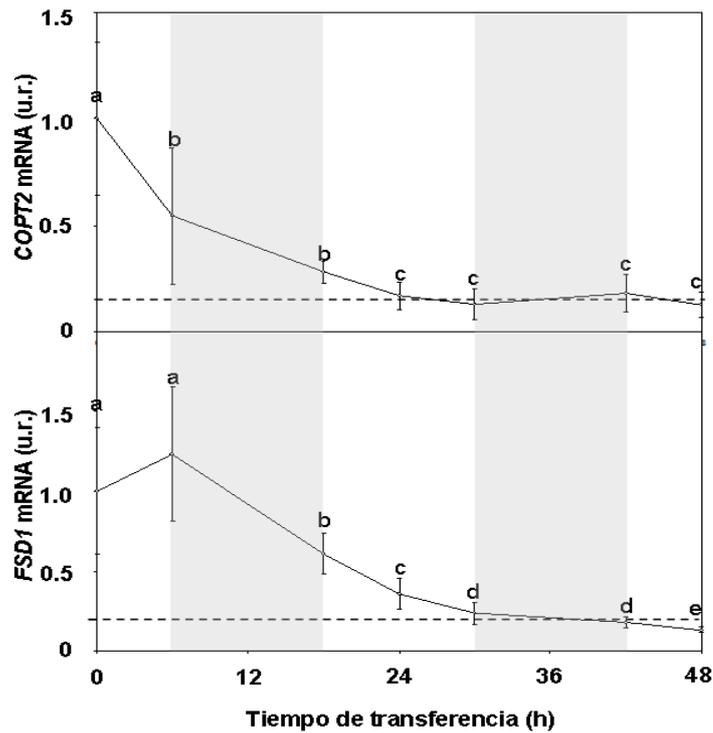


Figura R.1.8. Cinéticas de expresión de los genes *COPT2* y *FSD1* tras la transferencia de deficiencia a suficiencia en Cu. Las plántulas de 6 d cultivadas en medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con BCS $50 \mu\text{M}$ se transfirieron a un medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con $1 \mu\text{M}$ de Cu. Las muestras se recogieron a las 0, 6 y 12 h, desde el inicio de la etapa luminosa (luz: fondo blanco, oscuridad: fondo gris) durante 2 d. El mRNA se analiza por qPCR con cebadores específicos y se normaliza con la expresión del gen *UBQ10*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la muestra a tiempo cero en el eje (inicio de la transferencia). Cada punto representa la media \pm DE de cinco réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Al transferir las plántulas que habían sido cultivadas en condiciones de deficiencia severa a condiciones de suficiencia de Cu, se observa una disminución de la expresión relativa de los genes *COPT2* y *FSD1* (Figura R.1.8). La expresión relativa de ambos genes se estabiliza cuando se alcanza un 80 % de reducción en relación al tiempo cero, en ambos casos. Sin embargo, la cinética de la disminución fue distinta según el gen evaluado. Mientras que para

el gen *COPT2* se observa una represión del 50 % de su expresión a las 6 h de la transferencia de medio, para el gen *FSD1* se observa una represión de similar magnitud entre las 18 y 24 h de la transferencia (Figura R.1.8).

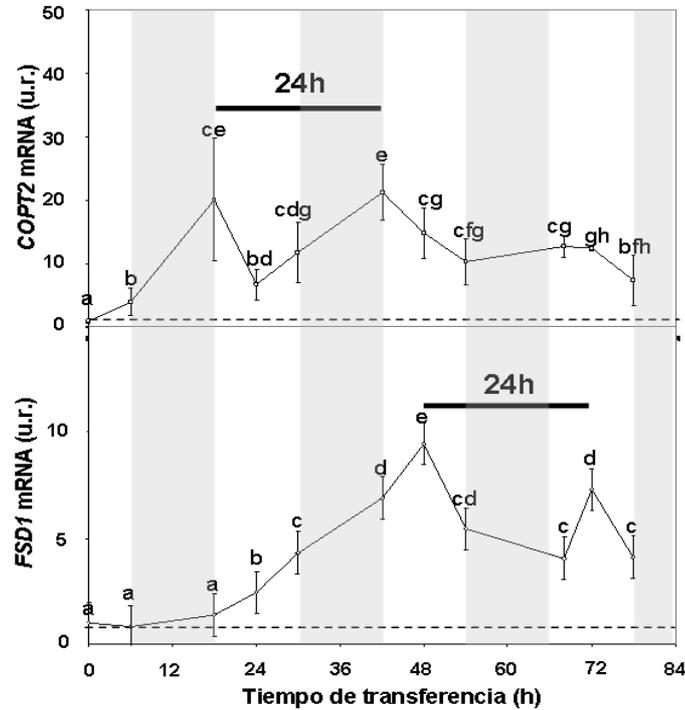


Figura R.1.9. Cinéticas de la expresión de los genes *COPT2* y *FSD1* tras la transferencia de suficiencia a deficiencia severa de Cu. Las plántulas de 6 d cultivadas en medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con $1 \mu\text{M}$ de Cu se transfirieron a un medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con BCS $50 \mu\text{M}$. Las muestras se recogieron a las 0, 6 y 12 h desde el inicio de la luz (luz: fondo blanco, oscuridad: fondo gris) durante 3-4 d. El mRNA de cada gen se analizó por qPCR con cebadores específicos y se normalizó con la expresión del gen *UBQ10*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la muestra a tiempo cero en el eje (inicio de la transferencia). Cada punto representa la media \pm DE de cinco réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En el caso inverso, al transferir las plántulas cultivadas en condiciones de suficiencia a condiciones de deficiencia de Cu, se observa la inducción de la

expresión de los genes *COPT2* y *FSD1* (Figura R.1.9). La expresión de *COPT2* aumenta 20 veces a las 18 h de la transferencia, mientras que para el gen *FSD1* se observa el incremento máximo (unas 10 veces) a las 48 h de la transferencia. Como se ha descrito anteriormente, estos datos confirman que el tiempo de respuesta ante la variación del Cu del medio es menor para *COPT2* que para *FSD1*.

Además, en ambos casos se observa que, tras el incremento, la expresión no se estabiliza, sino que muestra oscilaciones (Figura R.1.9). Efectivamente, una vez que se alcanza el máximo de expresión, se observa un descenso significativo y la expresión vuelve a alcanzar otro máximo relativo 24 h después del primero, lo que sugiere que los genes poseen una expresión cíclica con un periodo circadiano. Como se observa en la Figura R.1.9, los máximos de expresión de ambos genes no coinciden, ya que se producen a distintos tiempos del ciclo. En el caso de *COPT2*, la expresión cíclica alcanza máximos alrededor de las 0 h del fotoperiodo y en el caso de *FSD1*, los picos se producen alrededor de las 6 h (Figura R.1.9).

1.3. Efecto de la sobreexpresión del factor transcripcional SPL3 sobre la respuesta a la deficiencia de cobre

Para estudiar la posible relación de otros miembros de la familia de factores de transcripción SPL con la homeostasis del Cu, se realizó un análisis comparativo entre dos estudios transcriptómicos globales previos. Por un lado, el análisis de micromatrices mencionado anteriormente (deficiencia vs exceso de Cu) (Andrés-Colás et al., 2013) y por otro lado, el análisis de los cambios globales de expresión génica de plantas sobreexpresoras del factor de transcripción SPL3 (SPL3^{OE} vs WT), obtenido en el laboratorio del Dr. Peter Huijser (Instituto Max Planck de Colonia) (resultados no publicados).

Alrededor del 45 % de los genes inducidos (valor \log_2 ratio de $\geq |1|$) en condiciones de deficiencia de Cu, aparecen reprimidos en las plantas $SPL3^{OE}$ con respecto a las WT (resultados no mostrados). Entre ellos se encuentran algunos genes relacionados con el ritmo circadiano y la homeostasis del Cu. A partir de los resultados de esta comparación, se analizó por qPCR la expresión de genes relacionados con las respuestas a deficiencia de Cu (*FSD1*, *COPT2* y *CCH*) en plántulas WT y $SPL3^{OE}$ cultivadas durante 7 d en deficiencia ($\frac{1}{2}$ MS) y suficiencia de Cu ($\frac{1}{2}$ MS suplementado con 0.5 μ M). Como se muestra en la Figura R.1.10, las plántulas WT cultivadas en deficiencia de Cu presentan un aumento en la expresión de *FSD1* y de *COPT2* con respecto a la condición de suficiencia. Sin embargo, en las plántulas $SPL3^{OE}$ esta inducción es unas 8 veces inferior para *FSD1* y de unas 10 veces para *COPT2*, con respecto a la inducción observada en las WT. Además, la inducción de *CCH* en condiciones de deficiencia de Cu no se detecta en las plántulas $SPL3^{OE}$ (Figura R.1.10).

Con el objetivo de determinar si el efecto de la sobreexpresión de *SPL3* sobre la atenuación de la respuesta a la deficiencia de Cu está mediado por cambios en la expresión de *SPL7*, que se considera el principal regulador de dichas respuestas, se analizó la expresión de éste en las mismas plántulas (Figura R.1.10). Dado que no se observan diferencias significativas en los niveles de expresión de *SPL7* en las plántulas $SPL3^{OE}$ con respecto a las WT, ni tampoco en función de la concentración de Cu en el medio, estos resultados indican que la respuesta a la deficiencia de Cu está fuertemente atenuada en las plantas $SPL3^{OE}$ y que este efecto no está mediado por cambios a nivel transcripcional de la expresión del factor *SPL7*.

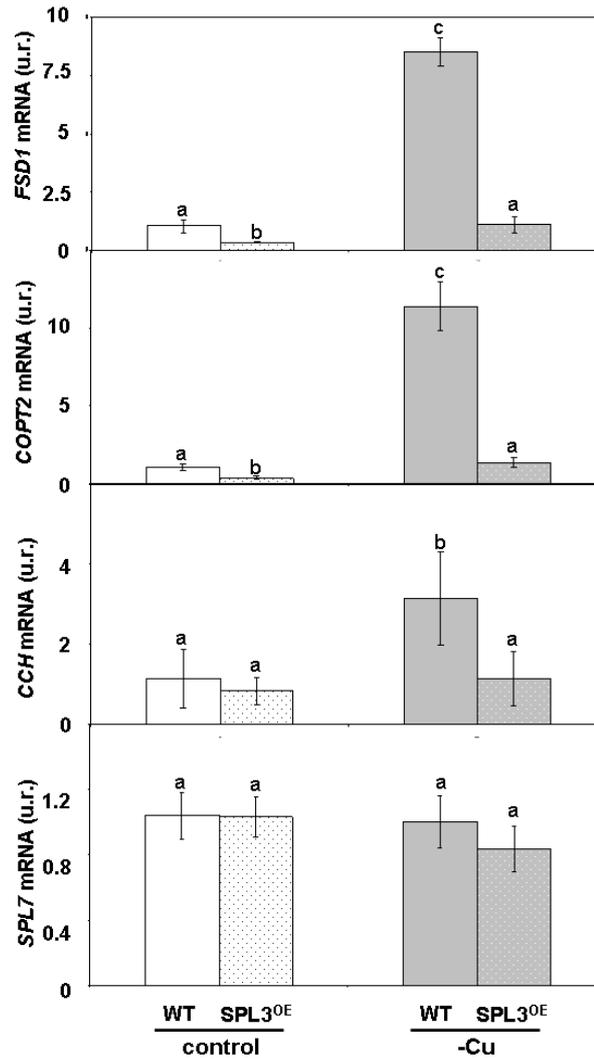


Figura R.1.10. Expresión de genes marcadores de deficiencia de Cu en plántulas *SPL3^{OE}*. Expresiones relativas de *FSD1*, *COPT2*, *CCH* y *SPL7*. Plántulas de 7 d WT (barras lisas) y *SPL3^{OE}* (barras punteadas) se cultivaron en suficiencia de Cu (medio ½ MS comercial con 0.5 µM de Cu; control, barras blancas) y deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu, barras grises). El mRNA de cada gen se analiza por qPCR con cebadores específicos y se normaliza con la expresión del gen *UBQ10* y *EF1*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la planta WT en la condición de suficiencia de Cu. Las barras representan la media ± DE de tres réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para evaluar si la atenuación en la respuesta a la deficiencia de Cu observada en las plántulas $SPL3^{OE}$ es un efecto general de competencia por los sitios de unión GTAC en los promotores de los genes diana, que podría ser provocado por la sobreexpresión de cualquier otro factor SPL, se analizó la expresión relativa de los marcadores de Cu *FSD1*, *COPT2* y *CCH* en plántulas $SPL8^{OE}$. El factor SPL8, que pertenece a una subfamilia distinta al factor SPL3, no posee el dominio “*extended SBP*” que contiene una secuencia muy conservada, pero de función todavía desconocida (Sommer et al., 2010). Para evaluar el efecto que causa la sobreexpresión de SPL8, se cultivaron plántulas WT y $SPL8^{OE}$ durante 7 d en medio deficiente en Cu y se analizó la expresión de genes marcadores de deficiencia del metal.

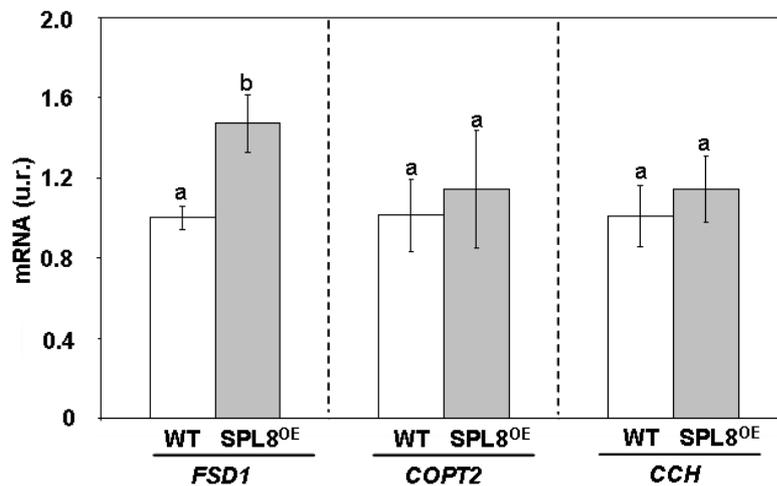


Figura R.1.11. Expresión de genes marcadores de deficiencia de Cu en plántulas $SPL8^{OE}$. Expresiones relativas de *FSD1*, *COPT* y *CCH*. Plántulas de 7 d WT (barras lisas) y $SPL8^{OE}$ (barras grises) se cultivaron en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial). El mRNA de cada gen se analiza por qPCR con cebadores específicos y se normaliza con la expresión del gen *EF1*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a las plantas WT. Las barras representan la media \pm DE de cuatro réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Como se muestra en la Figura R.1.11, la expresión relativa de los genes *FSD1*, *COPT2* y *CCH* no varía en las plántulas *SPL8^{OE}*, o es incluso mayor, en el caso de *FSD1*, con respecto a las WT. Estos resultados indican que los efectos de la sobreexpresión de *SPL3* sobre la atenuación de la respuesta a deficiencia de Cu son específicos de esta *SPL*, ya que no se producen con la sobreexpresión de otros miembros de la familia como *SPL8*.

Con el objetivo de conocer si la regulación de *SPL3* depende de la concentración de Cu en el medio, se cultivaron plántulas WT durante 6 d en distintas concentraciones del metal. A medida que aumenta la concentración del metal en el medio de crecimiento, se observa una disminución gradual de la expresión del gen *SPL3* (Figura R.1.12).

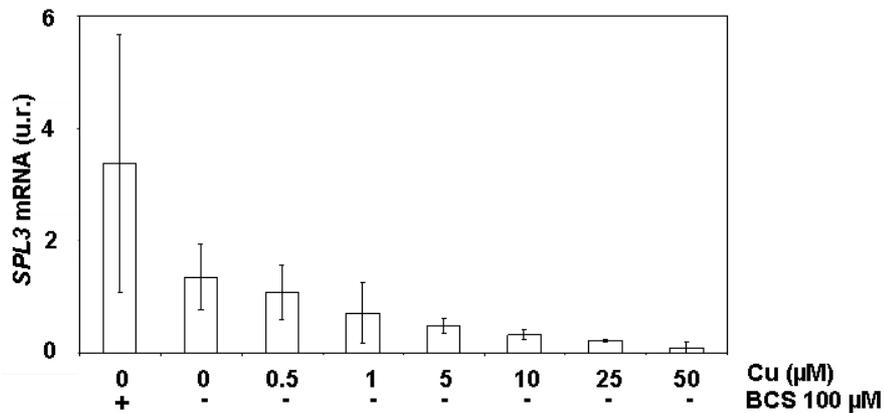


Figura R.1.12. Expresión del gen *SPL3* en diferentes concentraciones de Cu. Expresión relativa del gen *SPL3* en plántulas de 6 d WT cultivadas en medio $\frac{1}{2}$ MS en las concentraciones de Cu indicadas. El mRNA de cada gen se analiza por qPCR con cebadores específicos y se normaliza con la expresión del gen *UBQ10*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la condición de suficiencia de Cu (0.5 μ M). Las barras representan la media \pm DE de dos réplicas biológicas.

A continuación, tras observar la ligera inducción de la expresión relativa de *SPL3* en deficiencia de Cu, se analizó si su regulación depende del factor de transcripción *SPL7* (Figura R.1.13). Para ello, se cultivaron plántulas WT y *spl7* durante 7 d en deficiencia severa ($\frac{1}{2}$ MS + BCS 30 μ M) y exceso de Cu ($\frac{1}{2}$ MS con 5 μ M). La expresión de *FSD1* se usó como control de la respuesta a la deficiencia de Cu dependiente de *SPL7*. Como se observa en la Figura R.1.13, la expresión relativa de *SPL3* se induce ligeramente en deficiencia severa frente a exceso de Cu, y esta inducción es, al menos parcialmente, dependiente de *SPL7*. La presencia de elementos GTAC, de respuesta a deficiencia de Cu, en la región promotora de *SPL3* (resultados no mostrados) podría ser la causa de esta regulación parcial.

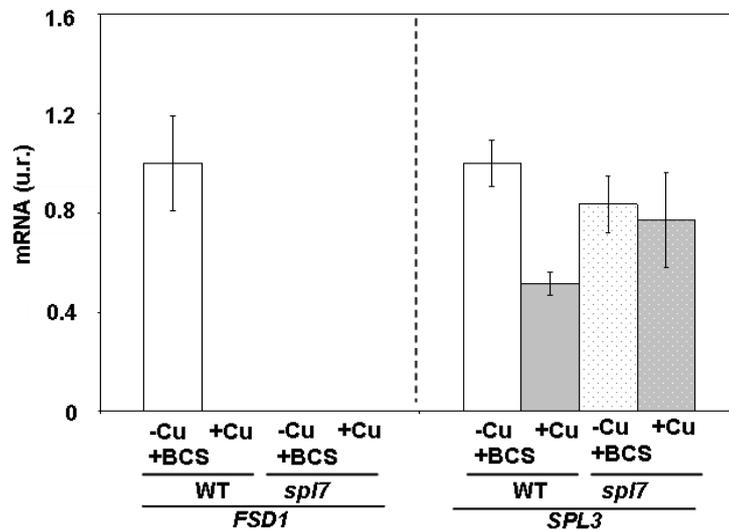


Figura R.1.13. Expresión del gen *SPL3* en plántulas WT y *spl7*. Expresión relativa de *FSD1* y *SPL3* en plántulas de 7 d WT (barras lisas) y *spl7* (barras punteadas) cultivadas en deficiencia severa de Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con BCS 30 μ M; -Cu+BCS, barras blancas) y en exceso de Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con 5 μ M de Cu; +Cu, barras grises). El mRNA de cada gen se analizó por qPCR con cebadores específicos y se normalizó con la expresión del gen *EF1*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a los de deficiencia de Cu en la planta WT. Las barras representan la media \pm DE de tres réplicas técnicas.

Dado que las plántulas $SPL3^{OE}$ tienen muy atenuada la respuesta a deficiencia de Cu, se evaluó si el crecimiento de estas plántulas se ve afectado por la escasez de Cu en el medio. Para ello, se cultivaron plántulas WT y $SPL3^{OE}$ durante 7 d en deficiencia, suficiencia y exceso de Cu y, como se muestra en la Figura R.1.14, no se observan diferencias en el crecimiento de las plántulas $SPL3^{OE}$ con respecto a las plántulas WT en suficiencia y exceso de Cu. Sin embargo, en deficiencia, tanto la longitud de los hipocotilos, como el grado de inclinación de los cotiledones respecto al eje (parámetro relacionado con el ritmo circadiano), están ligeramente afectados en las plántulas $SPL3^{OE}$.

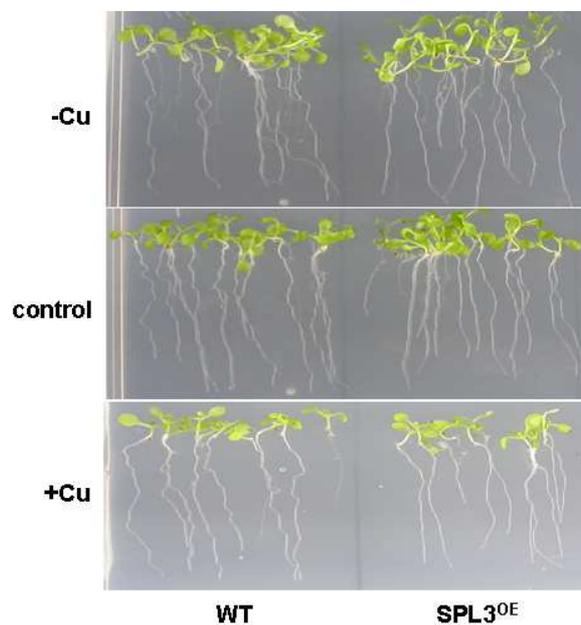


Figura R.1.14. Fenotipo de plantas $SPL3^{OE}$ en diferentes concentraciones de Cu. Plántulas WT y $SPL3^{OE}$ cultivadas durante 7 d en deficiencia de Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS comercial; -Cu), suficiencia de Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con $0.5 \mu\text{M}$ de Cu; control) y en exceso de Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con $10 \mu\text{M}$ de Cu; +Cu).

Con el objetivo de exacerbar las condiciones de deficiencia, se cultivaron plántulas WT y $SPL3^{OE}$ durante 18 d en deficiencia severa (medio

½ MS con 100 µM de BCS) y se compararon con las plántulas cultivadas en suficiencia de Cu (Figura R.1.15).

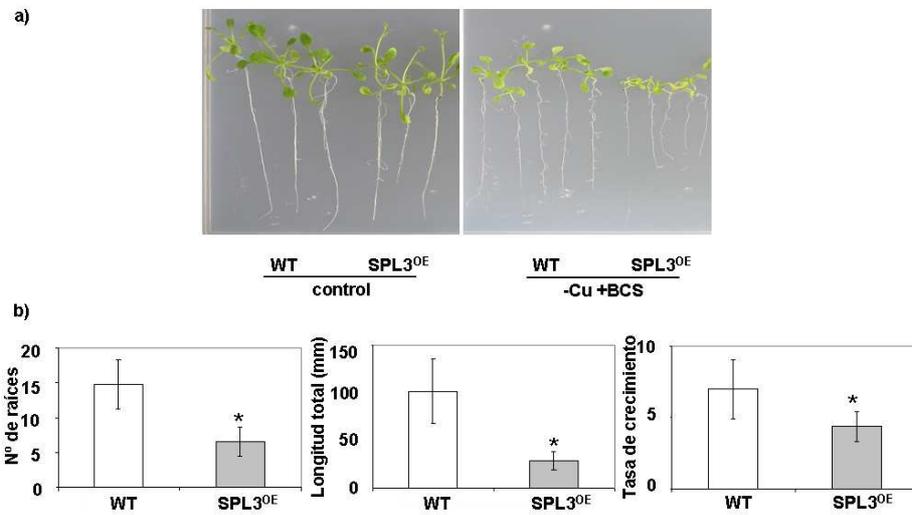


Figura R.1.15. Fenotipo de plántulas SPL3^{OE} en deficiencia severa de Cu. a) Plántulas WT y SPL3^{OE} cultivadas durante 18 d en suficiencia de Cu (medio ½ MS comercial con 0.5 µM de Cu; control) y deficiencia severa de Cu (medio ½ MS comercial con 100 µM de BCS; -Cu+BCS). b) Longitud de la raíz, número de raíces y tasa de crecimiento en plántulas SPL3^{OE}. Plántulas WT (barras blancas) y SPL3^{OE} (barras grises) cultivadas durante 18 d en deficiencia severa de Cu (medio ½ MS comercial con 100 µM de BCS). El número de raíces y su longitud se cuantifican con el software *Image J* y el cociente (longitud de la raíz/ nº de raíces). Las barras representan la media ± SD de tres réplicas biológicas. Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto al WT ($p < 0.05$).

La medida de la longitud de la raíz, número de raíces y la tasa de crecimiento nos sirven para cuantificar el fenotipo observado. Para todos estos parámetros, las plántulas SPL3^{OE} muestran valores menores que las WT (Figura R.1.15), lo que indica que son más sensibles que las plántulas WT a la deficiencia severa de Cu.

1.4. Regulación postranscripcional de la deficiencia de cobre

Como ya se ha indicado en la introducción, dentro de la familia de factores de transcripción SPL, los miembros de los subgrupos II y III, entre los que se encuentra *SPL3*, están regulados a nivel postranscripcional por los *miRNAs 156* y *157* (Rhoades et al., 2002; Xing et al., 2010). Con el objetivo de conocer si se produce la citada regulación postranscripcional de *SPL3* según el estatus nutricional de Cu, se utilizaron plantas transgénicas disponibles en el laboratorio del Dr. Peter Huijser, en las que los promotores de los diferentes *miR156* (*a*, *b*, *c*, *d* y *h*) y *miR157* (*a*, *b*, *c* y *d*) están fusionados al gen testigo de la β -glucuronidasa (GUS). Estos miRNAs funcionan como agentes reguladores del desarrollo floral, por lo que, en los trabajos publicados previamente, sólo se había estudiado su expresión en la parte aérea de las plantas (Xing et al., 2010). Para estudiar la posible función en la homeostasis del Cu, en primer lugar, se analizó la expresión de estos miRNAs en la raíz, tanto en plántulas como en plantas adultas (Tabla R.1.3 y Figura R.1.16). La actividad GUS dirigida por los promotores de los *miR156*, a excepción del *miR156a*, se detecta en raíces, tanto en plántulas de 14 d, como en plantas adultas (Tabla R.1.3.). Sin embargo, los *miR157* sólo presentan actividad en las raíces de plantas adultas (Tabla R.1.3.). Además, la actividad de los *miR156* en las raíces se observa en suficiencia de Cu (Figura R.1.16) y permanece en medios con concentraciones variables de Cu (deficiencia y exceso de Cu) (resultados no mostrados).

Tabla R.1.3. Resumen de la expresión de los *miRNAs 156* y *157* en raíces en diferentes estadios del crecimiento. Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de la actividad GUS en raíces de plántulas de 14 d crecidas en placa o plantas adultas en cultivo hidropónico.

	<i>miR156</i>					<i>miR157</i>			
	a	b	c	d	h	a	b	c	d
Plántula	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Planta	-	+	+	+	+	+	+	+	+

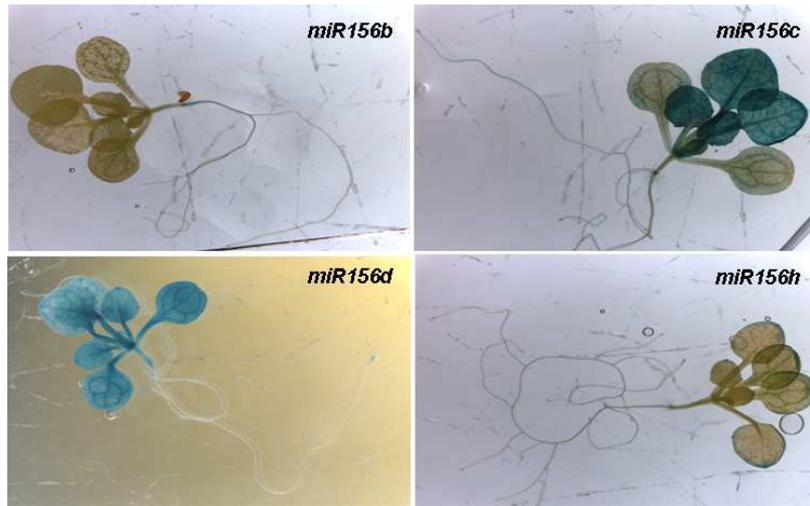


Figura R.1.16. Detección de la actividad GUS en plantas *PMIR156:GUS*. Tinción GUS durante toda la noche de plántulas *PMIR156:GUS* cultivadas durante 14 d en medio con suficiencia de Cu (medio ½ MS comercial con 0.5 μ M de Cu).

El análisis de 1000 pb de las regiones promotoras de los *pre-miR156* indica la presencia de posibles elementos reguladores *cis* de respuesta a deficiencia de Cu (cajas GTAC) en algunos de ellos (*a*, *c*, *d*, *e*, *f* y *g*). Por otro lado, los datos de las micromatrices mencionados previamente (deficiencia vs exceso de Cu) (Andrés-Colás et al., 2013) muestran que los *pre-miR156* (*b*, *d*, *e*, *f* y *h*) están ligeramente regulados por los niveles de Cu en el medio. Con el objetivo de corroborar si la expresión de los *miR156* está regulada por la presencia del metal en el medio, se analizaron por qPCR los niveles de los *miR156s* maduros (con cebadores específicos para las formas del *miR156 a-f*), ya que las formas maduras son las que actúan directamente sobre los mensajeros diana que se van a degradar. Para ello, se recogieron raíces de plántulas WT de 14 d cultivadas en diferentes concentraciones de Cu. El análisis de la expresión génica muestra que los niveles de transcritos de los *miR156* (*a-f*) se inducen, tanto en deficiencia como en exceso de Cu, con respecto a la condición control de suficiencia, siendo mayor la expresión en exceso de Cu (Figura R.1.17).

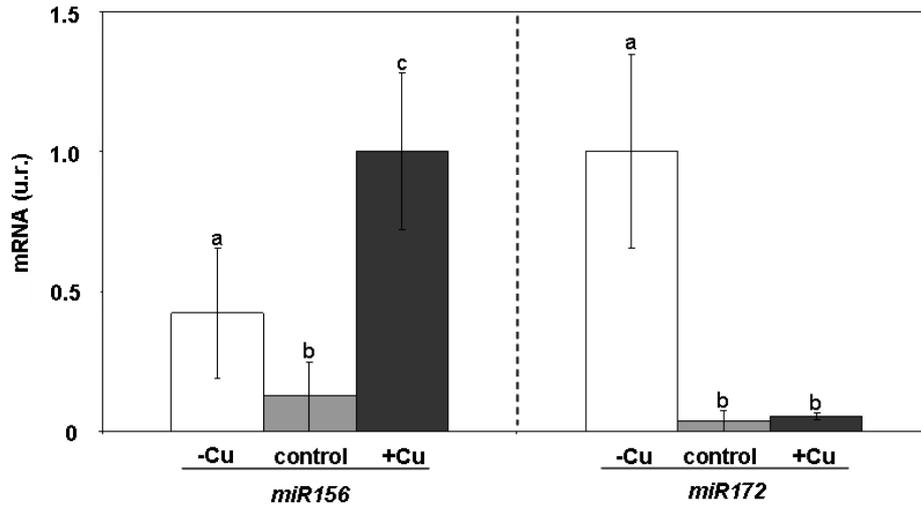


Figura R.1.17. Expresión de los *miRNAs* 156 y 172 en diferentes concentraciones de Cu. Expresiones relativas de los genes *miR156* y *miR172* en raíces de plántulas WT de 14 d cultivadas en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu, barras blancas), suficiencia de Cu (medio ½ MS comercial con 0.5 µM de Cu; control, barras grises) y en exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu; +Cu, barras negras). El mRNA de cada gen se analiza por qPCR con cebadores específicos y se normaliza con la expresión del gen *18S*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la condición de exceso y deficiencia, respectivamente. Las barras representan la media ± DE de cuatro réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.01$).

Además, se ha descrito que el *miR172* está regulado aguas abajo por el *miR156* (Wu et al., 2009; Huijser and Schmid, 2011), por lo que también se analizó la expresión de este miRNA. Como se muestra en la Figura R.1.17, la expresión del *miR172* es baja en exceso de Cu, probablemente como consecuencia de la inducción del *miR156*. Sin embargo, en condiciones de deficiencia de Cu, se observa simultáneamente la inducción del *miR172* y la del *miR156* con respecto al control (Figura R.1.17), lo que sugiere que en deficiencia de Cu tiene lugar una compleja regulación espacial entre los *miR172* y *miR156*, quedando todavía por determinar la acción que ambos ejercen sobre la expresión de *SPL3*.

2. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE ALTA AFINIDAD DE COBRE COPT2, EN DEFICIENCIA DE HIERRO

2.1. Efecto de las deficiencias de cobre y de hierro en la regulación de la expresión de *copt2*

El análisis *in silico* de unas 1000 pb de la región promotora previa al inicio transcripcional de *COPT2* revela la presencia de posibles elementos reguladores por deficiencia de Cu y de Fe. Esta región contiene cuatro motivos GTAC probablemente involucrados en la respuesta a la deficiencia de Cu (Kropat et al., 2005; Yamasaki et al., 2009) y un motivo E-box, que podría estar implicado en la respuesta a deficiencia de Fe (Colangelo and Guerinot, 2004; Hartmann et al., 2005). También es destacable la presencia de posibles motivos de regulación por la luz y el ritmo circadiano, que se describirán más adelante.

Con el objetivo de determinar la expresión relativa de *COPT2* en condiciones de deficiencias de Cu y de Fe por separado y en la doble deficiencia conjunta de Cu/Fe en el medio de crecimiento, se cultivaron plántulas WT de *Arabidopsis* en placas con los siguientes medios:

- a) suficiencia de Fe y suficiencia/ exceso de Cu (control)
- b) suficiencia de Fe y deficiencia de Cu (-Cu)
- c) deficiencia de Fe y suficiencia/ exceso de Cu (-Fe)
- d) deficiencias de ambos metales (-Fe -Cu)

En plántulas cultivadas en deficiencia de Cu se observa una inducción en la expresión relativa de *COPT2* (35.6 u.r.) con respecto a la condición control (Figura R.2.1). Esta inducción también se observa en plantas con deficiencia simultánea de Fe y Cu, siendo ésta todavía mayor (52.3 u.r.) a la observada en plantas cultivadas en deficiencia de Cu (Figura R.2.1 y Tabla

R.2.1). Por otro lado, al evaluar la expresión de *COPT2* en plántulas del mutante de pérdida de función *spl7* con respecto al WT, se observan niveles basales de mRNA en plántulas *spl7* en las condiciones de deficiencia de Cu (Figura R.2.1). Este hecho indica que la expresión relativa de *COPT2* depende parcialmente del factor transcripcional SPL7. Además, en la misma Figura se puede observar que las plantas WT y *spl7* presentan un nivel basal de la expresión de *COPT2* superior al del mutante *copt2-1*, cuando se cultivan en exceso de Cu.

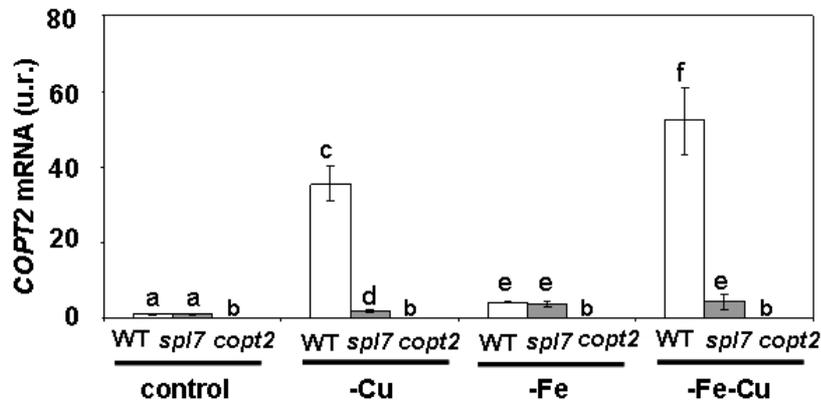


Figura R.2.1. Expresión de *COPT2* en deficiencia de Fe y de Cu en plántulas de *Arabidopsis*. Análisis de la expresión relativa de *COPT2* por qPCR en plántulas WT (barra blanca), *spl7* (barra gris) y *copt2-1* (barra gris oscuro) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄ y 300 µM de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y de Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu). La expresión del gen *UBQ10* se utiliza como control interno. Las barras son la media ± DE de tres réplicas biológicas. u.r.: unidades relativas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Con el objetivo de estudiar el patrón de expresión espacial de *COPT2*, la región promotora del gen se fusionó al gen testigo *GUS* (*PCOPT2:GUS*) y el transgén se introdujo en plantas WT de *Arabidopsis* (García-Molina, 2011). Las

plantas transformadas se cultivaron en condiciones de deficiencia de Cu durante 7 d, transcurridos los cuales, se procedió a la tinción GUS. La actividad del gen testigo se detecta prácticamente en toda la plántula y se encuentran niveles altos en las raíces en deficiencia de Cu, que aumentan cuando se aplican ambas deficiencias metálicas de Cu y de Fe conjuntamente (Figura R.2.2).

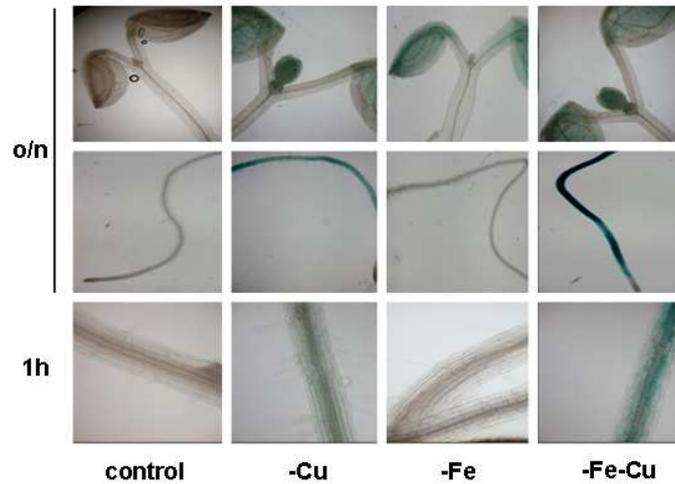


Figura R.2.2. Detección de la actividad β -glucuronidasa en plántulas *PCOPT2:GUS*. Plántulas cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS casero; control), deficiencia de Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio $\frac{1}{2}$ MS casero con 300 μ M de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS casero con 300 μ M de ferrozina; -Fe-Cu) a diferentes tiempos de incubación a 37°C + GUS (overnight; o/n y 1 h).

Con el fin de establecer en qué tejidos se inicia la expresión de *COPT2*, se tomaron fotografías de las plántulas *PCOPT2:GUS* tras incubarse tan sólo 1 h a 37 °C la reacción del ensayo GUS. En las condiciones de suficiencia de Cu (1 μ M) empleadas en este ensayo no se observa expresión de *COPT2* en raíces, ni en suficiencia, ni en deficiencia de Fe (Figura R.2.2). Curiosamente, se detecta un nivel basal de actividad GUS en cotiledones, cuando las plántulas se

incubaban durante toda la noche en condiciones de deficiencia de Fe y suficiencia de Cu (Figura R.2.2).

A continuación, se evaluó la respuesta del patrón espacial de expresión en deficiencia de Fe a diferentes concentraciones de Cu. Para ello, se cultivaron plántulas *PCOPT2:GUS* en un rango de concentraciones de Cu de 0 a 1 μM .

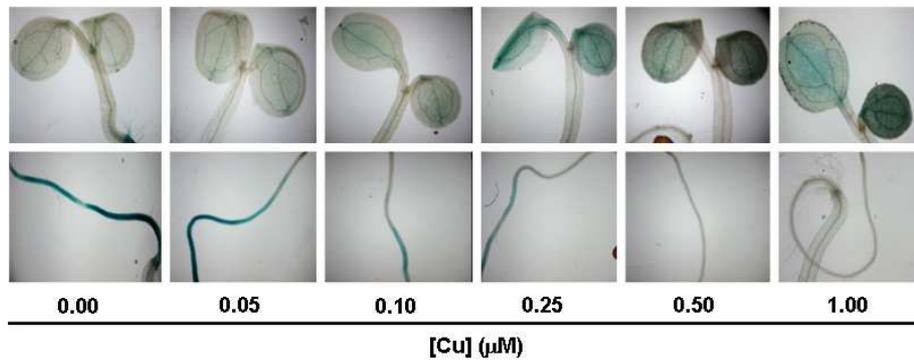


Figura R.2.3. Patrón de expresión de *COPT2* en plántulas *PCOPT2:GUS* con diferente contenido en Cu. Tinción β -glucuronidasa de plántulas *PCOPT2:GUS* de 7 d incubadas durante la noche a 37° C en deficiencia de Fe y a las concentraciones de Cu indicadas en el medio.

La expresión en deficiencia de Fe se observa únicamente cuando los niveles de Cu en el medio son inferiores a 0.25 μM (Figura R.2.3), lo que indica que la expresión de *COPT2* en raíces requiere condiciones de deficiencia de Cu.

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA MUTANTE *copt2-1* EN CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE COBRE Y HIERRO

Puesto que el patrón de expresión del gen *COPT2* es diferente en deficiencia de Cu, de Fe o en ambas deficiencias conjuntamente, se analizaron los posibles fenotipos del mutante *copt2-1* en dichas condiciones y se

compararon con la condición control (suficiencia de Fe y exceso de Cu). No se detecta ningún fenotipo apreciable en las plántulas del mutante *copt2-1* cultivadas en medio ½ MS con diferentes disponibilidades de Cu. Sin embargo, mientras que las plántulas WT en condiciones de deficiencia simultánea de Fe y Cu, muestran una ligera clorosis, las hojas de las plántulas *copt2-1* permanecen más tiempo verdes, lo que sugiere un leve incremento en la resistencia a la privación de Fe en ausencia de la función de COPT2 (Figura R.2.4).

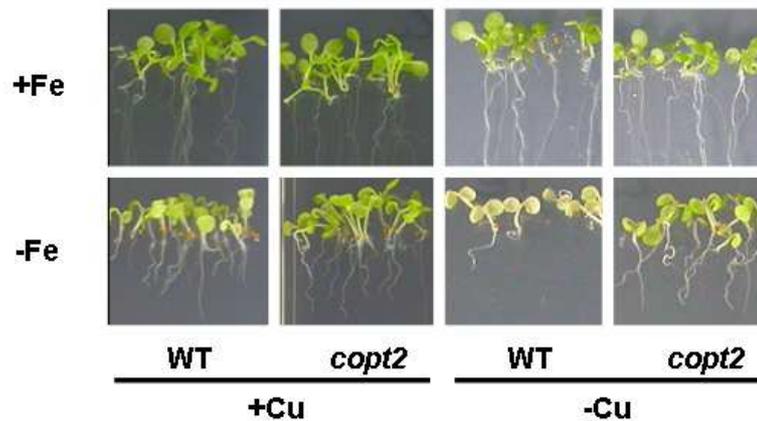


Figura R.2.4. Fenotipos de plántulas *copt2-1* cultivadas en deficiencia de Cu y de Fe. Fotografías de plántulas WT y *copt2-1* cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 μ M CuSO₄; +Fe+Cu), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; +Fe-Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 μ M CuSO₄ y 300 μ M de ferrozina; -Fe+Cu), o deficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero con 300 μ M de ferrozina; -Fe-Cu).

Con el fin de cuantificar el fenotipo observado en las plántulas del mutante *copt2-1*, se midió el contenido de clorofila total, el peso fresco y la expresión del gen *LHCBI.1*. Para ello, se cultivaron dichas plántulas durante 7 d, en las cuatro condiciones de Fe/Cu utilizadas en el ensayo anterior. Como se puede observar en la Figura R.2.5, la línea *copt2-1* presenta un contenido mayor de clorofila total en comparación con las plántulas WT en todas las

condiciones evaluadas, y esta diferencia se acentúa en condiciones de deficiencia de Fe.

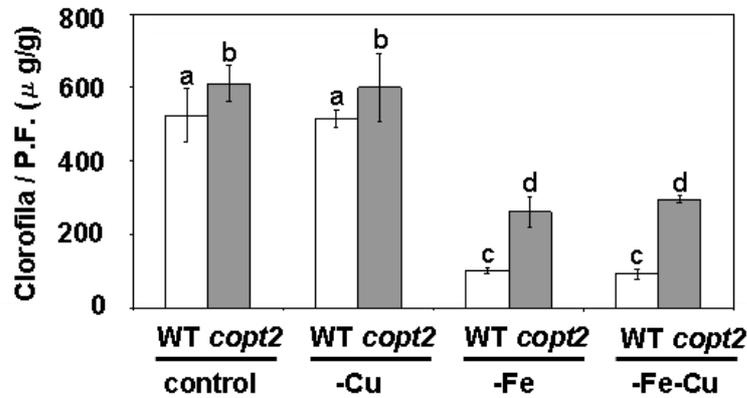


Figura R.2.5. Contenido en clorofila total de plántulas cultivadas en deficiencia de Fe. El contenido total de clorofila de plántulas WT (barras blancas) y *copt2-1* (barras grises) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄ y 300 µM de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Por otro lado, no se observan cambios significativos en el peso fresco de las plántulas *copt2-1* en deficiencia de Fe (Figura R.2.6a). Sin embargo, la expresión de *LHCB1.1* (*Light harvesting chlorophyll binding protein*), parámetro indicativo de la integridad del aparato fotosintético, aumenta en el mutante en deficiencia de Fe (Figura R.2.6b).

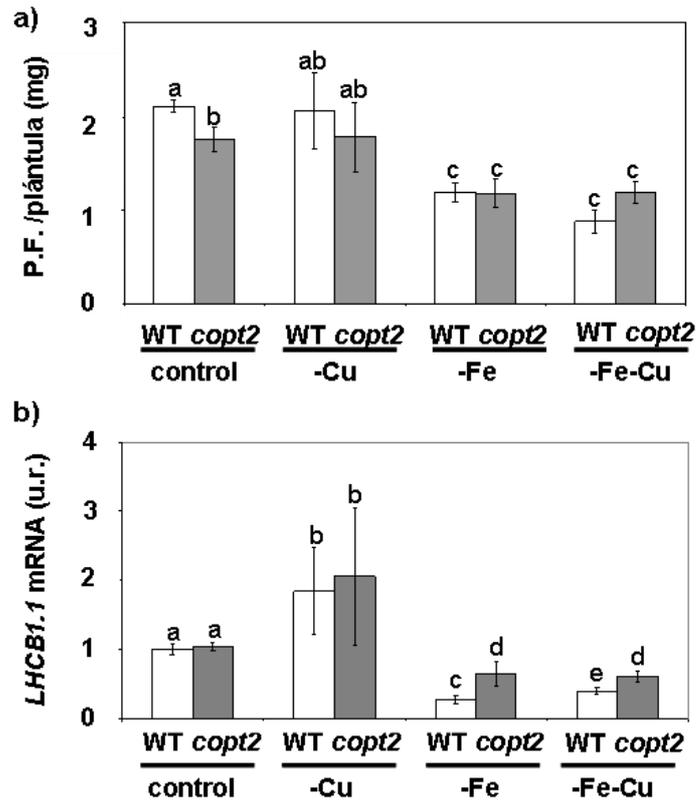


Figura R.2.6. Peso fresco y expresión de *LHCBI.1* en plántulas *copt2-1*. a) Peso fresco de plántulas WT (barra blanca) y *copt2-1* (barra gris) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 μ M CuSO₄; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 μ M CuSO₄ y 300 μ M de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero con 300 μ M de ferrozina; -Fe-Cu). Las barras son la media \pm DE de tres réplicas biológicas. b) Análisis de la expresión de *LHCBI.1* en plántulas WT (barras blancas) y *copt2-1* (barras grises) en las condiciones descritas en el Apartado a). La expresión del gen *UBQ10* se usa como control interno. Las barras son la media \pm DE de tres réplicas biológicas. u.r.: unidades relativas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para determinar si las diferencias observadas se deben a la ausencia de expresión de *COPT2*, obtuvimos la planta complementada, transformando la línea *copt2-1* con el gen *COPT2* silvestre, dirigido por su propio promotor (*PCOPT2:COPT2:GFP*). Las plántulas de *Arabidopsis PCOPT2:COPT2:GFP*, cultivadas en deficiencia de ambos metales, muestran una restauración parcial de la expresión de *COPT2*. De acuerdo con este hecho, se observa una recuperación de la sensibilidad a las deficiencias de metales en la línea complementada, como se aprecia en la medida del contenido de clorofila (Figura R.2.7a, b). Además, en esta línea también disminuye la expresión de *LHCBI.1* y *FSD1* en deficiencia simultánea de ambos metales, en comparación con la línea *copt2-1* (Figura R.2.7c).

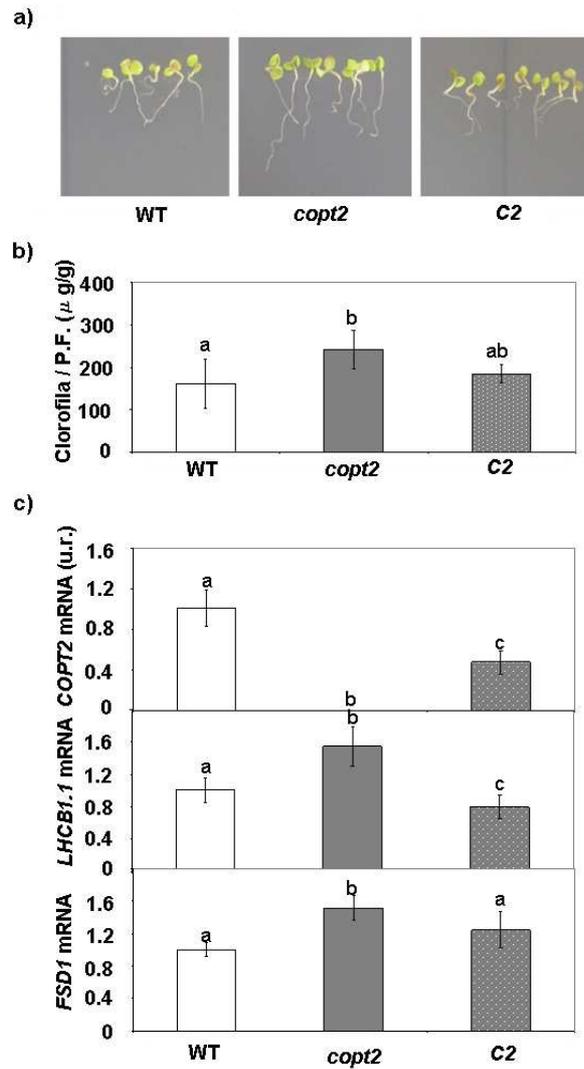


Figura R.2.7. Contenido en clorofila y expresión génica de plántulas *copt2-1* complementadas cultivadas en deficiencia de Cu y de Fe. a) Fotografías de plántulas WT, *copt2-1* y PCOPT2:COPT2:GFP (C2) cultivadas durante 7 d en deficiencia de Fe y de Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu). b) Contenido en clorofila en plántulas WT (barra blanca), *copt2-1* (barra gris) y C2 (barra punteada). Las barras son medias ± DE de cuatro replicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.01$). c) Análisis de la expresión de COPT2, LHCb1.1 y FSD1 por qPCR en plántulas WT (barra blanca), *copt2-1* (barra grises) y C2 (barra punteada) cultivadas como se describe en el Apartado a). La expresión del gen *UBQ10* se usa como control interno. Las barras son la media ± DE de tres réplicas biológicas. u.r.: unidades relativas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

También se midió el nivel de clorofila total y el peso fresco en plántulas del mutante *copt1*, obteniéndose resultados similares a los descritos para el mutante *copt2-1*, en condiciones de deficiencia de Fe y de Cu (Figura R.2.8a), lo que corrobora la participación de los transportadores *COPT* en este proceso (Figura R.2.8b).

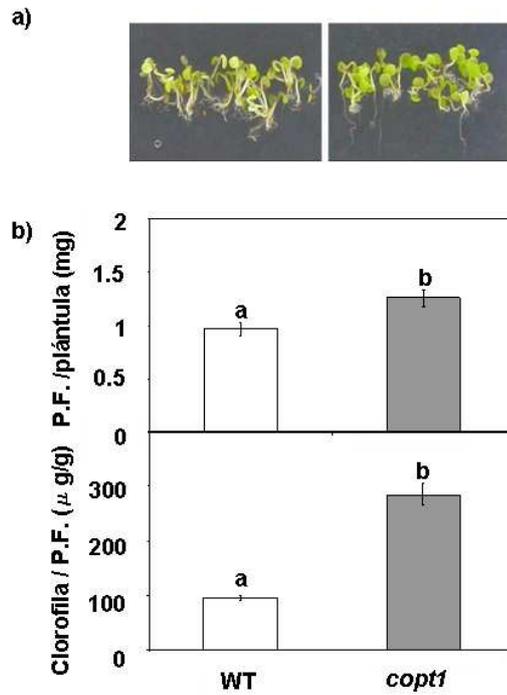


Figura R.2.8. Fenotipos de plántulas *copt1* cultivadas en deficiencia de Cu y de Fe. a) Fotografías de plántulas WT y *copt1* cultivadas durante 7 d en deficiencia de Cu y de Fe (medio ½ MS casero con 300 μ M de ferrozina; -Fe-Cu). b) Peso fresco y contenido en clorofila total de plántulas WT (barra blanca) y *copt1* (barra gris) cultivadas en las mismas condiciones que el Apartado a). Las barras son la media \pm DE de tres réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para evaluar si la mayor resistencia del mutante *copt2-1* a la clorosis férrica también ocurre en estadios ontogénicos posteriores, las plantas se

cultivaron en sistemas hidropónicos en las cuatro condiciones indicadas previamente (suficiencia de Fe y de Cu (condición control), suficiencia de Fe/deficiencia de Cu, deficiencia de Fe/suficiencia de Cu y deficiencia en ambos metales). En plantas cultivadas en el sistema hidropónico, en condiciones de doble deficiencia metálica, se observan síntomas de clorosis similares a los descritos en plantas cultivadas en placa en condiciones de doble deficiencia (Figura R.2.9). Una vez más, los síntomas de clorosis en la parte aérea son menos pronunciados o están retardados en las plantas *copt2-1* con respecto a las plantas WT (Figura R.2.9). Este retraso repercute en la producción de las semillas, ya que las plantas mutantes producen más semillas que las plantas WT, cuando son cultivadas en deficiencia de Fe y de Cu.

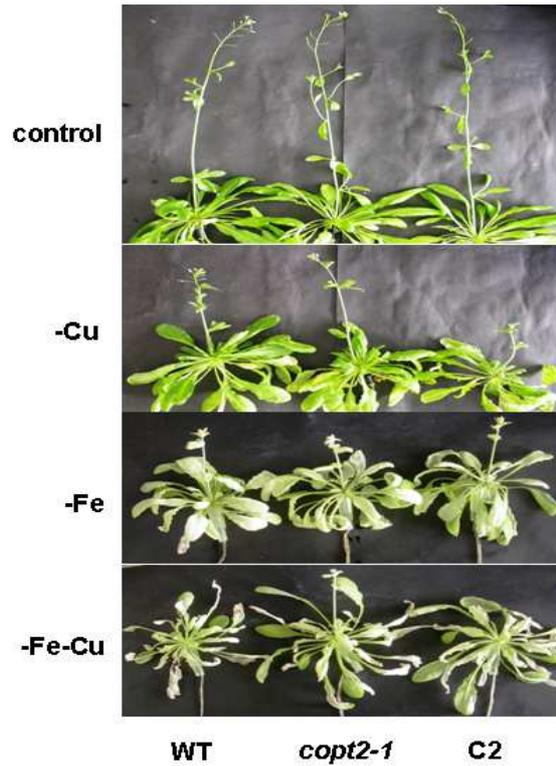


Figura R.2.9. Fenotipo de plantas *copt2-1* cultivadas en cultivo hidropónico. Plantas WT, *copt2-1* y *PCOPT2-1:COPT2-1* (C2) cultivadas en el sistema hidropónico con solución Hoagland (control), Hoagland sin Cu (-Cu), Hoagland sin Fe (-Fe) o Hoagland sin Fe y sin Cu (-Fe y -Cu).

Con el fin de determinar si el contenido endógeno de los metales en estas plantas es el responsable de los fenotipos observados en la línea *copt2-1*, se determinó el contenido de Fe y de Cu mediante ICP-MS en plántulas de *Arabidopsis* WT y *copt2-1* cultivadas durante 7 d en las cuatro condiciones de Fe/Cu descritas previamente. Respecto al Fe, se observa que, tanto en las plántulas WT como *copt2-1*, el contenido es menor cuando se cultivan en condiciones -Fe y -Fe-Cu. Sin embargo, no se observan diferencias en el contenido de Fe entre genotipos dentro de cada condición de cultivo evaluada (Figura R.2.10).

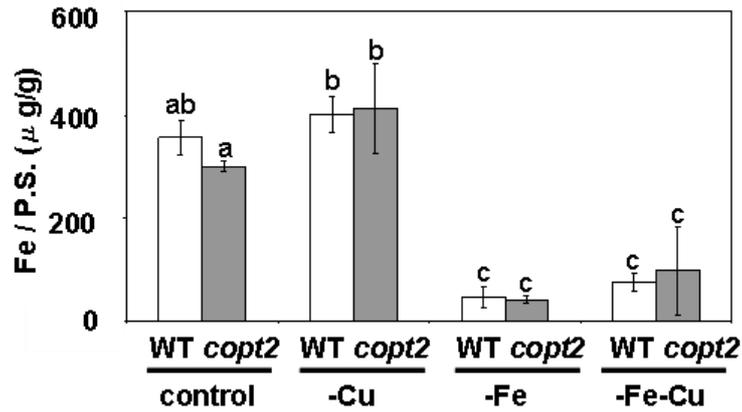


Figura R.2.10. Contenido endógeno de Fe en plántulas WT y *copt2-1*. Contenido en Fe medido por ICP-MS de plántulas WT (barra blanca) y *copt2-1* (barra gris) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 μM CuSO₄; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 μM CuSO₄ y 300 μM de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero con 300 μM de ferrozina; -Fe-Cu). Las barras son la media ± DE de tres réplicas biológicas. P.S: peso seco. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Por otra parte, respecto del contenido en Cu, se observa una marcada disminución en deficiencia de Cu. Sin embargo, a diferencia de lo descrito para el contenido de Fe, sí se observan diferencias en el contenido en Cu en función del genotipo. En concreto, se observa una ligera disminución en el mutante en las dos condiciones de exceso de Cu (Figura R.2.11), donde previamente se habían detectado niveles basales de expresión de *COPT2* (Figuras R.2.1 y R.2.2). Por otro lado, se observa un contenido significativamente mayor de Cu en las plantas WT cuando se compara la condición deficiente en Fe con la de suficiencia (+Fe+Cu; control).

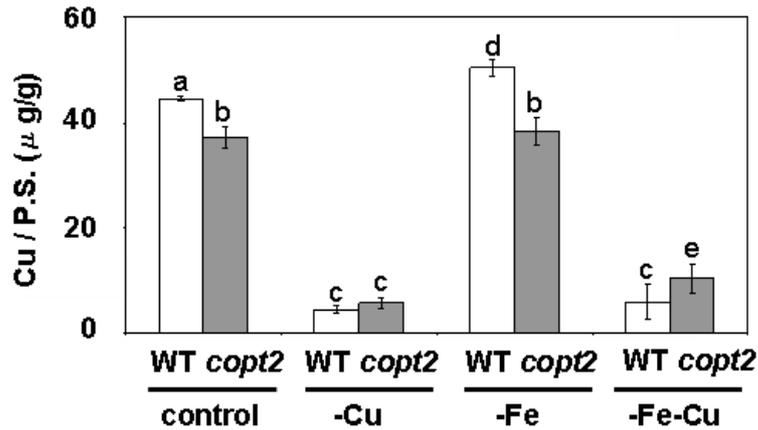


Figura R.2.11. Contenido endógeno de Cu en plántulas WT y *copt2-1*. Contenido en Cu medido por ICP-MS de plántulas WT (barra blanca) y *copt2-1* (barra gris) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄ y 300 µM de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu). Las barras son la media ± DE de tres réplicas biológicas. P.S., peso seco. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

2.3. Efectos de la deficiencia de hierro en la respuesta a la deficiencia de cobre

Para conocer las razones moleculares asociadas al fenotipo observado en las plántulas *copt2-1*, se determinaron mediante qPCR los niveles de mRNA de *COPT1* en plántulas WT y *copt2-1* cultivadas durante 7 d en las cuatro condiciones de contenido en Fe/Cu descritas anteriormente. Cuando las plántulas se cultivan en condiciones de deficiencia de Cu, se observa una inducción de la expresión de *COPT1*, en comparación con el control. Sin embargo, esta inducción es menor en plántulas *copt2-1* (Figura R.2.11). Por último, cabe destacar que al contrario que en deficiencia de Cu, la expresión de *COPT1* no se induce en la doble deficiencia de Fe y de Cu en las plántulas WT (Figura R.2.11).

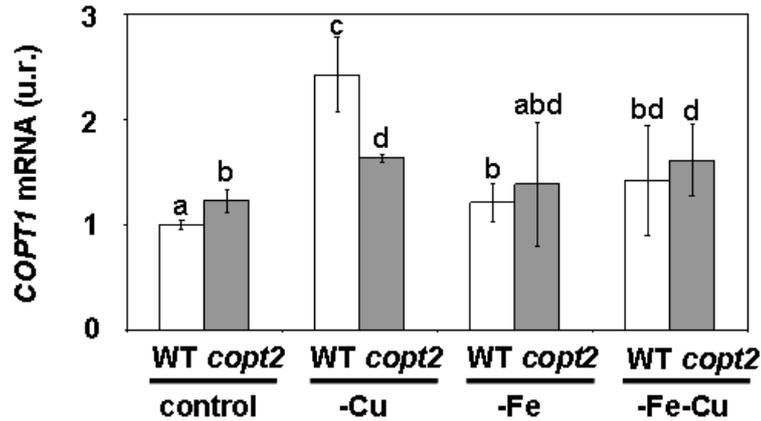


Figura R.2.12. Análisis de la expresión de *COPT1* en plántulas *copt2-1*. Expresión relativa de *COPT1* por qPCR en plántulas WT (barra blanca) y *copt2-1* (barra gris) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 μ M CuSO_4 ; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 μ M CuSO_4 y 300 μ M de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y de Cu (medio ½ MS casero con 300 μ M de ferrozina; -Fe-Cu). La expresión del gen *UBQ10* se usa como control interno. Las barras son la media \pm DE de tres réplicas biológicas. u.r.: unidades relativas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

A continuación, se determinaron los niveles de mRNA de dos genes regulados por deficiencia de Cu, *FSD1* y *CSD2*, que codifican respectivamente las SODs de Fe y de Cu/Zn (FeSOD y Cu/ZnSOD). Como muestra la Figura R.2.13, en suficiencia de Fe y exceso de Cu (control) se observa la expresión predominante de *CSD2*. Por el contrario, en condiciones de deficiencia de Cu (y suficiencia de Fe) se produce la sustitución de la expresión de *CSD2* por *FSD1*. Sin embargo, en plántulas de la línea *copt2-1*, en condiciones de doble deficiencia metálica, la expresión de *FSD1* se ve fuertemente comprometida (Figura R.2.13). Así mismo, la expresión de *CSD2* también está limitada en deficiencia de Fe. Por otra parte, se observa que la línea *copt2-1* muestra una expresión mayor de *FSD1* en deficiencia de Cu y Fe y también un incremento de la expresión de *CSD2* en deficiencia de Fe (Figura R.2.13).

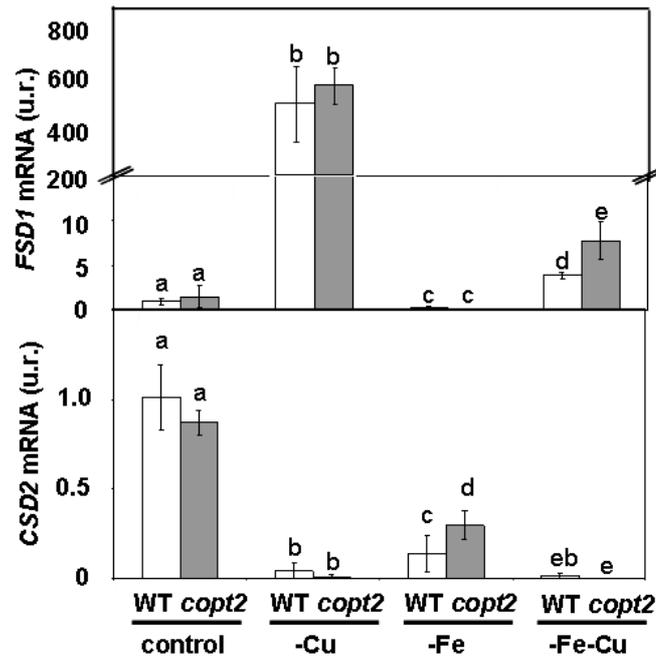


Figura R.2.13. Análisis de la expresión de *FSD1* y *CSD2* en plántulas *copt2-1*. Expresión relativa de *FSD1* y *CSD2* por qPCR en plántulas WT (barras blancas) y *copt2-1* (barras grises) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄ y 300 µM de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu). La expresión del gen *UBQ10* se usa como control interno. Las barras son la media ± DE de tres réplicas biológicas. u.r.: unidades relativas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El aumento observado en la expresión de las *SOD* en las plántulas *copt2-1* sugiere una mejora general en la protección frente al estrés oxidativo. Para comprobar esta posibilidad, se midieron las distintas actividades SOD, utilizando electroforesis en gel para la separación de las diferentes isoformas y detección *in situ* de las actividades. Estas medidas enzimáticas permiten corroborar el incremento de la FeSOD en condiciones de deficiencia de Cu y la falta de inducción ante la doble deficiencia metálica. Sin embargo, no se detectan diferencias significativas entre plántulas WT y *copt2-1* en ninguna de

las actividades SODs, en las condiciones estudiadas (Figura R.2.14), por lo que se descarta que los fenotipos descritos se deban a una mejor defensa antioxidante de tipo SOD en las plantas *copt2-1*.

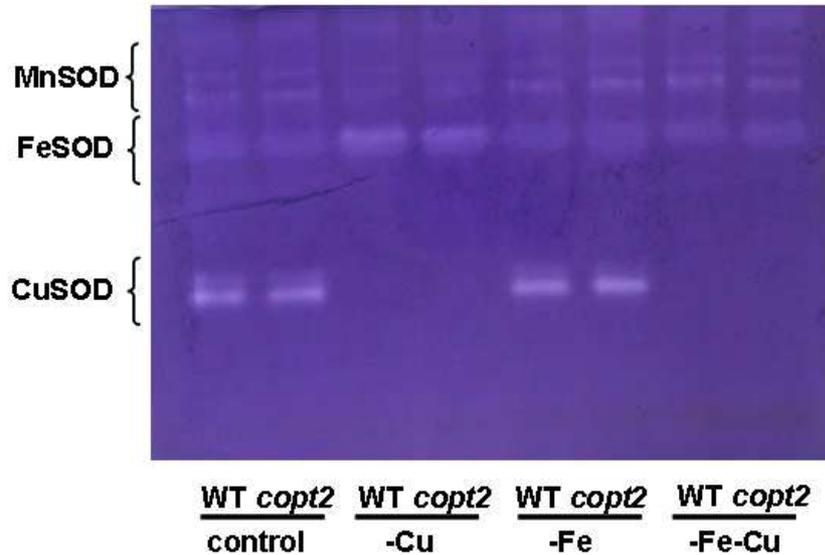


Figura R.2.14. Actividad SOD de plántulas *copt2-1* en diferentes niveles de Cu y de Fe. Actividad SOD de plántulas WT y *copt2-1* cultivadas durante 6 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 µM CuSO₄ y 300 µM de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y de Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu).

Además, para evaluar si la resistencia observada en las plántulas *copt2-1* se mantiene en otras condiciones de estrés oxidativo, se cultivaron plántulas WT y *copt2-1* en medio ½ MS comercial suplementado con peróxido de hidrógeno (500 µM) o paraquat (0.1 µM). En dichos medios no se observan diferencias fenotípicas entre los mutantes y los controles (Figura R.2.15), lo que indica que, en general, las plántulas de la línea *copt2-1* no son más resistentes al estrés oxidativo.

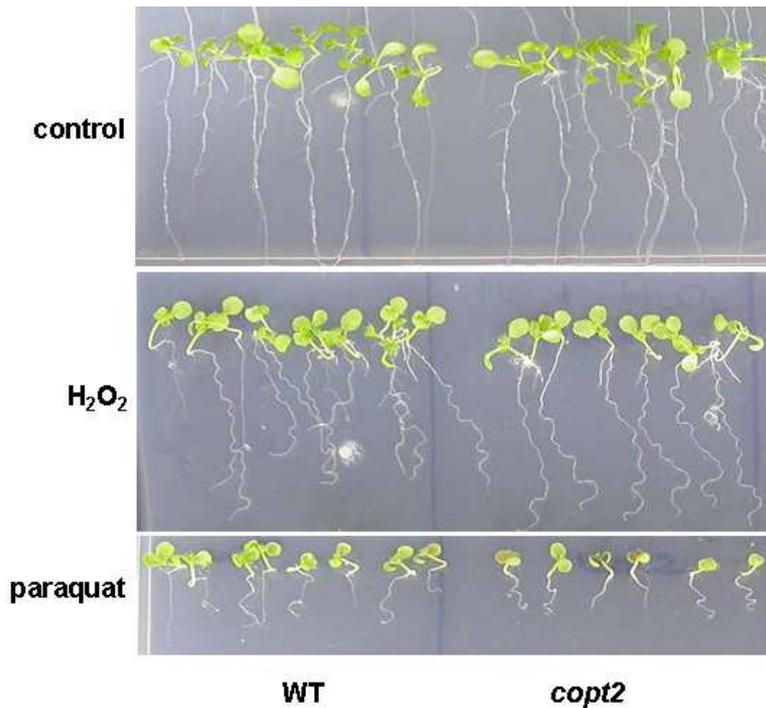


Figura R.2.15. Fenotipo de plántulas *copt2-1* en diferentes condiciones de estrés oxidativo. Fenotipo de plántulas *copt2-1* cultivadas durante 14 d en medio control (½ MS) y el mismo medio ½ MS con 500 µM de H₂O₂ o 0.1µM de paraquat.

Puesto que la deficiencia de Fe atenúa las respuestas a la deficiencia de Cu, al menos en lo que respecta a la regulación de la expresión de los genes *COPT1* y *FSD1* (Figuras R.2.12 y R.2.13), se analizó la expresión de dos genes marcadores de deficiencia de Fe, la metalorreductasa *FRO2* y el transportador de Fe *IRT1*, en las cuatro condiciones de Fe/Cu descritas previamente.

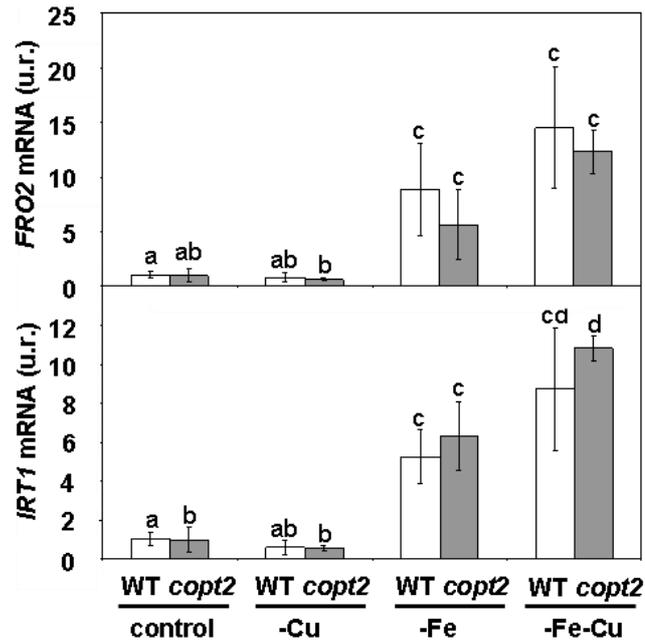


Figura R.2.16. Análisis de la expresión de *FRO2* e *IRT1* en plántulas *copt2-1*. Expresión de *FRO2* e *IRT1* por qPCR en plántulas WT (barra blanca) y *copt2-1* (barra gris) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y exceso de Cu (medio ½ MS casero con 10 μ M CuSO_4 ; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 10 μ M CuSO_4 y 300 μ M de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero con 300 μ M de ferrozina; -Fe-Cu). La expresión del gen *UBQ10* se usa como control interno. Las barras son la media \pm DE de tres réplicas biológicas. u.r.: unidades relativas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Aunque como cabe esperar ambos genes se inducen en respuesta a la deficiencia de Fe (Figura R.2.16), no se observan diferencias de expresión de *FRO2* y de *IRT1* entre plántulas *copt2-1* y WT en ninguna de las condiciones evaluadas (Figura R.2.16). Estos resultados nos permiten concluir que, mientras que la deficiencia de Fe atenúa al menos algunas de las respuestas moleculares al ayuno de Cu, la deficiencia de Cu no afecta significativamente a las respuestas al ayuno de Fe y que estas respuestas tampoco están alteradas en el mutante *copt2-1*.

2.4. Análisis global de los cambios de expresión génica en las plantas *copt2-1*

Con el objetivo de caracterizar a nivel molecular las causas de la mayor resistencia a la doble deficiencia metálica que presenta el mutante, se compararon los cambios globales de expresión génica en plántulas WT y *copt2-1* cultivadas 7 d en suficiencia de Fe y de Cu (medio ½ MS suplementado con Fe 50 µM y Cu 1 µM) frente a las mismas plántulas cultivadas en medios deficientes en Fe y en Cu (medio ½ MS sin adición de Fe y Cu, suplementado con 300 µM de ferrozina). Como control de los cambios de expresión en la línea *copt2-1* debidos sólo a la deficiencia de Cu, se cultivaron las plántulas WT y *copt2-1* en medio deficiente en Fe (medio ½ MS sin adición de Fe y suplementado con ferrozina 300 µM).

Previamente a la hibridación de las micromatrices, y para validar las condiciones de crecimiento, se analizó por qPCR el patrón de expresión de dos genes marcadores de la deficiencia de Cu, *COPT2* (Figuras R.2.1 y R.2.17) y la proteína del tipo ZRT/IRT, *ZIP2* (Figura R.2.17). Los resultados corroboran el patrón de expresión esperable para *COPT2* y *ZIP2* en plántulas WT y *copt2-1* en las condiciones citadas previamente (Figura R.2.17). La expresión de *COPT2* y de *ZIP2* está regulada en ambos casos por la doble deficiencia de Fe y de Cu.

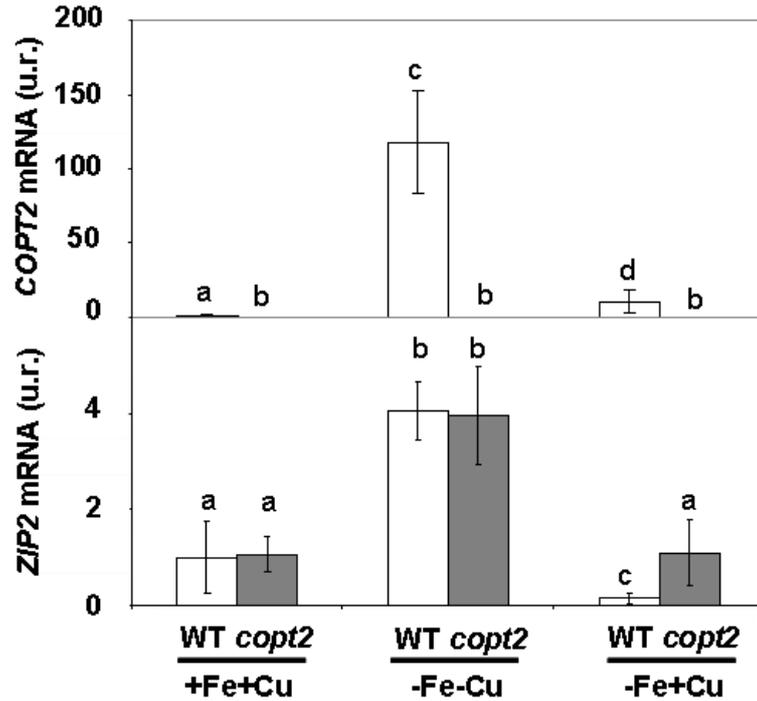


Figura R.2.17. Análisis de la expresión de *COPT2* y *ZIP2* en plántulas *copt2-1*. Expresión de *COPT2* y *ZIP2* por qPCR en plántulas WT (barra blanca) y *copt2-1* (barra gris) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero; control), deficiencia de Cu (medio ½ MS casero; -Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu). La expresión del gen *UBQ10* se usa como control interno. Las barras son la media ± DE de tres réplicas biológicas. u.r.: unidades relativas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Del análisis global de la expresión génica, se identificaron un total de 324 genes diferencialmente expresados (valor \log_2 ratio de $\geq |1|$) en las plántulas *copt2-1* (Tablas R.A1 y R.A2), distribuidos en 49 genes inducidos (ratio ≥ 1) y 275 genes reprimidos (ratio ≥ -1) para las tres condiciones de crecimiento testadas (Figura R.2.18). El número de genes reprimidos es mayor que el número de genes inducidos en las tres condiciones. La condición de deficiencia en Fe muestra el mayor número de genes cuya expresión está afectada.

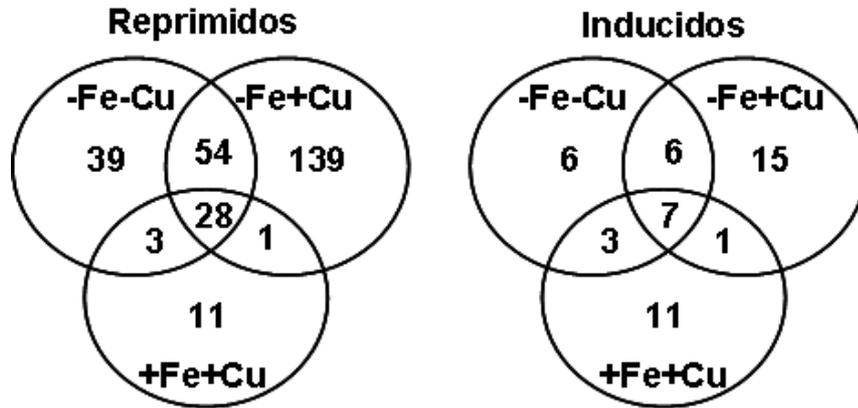


Figura R.2.18. Diagramas de Venn para genes inducidos y reprimidos en plántulas *copt2-1*. Plántulas WT y *copt2-1* cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y de Cu (medio ½ MS casero; +Fe+Cu), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe+Cu), o deficiencia de Fe y de Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu). Los valores corresponden al número de inducidos o reprimidos en las plántulas *copt2-1* en las tres condiciones de Fe y de Cu testadas.

El análisis de la ontología génica llevado a cabo con el programa *GeneCodis2.0* indica que, entre los genes reprimidos en las plántulas *copt2-1*, tienen una mayor preponderancia las categorías de estrés abiótico y los procesos de desintoxicación. Curiosamente, un porcentaje significativo (35 %) de los genes inducidos en la línea *copt2-1* están relacionados con las respuestas al ayuno de fosfato inorgánico (Pi) (Tabla R.2.1).

Tabla R.2.1. Preponderancia de la categoría funcional de ayuno de fosfato en plántulas *copt2-1*. Genes relacionados con el ayuno de fosfato inducidos en la línea *copt2-1* en comparación con la línea WT (Thibaud et al., 2010)(*otras fuentes). Código MIPS, descripción del gen, función celular y valores de las micromatrices en condiciones control (+Fe+Cu), doble deficiencia (-Fe-Cu) y deficiencia de Fe (-Fe+Cu). Los genes cuya expresión ha sido validada por qPCR están resaltados en negrita, los genes con valor $<|1|$, pero cuyos valores de expresión diferencial son estadísticamente significativos, están resaltados en gris y los de valores que no son estadísticamente significativos se indican como n.s.

Código	Gen	Función celular	+Fe +Cu	-Fe -Cu	-Fe +Cu
At2g32960*	PFA-DSP2	catalytic activity, phosphatase activity	2.524	2.873	2.652
At2g04460	unknown	Unknown	2.205	2.495	2.300
At5g03545*	At4	Unknown	1.383	1.986	1.855
At5g20150	SPX1	Unknown	1.145	1.309	1.477
At1g73010	PPsPase1	phosphoric monoester hydrolase activity	1.073	1.222	1.165
At2g11810	MGD3	1,2-diacylglycerol 3-beta-galactosyltransferase activity	1.306	1.052	0.738
At5g20790	unknown	Unknown	0.865	1.811	1.515
At3g09922*	IPS1	Unknown	0.614	1.354	1.469
At1g73220	OCT1	carbohydrate and cRNAitine transporter activity	2.067	0.782	0.733
At3g03530*	NPC4	hydrolase and phospholipase C activity	1.112	0.489	0.607
At1g17710	unknown	phosphoric monoester hydrolase activity	1.448	1.289	n.s.
At1g08310	unknown	galactolipid biosynthetic process, negative regulation of transcription, DNA-dependent	1.000	1.441	n.s.
At4g26530*	unknown	fructose-bisphosphate aldolase activity	1.123	0.219	n.s.
At2g45130	SPX3	Unknown	2.069	n.s.	n.s.
At2g30540	unknown	thiol-disulfide exchange intermediate activity	1.039	n.s.	n.s.
At4g11800*	unknown	protein serine/threonine phosphatase activity	n.s.	1.129	n.s.
At1g21980*	PIP5K1	1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activity	n.s.	n.s.	1.111

La preponderancia de esta categoría en todas las condiciones nutricionales estudiadas indica un efecto general de la función de COPT2 en el ayuno de Pi (Tabla R.2.1). Para corroborar este hecho, se analizó por qPCR la expresión de dos genes marcadores de ayuno de Pi, *AT4* y *SPX1*, en plántulas WT y *copt2-1* de 7 d (Figura R.2.19). Efectivamente, en las plántulas *copt2-1* se observa la inducción de ambos genes en todas las condiciones nutricionales estudiadas (Figura R.2.19).

Estos datos ponen de relieve las complejas interacciones entre las deficiencias de Cu, de Fe y de Pi. Las condiciones con mayor capacidad de inducción de la respuesta al ayuno de Pi en la línea *copt2-1* difieren para los genes *AT4* y *SPX1*. En el caso de la expresión relativa de *AT4*, la mayor inducción se produce en suficiencia de Fe y de Cu (control), pero la expresión más alta de *SPX1* se produce en deficiencia de Fe (Figura R.2.19).

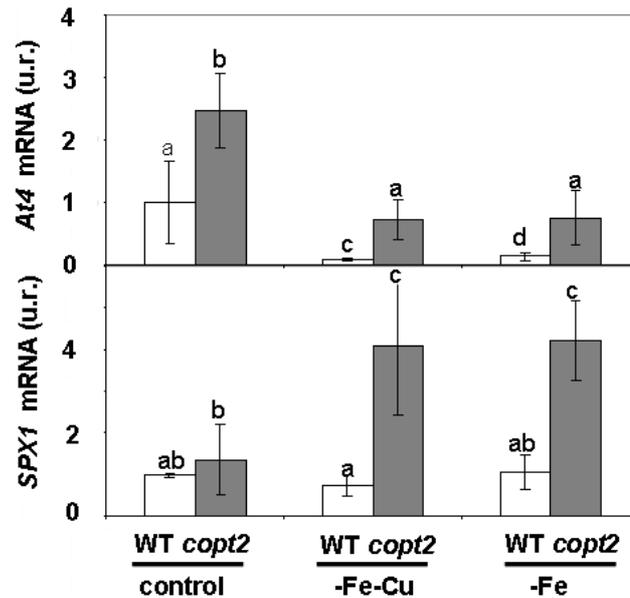


Figura R.2.19. Análisis de la expresión de *AT4* y *SPX1* en plántulas *copt2-1*. Expresión de *AT4* y *SPX1* por qPCR en plántulas WT (barras blancas) y *copt2-1* (barras grises) cultivadas durante 7 d en suficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero; control), deficiencia de Fe (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe), o deficiencia de Fe y de Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu). La expresión del gen *UBQ10* se usa como control interno. Las barras son la media ± DE de tres réplicas biológicas. u.r.: unidades relativas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Además, mientras que la expresión de *AT4* se regula por deficiencia de Fe, la expresión de *SPX1* en las plántulas WT no se altera en ninguna de las

condiciones estudiadas (Figura R.2.19). Para comprobar la implicación del Cu en el ayuno de Pi, se cultivaron plántulas WT y *copt2-1* durante 7 d en medios deficientes en Pi y en diferentes regímenes de Fe y de Cu (Figura R.2.20a).

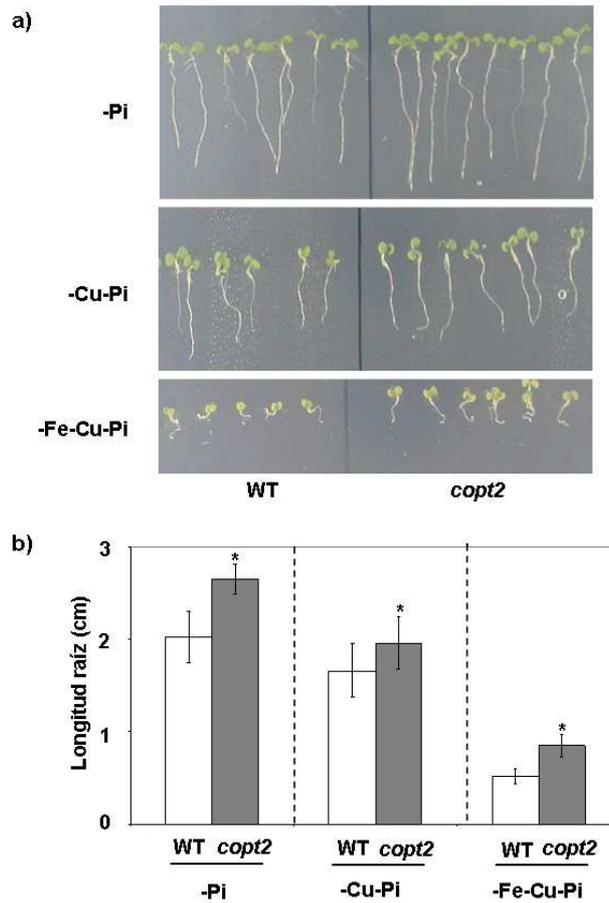


Figura R.2.20. Fenotipo de plántulas *copt2-1* en ayuno de Pi. a) Plántulas WT y *copt2-1* se cultivaron durante 7 d en deficiencia de Pi y suficiencia de Fe y de Cu (medio ½ MS casero; -Pi), deficiencia de Pi y de Cu y suficiencia de Fe (medio ½ MS casero; -Cu-Pi), y deficiencia de Pi, de Cu y de Fe (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Cu-Pi). b) La longitud de la raíz se midió de las plántulas WT (barra blanca) y *copt2-1* (barra gris) descritas en el apartado a). Las barras son la media ± DE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos sobre las barras representan diferencias significativas entre las plántulas *copt2-1* comparando al WT (p < 0.05).

Como se muestra en la Figura R.2.20b, la longitud de las raíces de las plántulas *copt2-1* es mayor que la de las WT para todas las condiciones de crecimiento estudiadas, lo que indica que las plántulas *copt2-1* son menos sensibles al ayuno de Pi.

Por último, se evaluó el patrón espacial de la expresión de *COPT2* en plántulas *PCOPT2:GUS* en deficiencia de Pi (Figura R.2.21).



Figura R.2.21. Actividad GUS de plántulas *copt2-1* en ayuno de Pi. Tinción GUS en plántulas *PCOPT2:GUS* cultivadas durante 7 d en deficiencia de Pi y suficiencia de Fe y Cu (medio ½ MS casero; -Pi), deficiencia de Pi y de Cu y suficiencia de Fe (medio ½ MS casero; -Cu-Pi), y deficiencia de Pi y de Fe y suficiencia de Cu (medio ½ MS casero con 300 µM de ferrozina; -Fe-Pi).

A diferencia de lo que ocurre en deficiencia conjunta de Cu y de Fe, la tinción GUS permanece invariable con la concentración de Pi. Únicamente en deficiencia de Cu se observa actividad GUS en la raíz en ayuno de Pi (Figura R.2.21). Estos resultados ponen de manifiesto la relación antagónica entre la deficiencia de micronutrientes, como el Fe y el Cu, y macronutrientes como el Pi.

Tabla R.A1. Genes reprimidos en plántulas *copt2-1*. Se indican el código MIPS, el valor \log_2 ratio de $\geq |1|$ de las micromatrices en condiciones -Fe-Cu, -Fe+Cu y +Fe+Cu, anotación génica y nombre del gen.

Código MIPS	Ratio	Anotación génica	Nombre gen
	-Fe-Cu/-Fe+Cu/+Fe+Cu		
At3g27660	-4.138 /-3.601 /-3.304	Oleosin4	<i>OLE4</i>
At5g44120	-4.075 /-3.664 /-3.971	CRUCIFERINA; nutrient reservoir	<i>ATCRA1</i>
At1g47540	-3.852 /-3.317 /-3.705	Trypsin inhibitor, putative	
At4g26740	-3.843 /-3.831 /-3.495	ARABIDOPSIS SEED GENE 1; calcium ion binding	<i>ATPXG1</i>
At1g03880	-3.692 /-3.124 /-3.313	CRUCIFERIN 2; nutrient reservoir	<i>CRB</i>
At3g01570	-3.617 /-3.287 /-2.932	Glycine-rich protein / oleosin	
At4g28520	-3.341 /-3.211 /-3.334	Cruciferin 3	<i>CRC</i>
At1g73190	-3.289 /-3.434 /-2.110	α -TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN; water channel	<i>ALPHA-TIP</i>
At3g22640	-3.281 /-3.244 /-1.997	Cupin family protein	<i>PAP85</i>
At5g07190	-3.172 /-2.864 /-2.722	Arabidopsis thaliana seed gene 3	<i>ATS3</i>
At1g65090	-3.003 /-2.906 /-1.642	Similar to AT5G36100.1	
At5g51210	-2.871 /-3.257 /-1.427	Oleosin3	<i>OLEO3</i>
At2g28490	-2.825 /-2.553 /-2.414	Cupin family protein	
At2g15010	-2.611 /-3.492 /-3.600	Thionin, putative	
At5g50700	-2.568 /-3.459 /-2.502	Short-chain dehydrogenase/reductase family protein	<i>HSD1</i>
At4g27170	-2.492 /-2.629 /-3.923	2S seed storage protein 4 / NWMU2-2S albumin 4	<i>AT2S4</i>
At5g40420	-2.484 /-2.534 /-1.284	Oleosin 2	<i>OLE2</i>
At4g25140	-2.461 /-2.158 /-1.829	Oleosin1	<i>OLE1</i>
At2g34700	-2.360 /-2.723 /-1.970	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	
At4g27160	-2.326 /-3.060 /-2.065	2S seed storage protein 3 / NWMU2-2S albumin 3	<i>AT2S3</i>
At3g63040	-2.291 /-2.831 /-1.408	Unknown protein	
At1g54860	-2.096 /-2.431 /-1.575	Similar to AT5G19250.1	
At4g27140	-2.061 /-2.410 /-3.025	2S seed storage protein 1 / NWMU1-2S albumin 1	<i>AT2S1</i>
At1g53480	-2.058 /-2.204 /-1.558	Similar to AT5G03090.1	<i>ATMRD1</i>
At2g02120	-1.933 /-1.945 /-1.418	LMW cysteine-rich 70; protease inhibitor	<i>LCR70</i>
At5g03090	-1.626 /-2.173 /-1.629	Similar to AT1G53480.1	
At4g27240	-1.490 /-1.276 /-1.421	Zinc finger (C2H2 type) family protein	
At5g44170	-1.414 /-1.127 /-1.461	Similar to AT1G08125.1	
	-Fe-Cu/ -Fe+Cu		
At4g16160	-3.272 / -2.595	Protein translocase	<i>ATOEP16-2</i>
At3g46900	-3.264 / -1.762	Copper transporter 2	<i>COPT2</i>
At5g07500	-3.139 / -3.032	Nucleic acid binding / transcription factor	<i>PEI1</i>
At3g12203	-3.031 / -3.556	Serine carboxypeptidase-like 17	<i>scpl17</i>
At4g34520	-2.836 / -3.262	FATTY ACID ELONGATION1; acyltransferase	<i>FAE1</i>
At1g05510	-2.638 / -2.488	Similar to AT2G31985.1	
At5g49190	-2.447 / -2.897	SUCROSE SYNTHASE 2; UDP-glycosyltransferase	<i>ATSUS2</i>
At2g23640	-2.347 / -2.932	Reticulon family protein	<i>RTNLB13</i>
At3g54940	-2.325 / -3.242	Cysteine proteinase, putative	
At1g48130	-2.244 / -2.984	Arabidopsis thaliana 1-cysteine peroxiredoxin 1	<i>ATPER1</i>
At1g04560	-2.036 / -2.449	AWPM-19-like membrane family protein	
At1g61800	-1.944 / -1.226	Glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2	<i>ATGPT2</i>
At4g37290	-1.82 / -1.922	Similar to AT2G23270.1	

At3g56350	-1.754 / -2.134	Superoxide dismutase (Mn), putative	
At3g49620	-1.712 / -1.242	DARK INDUCIBLE 11; oxidoreductase	<i>DIN11</i>
At2g21490	-1.698 / -1.912	Dehydrin family protein	<i>LEA</i>
At1g06135	-1.673 / -1.583	Similar to AT2G31345.1	
At5g62800	-1.541 / -1.671	Seven in absentia (SINA) family protein	
At1g15520	-1.517 / -1.475	Pleiotropic drug resistance 12)	<i>ABCG40</i>
At3g01830	-1.503 / -1.670	Calmodulin-related protein, putative	
At2g23270	-1.442 / -1.607	Similar to AT4G37290.1	
At1g03106	-1.388 / -2.420	Unknown protein	
At5g27420	-1.367 / -1.451	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	<i>ATL31</i>
At1g62290	-1.306 / -1.170	Pepsin A	
At2g07725	-1.266 / -1.695	Mitochondrial ribosomal protein L5	
At4g35180	-1.261 / -1.802	LYS/HIS TRANSPORTER 7; amino acid permease	<i>LHT7</i>
At1g79680	-1.260 / -1.559	Wall-associated kinase, putative	<i>ATWAKL10</i>
At2g07741	-1.250 / -1.488	Atpase subunit 6	
At1g69930	-1.243 / -1.811	Glutathione S-transferase (class tau) 11	<i>ATGSTU11</i>
At2g07698	-1.218 / -1.499	Atpase subunit 1	
At2g29470	-1.216 / -1.089	Glutathione s-transferase 21	<i>ATGSTU3</i>
At5g52760	-1.199 / -1.922	Heavy-metal-associated domain-containing protein	
At5g05300	-1.198 / -1.423	Unknown protein	
At5g13080	-1.164 / -1.373	WRKY DNA-binding protein 75; transcription factor	<i>ATWRKY75</i>
At1g19530	-1.149 / -1.064	Unknown protein	
At4g39675	-1.127 / -1.445	Unknown protein	
At5g57510	-1.118 / -1.220	Similar to Os08g0448100	
At2g07707	-1.115 / -1.125	Subunit 8 mitochondrial F(O) ATP synthase complex.	
At1g57630	-1.096 / -1.656	Disease resistance protein (TIR class), putative	
At3g46660	-1.075 / -1.916	UDP-glucosyl transferase family protein	<i>UGT76E12</i>
At5g01300	-1.060 / -1.234	Phosphatidylethanolamine-binding family protein	
At5g10210	-1.056 / -1.018	Similar to TAIR:AT5G65030.1	
At1g03890	-1.052 / -1.357	Cupin family protein	
At1g26390	-1.046 / -1.951	FAD-binding domain-containing protein	
At5g55150	-1.043 / -1.486	F-box family protein	
At5g27200	-1.040 / -1.518	Acyl carrier protein 5	<i>ACP5</i>
At1g74870	-1.036 / -1.715	Protein binding / zinc ion binding	
At1g12805	-1.027 / -1.481	Nucleotide binding	
At1g26380	-1.025 / -1.593	FAD-binding domain-containing protein	
At4g39670	-1.018 / -1.516	Similar to AT2G34690.1	
At1g32350	-1.014 / -1.929	Alternative oxidase 1d	<i>AOX1D</i>
At5g42900	-1.012 / -1.928	Similar to AT4G33980.1	<i>COR27</i>
At2g25770	-1.010 / -1.330	Similar to AT4G32870.1	
At1g04660	-1.002 / -1.230	Glycine-rich protein	
	-Fe-Cu/ +Fe+Cu		
At1g73600	-1.427 / -1.753	Phosphoethanolamine N-methyltransferase 3 (NMT3)	
At4g31830	-1.383 / -1.198	Similar to [Medicago truncatula] (GB:ABE93904.1)	
At4g12490	-1.042 / -1.703	Lipid transfer protein (LTP) family protein	
	-Fe+Cu/ +Fe+Cu		
At2g16060	-1.167 / -1.003	ARABIDOPSIS HEMOGLOBIN 1	<i>AHB1</i>
	-Fe-Cu		
At5g36010	-2.405	Similar to AT3G52410.1	
At4g05136	-1.937	Similar to AT3G52410.1	
At5g45690	-1.884	Similar to AT4G18920.1	

At3g52410	-1.611	Similar to AT5G36010.1	
At4g22870	-1.532	Leucoanthocyanidin dioxygenase	
At2g07696	-1.489	Mitochondrial ribosomal protein 7	
At2g07981	-1.488	Similar to TAIR:AT2G08986.1	
At5g42800	-1.437	Dihydroflavonol 4-reductase;	<i>DFR</i>
At3g28010	-1.394	Similar to AT5G38037.1	
At4g21920	-1.330	Similar to AT3G20340.1	
At3g30720	-1.313	Unknown protein	<i>QQS</i>
At2g12905	-1.266	Similar to ORF54b [Pinus thunber (GB:NP_042462.1)]	
At2g07671	-1.258	H ⁺ -transporting two-sector atpase,	
At5g54060	-1.244	Udp-glucose:flavonoid 3-o-glucosyltransferase	<i>UF3GT</i>
At5g43570	-1.236	Serine protease inhibitor	
At4g37570	-1.234	Similar to AT3G52410.1	
At5g67080	-1.162	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19	<i>MAPKKK19</i>
At4g37295	-1.148	Unknown protein	
At2g18050	-1.142	HISTONE H1-3; DNA binding	<i>HIS1-3</i>
At5g11280	-1.134	Similar to AT1G80200.1	
At1g62710	-1.131	Vacuolar processing enzyme beta	<i>BETA-VPE</i>
At2g42540	-1.115	Cold-regulated 15a	<i>COR15</i>
At3g52180	-1.112	Tyrosine/serine/threonine phosphatase	<i>ATPTPKIS1</i>
At5g03210	-1.102	Unknown protein	
At5g19890	-1.101	Peroxidase, putative	
At2g07739	-1.099	Mitochondrial protein atmg00370 (ORF199)	
At4g21020	-1.095	Late embryogenesis abundant domain- containing protein	
At3g51810	-1.079	Early methionine labelled	<i>AT3</i>
At2g07777	-1.067	Identical to Mitochondrial protein atmg01090 (ORF262)	
At1g69880	-1.044	Thioredoxin H-type 8	<i>ATH8</i>
At3g21720	-1.043	Isocitrate lyase, putative	<i>ICL</i>
At4g22880	-1.033	Ldox (tannin deficient seed 4)	<i>ANS</i>
At5g17220	-1.022	Glutathione s-transferase 26	<i>ATGSTF12</i>
At5g50800	-1.021	Nodulin mtn3 family protein	<i>ATSWEET13</i>
At5g63350	-1.021	Similar to AT3G48510.1	
At4g27460	-1.020	CBS domain-containing protein	
At5g44420	-1.020	LMW cysteine-rich 77	<i>LCR77</i>
At5g28030	-1.017	Cysteine synthase, / O-acetylserine (thiol)-lyase, putative	<i>DES1</i>
At5g64790	-1.004	Glycosyl hydrolase family 17 protein	
<hr/>			
	-Fe+Cu		
At2g36750	-2.191	UDP-glucosyl transferase 72C1	<i>UGT73C1</i>
At2g36790	-1.977	UDP-glucosyl transferase 73C6	<i>UGT73C6</i>
At3g49580	-1.968	Similar to AT3G49570.1	<i>LSU1</i>
At2g44460	-1.899	Glycosyl hydrolase family 1 protein	<i>BGLU28</i>
At3g28740	-1.891	-	<i>CYP81D1</i>
At3g60140	-1.697	Din2 (dark inducible 2)	<i>BGLU30</i>
At1g09500	-1.687	Cinnamyl-alcohol dehydrogenase	
At3g26830	-1.671	PHYTOALEXIN DEFICIENT 3); oxygen binding	<i>CYP71B15</i>
At3g21080	-1.648	ABC transporter-related	
At2g36770	-1.629	UDP-glucosyl transferase family protein	
At2g26560	-1.554	PHOSPHOLIPASE A 2 ^a ; nutrient reservoir	<i>PLA IIA</i>
At2g36780	-1.552	UDP-glucosyl transferase family protein	
At1g17810	-1.473	Beta-tonoplast intrinsic protein	<i>BETA-TIP</i>
At5g48850	-1.471	Male sterility MS5 family protein	<i>ATSDI1</i>
At3g29970	-1.450	Germination protein-related	
At2g45570	-1.440	Cytochrome P450, oxygen binding	<i>CYP76C2</i>

At1g48470	-1.429	Glutamine synthetase 1;5	<i>GLN1;5</i>
At5g37490	-1.424	U-box domain-containing protein	
At3g47340	-1.414	Dark inducible 6	<i>ASNI</i>
At3g46080	-1.411	Zinc finger (C2H2 type) family protein	
At2g40340	-1.410	AP2 domain-containing transcription factor, putative	<i>ATERF48</i>
At1g26400	-1.407	FAD-binding domain-containing protein	
At3g63380	-1.393	Ca(2+)-atpase, putative (ACA12)	
At2g36800	-1.377	Don-glucosyltransferase	<i>DOGT1</i>
At4g04490	-1.358	Protein kinase family protein	<i>CRK36</i>
At1g10585	-1.358	Transcription factor	
At1g71520	-1.350	AP2 domain-containing transcription factor, putative	
At5g57220	-1.348	Cytochrome P450, oxygen binding	<i>CYP81F2</i>
At1g05680	-1.343	UDP-glucosyl transferase family protein	<i>UGT74E2</i>
At5g17030	-1.327	UDP-glucosyl transferase family protein	<i>UGT78D3</i>
At2g33710	-1.313	AP2 domain-containing transcription factor	
At1g26410	-1.311	FAD-binding domain-containing protein	
At1g07160	-1.289	Protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative	
At2g30770	-1.287	Cytochrome P450, oxygen binding	<i>CYP71A13</i>
At4g22710	-1.283	Cytochrome P450, oxygen binding	<i>CYP706A2</i>
At4g37370	-1.279	Cytochrome P450, oxygen binding	<i>CYP81D8</i>
At4g21990	-1.278	Aps reductase 3	<i>APR3</i>
At1g65970	-1.272	Ubiquitin-protein ligase 4	<i>TPX2</i>
At2g41100	-1.270	Tch3 (touch 3)	<i>ATCAL4</i>
At5g41750	-1.269	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	
At1g16420	-1.262	Latex-abundant protein, putative/ caspase family protein	<i>ATMC8</i>
At4g08555	-1.259	Unknown protein	
At5g22140	-1.250	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	
At4g15760	-1.247	Monoxygenase, putative	<i>MO1</i>
At4g23700	-1.245	Cation/h ⁺ exchanger 17	<i>ATCHX17</i>
At2g34870	-1.242	Maternal effect embryo arrest 26	<i>MEE26</i>
At2g04040	-1.235	Antiporter/ multidrug efflux pump	<i>ATDTX1</i>
At1g26420	-1.235	FAD-binding domain-containing protein	
At1g43160	-1.229	Related to AP2 6; DNA binding / transcription factor	<i>RAP2.6</i>
At2g35980	-1.228	Yellow-leaf-specific gene 9	<i>ATNHL10</i>
At3g46090	-1.225	Transcription factor/ zinc ion binding	<i>ZAT7</i>
At5g56870	-1.224	Beta-galactosidase, putative / lactase, putative	<i>BGAL4</i>
At5g16980	-1.206	NADP-dependent oxidoreductase, putative	
At5g01540	-1.205	Lectin protein kinase, putative	<i>LECRKA4.1</i>
At5g63160	-1.199	BTB and TAZ domain protein 1; protein binding	<i>BT1</i>
At2g17850	-1.196	Similar to AT5G66170.2	
At1g49640	-1.192	Similar to AT1G49650.1	
At2g18680	-1.192	Similar to AT2G18690.1	
At2g15480	-1.191	UDP-glucosyl transferase 73B5	<i>UGT73B5</i>
At1g59950	-1.190	Aldo/keto reductase, putative	
At1g19020	-1.189	Similar to AT3G48180.1	
At4g16680	-1.183	RNA helicase, putative	
At1g69920	-1.178	Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase	<i>ATGSTU12</i>
At1g13340	-1.173	Similar to AT4G35730.1	
At2g33830	-1.171	Dormancy/auxin associated family protein	
At2g25890	-1.170	Glycine-rich protein / oleosin	
At5g17000	-1.168	NADP-dependent oxidoreductase, putative	
At5g18290	-1.166	Small and basic intrinsic protein1b	<i>SIP1;2</i>
At3g44190	-1.166	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	

At2g22880	-1.166	VQ motif-containing protein	
At1g75280	-1.161	Isoflavone reductase, putative	
At2g07734	-1.158	Ribosomal protein S4 (RPS4)	
At3g09520	-1.157	Exocyst subunit EXO70 family protein H4	<i>ATEXO70H4</i>
At2g16130	-1.153	Mannitol transporter, putative	<i>ATPMT2</i>
At2g29720	-1.152	Monoxygenase	<i>CTF2B</i>
At1g72520	-1.145	Lipoxygenase, putative	<i>ATLOX4</i>
At4g01870	-1.144	Tolb protein-related	
At2g30750	-1.142	Cytochrome P450, oxygen binding	<i>CYP71A12</i>
At4g28460	-1.142	Unknown protein	
At1g68765	-1.140	Inflorescence deficient in abscission	<i>IDA</i>
At3g49570	-1.138	Similar to AT5G24660.1	<i>LSU3</i>
At1g33030	-1.137	O-methyltransferase family 2 protein	
At5g36980	-1.137	Similar to AT4G02400.1	
At3g02850	-1.135	Immediate-early fungal elicitor family protein	<i>SKOR</i>
At1g28480	-1.135	Glutaredoxin family protein	<i>GRX480</i>
At1g08630	-1.134	Threonine aldolase 1	<i>THA1</i>
At5g44180	-1.132	Homeobox transcription factor, putative	
At5g49690	-1.131	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase	
At5g51830	-1.124	Pfk-type carbohydrate kinase family protein	
At5g64200	-1.124	Similar to AT2G40390.1	<i>AT-SC35</i>
At2g15490	-1.124	UDP-glycosyltransferase	<i>UGT73B4</i>
At4g25200	-1.124	Mitochondrion-localized small heat shock protein 23.6	<i>HSP23.6-MITO</i>
At5g59510	-1.120	Rotundifolia like 5	<i>DVL18</i>
At2g34500	-1.120	Cytochrome P450, oxygen binding	<i>CYP710A1</i>
At5g01550	-1.119	Lectin protein kinase, putative	<i>LECRKA4.2</i>
At1g66600	-1.116	WRKY DNA-binding protein 63; transcription factor	<i>ABO3</i>
At5g04340	-1.111	transcription factor/ zinc ion binding	<i>C2H2</i>
At5g39580	-1.107	Peroxidase	
At5g20230	-1.106	ARABIDOPSIS BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN	<i>ATBCB</i>
At5g22530	-1.090	Similar to AT5G22520.1	
At1g67980	-1.089	Caffeoyl-coa 3-O-methyltransferase	<i>CCOAMT</i>
At2g18190	-1.088	AAA-type atpase family protein	
At3g60420	-1.088	Similar to AT3G60450.1	
At1g64900	-1.087	CYTOCHROME P450 89A2; oxygen binding	<i>CYP89</i>
At3g56710	-1.087	SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 1; binding	<i>SIB1</i>
At4g34135	-1.086	UDP-glycosyltransferase	<i>UGT73B2</i>
At5g24110	-1.086	WRKY DNA-binding protein 30; transcription factor	<i>ATWRKY30</i>
At2g29490	-1.079	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 19	<i>ATGSTU1</i>
At5g03240	-1.073	POLYUBIQUITIN 3; protein binding	<i>UBQ3</i>
At1g74360	-1.072	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	
At1g75270	-1.071	Glutathione dehydrogenase (ascorbate)	<i>DHAR2</i>
At1g05560	-1.070	UDP-glucosyl transferase 75B1	<i>UGT1</i>
At5g16970	-1.069	Alkenal reductase	<i>AER</i>
At2g20145	-1.068	Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein	
At1g22400	-1.067	UDP-glucosyl transferase 85A1	<i>ATUGT85A1</i>
At3g23550	-1.060	MATE efflux family protein	
At3g09020	-1.060	Alpha 1,4-glycosyltransferase family protein	
At1g23730	-1.054	Carbonic anhydrase, putative	<i>ATBCA3</i>
At3g15450	-1.054	Similar to AT4G27450.1	
At3g15356	-1.053	Legume lectin family protein	
At1g76650	-1.051	Calcium-binding EF hand family protein	<i>CML38</i>
At3g01970	-1.044	WRKY DNA-binding protein 45; transcription	<i>ATWRKY45</i>

		factor	
At2g40200	-1.043	Basic helix-loop-helix (bhlh) family protein	
At5g36925	-1.043	Similar to AT5G36920.1	
At4g21680	-1.039	Proton-dependent oligopeptide transport (POT)	<i>NRT1.8</i>
At4g11890	-1.036	Protein kinase family protein	
At5g39050	-1.034	Transferase family protein	
At1g56060	-1.034	Similar to AT2G32190.1	
At5g62480	-1.033	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 9	<i>ATGSTU9</i>
At4g20830	-1.030	FAD-binding domain-containing protein	
At4g25980	-1.028	Cationic peroxidase, putative	
At2g40180	-1.026	Protein phosphatase 2C, putative	<i>ATHPP2C5</i>
At2g35730	-1.024	Heavy-metal-associated domain-containing protein	
At5g04330	-1.019	Cytochrome P450, putative	
At5g22520	-1.017	Similar to AT5G22530.1	
At3g30775	-1.016	PROLINE OXIDASE	<i>AT-POX</i>
At2g30140	-1.009	UDP-glucosyl transferase family protein	
At5g03490	-1.007	UDP-glucosyl transferase family protein	
	+Fe+Cu		
At4g27150	-3.773	2S seed storage protein 2	<i>AT2S2</i>
At5g54740	-3.196	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	<i>SESA5</i>
At4g15210	-1.683	Beta-amylase	<i>AT-BETA-AMY</i>
At1g43800	-1.463	Acyl-(acyl-carrier-protein) desaturase, putative	
At4g34810	-1.358	Auxin-responsive family protein	
At4g12480	-1.352	Pearli 1; lipid binding	<i>EARLII</i>
At2g43140	-1.231	DNA binding / transcription factor	
At4g12500	-1.187	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	
At5g54790	-1.165	Similar to AT1G50930.1	
At2g43620	-1.126	Chitinase, putative	
At4g10280	-1.043	Wound-responsive family protein	

Tabla R.A2. Genes inducidos en plántulas *copt2-1*. Se indican el código MIPS, el valor \log_2 ratio de $\geq |1|$ de las micromatrices en condiciones -Fe-Cu, -Fe+Cu y +Fe+Cu, anotación génica y nombre del gen.

Código MIPS	Ratio	Anotación génica	Nombre gen
-Fe-Cu/ Fe+Cu/Fe+Cu			
At3g46880	3.114 / 3.112 / 1.730	Similar to AT5G59080.1	
At2g32960	2.873 / 2.652 / 2.524	Tyrosine specific protein phosphatase family protein	<i>ATPFA-DSP2</i>
At2g04460	2.495 / 2.300 / 2.205	Similar to AT2G10090.1	
At5g03545	1.986 / 1.855 / 1.383	Unknown protein	<i>AT4</i>
At5g03710	1.688 / 1.689 / 1.433	Similar to AT4G08710.1	
At5g20150	1.309 / 1.477 / 1.145	(SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein	<i>ATSPX1</i>
At1g73010	1.222 / 1.165 / 1.073	Phosphoric monoester hydrolase	<i>ATPPase1</i>
-Fe-Cu/ -Fe+Cu			
At3g14210	1.814 / 1.700	EPITHIOSPECIFIER MODIFIER 1; carboxylic ester hydrolase	<i>ESM1</i>
At5g20790	1.811 / 1.515	Similar to TAIR:AT3G43110.1	
At5g35480	1.458 / 1.828	Unknown protein	
At3g09922	1.354 / 1.469		<i>ATIPS1</i>
At3g15540	1.018 / 1.248	Indoleacetic acid-induced protein 19; transcription factor	<i>IAA19</i>
At4g32280	1.013 / 1.153	Indoleacetic acid-induced protein 29; transcription factor	<i>IAA29</i>
-Fe-Cu/ +Fe+Cu			
At1g08310	1.441 / 1.000	Esterase/lipase/thioesterase family protein	
At1g17710	1.289 / 1.448	Similar to AT1G73010.1	
At2g11810	1.052 / 1.306	Monogalactosyldiacylglycerol synthase type C	<i>ATMGD3</i>
-Fe+Cu/ +Fe+Cu			
At5g59310	1.335 / 1.247	LIPID TRANSFER PROTEIN 4; lipid binding	<i>LTP4</i>
-Fe-Cu			
At3g55240	1.304	Similar to AT3G28990.1	
At1g74150	1.177	Similar to AT1G18610.1	
At4g11800	1.129	Calcineurin-like phosphoesterase family protein	
At5g07770	1.093	Formin homology 2 domain-containing protein	
At5g44260	1.042	Zinc finger (CCCH-type) family protein	
At3g12900	1.009	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	
-Fe+Cu			
At1g58480	2.132	GDSL-motif lipase, putative	
At2g14610	2.025	Pathogenesis-related gene 1	<i>ATPR1</i>
At2g25625	1.478	Similar to Os05g0575000	
At1g59406	1.446	Carboxylic ester hydrolase/ lipase	
At5g59520	1.445	Zinc transporter 2 precursor	<i>ZIP2</i>
At4g14400	1.333	ACCELERATED CELL DEATH 6; protein binding	<i>ACD6</i>
At5g35490	1.129	Unknown protein	<i>ATMRU1</i>
At1g21980	1.111	1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 1	<i>ATPIP5K1</i>
At2g18570	1.076	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	
At1g15050	1.075	Indoleacetic acid-induced protein 34; transcription factor	<i>IAA34</i>
At5g48000	1.067	Cytochrome P450, family 708, subfamily A, polypeptide 2	<i>CYP708 A2</i>
At2g22810	1.027	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 4	<i>ACC4</i>
At2g10940	1.019	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	

		(LTP) family protein	
At5g02540	1.013	Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	
At5g61940	1.007	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related	
+Fe+Cu			
At2g45130	2.069	SYG1/Pho81/XPR1 domain-containing protein	<i>ATSPX3</i>
At1g73220	2.067	Sugar transporter family protein	<i>ATOCT1</i>
At5g40260	1.236	Nodulin mtn3 family protein	<i>ATSWEE8</i>
At4g37550	1.190	Formamidase	
At4g26530	1.123	Fructose-bisphosphate aldolase	
At3g03530	1.112	NONSPECIFIC PHOSPHOLIPASE C4; hydrolase	<i>NPC4</i>
At1g34575	1.100	FAD-binding domain-containing protein	
At2g30540	1.039	Glutaredoxin family protein	
At5g20180	1.020	Ribosomal protein L36 family protein	
At3g08860	1.019	Alanine--glyoxylate aminotransferase, putative	<i>PYD4</i>
At1g29395	1.002	Cold regulated 414 thylakoid membrane 1	<i>COR413-TM1</i>

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS SOBREENPRESORAS DE COPT1

3.1. Efectos de la sobreexpresión del transportador de alta afinidad de cobre COPT1, en plantas de *Arabidopsis thaliana*

Para estudiar el efecto que provoca la sobreexpresión y desregulación del transporte intracelular de Cu en el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*, se utilizaron plantas transgénicas sobreexpresoras del gen *COPT1* ($COPT1^{OE}$), previamente obtenidas en el laboratorio (Andrés-Colás et al., 2010). Como resumen de los fenotipos de las plantas $COPT1^{OE}$, podemos destacar que el tamaño global es sustancialmente menor que el de las plantas WT (Figura R.3.1a). Por otra parte, las hojas de la roseta de las plantas $COPT1^{OE}$ presentan hiponastia, es decir enrollamiento de los bordes hacia arriba. Además, el tiempo de floración está ligeramente retrasado con respecto a las plantas WT, en condiciones de fotoperíodo de día largo (16 h de luz a 23 °C y 8 h de oscuridad a 16 °C). Sin embargo, se produce un ligero avance en el tiempo de floración en condiciones de fotoperíodo de día corto (8 h de luz a 23 °C y 16 h de oscuridad a 16 °C). Los órganos reproductivos también están afectados, dado que la mayoría de las flores muestran estambres más cortos, lo que explicaría la baja fertilidad que se observa en dichas plantas (Andrés-Colás et al., 2010).

En este trabajo, se ha realizado parte de la caracterización de las plantas $COPT1^{OE}$. En primer lugar, se seleccionaron las plantas a utilizar y para ello, se cultivaron plantas de las líneas $COPT1^{OE}$ en condiciones control y se analizaron extractos de las proteínas totales, mediante Western-blot, que se incubó con el anticuerpo contra el epitopo de la hemaglutinina del virus de la gripe humana (HA), con el que está etiquetada la proteína COPT1 en la región carboxi-terminal (Figura R.3.1b). Se seleccionaron aquellas plantas que presentan

mayores niveles relativos de la proteína HA, que se correlacionan con la severidad del fenotipo observado en las plantas cultivadas en maceta (Figura R.3.1a).

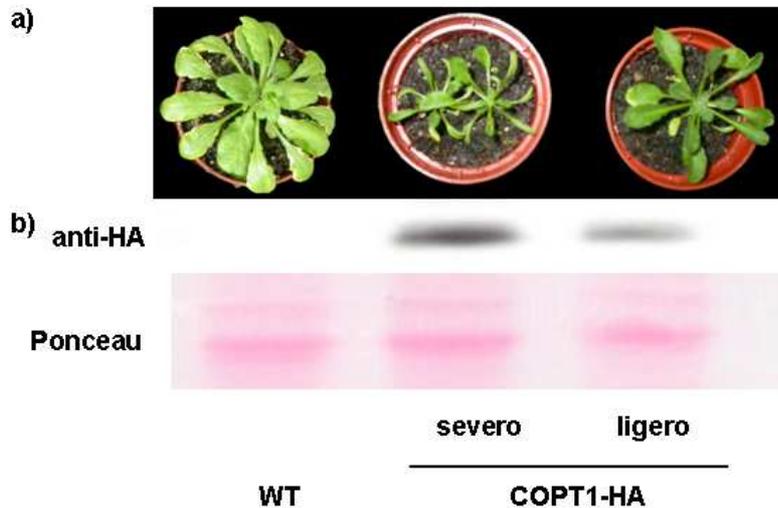


Figura R.3.1. Sobreexpresión del transportador *COPT1* en plantas de *Arabidopsis*. a) Fotografía representativa de los fenotipos observados en plantas transgénicas *COPT1*^{OE} (*COPT1*-HA) cultivadas en maceta durante 4 semanas en condiciones de fotoperíodo neutro, 12 h de luz a 23 °C y 12 h de oscuridad a 16 °C (LDHC). b) Detección de la proteína *COPT1*-HA en las hojas de plantas WT y *COPT1*^{OE} mostradas en el Apartado a) mediante Western-blot de extractos de proteínas totales revelado con anticuerpo anti-HA. La tinción Ponceau de la subunidad grande de la RubisCo se muestra como control de carga.

A continuación, se analizó por qPCR la expresión relativa del gen *COPT1* en plántulas WT y *COPT1*^{OE} cultivadas durante 6 d en condiciones de deficiencia o exceso de Cu. En las dos condiciones evaluadas, las plantas *COPT1*^{OE} presentan niveles más elevados de *COPT1* (2.5 veces), en comparación con los niveles observados en plántulas WT, de acuerdo con la sobreexpresión del transportador (Figura R.3.2).

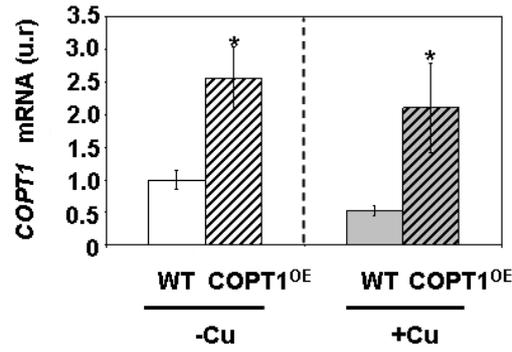


Figura R.3.2. Expresión del gen *COPT1* en plántulas *COPT1*^{OE}. Expresión relativa de *COPT1* en plántulas de 6 d WT (barras lisas) y *COPT1*^{OE} (barras rayadas) cultivadas en deficiencia de Cu (½ MS comercial, -Cu, barras blancas) o en exceso de Cu (½ MS comercial con 10 µM de Cu, +Cu, barras grises). El gen *UBQ10* se usa como control interno. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la planta WT para cada condición. Las barras representan la media ± DE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, en plántulas WT se observa la inducción (2 veces) de la expresión relativa de *COPT1* en deficiencia de Cu con respecto a las suplementadas con el metal (Figura R.3.2).

3.2. Sensibilidad de las plántulas sobreexpresoras de *COPT1* a diferentes tipos de iluminación

Con el objetivo de indagar en el fenotipo observado en luz blanca, se estudió la respuesta de plántulas *COPT1*^{OE} en luz roja o en oscuridad, en colaboración con los Drs. Verónica Arana y Miguel Ángel Blázquez (IBMCP, Valencia). Para evaluar la sensibilidad de las plántulas *COPT1*^{OE} a la concentración de Cu en luz blanca, se cultivaron plántulas WT y *COPT1*^{OE} durante 6 d en condiciones de deficiencia de Cu. Como se observa en la Figura R.3.3, en deficiencia del metal, la longitud de los hipocotilos es mayor en plántulas *COPT1*^{OE} que en las WT.

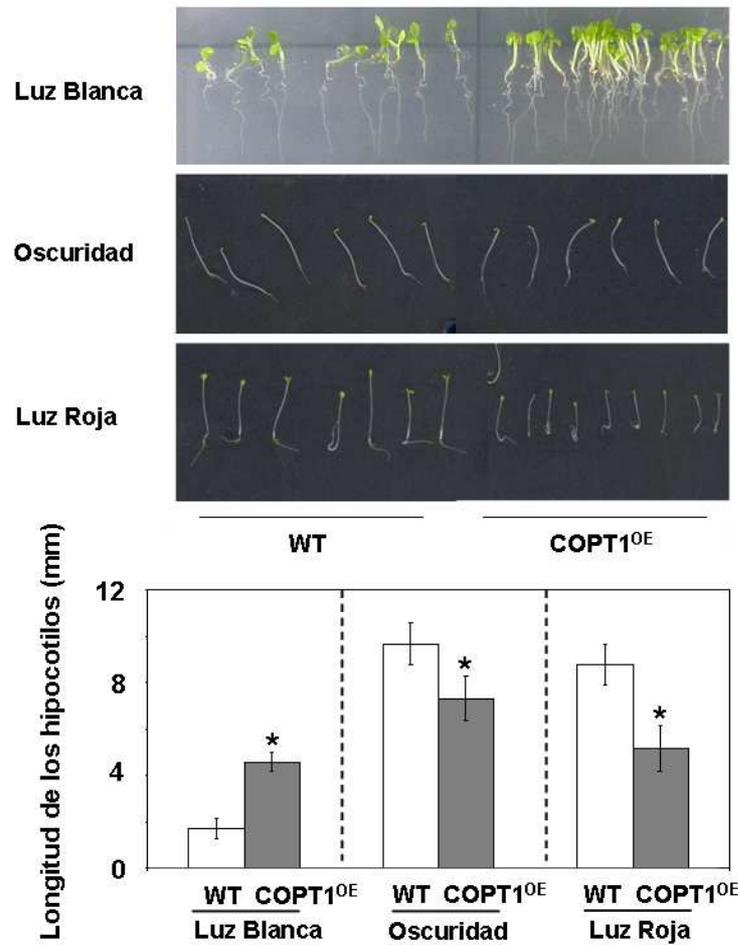


Figura R.3.3. Fenotipo de las plántulas COPT1^{OE} en diferentes condiciones de iluminación. Las plántulas WT y COPT1^{OE} se cultivaron en luz blanca en condiciones LDHC durante 7 d en deficiencia de Cu (½ MS comercial). Las mismas plantas se cultivaron en oscuridad (DDHC) y en luz roja, en medio ½ MS comercial sin sacarosa. Las medidas de la longitud de los hipocotilos corresponden a la media ± DE de 5-16 réplicas biológicas. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Al contrario de lo que ocurre en luz blanca, tanto en oscuridad como en luz roja se observa que la longitud de los hipocotilos de las plántulas COPT1^{OE} es menor que la de las WT (Figura R.3.3).

3.3. Análisis global de los cambios de expresión génica en deficiencia y exceso de cobre en las plantas sobreexpresoras de COPT1

Para analizar a nivel molecular los efectos globales que provoca la desregulación de la homeostasis del Cu, se cultivaron plántulas WT y COPT1^{OE} durante 6 d en condiciones de deficiencia de Cu y se compararon con plántulas cultivadas en condiciones de exceso del metal mediante la utilización de micromatrices de DNA.

Previamente a la realización de estas micromatrices, se analizó la sobreexpresión de *COPT1* por sqPCR (Figura R.3.4). De este modo, se corroboró la inducción de la expresión de *COPT1* en deficiencia de Cu en plántulas WT, así como la sobreexpresión en las plántulas COPT1^{OE}, tanto en condiciones de deficiencia como de exceso de Cu, en las 4 muestras que se utilizaron en las hibridaciones de las micromatrices de DNA.

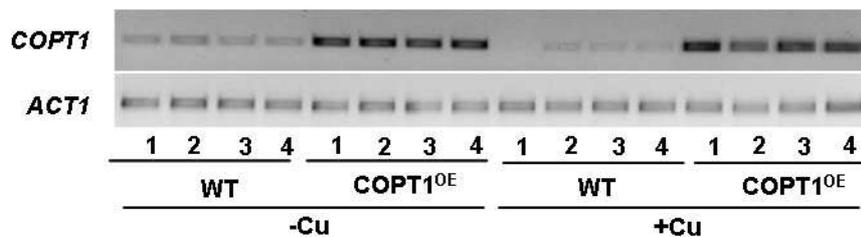


Figura R.3.4. Expresión de *COPT1* en plántulas COPT1^{OE}. Expresión relativa del gen *COPT1* en plántulas WT y COPT1^{OE} cultivadas durante 6 d en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial) y exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu). El gen *ACT1* se usa como control de carga. Los números representan las réplicas biológicas empleadas en la hibridación de las micromatrices de DNA.

Del análisis global de la expresión génica de plántulas WT y COPT1^{OE}, se identificaron un total de 583 genes diferencialmente expresados con un valor \log_2 ratio de $\geq |1|$ en las plántulas COPT1^{OE} frente a las WT (Tabla R.A3 y R.A4). Estas diferencias se distribuyen en un total de 482 genes inducidos (ratio

≥ 1) y de 101 genes reprimidos (ratio ≥ -1) en las plantas COPT1^{OE} para las dos condiciones de crecimiento testadas (deficiencia y exceso de Cu) (Figura R.3.5).

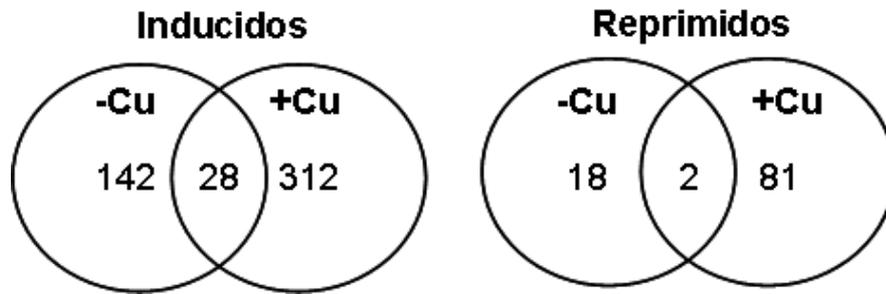


Figura R.3.5. Diagramas de Venn de genes inducidos y reprimidos en plántulas COPT1^{OE} en deficiencia y exceso de Cu. Plántulas WT y COPT1^{OE} cultivadas durante 6 d en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial) y en exceso de Cu (medio ½ MS comercial suplementado con 10 μ M CuSO₄). Los valores corresponden al número de genes inducidos o reprimidos en las plántulas COPT1^{OE} tras el análisis de micromatrices en las dos condiciones de deficiencia o exceso de Cu testadas.

El número de genes inducidos es mayor que el de genes reprimidos en las dos condiciones y el exceso de Cu muestra el mayor número de genes con expresión diferencial. El análisis de la ontología génica, llevado a cabo con el programa *GeneCodis2.0*, indica que, dentro de los genes reprimidos en las plántulas COPT1^{OE}, destacan las categorías de genes implicados en procesos biológicos vinculados con la fotosíntesis, la fotomorfogénesis, el transporte de metales como Fe y Zn, el estrés oxidativo y las respuestas a ácido abscísico (ABA) (Tabla R.3.1).

Tabla R.3.1. Procesos biológicos preponderantes entre los genes reprimidos en las plántulas COPT1^{OE}. Hyp* < 0.01. NG = Número de genes anotados en la lista de genes reprimidos; TNG = Número total de genes en la lista de genes reprimidos; NGR = Número de genes anotados en la lista de referencia; TNGR = Número total de genes en la lista de referencia; Hyp* = p-Value corregido hipergeométrico.

Procesos biológicos	Código	NG/ TNG	NGR/ TNGR	Hyp*
Fotosíntesis	GO:0015979	0.0693	0.0026	0.0000
Respuesta de defensa a bacterias	GO:0042742	0.0693	0.0058	0.0002
Respuesta a luz azul	GO:0009637	0.0396	0.0011	0.0002
Respuesta a rojo lejano	GO:0010218	0.0396	0.0012	0.0003
Respuesta a luz roja	GO:0010114	0.0396	0.0015	0.0003
Respuesta a frío	GO:0009409	0.0693	0.0076	0.0003
Utilización de carbono	GO:0015976	0.0198	0.0002	0.0023
Descarboxilación de glicina vía sistemas de corte	GO:0019464	0.0198	0.0002	0.0023
Respuesta al ión zinc	GO:0010043	0.0297	0.0012	0.0034
Senescencia foliar	GO:0010150	0.0297	0.0015	0.0072
Transporte del ión hierro	GO:0006826	0.0198	0.0004	0.0073
Respuesta a estrés oxidativo	GO:0006979	0.0495	0.0070	0.0078
Homeostasis celular del ión hierro	GO:0006879	0.0198	0.0004	0.0079
Transporte del ión zinc	GO:0006829	0.0198	0.0004	0.0090
Respuesta celular al ácido abscísico	GO:0071215	0.0198	0.0005	0.0096

Tabla R.3.2. Compartimentos celulares preponderantes entre los genes reprimidos en las plántulas COPT1^{OE}. Hyp* < 0.01. NG = Número de genes anotados en la lista de genes reprimidos; TNG = Número total de genes en la lista de genes reprimidos; NGR = Número de genes anotados en la lista de referencia; TNGR = Número total de genes en la lista de referencia; Hyp* = p-Value corregido hipergeométrico.

Compartimento celular	Código	NG/ TNG	NGR/ TNGR	Hyp*
Cloroplasto	GO:0009507	0.3861	0.0550	0.0000
Envoltura cloroplasto	GO:0009941	0.2277	0.0156	0.0000
Membrana del tilacoide del cloroplasto	GO:0009535	0.1881	0.0093	0.0000
Tilacoides del cloroplasto	GO:0009534	0.1485	0.0065	0.0000
Tilacoide	GO:0009579	0.1287	0.0063	0.0000
Estroma del cloroplasto	GO:0009570	0.1683	0.0174	0.0000
Apoplasto	GO:0048046	0.1089	0.0097	0.0000
Complejo captador de luz	GO:0030076	0.0396	0.0006	0.0000
Plastoglobulo	GO:0010287	0.0396	0.0020	0.0002
Complejo de corte de glicina	GO:0005960	0.0198	0.0001	0.0003
Membrana	GO:0016020	0.1485	0.0496	0.0005
Estrómulo	GO:0010319	0.0297	0.0011	0.0006
Nucleoide	GO:0009295	0.0297	0.0011	0.0006
Peroxisoma	GO:0005777	0.0396	0.0049	0.0042
Fotosistema del cloroplasto II	GO:0030095	0.0198	0.0006	0.0043
Orgánulo lumen	GO:0043233	0.0099	0.0000	0.0073

El cloroplasto es el compartimento subcelular al que más afectan los cambios observados en las plantas COPT1^{OE} (39 % de los procesos biológicos indicados) (Tabla R.3.2). Por otro lado, dentro de los genes inducidos en las plantas COPT1^{OE} se incluyen las categorías de respuesta a estrés abiótico y el transporte de metales (Tabla R.3.3).

Tabla R.3.3. Genes representativos de las distintas categorías funcionales entre los genes inducidos y reprimidos en las plántulas COPT1^{OE}

Categoría funcional	Inducidos	Reprimidos
Respuesta a estrés	<i>AOX1D, LSU1, NAC87</i>	<i>LHCB</i>
Transporte de metales	<i>UPBI</i>	<i>FER1</i>

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en el análisis de las micromatrices, se han elegido genes representativos de las diferentes categorías para estudiar su expresión por qPCR (Tabla R.3.3). Como candidatos de la categoría de respuesta al estrés se han elegido los genes que codifican a la oxidasa alternativa 1D, *AOX1D* y el de respuesta a ayuno de sulfuro, *LSU1*. El análisis de la expresión por qPCR muestra que la expresión relativa de los genes *AOX1D* y *LSU1* en las plántulas COPT1^{OE} está inducida en condiciones de exceso de Cu con respecto a la suficiencia del metal, aunque *AOX1* se induce también ligeramente en deficiencia de Cu (Figura R.3.6). Otros miembros de la familia LSU, como *LSU2* y *LSU3*, también se inducen en las plántulas COPT1^{OE}, aunque con valores menores (Tabla R.A3), lo que corrobora la relación entre las respuestas de ayuno de sulfato y la homeostasis del Cu.

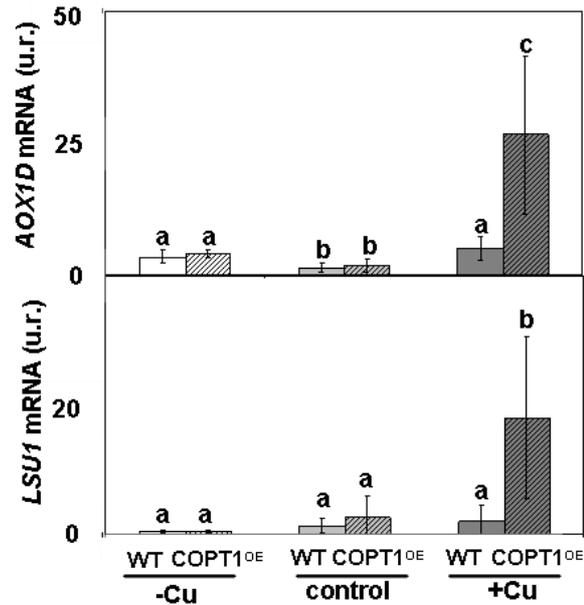


Figura R.3.6. Expresión de los genes *AOX1D* y *LSU1* en plántulas *COPT1*^{OE}. Expresión relativa de los genes *AOX1D* y *LSU1* en plántulas de 6 d WT (barras lisas) y *COPT1*^{OE} (barras rayadas) cultivadas en deficiencia de Cu ($\frac{1}{2}$ MS comercial, -Cu, barras blancas), suficiencia de Cu ($\frac{1}{2}$ MS comercial con 0.5 μ M de Cu, control, barras grises) o en exceso de Cu ($\frac{1}{2}$ MS comercial con 10 μ M de Cu, +Cu, barras gris oscuro). El gen *UBQ10* se usa como control interno. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la condición de suficiencia de Cu. Las barras representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Entre las familias más destacadas de genes reprimidos en las plántulas *COPT1*^{OE} en exceso de Cu, se encuentran las que codifican proteínas captadoras de luz o *light harvesting chlorophyll binding*, LHCB (Tabla R.A4). Dada la relación de esta familia con la luz y el ritmo circadiano, detallamos los resultados de la regulación por Cu en el siguiente capítulo.

Por otro lado, la interacción entre los metales Fe y Cu, descrita con anterioridad (Capítulo 2) también se pone de manifiesto en las plántulas *COPT1*^{OE}, siendo el transporte de metales una de las categorías destacadas. En este sentido, se analizó por qPCR la expresión relativa de dos genes

relacionados con la homeostasis del Fe, el factor transcripcional *upbeat1*, *UPBI*, y la ferritina, *FER1*, y los resultados obtenidos corroboran los del análisis de micromatrices. Efectivamente, cuando comparamos las condiciones de deficiencia y exceso de Cu, se observa como la expresión relativa de ambos genes se induce en las plántulas *COPT1^{OE}* en deficiencia de Cu y también con respecto a las plántulas WT en dicha condición. Por otro lado, se reprime la expresión relativa de *FER1* en las plántulas *COPT1^{OE}* en exceso de Cu (Figura R.3.7).

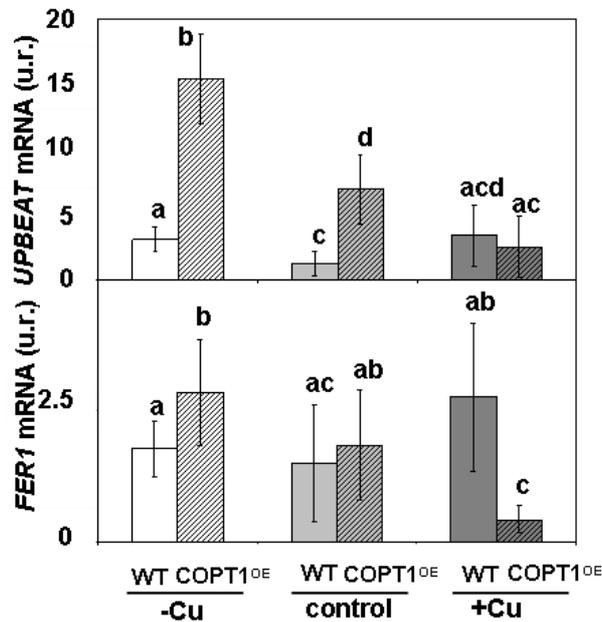


Figura R.3.7. Expresión de los genes *UPBI* y *FER1* en plántulas *COPT1^{OE}*. Expresión relativa de los genes *UPBI* y *FER1* en plántulas de 6 d WT (barras lisas) y *COPT1^{OE}* (barras rayadas) cultivadas en deficiencia de Cu (½ MS comercial, -Cu, barras blancas), suficiencia de Cu (1/2 MS comercial con 0.5 µM de Cu, control, barras grises) o en exceso de Cu (½ MS comercial con 10 µM de Cu, +Cu, barras gris oscuro). El gen *UBQ10* se usa como control interno. Los niveles de mRNA fueron expresados en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la condición de suficiencia de Cu. Las barras representan la media ± DE de tres réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Dado que alrededor del 6 % de los genes de *Arabidopsis* codifican a factores transcripcionales (TF) (Ratcliffe and Riechmann, 2002; Guo et al., 2005) y que un porcentaje mayor (9 %) de los genes inducidos en la línea COPT1^{OE} son TF, hay una preponderancia de esta categoría, por lo que se ha elaborado una Tabla con los TF afectados (Tabla R.3.4). Cabe destacar que el TF SPL3, estudiado en el Capítulo 1, está inducido ligeramente en las plantas COPT1^{OE} en condiciones de deficiencia de Cu (Tabla R.3.4 y R.A3).

Alrededor del 25 % de los TF inducidos en las plántulas COPT1^{OE}, sobretudo en condiciones de exceso del metal, pertenecen a la familia NAC (Tabla R.3.4). La familia de factores de transcripción NAC ha sido relacionada con el desarrollo vegetal y las respuestas a estreses abióticos, como el estrés hídrico y el salino (Nuruzzaman et al., 2010; Nakashima et al., 2012).

Tabla R.3.4. Factores transcripcionales diferencialmente regulados en las plántulas COPT1^{OE}. La función molecular de actividad de factor transcripcional de unión específica a secuencias de DNA es una categoría preponderante en las plántulas COPT1^{OE} en deficiencia (-Cu) y exceso de Cu (+Cu). En rojo se representan los miembros de la familia NAC y en azul el factor transcripcional SPL3. Los valores corresponden con un valor log₂ ratio de $\geq |1|$ en las micromatrices.

Código MIPS	Descripción génica	-Cu	+Cu
At1g02220	NAC domain containing protein 3		1.206
At1g19210	Integrase-type DNA-binding superfamily protein		1.418
At1g32870	NAC domain protein 13		1.593
At1g43160	related to AP2 6	1.261	
At1g52890	NAC domain containing protein 19		1.389
At1g66380	myb domain protein 114		1.189
At1g68200	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein		1.060
At1g69490	NAC-like, activated by AP3/PI	1.286	
At1g73805	Calmodulin binding protein-like		1.583
At2g17040	NAC domain containing protein 36		1.076
At2g33810	Squamosa Promoter binding protein-Like 3 (SPL3)	1.212	
At2g38340	Integrase-type DNA-binding superfamily protein		3.248
At2g40340	Integrase-type DNA-binding superfamily protein		1.676
At2g41240	basic helix-loop-helix protein 100		2.914
At2g42660	Homeodomain-like superfamily protein		1.147

At2g44840	ethylene-responsive element binding factor 13	1.086
At2g47190	myb domain protein 2	1.989
At2g47270	sequence-specific DNA binding transcription factors	1.794
At3g01600	NAC domain containing protein 44	2.136
At3g01970	WRKY DNA-binding protein 45	1.707
At3g04070	NAC domain containing protein 47	1.987
At3g04410	NAC domain transcriptional regulator superfamily protein	1.463
At3g04420	NAC domain containing protein 48	1.292
At3g10595	Duplicated homeodomain-like superfamily protein	3.049
At3g11580	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	1.589
At3g23250	myb domain protein 15	1.211
At3g44350	NAC domain containing protein 61	1.227
At3g46070	C2H2-type zinc finger family protein	1.692
At3g46080	C2H2-type zinc finger family protein	1.373
At3g46090	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	1.308
At3g56970	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	2.453
At3g56980	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	2.523
At3g61630	cytokinin response factor 6	1.375
At4g32280	Indole-3-acetic acid inducible 29	1.201
At5g04150	Transcription factor bHLH101	2.152
At5g07100	WRKY DNA-binding protein 26	1.778
At5g13080	WRKY DNA-binding protein 75	1.051
At5g18270	Arabidopsis NAC domain containing protein 87	1.921
At5g39610	ATNAC6 protein heterodimerization, homodimerization	1.357
At5g44260	Zinc finger CCCH domain-containing protein 61	1.829
At5g53980	homeobox protein 52	1.655
At5g57720	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	1.063
At5g64810	WRKY DNA-binding protein 51	1.088

Para comprobar la inducción observada en el análisis de micromatrices y averiguar si está o no mediada por el principal TF implicado en la regulación por deficiencia de Cu, SPL7, se cultivaron plántulas WT, COPT1^{OE} y *spl7* durante 6 d en las mismas condiciones de cultivo utilizadas para las micromatrices y se analizó la expresión génica por qPCR. Se seleccionó el factor transcripcional *NAC87* por el elevado valor de expresión obtenido en el análisis de las micromatrices (1.921) y por su relación con la señalización mediada por ROS. El gen *NAC87* se induce alrededor de unas 3 veces más por

qPCR en las plántulas *COPT1^{OE}* que en las plántulas WT en condiciones de exceso en Cu (Figura R.3.8).

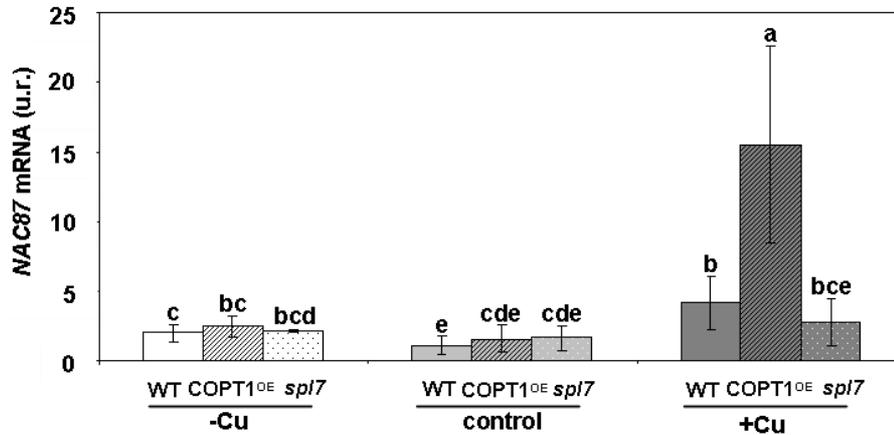


Figura R.3.8. Expresión del gen *NAC87* en plántulas *COPT1^{OE}*. Expresión relativa del gen *NAC87* en plántulas de 6 d WT (barras lisas), *COPT1^{OE}* (barras rayadas) y *spl7* (barras punteadas) cultivadas en deficiencia de Cu (½ MS comercial; -Cu, barras blancas), suficiencia de Cu (½ MS comercial con 0.5 µM de Cu; control, barras grises) o en exceso de Cu (½ MS comercial con 10 µM de Cu; +Cu, barras gris oscuro). El gen *UBQ10* se usa como control interno. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la condición de suficiencia de Cu. Las barras representan la media ± DE de tres réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Además, en plántulas WT se observa la inducción de la expresión de *NAC87* tanto en deficiencia como en exceso de Cu en el medio, con respecto a la suficiencia (Figura R.3.8). Por último, no se observan diferencias en la expresión de *NAC87* en las plántulas *spl7* con respecto a las WT, lo que significa que el factor de transcripción *SPL7* no es responsable de la ligera inducción observada en las condiciones de deficiencia de Cu (Figura R.3.8).

Con el objetivo de verificar el efecto del Cu en la regulación de la expresión de *NAC87*, se cultivaron plántulas WT durante 6 d en distintas concentraciones de Cu en el medio. Comparando con la condición control o de

suficiencia (0.5-1 μM de Cu), se observa inducción de *NAC87*, tanto en deficiencia, como especialmente de exceso de Cu (Figura R.3.9).

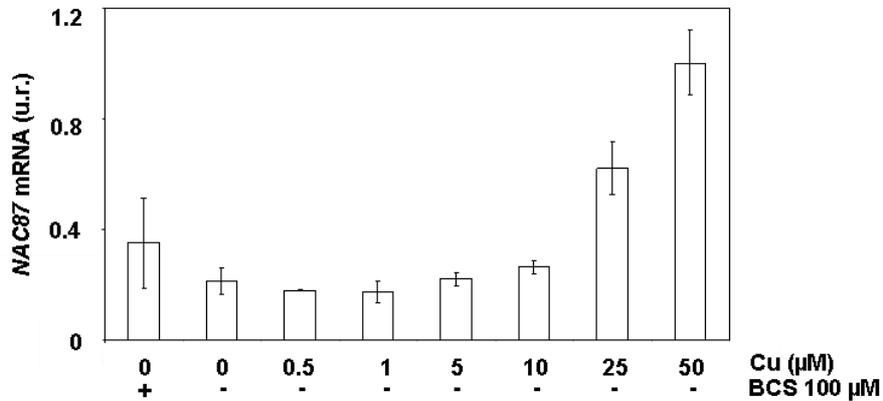


Figura R.3.9. Expresión del gen *NAC87* en diferentes concentraciones de Cu. Expresión relativa del gen *NAC87* en plántulas de 6 d WT cultivadas en medio $\frac{1}{2}$ MS comercial en las concentraciones de Cu indicadas. El mRNA de cada gen se analiza por qPCR con cebadores específicos y se normaliza con la expresión del gen *UBQ10*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la condición de Cu 50 μM . Las barras representan la media \pm DE de dos réplicas biológicas.

A continuación, se estudió si la inducción de la expresión del gen *NAC87* por el Cu es específica de este metal. Para ello, se cultivaron plántulas WT durante 6 d en medio $\frac{1}{2}$ MS y el mismo medio suplementado con exceso (30 μM) de los siguientes metales: Cu, Fe, Zn, Mn y Cd. Usando la condición $\frac{1}{2}$ MS como referencia, se observa que además del exceso de Cu, también el exceso de Cd en el medio induce la expresión del gen *NAC87*, aunque el Cd es menos efectivo que el Cu en la inducción (Figura R.3.10).

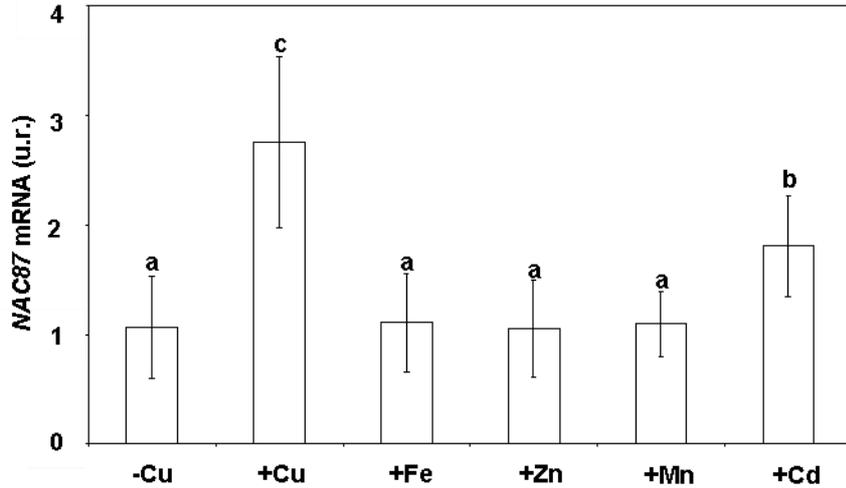


Figura R.3.10. Expresión del gen *NAC87* en condiciones de exceso de diferentes metales. Expresión relativa del gen *NAC87* en plántulas de 6 d WT cultivadas en medio $\frac{1}{2}$ MS en condiciones de un exceso ($30 \mu\text{M}$) de los metales indicados. El mRNA de cada gen se analiza por qPCR con cebadores específicos y se normaliza con la expresión del gen *UBQ10*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) y están referidos a la deficiencia de Cu. Las barras representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Por otro lado, se analizó el efecto de distintas deficiencias metálicas sobre la regulación de la expresión del gen *NAC87*. Para ello, se cultivaron plántulas WT de 6 d en medio $\frac{1}{2}$ MS en deficiencia de los siguientes metales: Cu (suplementado con BCS $100 \mu\text{M}$), Fe (suplementado con ferrozina $300 \mu\text{M}$), Zn (sin adición del metal) y Mn (sin adición del metal).

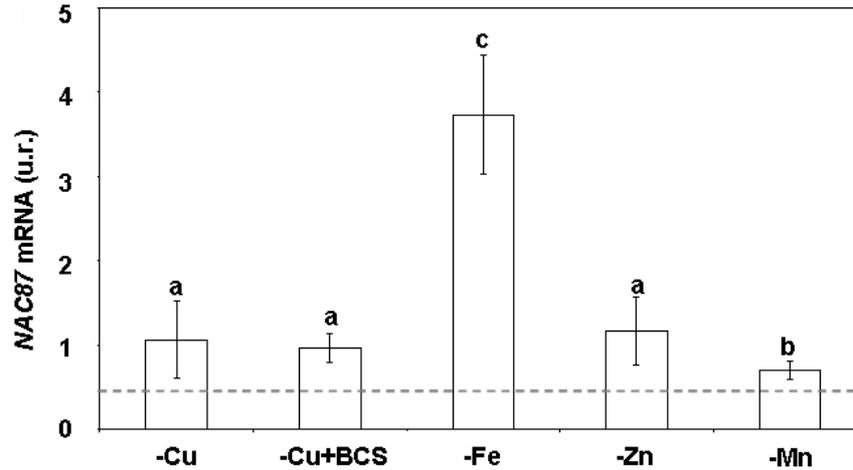


Figura R.3.11. Expresión del gen *NAC87* en condiciones de deficiencia de diferentes metales. Expresión relativa del gen *NAC87* en plántulas de 6 d WT cultivadas en medio $\frac{1}{2}$ MS casero en las deficiencias metálicas indicadas. El mRNA de cada gen se analiza por qPCR con cebadores específicos y se normaliza a la expresión del gen *UBQ10*. Los niveles de mRNA se expresan en unidades relativas (u.r.) respecto a la deficiencia de Cu. Las barras representan la media \pm DE de tres réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Comparando con la suficiencia de Cu, representada en la Figura por la línea punteada, se observa que la deficiencia de Fe es la que más induce la expresión del gen *NAC87*, aunque todas las deficiencias estudiadas producen la inducción del gen (Figura R.3.11).

3.4. Apertura estomática y contenido en aba en plantas con diferente contenido en cobre y hierro

La familia de factores de transcripción NAC se ha relacionado recientemente con la señalización de ABA (Nakashima et al., 2012). Por ello, se determinó el contenido total de ABA en plántulas WT de 6 d, mediante un ensayo de ELISA indirecto en colaboración con la Dra. Teresa Lafuente (IATA, Universidad de Valencia), de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y

métodos (Apartado 3.4) (Walker-Simmons, 1987; Lafuente and Marti, 1997). En la Figura R.3.12 se muestra el contenido de la hormona ABA en plántulas cultivadas en diferentes concentraciones de Cu en el medio de crecimiento en placa (deficiencia severa, deficiencia, suficiencia y exceso de Cu). En deficiencia de Cu se observan niveles más elevados de ABA, en relación a los niveles obtenidos en plantas en condiciones de suficiencia y exceso de Cu (tratamiento 0.5 y 10 μM , respectivamente).

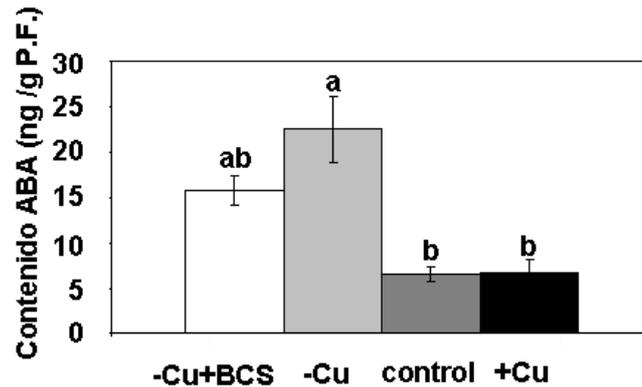


Figura R.3.12. Contenido total de ABA en función del contenido en Cu. Plántulas WT cultivadas durante 6 d en medio $\frac{1}{2}$ MS comercial (-Cu, barra gris) o el mismo medio con BCS 50 μM (-Cu+BCS, barra blanca), 0.5 μM de Cu (control, barra gris oscuro) o 10 μM de Cu (+Cu, barra negra). Las barras corresponden con la media \pm DE de tres réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Por otro lado, debido a la relación entre los metales Fe y Cu descrita en el Capítulo anterior, se determinó el contenido de ABA en deficiencia de Cu, de Fe o en ambas deficiencias metálicas. Como se observa en la Figura R.3.13, tanto la deficiencia en Cu, como la de Fe aplicadas por separado provocan un aumento en el contenido de ABA total. El mayor incremento de la hormona lo causa la deficiencia de Cu en el medio de cultivo y ambas deficiencias aplicadas conjuntamente no logran aumentar todavía más el contenido en ABA.

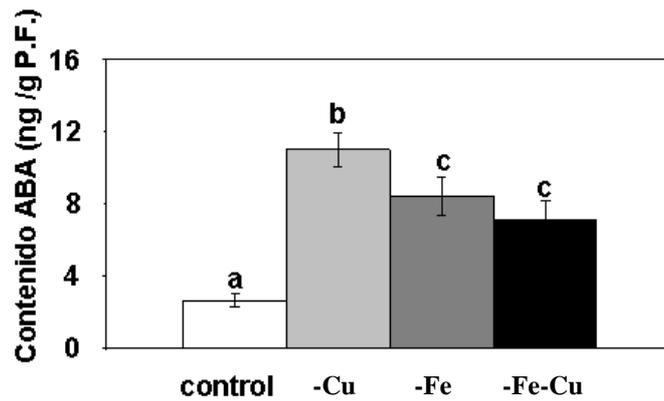


Figura R.3.13. Contenido total de ABA en deficiencias de Fe y de Cu. Plántulas WT cultivadas durante 6 d en medio $\frac{1}{2}$ MS casero con suficiencia de Cu y Fe (control, barra blanca) y medio $\frac{1}{2}$ MS casero sin Cu (-Cu, barra gris), sin Fe (-Fe, barra gris oscuro) o sin ambos metales (-Fe-Cu, barra negra). Las barras corresponden con la media \pm DE de tres réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Con el objetivo de indagar en la función de la biosíntesis y señalización de ABA en la respuesta a deficiencia de Cu, se midió la apertura estomática, que es uno de los efectos de la transducción de la señal hormonal. Para ello, plantas adultas WT y del mutante *spl7* se cultivaron en maceta y se regaron con solución Hoagland 0.5X, como se describe en Materiales y métodos (Apartado 1.1.1). Como parámetro directamente relacionado con la apertura estomática, se determinó el cociente entre la longitud y la anchura de los estomas, en el envés de hojas (Lawson et al., 1998). Los resultados muestran que dicho parámetro tiene un valor alrededor de 1.5 en plantas mantenidas en la luz y un valor superior a 2 en la oscuridad, condición en la que se produce el cierre estomático en las plantas WT. Sin embargo, en el mutante *spl7* no se observan diferencias en este parámetro entre condiciones (Figura R.3.14).

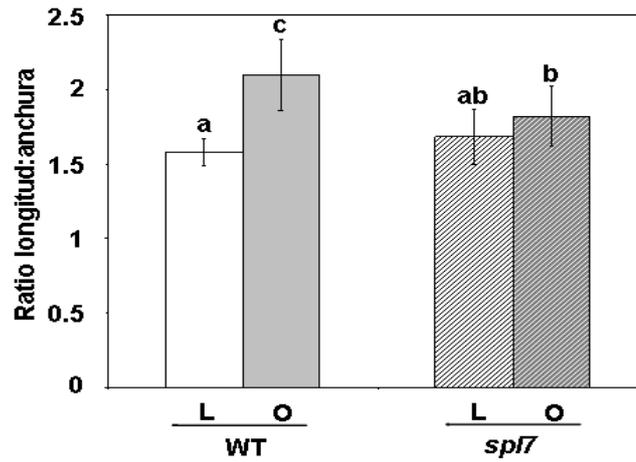


Figura R.3.14. Apertura estomática en plantas WT y en el mutante *spl7*. Se midió el cociente longitud: anchura en el envés de hojas de plantas adultas WT (barra lisa) y *spl7* (barra punteada) cultivadas en maceta y regadas con la solución Hoagland 0.5X. Las hojas se mantuvieron en la luz y en una solución de KCl 100 mM (L, barras blancas) o en la oscuridad, en una solución de CaCl₂ 1 mM (O, barras grises). Los valores corresponden a la media \pm DE de 9-13 réplicas biológicas. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La relación entre el ABA y la deficiencia de metales, como el Cu y el Fe, merecen un estudio más detallado en el futuro para entender el papel de la apertura/cierre estomático y la posible participación del gen *NAC87*, mediada por especies reactivas de oxígeno (Legnaioli, 2013), en las respuestas al estrés nutricional que provocan dichas deficiencias.

Tabla R.A3. Genes inducidos en plántulas COPT1^{OE}. Se indican el código MIPS, el valor \log_2 ratio de $\geq |1|$ de las micromatrices en condiciones -Cu y +Cu, la anotación génica y el nombre del gen.

Código MIPS	Ratio	Anotación génica	Nombre gen
-Cu/ +Cu			
At5g06170	3.519/ 1.806	SUCROSE-PROTON SYMPORTER 9; Carbohydrate Transporter/ Sucrose:Hydrogen Symporter/ Sugar Porter	ATSUC9
At3g01185	3.059/ 2.005	Similar To TAIR:AT2G21655.1	
At3g10595	3.049/ 1.359	Myb Family Transcription Factor	
At1g33960	2.804/ 2.238	AVRRPT2-INDUCED GENE 1; GTP Binding	AIG1
At1g19530	2.573/ 1.124	Unknown Protein	
At2g18660	2.507/ 2.825	Expansin Family Protein (EXPR3)	AtPNP-A
At5g52760	2.294/ 1.442	Heavy-Metal-Associated Domain-Containing Protein	
At3g22231	2.289/ 1.657	Pathogen And Circadian Controlled 1	PCC1
At2g04495	2.282/ 1.875	Similar To TAIR:AT2G04515.1	
At2g14560	2.133/ 2.545	Similar To TAIR:AT1G33840.1	LURP1
At1g01680	2.111/ 1.768	U-Box Domain-Containing Protein	ATPUB54
At5g59030	1.898/ 2.269	COPPER TRANSPORTER 1; Copper Ion Transporter	COPT1
At1g73800	1.897/ 1.523	Calmodulin-Binding Protein	
At3g47480	1.792/ 2.346	Calcium-Binding EF Hand Family Protein	
At1g69880	1.778/ 2.395	Thioredoxin H-Type 8; Thiol-Disulfide Exchange Intermediate	ATH8
At3g50770	1.732/ 2.220	Calmodulin-Related Protein, Putative	CML41
At5g15190	1.388/ 1.350	Unknown Protein	
At5g57510	1.384/ 1.480	Similar To Os08g0448100	
At4g14365	1.354/ 1.196	Zinc Finger (C3HC4-Type RING Finger) Family Protein / Ankyrin Repeat Family Protein	XBAT34
At1g65500	1.302/ 2.298	Similar To TAIR:AT1G65490.1	
At3g60540	1.242/ 1.247	Sec61beta Family Protein	
At5g25250	1.207/ 1.481	Similar To TAIR:AT5G64870.1; TAIR:AT5G25260.1	
At3g02840	1.147/ 1.093		
At4g12490	1.147/ 1.492	Protease Inhibitor/Seed Storage/Lipid Transfer Protein (LTP) Family Protein	
At5g03210	1.140/ 1.414	Unknown Protein	
At5g02580	1.122/ 1.293	Similar To TAIR:AT3G55240.1	
At4g39670	1.115/ 1.299	Similar To TAIR:AT2G34690.1	
At3g28580	1.064/ 1.695	AAA-Type Atpase Family Protein	
-Cu			
At2g24850	2.702	TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3; Transaminase	TAT
At1g53690	2.652	DNA-Directed RNA Polymerases I, II, And III 7 Kda Subunit, Putative	
At3g49620	2.587	DARK INDUCIBLE 11; Oxidoreductase	DIN11
At3g44870	2.330	S-Adenosyl-L-Methionine:Carboxyl Methyltransferase Family Protein	
At3g60650	2.219	Unknown Protein	
At2g37030	2.196	Auxin-Responsive Family Protein	
At3g49970	2.136	Phototropic-Responsive Protein, Putative	
At3g26200	2.073	Cytochrome P450, Family 71, Subfamily B, Polypeptide 22); Oxygen Binding	CYP71B22
At1g57630	1.944	Disease Resistance Protein (TIR Class), Putative	
At2g41230	1.934	Similar To TAIR:AT2G44080.1	ORS1
At3g47340	1.896	Asn1 (Dark Inducible 6)	ASN1
At2g39030	1.890	GCN5-Related N-Acetyltransferase (GNAT) Family Protein	
At3g60420	1.855	Similar To TAIR:AT3G60450.1	
At3g21080	1.834	ABC Transporter-Related	
At5g44260	1.829	Zinc Finger (CCCH-Type) Family Protein	

At5g14360	1.796	Ubiquitin Family Protein	
At2g47270	1.794	Transcription Factor/ Transcription Regulator	UPB1
At1g21400	1.782	2-Oxoisovalerate Dehydrogenase, Putative / 3-Methyl-2-Oxobutanoate Dehydrogenase, Putative / Branched-Chain Alpha-Keto Acid Dehydrogenase E1 Alpha Subunit, Putative	
At5g07100	1.778	WRKY DNA-Binding Protein 26; Transcription Factor	WRKY26
At5g50335	1.765	Unknown Protein	
At1g77380	1.758	Amino Acid Permease 3; Amino Acid Permease	AAP3
At4g39675	1.741	Unknown Protein	
At5g39160	1.719	Germin-Like Protein (GLP2a) (GLP5a)	
At3g01970	1.707	WRKY DNA-Binding Protein 45; Transcription Factor	ATWRKY45
At5g57760	1.687		
At5g43440	1.673	2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase, Putative	
At5g53980	1.655	ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN 52; Transcription Factor	ATHB52
At3g29370	1.650	Similar To TAIR:AT5G39240.1	PIR3
At4g35770	1.637	Dark Inducible 1	ATSEN1
At2g41280	1.604	M10	ATM10
At3g50470	1.579	Homolog Of Rpw8 3	HR3
At5g22520	1.532	Similar To TAIR:AT5G22530.1	
At4g28850	1.532	Xyloglucan:Xyloglucosyl Transferase, Putative / Xyloglucan Endotransglycosylase, Putative / Endo-Xyloglucan Transferase, Putative	ATXTH26
At1g20520	1.515	Similar To TAIR:AT1G76210.1	
At2g43530	1.514	Trypsin Inhibitor, Putative	
At5g06570	1.505	Similar To TAIR:AT5G16080.1	
At5g49170	1.499	Similar To TAIR:AT3G06840.1	
At2g26020	1.492	PDF1.2b (Plant Defensin 1.2b)	PDF1.2b
At1g51620	1.490	Protein Kinase Family Protein	
At4g18250	1.483	Receptor Serine/Threonine Kinase, Putative	
At1g53890	1.483	Similar To TAIR:AT1G53870.2	
At2g44570	1.481	Glycosyl Hydrolase Family 9 Protein	AtGH9B12
At1g30135	1.460	Similar To TAIR:AT2G34600.1	JAZ8
At1g10070	1.451	ATBCAT-2; Catalytic	ATBCAT-2
At1g10340	1.431	Ankyrin Repeat Family Protein	
At1g53870	1.430		
At1g49860	1.430	Arabidopsis Thaliana Glutathione S-Transferase (Class Phi) 14; Glutathione Transferase	ATGSTF14
At3g01830	1.417	Calmodulin-Related Protein, Putative	
At1g24145	1.410	Unknown Protein	
At3g46080	1.373	Zinc Finger (C2H2 Type) Family Protein	
At5g03310	1.360	Auxin-Responsive Family Protein	
At5g39610	1.357	ANAC092/ATNAC2/ATNAC6 (Arabidopsis NAC Domain Containing Protein 92); Protein Heterodimerization/ Protein Homodimerization/ Transcription Factor	ANAC092
At3g26740	1.355	Ccr-Like	CCL
At4g22214	1.350	Encodes A Defensin-Like (DEFL) Family Protein.	
At5g44430	1.349	Plant Defensin 1.2c	PDF1.2c
At2g22860	1.347	ATPSK2 (PHYTOSULFOKINE 2 PRECURSOR); Growth Factor	ATPSK2
At4g23700	1.342	CATION/H+ EXCHANGER 17; Monovalent Cation:Proton Antiporter	ATCHX17
At2g43870	1.330	Polygalacturonase, Putative / Pectinase, Putative	
At5g19890	1.319	Peroxidase, Putative	
At2g39400	1.318	Hydrolase, Alpha/Beta Fold Family Protein	
At5g13220	1.318	Similar To TAIR:AT1G19180.1	JAS1
At2g17850	1.313	Similar To TAIR:AT5G66170.2	
At3g46090	1.308	Nucleic Acid Binding / Transcription Factor/ Zinc Ion Binding	ZAT7
At2g35730	1.297	Heavy-Metal-Associated Domain-Containing Protein	

At5g49590	1.295	Unknown Protein	
At4g34810	1.294	Auxin-Responsive Family Protein	
At3g23150	1.290	ETHYLENE RESPONSE 2; Receptor	ETR2
At1g69490	1.286	NAP (NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI); Transcription Factor	ANAC029
At3g55240	1.273	Similar To TAIR:AT3G28990.1	
At2g33380	1.268	RD20 (RESPONSIVE TO DESSICATION 20); Calcium Ion Binding	AtCLO3
At2g05510	1.267	Glycine-Rich Protein	
At4g36410	1.264	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 17; Ubiquitin-Protein Ligase	UBC17
At4g25860	1.263	Oxysterol-Binding Family Protein	ORP4A
At1g43160	1.261	Related To AP2 6; DNA Binding / Transcription Factor	RAP2.6
At1g75830	1.260	PDF1.1 (Low-Molecular-Weight Cysteine-Rich 67)	LCR67
At5g59070	1.260	Glycosyl Transferase Family 1 Protein	
At4g14130	1.241	XTR7 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7); Hydrolase, Acting On Glycosyl Bonds	XTH15
At1g53885	1.237	Senescence-Associated Protein-Related	
At2g16060	1.234	Ahb1 (Arabidopsis Hemoglobin 1)	AHB1
At4g28703	1.223	Similar To TAIR:AT3G04300.1	
At1g16370	1.221	Transporter-Related	ATOCT6
At2g26010	1.215	Plant Defensin 1.3	PDF1.3
At2g33810	1.212	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3; Transcription Factor	SPL3
At3g23250	1.211	Myb Domain Protein 15; DNA Binding	ATMYB15
At1g19610	1.209	PDF1.4 (Low-Molecular-Weight Cysteine-Rich 78)	LCR78
At1g77120	1.206	ALCOHOL DEHYDROGENASE 1; Alcohol Dehydrogenase	ADH
At4g32280	1.201	Indoleacetic Acid-Induced Protein 29; Transcription Factor	IAA29
At2g42850	1.198	Cytochrome P450, Family 718; Oxygen Binding	CYP718
At4g22210	1.182	Low-Molecular-Weight Cysteine-Rich 85	LCR85
At3g52340	1.182	SPP2; Sucrose-Phosphatase	ATSPP2
At1g70270	1.180	Contains Interpro Domain Helix-Loop-Helix DNA-Binding; (Interpro:IPR011598)	
At5g63270	1.169	Nitrate-Responsive NOI Protein, Putative	
At1g76410	1.165	Protein Binding / Zinc Ion Binding	ATL8
At4g36110	1.164	Auxin-Responsive Protein, Putative	
At5g55450	1.164	Protease Inhibitor/Seed Storage/Lipid Transfer Protein (LTP) Family Protein	
At1g27670	1.160	Similar To TAIR:AT1G75360.1	
At2g17660	1.159	Nitrate-Responsive NOI Protein, Putative	
At5g02020	1.152	Similar To TAIR:AT5G59080.1	SIS
At2g11810	1.151	Monogalactosyldiacylglycerol Synthase Type C; 1,2-Diacylglycerol 3-Beta-Galactosyltransferase	ATMGD3
At5g51390	1.138	Unknown Protein	
At5g02540	1.134	Short-Chain Dehydrogenase/Reductase (SDR) Family Protein	
At3g22460	1.132	Cysteine Synthase, Putative / O-Acetylserine (Thiol)-Lyase, Putative / O-Acetylserine Sulfhydrylase, Putative	OASA2
At2g44080	1.124	Argos-Like	ARL
At3g51660	1.120	Macrophage Migration Inhibitory Factor Family Protein / MIF Family Protein	
At4g31875	1.112	Contains Domain (Trans)Glycosidases (SSF51445)	
At1g76210	1.112	Similar To TAIR:AT1G20520.1	
At1g24575	1.108	Unknown Protein	
At3g57260	1.105	PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2; Glucan 1,3-Beta-Glucosidase/ Hydrolase, Hydrolyzing O-Glycosyl Compounds	BG2
At4g26070	1.103	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1; MAP Kinase Kinase/ Kinase	ATMEK1
At4g23170	1.100	EP1; Protein Kinase	CRK9
At3g48970	1.095	Copper-Binding Family Protein	

At5g02600	1.094	Heavy-Metal-Associated Domain-Containing Protein	NAKR1
At5g16410	1.089	Transferase Family Protein	
At1g56060	1.088	Similar To TAIR:AT2G32190.1	
At5g44390	1.077	FAD-Binding Domain-Containing Protein	
At1g76590	1.077	Zinc-Binding Family Protein	
At1g15040	1.061	Glutamine Amidotransferase-Related	
At5g28610	1.060	Similar To TAIR:AT5G28630.1	
At3g60520	1.056	Zinc Ion Binding	
At4g11890	1.056	Protein Kinase Family Protein	
At4g21400	1.051	Protein Kinase Family Protein	CRK28
At2g29090	1.048	Cytochrome P450, Family 707, Subfamily A, Polypeptide 2; Oxygen Binding	CYP707A2
At1g12010	1.047	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase, Putative / ACC Oxidase, Putative	
At1g30757	1.046	Unknown Protein	
At2g22880	1.046	VQ Motif-Containing Protein	
At3g13435	1.046	Unknown Protein	
At5g46295	1.040	Similar To TAIR:AT1G06475.1	
At3g55840	1.036	Similar To TAIR:AT2G40000.1	
At2g48090	1.032	Unknown Protein	
At5g52750	1.030	Heavy-Metal-Associated Domain-Containing Protein	
At3g53250	1.027	Auxin-Responsive Family Protein	
At3g20340	1.027	Similar To TAIR:AT4G21920.1	
At5g02750	1.027	Zinc Finger (C3HC4-Type RING Finger) Family Protein	SGR9
At2g20080	1.023	Similar To TAIR:AT4G28840.1	
At5g46330	1.022	FLAGELLIN-SENSITIVE 2; ATP Binding / Kinase/ Protein Binding / Protein Serine/Threonine Kinase/ Transmembrane Receptor Protein Serine/Threonine Kinase	FLS2
At5g54530	1.021	Similar To TAIR:AT1G61667.1	
At1g13430	1.020	Sulfotransferase Family Protein	ATST4C
At2g07739	1.018	Identical To Hypothetical Mitochondrial Protein Atmg00370	
At2g40113	1.018	Similar To TAIR:AT5G47635	
At4g39890	1.018	AtRabH1c (Arabidopsis Rab Gtpase Homolog H1c); GTP Binding	AtRABH1c
At1g07985	1.013	Similar To Expressed Protein [Oryza Sativa (Japonica Cultivar-Group)] (GB:ABF97687.1)	
At5g42530	1.008	Similar To TAIR:AT1G31580.1	
<hr/>			
		+Cu	
At2g29350	4.705	Senescence-Associated Gene 13; Oxidoreductase	SAG13
At2g14610	4.633	Pathogenesis-Related Gene 1	ATPR1
At3g60140	3.815	DIN2 (DARK INDUCIBLE 2); Hydrolase, Hydrolyzing O- Glycosyl Compounds	BGLU30
At1g61800	3.371	Glucose-6-Phosphate/Phosphate Translocator 2; Antiporter/ Glucose-6-Phosphate Transporter	ATGPT2
At1g47395	3.318	Similar To TAIR:AT1G47400.1	
At2g38340	3.248	AP2 Domain-Containing Transcription Factor, Putative (DRE2B)	DREB19
At5g26220	3.189	Chac-Like Family Protein	
At5g13210	3.166	Similar To TAIR:AT3G24780.1; TAIR:AT5G43400.1; TAIR:AT5G43390.1	
At2g44460	3.037	Glycosyl Hydrolase Family 1 Protein	BGLU28
At1g23730	3.018	Carbonic Anhydrase, Putative / Carbonate Dehydratase, Putative	ATBCA3
At4g12735	2.971	Unknown Protein	
At3g49580	2.950	Similar To TAIR:AT3G49570.1	LSU1
At2g38823	2.921	Similar To TAIR:AT3G54520.1	
At2g41240	2.914	Basic Helix-Loop-Helix (Bhlh) Family Protein	BHLH100
At2g04070	2.825	MATE Efflux Family Protein	
At1g12030	2.740	Similar To TAIR:AT1G62420.1	

At5g17220	2.659	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 26; Glutathione Transferase	ATGSTF12
At5g48850	2.657	Male Sterility MS5 Family Protein	ATSDI1
At2g20800	2.634	NAD(P)H DEHYDROGENASE B4; NADH Dehydrogenase	NDB4
At2g18190	2.612	AAA-Type Atpase Family Protein	
At2g21640	2.584	Similar To TAIR:AT3G05570.1; TAIR:AT4G39235.1	
At2g14620	2.577	Xyloglucan:Xyloglucosyl Transferase, Putative / Xyloglucan Endotransglycosylase, Putative / Endo-Xyloglucan Transferase, Putative	XTH10
At4g04490	2.531	Protein Kinase Family Protein	CRK36
At3g08860	2.528	Alanine--Glyoxylate Aminotransferase, Putative / Beta- Alanine-Pyruvate Aminotransferase, Putative / AGT, Putative	PYD4
At2g04050	2.525	MATE Efflux Family Protein	
At3g56980	2.523	ORG3 (OBP3-Responsive Gene 3); DNA Binding / Transcription Factor	BHLH039
At1g05680	2.510	UDP-Glucuronosyl/UDP-Glucosyl Transferase Family Protein	UGT74E2
At1g47400	2.466	Similar To TAIR:AT1G47395.1	
At3g22370	2.463	Alternative Oxidase 1A; Alternative Oxidase	AOX1A
At2g41730	2.456	Similar To TAIR:AT5G24640.1	
At3g56970	2.453	ORG2 (OBP3-Responsive Gene 2); DNA Binding / Transcription Factor	BHLH038
At2g18193	2.436	AAA-Type Atpase Family Protein	
At3g25180	2.427	Cytochrome P450, Family 82, Subfamily G, Polypeptide 1; Oxygen Binding	CYP82G1
At3g13080	2.417	ATMRP3 (Arabidopsis Thaliana Multidrug Resistance- Associated Protein 3)	ABCC3
At1g17180	2.407	Arabidopsis Thaliana Glutathione S-Transferase (Class Tau) 25; Glutathione Transferase	ATGSTU25
At5g42800	2.355	DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE; Dihydrokaempferol 4-Reductase	DFR
At5g24200	2.349	Triacylglycerol Lipase	
At3g50610	2.334	Similar To TAIR:AT1G59835.1	
At3g13950	2.292	Similar To TAIR:AT4G13266.1 (GB:ABE80572.1)	
At5g62480	2.273	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 9; Glutathione Transferase	ATGSTU9
At2g26560	2.240	PLP2 (PHOSPHOLIPASE A 2A); Nutrient Reservoir	PLA IIA
At1g43910	2.205	Protein Phosphatase 2C, Putative / PP2C, Putative	
At1g02470	2.202	Similar To TAIR:AT1G02475.1	
At5g24640	2.191	Similar To TAIR:AT2G41730.1	
At4g21680	2.177	Proton-Dependent Oligopeptide Transport (POT) Family Protein	NRT1.8
At2g36790	2.175	UDP-Glucosyl Transferase 73C6; UDP-Glucosyltransferase/ UDP-Glycosyltransferase/ Transferase, Transferring Glycosyl Groups	UGT73C6
At3g05400	2.167	Sugar Transporter, Putative	
At5g04150	2.152	Basic Helix-Loop-Helix (Bhlh) Family Protein	BHLH101
At1g21520	2.149	Unknown Protein	
At4g37370	2.145	Cytochrome P450, Family 81, Subfamily D, Polypeptide 8; Oxygen Binding	CYP81D8
At3g01600	2.136	Arabidopsis NAC Domain Containing Protein 44; Transcription Factor	anac044
At4g32810	2.106	Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8	ATCCD8
At3g29250	2.101	Oxidoreductase	
At5g22460	2.092	Esterase/Lipase/Thioesterase Family Protein	
At1g32350	2.065	ALTERNATIVE OXIDASE 1D; Alternative Oxidase	AOX1D
At2g36800	2.055	DON-GLUCOSYLTRANSFERASE; UDP- Glycosyltransferase/ Transferase, Transferring Glycosyl Groups	DOGT1
At3g29970	2.033	Germination Protein-Related	

At3g59450	2.029	Calcium-Binding EF Hand Family Protein	
At1g68765	2.019	Inflorescence Deficient In Abscission	IDA
At1g52315	2.003	Similar To TAIR:AT1G79910.1	
At2g47190	1.989	Myb Domain Protein 2; DNA Binding / Transcription Factor	ATMYB2
At3g04070	1.987	Arabidopsis NAC Domain Containing Protein 47; Transcription Factor	anac047
At2g02990	1.940	RIBONUCLEASE 1; Endoribonuclease	ATRNS1
At5g18270	1.921		ANAC087
At2g08986	1.911		
At3g24780	1.893	Similar To TAIR:AT5G13210.1; TAIR:AT5G43400.1; TAIR:AT5G43390.1	
At5g53450	1.893	OBP3-RESPONSIVE GENE 1; Kinase	ORG1
At2g36780	1.893	UDP-Glucuronosyl/UDP-Glucosyl Transferase Family Protein	
At2g03230	1.889	Similar To TAIR:AT1G14060.1	
At1g66700	1.889	S-Adenosyl-L-Methionine:Carboxyl Methyltransferase Family Protein	PXMT1
At4g05370	1.876	Similar To TAIR:AT1G43910.1	
At4g05380	1.875	AAA-Type Atpase Family Protein	
At2g03760	1.867	ST (Steroid Sulfotransferase); Sulfotransferase	AtSOT1
At3g03270	1.867	Universal Stress Protein (USP) Family Protein / Early Nodulin ENOD18 Family Protein	
At5g27760	1.857	Hypoxia-Responsive Family Protein	
At4g23990	1.845	Cellulose Synthase-Like G3; Transferase/ Transferring Glycosyl Groups	ATCSLG3
At5g07550	1.837	GRP19 (Glycine Rich Protein 19)	ATGRP19
At5g33290	1.820	XYLOGALACTURONAN DEFICIENT 1; Catalytic	XGD1
At3g21720	1.812	Isocitrate Lyase, Putative	ICL
At4g36700	1.798	Cupin Family Protein	
At2g30770	1.795	Cytochrome P450, Family 71, Subfamily A, Polypeptide 13; Oxygen Binding	CYP71A13
At5g40770	1.785	Prohibitin 3	ATPHB3
At3g49570	1.785	Similar To TAIR:AT5G24660.1	LSU3
At1g74010	1.779	Strictosidine Synthase Family Protein	
At3g13130	1.767	Similar To TAIR:AT2G04515.1	
At5g43450	1.766	2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase, Putative	
At2g36750	1.757	UGT72C1 (UDP-Glucosyl Transferase 72C1); UDP- Glycosyltransferase/ Transferase, Transferring Glycosyl Groups	UGT73C1
At4g37290	1.746	Similar To TAIR:AT2G23270.1	
At5g54560	1.743	Similar To TAIR:AT5G54550.1	
At2g35480	1.742	Similar To TAIR:AT1G32260.1	
At2g25625	1.739	Similar To Os05g0575000 Group	
At4g08555	1.738	Unknown Protein	
At5g07610	1.731	F-Box Family Protein	
At5g07600	1.730	Oleosin / Glycine-Rich Protein	
At3g56730	1.727	Similar To TAIR:AT3G62050.1	
At4g22870	1.725	Leucoanthocyanidin Dioxygenase, Putative / Anthocyanidin Synthase, Putative	
At3g45730	1.724	Unknown Protein	
At1g24580	1.719	Zinc Finger (C3HC4-Type RING Finger) Family Protein	
At4g37990	1.711	Eli3-2 (Elicitor-Activated Gene 3)	ATCAD8
At3g28210	1.703	Zinc Ion Binding	PMZ
At3g46070	1.692	Zinc Finger (C2H2 Type) Family Protein	
At3g21500	1.689	1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase	DXPS1
At2g47780	1.689	Rubber Elongation Factor (REF) Protein-Related	
At5g57730	1.682	Unknown Protein	
At2g40340	1.676	AP2 Domain-Containing Transcription Factor, Putative (DRE2B)	AtERF48
At1g29640	1.674	Similar To TAIR:AT2G34340.1	

At2g18600	1.672	RUB1-Conjugating Enzyme, Putative	
At3g25655	1.669	Unknown Protein	IDL1
At5g24660	1.664	Similar To TAIR:AT5G24655.1	LSU2
At3g58270	1.659	Meprin And TRAF Homology Domain-Containing Protein / MATH Domain-Containing Protein	
At5g06190	1.659	Similar To TAIR:AT3G58540.1	
At4g05020	1.658	NAD(P)H DEHYDROGENASE B2; Disulfide Oxidoreductase	NDB2
At2g26400	1.658	ARD/ATARD3 (ACIREDUCTONE DIOXYGENASE); Acireductone Dioxygenase (Fe ²⁺ -Requiring)/ Heteroglycan Binding / Metal Ion Binding	ARD
At1g54575	1.651	Unknown Protein	
At4g35180	1.650	LYS/HIS TRANSPORTER 7; Amino Acid Permease	LHT7
At2g27840	1.649	HDT4 (Histone Deacetylase 13)	HDA13
At4g05136	1.641	Similar To TAIR:AT3G52410.1	
At1g56650	1.635	PAP1 (PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1); DNA Binding / Transcription Factor	ATMYB75
At3g55620	1.634	EMB1624 (EMBRYO DEFECTIVE 1624); Translation Initiation Factor	eIF6A
At5g37600	1.629	ATGSR1 (Arabidopsis Thaliana Glutamine Synthase Clone R1); Glutamate-Ammonia Ligase	ATGLN1;1
At3g57380	1.629	Similar To TAIR:AT2G41640.1	
At5g67510	1.623	60S Ribosomal Protein L26 (RPL26B)	
At2g14247	1.620	Unknown Protein	
At1g26390	1.616	FAD-Binding Domain-Containing Protein	
At2g03770	1.612	Sulfotransferase Family Protein	
At2g43510	1.596	Arabidopsis Thaliana Trypsin Inhibitor Protein 1	ATTI1
At1g14720	1.595	XTR2 (XYLOGLUCAN ENDOTRANGLYCOSYLASE RELATED 2); Hydrolase, Acting On Glycosyl Bonds	ATXTH28
At1g32870	1.593	Arabidopsis NAC Domain Containing Protein 13; Transcription Factor	ANAC013
At2g04460	1.590	Similar To TAIR:AT2G10090.1	
At2g07981	1.590	Similar To TAIR:AT2G08986.1	
At3g23120	1.589	Leucine-Rich Repeat Family Protein	AtRLP38
At3g11580	1.589	DNA-Binding Protein, Putative	
At3g54150	1.585	Embryo-Abundant Protein-Related	
At1g73805	1.583	Calmodulin-Binding Protein	SARD1
At2g23270	1.564	Similar To TAIR:AT4G37290.1	
At2g35070	1.560	Similar To TAIR:AT2G35090.1	
At3g63380	1.560	Calcium-Transporting Atpase, Plasma Membrane-Type, Putative / Ca ²⁺ -Atpase, Putative (ACA12)	
At4g37570	1.556	Similar To TAIR:AT3G52410.1	
At1g69930	1.549	Arabidopsis Thaliana Glutathione S-Transferase (Class Tau) 11; Glutathione Transferase	ATGSTU11
At5g53420	1.547	Similar To TAIR:AT4G27900.2	
At1g26400	1.530	FAD-Binding Domain-Containing Protein	
At2g43570	1.527	Chitinase, Putative	CHI
At5g39520	1.513	Similar To TAIR:AT5G39530.1	
At1g52855	1.510	Similar To TAIR:AT2G20835.1	
At2g36770	1.509	UDP-Glucuronosyl/UDP-Glucosyl Transferase Family Protein	
At5g39850	1.504	40S Ribosomal Protein S9 (RPS9C)	
At3g52410	1.494	Similar To TAIR:AT5G36010.1	
At1g31760	1.473	SWIB Complex BAF60b Domain-Containing Protein	
At5g54100	1.465	Band 7 Family Protein	
At3g04410	1.463	Transcription Factor	
At4g21215	1.456	Similar To Hypothetical Protein Mtdraft_AC123975g8v1 [Medicago Truncatula] (GB:ABE84749.1)	
At5g47880	1.456	EUKARYOTIC RELEASE FACTOR 1-1) Translation Release Factor	ERF1-1

At2g20720	1.452	Pentatricopeptide (PPR) Repeat-Containing Protein	
At3g57440	1.446	Unknown Protein	
At4g22880	1.445	Ldox (Tannin Deficient Seed 4)	ANS
At3g27060	1.443	TSO2 (TSO2); Ribonucleoside-Diphosphate Reductase	ATTSO2
At1g26380	1.441	FAD-Binding Domain-Containing Protein	
At3g46280	1.436	Protein Kinase-Related	
At5g60520	1.433	EDA38 (Embryo Sac Development Arrest 38); Selenium Binding	
At1g67760	1.427	ATP Binding / Protein Binding / Unfolded Protein Binding	
At5g40690	1.418	Similar To Unknown Protein [Arabidopsis Thaliana] (TAIR:AT2G41730.1)	
At1g19210	1.418	AP2 Domain-Containing Transcription Factor, Putative	
At2g28820	1.416	Structural Constituent Of Ribosome	
At2g43660	1.416	Glycosyl Hydrolase Family Protein 17	
At2g43660	1.416	Glycosyl Hydrolase Family Protein 17	
At4g17670	1.411	Senescence-Associated Protein-Related	
At5g17760	1.411	AAA-Type Atpase Family Protein	
At4g01610	1.408	Cathepsin B-Like Cysteine Protease, Putative	
At4g01610	1.408	Cathepsin B-Like Cysteine Protease, Putative	
At3g28010	1.400	Similar To TAIR:AT5G38037.1	
At2g24762	1.397	Similar To TAIR:AT4G31730.1	AtGDU4
At1g17960	1.395	Threonyl-Trna Synthetase, Putative / Threonine--Trna Ligase, Putative	
At3g06600	1.393	Unknown Protein	
At3g08590	1.391	2,3-Biphosphoglycerate-Independent Phosphoglycerate Mutase, Putative / Phosphoglyceromutase, Putative	
At1g52890	1.389	Arabidopsis NAC Domain Containing Protein 19; Transcription Factor	ANAC019
At1g29290	1.387	Similar To Hypothetical Protein Mtdraft_AC152407g2v1	
At3g44300	1.386	Nitrilase 2	AtNIT2
At4g09600	1.385	Gast1 Protein Homolog 3	GASA3
At3g51860	1.384	Cation Exchanger 3; Cation:Cation Antiporter	ATCAX3
At3g61630	1.375	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 6; DNA Binding / Transcription Factor	CRF6
At3g04320	1.368	Endopeptidase Inhibitor	
At3g25250	1.361	OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1; Kinase	AGC2
At5g27420	1.359	Zinc Finger (C3HC4-Type RING Finger) Family Protein	ATL31
At3g18290	1.358	EMBRYO DEFECTIVE 2454) Protein Binding / Zinc Ion Binding	BTS
At3g27630	1.354	Similar To TAIR:AT5G40460.1	
At2g16700	1.352	ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 5; Actin Binding	ADF5
At1g76960	1.348	Unknown Protein	
At3g28510	1.347	AAA-Type Atpase Family Protein	
At3g16565	1.342	ATP Binding / Alanine-Trna Ligase	
At3g25882	1.341	Nim1-Interacting 2	NIMIN-2
At5g59220	1.341	Protein Phosphatase 2C, Putative / PP2C, Putative	HAI1
At3g30160	1.340	Similar To TAIR:AT1G35320.1	
At5g24980	1.337	Similar To TAIR:AT5G10745.1	
At1g26420	1.328	FAD-Binding Domain-Containing Protein	
At5g14730	1.322	Similar To TAIR:AT3G01513.1	
At5g02780	1.302	In2-1 Protein, Putative	GSTL1
At1g64490	1.296	Similar To TAIR:AT5G42060.1	
At3g26830	1.292	PAD3 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 3); Oxygen Binding	CYP71B15
ath-MIR395e	1.292		
At3g04420	1.292	Arabidopsis NAC Domain Containing Protein 48; Transcription Factor	anac048
At1g60730	1.287	Aldo/Keto Reductase Family Protein	
At2g23110	1.282	Similar To TAIR:AT2G23120.1	
At4g26460	1.280	Similar To GAMT1, S-Adenosylmethionine-Dependent	

		Methyltransferase/ Gibberellin Carboxyl-O-Methyltransferase [Arabidopsis Thaliana] (TAIR:AT4G26420.1)	
At2g44070	1.280	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Family Protein / Eif-2B Family Protein	
At2g47010	1.275	Similar To TAIR:AT1G17030.1	
At1g01810	1.272	Unknown Protein	
At1g77655	1.258	Unknown Protein	
At1g02750	1.257	Similar To TAIR:AT4G02200.1	
At2g14580	1.255	Arabidopsis Thaliana Basic Pathogenesis-Related Protein 1	ATPRB1
At1g54530	1.252	Calcium-Binding EF Hand Family Protein	
At2g43610	1.245	Glycoside Hydrolase Family 19 Protein	
At1g07900	1.240	LOB Domain Protein 1 / Lateral Organ Boundaries Domain Protein 1	LBD1
At5g11780	1.238	Similar To GB:BAD53434.1	
At1g23020	1.237	FERRIC REDUCTION OXIDASE 3; Ferric-Chelate Reductase	ATFRO3
At5g03860	1.235	Malate Synthase, Putative	MLS
At3g44040	1.234	MATE Efflux Protein-Related	
At4g09210	1.234	Similar To TAIR:AT4G09260.1	
At5g22800	1.229	Aminoacyl-Trna Synthetase Family Protein	EMB1030
At3g44350	1.227	Arabidopsis NAC Domain Containing Protein 61; Transcription Factor	anac061
At1g65370	1.225	Meprin And TRAF Homology Domain-Containing Protein / MATH Domain-Containing Protein	
At5g61160	1.223	ANTHOCYANIN 5-AROMATIC ACYLTRANSFERASE 1; Transferase	AACT1
At3g18250	1.223	Unknown Protein	
At1g02920	1.214	ATGSTF7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 11); Glutathione Transferase	ATGST11
At3g23605	1.213	UBX Domain-Containing Protein	
At1g27020	1.208	Similar To TAIR:AT1G27030.1	
At3g10930	1.207	Unknown Protein	
At1g02220	1.206	Arabidopsis NAC Domain Containing Protein 3; Transcription Factor	ANAC003
At3g44010	1.203	40S Ribosomal Protein S29 (RPS29B)	
At1g36640	1.201	Similar To TAIR:AT1G36622.1	
At1g51850	1.199	Leucine-Rich Repeat Protein Kinase, Putative	
At1g13330	1.192	Similar To TAIR:AT3G28770.1	AHP2
At2g02850	1.190	ARPN (PLANTACYANIN); Copper Ion Binding	ARPN
At1g66380	1.189	Myb Domain Protein 114; DNA Binding / Transcription Factor	AtMYB114
At1g23550	1.184	SIMILAR TO RCD ONE 2; NAD+ ADP-Ribosyltransferase	SRO2
At5g13320	1.180	Pbs3 (Avrpphb Susceptible 3)	GDG1
At3g47965	1.174	Unknown Protein	
At3g18610	1.172	ATRANGAP1 (RAN GTPASE-ACTIVATING PROTEIN 1); Nucleic Acid Binding	ATNUC-L2
At4g09260	1.170	Similar To TAIR:AT4G09210.1	
At4g01430	1.166	Nodulin Mtn21 Family Protein	
At4g01430	1.166	Nodulin Mtn21 Family Protein	
At1g61580	1.165	ARABIDOPSIS RIBOSOMAL PROTEIN 2; Structural Constituent Of Ribosome	ARP2
At1g61930	1.161	Similar To TAIR:AT1G11700.1	
At1g52905	1.161	Similar To TAIR:AT1G27565.1	
At5g20160	1.156	Ribosomal Protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 Family Protein	
At5g14930	1.155	Senescence-Associated Gene 101	SAG101
At1g26470	1.153	Similar To Os05g0512500	
At5g05250	1.153	Similar To TAIR:AT3G56360.1	
At2g03130	1.148	Ribosomal Protein L12 Family Protein	
At2g42660	1.147	Myb Family Transcription Factor	
At2g32220	1.136	60S Ribosomal Protein L27 (RPL27A)	

At1g61450	1.132	Similar To Os05g0275600	
At3g57860	1.127	(UV-B-INSENSITIVE 4-LIKE); Unknown Protein	OSD1
At4g15910	1.126	ATDI21 (Arabidopsis Thaliana Drought-Induced 21)	ATDI21
At1g76470	1.125	Cinnamoyl-Coa Reductase	
At3g14060	1.125	Similar To TAIR:AT1G54120.1	
At3g07590	1.118	Small Nuclear Ribonucleoprotein D1, Putative / Snrnp Core Protein D1, Putative / Sm Protein D1, Putative	
At3g10110	1.117	Maternal Effect Embryo Arrest 67; Protein Translocase	MEE67
At4g04620	1.116	AUTOPHAGY 8B; Microtubule Binding	ATG8B
At5g11100	1.114	C2 Domain-Containing Protein	ATSYTD
At2g14460	1.111	Unknown Protein	
At5g42830	1.108	Transferase Family Protein	
At5g53690	1.107	Unknown Protein	
At5g01540	1.107	Lectin Protein Kinase, Putative	LECRKA4.1
At3g57490	1.106	40S Ribosomal Protein S2 (RPS2D)	
At5g09270	1.102	Similar To Conserved Hypothetical Protein [Medicago Truncatula] (GB:ABE83174.1)	
At3g44320	1.101	Nit3 (Nitrilase 3)	AtNIT3
At5g58570	1.097		
At2g42310	1.096	Similar To TAIR:AT3G57785.1);	
At4g38100	1.095	Threonine Endopeptidase	
At2g30140	1.089	UDP-Glucuronosyl/UDP-Glucosyl Transferase Family Protein	
At5g64810	1.088	WRKY DNA-Binding Protein 51; Transcription Factor	ATWRKY51
At3g05937	1.087	Similar To TAIR:AT5G26731.1	
At2g44840	1.086	ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 13; DNA Binding / Transcription Factor	ATERF13
At4g02380	1.085	Sag21 (Senescence-Associated Gene 21)	ATLEA5
At3g03470	1.084	Cytochrome P450, Family 87, Subfamily A, Polypeptide 9; Oxygen Binding	CYP89A9
At2g17040	1.076	Arabidopsis NAC Domain Containing Protein 36; Transcription Factor	anac036
At1g30475	1.075	Similar To TAIR:AT1G56200.1	
At1g69790	1.075	Protein Kinase, Putative	
At3g61990	1.072	O-Methyltransferase Family 3 Protein	OMTF3
At2g42790	1.068	CITRATE SYNTHASE 3; Citrate (SI)-Synthase	CSY3
At5g62960	1.067	Similar To TAIR:AT1G10660.1	
At4g14310	1.066	Similar To TAIR:AT2G22795.1	
At5g57720	1.063	Transcriptional Factor B3 Family Protein	
At5g37660	1.062	Receptor-Like Protein Kinase-Related	PDLP7
At1g68200	1.060	Zinc Finger (CCCH-Type) Family Protein	
At3g55890	1.059	Yippee Family Protein	
At5g13080	1.051	WRKY DNA-Binding Protein 75; Transcription Factor	ATWRKY75
At1g49910	1.048	WD-40 Repeat Family Protein / Mitotic Checkpoint Protein, Putative	BUB3.2
At1g44130	1.048	Nucellin Protein, Putative	
At4g28460	1.045	Unknown Protein	
At2g33793	1.044	Similar To TAIR:AT2G46980.2	
At1g09815	1.043	DNA Polymerase Delta Subunit 4 Family	POLD4
At1g56045	1.041	Ribosomal Protein L41 Family Protein	
At3g43680	1.041	Similar To TAIR:AT3G60930.1	
At2g21870	1.039	Identical To Probable ATP Synthase 24 Kda Subunit, Mitochondrial Precursor (EC 3.6.3.14)	MGP1
At1g20350	1.039	Arabidopsis Thaliana Translocase Inner Membrane Subunit 17-1; Protein Translocase	ATTIM17-1
At4g28450	1.035	Transducin Family Protein / WD-40 Repeat Family Protein	
At4g20000	1.035	VQ Motif-Containing Protein	
At1g73965	1.034	CLAVATA3/ESR-RELATED 13; Receptor Binding	CLE13
At4g37870	1.031	ATP Binding / Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (ATP)	PCK1

At3g50910	1.030	Similar To TAIR:AT5G66480.1	
At4g31290	1.028	Chac-Like Family Protein	
At2g29490	1.021	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 19; Glutathione Transferase	ATGSTU1
At4g02390	1.017	ARABIDOPSIS POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE; NAD+ ADP-Ribosyltransferase	APP
At1g77840	1.016	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5, Putative / Eif-5, Putative	
At3g09020	1.016	Alpha 1,4-Glycosyltransferase Family Protein / Glycosyltransferase Sugar-Binding DXD Motif-Containing Protein	
At3g53040	1.014	Late Embryogenesis Abundant Protein, Putative / LEA Protein, Putative	
At2g29460	1.012	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 22; Glutathione Transferase	ATGSTU4
At4g26200	1.012	1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate Synthase 7; 1- Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase	ACS7
At2g45490	1.003	ATAURORA3; ATP Binding / Histone Serine Kinase(H3- S10 Specific) / Protein Kinase	AtAUR3
At5g19300	1.001	Similar To Os04g0244500	

Tabla R.A4. Genes reprimidos en plántulas COPT1^{OE}. Se indican el código MIPS, el valor \log_2 ratio de $\geq |1|$ de las micromatrices en condiciones -Cu y +Cu, la anotación génica y el nombre del gen.

Código MIPS	Ratio	Anotación génica	Nombre gen
	-Cu/ +Cu		
At4g19690	-1.736/ -1.775	Iron-Regulated Transporter 1	ATIRT1
At3g28270	-1.621/ -1.782	Similar To TAIR:AT3G28290.1; TAIR:AT3G28300.1	
	-Cu		
At2g27420	-2.442	Cysteine Proteinase, Putative	
At1g69070	-1.872	Similar To TAIR:AT3G28770.1	
At3g28345	-1.819	ABC Transporter Family Protein	ABCB15
At4g17090	-1.727	CT-BMY (BETA-AMYLASE 8); Beta-Amylase	BAM3
At2g42540	-1.644	Cor15a (Cold-Regulated 15a)	COR15
At5g03090	-1.618	Similar To TAIR:AT1G53480.1	
At3g58810	-1.585	MTPA2; Efflux Permease/ Zinc Ion Transporter	ATMTP3
At1g13650	-1.373	Similar To TAIR:AT2G03810.3	
At1g05680	-1.266	UDP-Glucuronosyl/UDP-Glucosyl Transferase Family Protein	UGT74E2
At1g29660	-1.257	GDSL-Motif Lipase/Hydrolase Family Protein	
At5g13170	-1.228	Nodulin Mtn3 Family Protein	AtSWEET15
At3g21720	-1.204	Isocitrate Lyase, Putative	ICL
At2g28290	-1.198	Syd (Splayed)	CHR3
At2g23000	-1.150	SCPL10 (Serine Carboxypeptidase-Like 10); Serine Carboxypeptidase	scpl10
At1g54040	-1.082	Epithiospecifier Protein	ESP
At1g69200	-1.033	Pfkb-Type Carbohydrate Kinase Family Protein	FLN2
At3g01550	-1.018	Triose Phosphate/Phosphate Translocator, Putative	ATPPT2
At5g35970	-1.004	DNA-Binding Protein, Putative	
	+Cu		
At4g26530	-3.344	Fructose-Bisphosphate Aldolase	
At4g31940	-2.586	Cytochrome P450, Family 82, Subfamily C, Polypeptide 4; Oxygen Binding	CYP82C4
At5g51720	-2.306	Similar To Zinc Finger, CDGSH-Type Domain 2	
At4g37410	-2.179	Cytochrome P450, Family 81, Subfamily F, Polypeptide 4; Oxygen Binding	CYP81F4
At1g66100	-2.171	Thionin, Putative	
At5g01600	-2.166	Ferretin 1; Ferric Iron Binding	ATFER1
At2g01520	-2.153	Major Latex Protein-Related / MLP-Related	MLP328
At3g25820	-2.071	#N/A	ATTPS-CIN
At4g11320	-2.020	Cysteine Proteinase, Putative	
At3g25830	-1.978	TERPENE SYNTHASE-LIKE SEQUENCE-1,8-CINEOLE; Myrcene/(E)-Beta-Ocimene Synthase	ATTPS-CIN
At5g37990	-1.917	S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferase	
At2g38390	-1.890	Peroxidase, Putative	
At1g64780	-1.809	AMMONIUM TRANSPORTER 1;2; Ammonium Transporter	AMT1;2
At2g13360	-1.790	Alanine:Glyoxylate Aminotransferase	AGT
At3g27690	-1.780	Photosystem II Light Harvesting Complex Gene 2.3; Chlorophyll Binding	LHCB2
At3g21055	-1.757	PSBTN (Photosystem II Subunit T)	PSBTN
At1g67870	-1.736	Glycine-Rich Protein	
At1g73330	-1.678	Arabidopsis Thaliana Drought-Repressed 4	ATDR4
At2g32870	-1.665	Meprin And TRAF Homology Domain-Containing Protein / MATH Domain-Containing Protein	
At3g01500	-1.664	CARBONIC ANHYDRASE 1; Carbonate Dehydratase/ Zinc Ion Binding	ATBCA1

At5g14740	-1.648	Beta Carbonic Anhydrase 2	BETA CA2
At4g12545	-1.630	Protease Inhibitor/Seed Storage/Lipid Transfer Protein (LTP) Family Protein	
At4g37580	-1.613	HLS1 (HOOKLESS 1); N-Acetyltransferase	COP3
At2g40170	-1.612	Arabidopsis Early Methionine-Labelled 6	ATEM6
At5g37690	-1.528	GDSL-Motif Lipase/Hydrolase Family Protein	
At4g23290	-1.521	Protein Kinase Family Protein	CRK21
At4g12550	-1.497	Auxin-Induced In Root Cultures 1; Lipid Binding	AIR1
At1g19150	-1.493	LHCA6 (Photosystem I Light Harvesting Complex Gene 6); Chlorophyll Binding	LHCA2*1
At1g68110	-1.492	Epsin N-Terminal Homology (ENTH) Domain-Containing Protein / Clathrin Assembly Protein-Related	
At1g62510	-1.490	Protease Inhibitor/Seed Storage/Lipid Transfer Protein (LTP) Family Protein	
At5g17170	-1.490	Rubredoxin Family Protein	ENH1
At1g58290	-1.462	Glutamyl-Trna Reductase	AtHEMA1
At1g03190	-1.461	UVH6 (ULTRAVIOLET HYPERSENSITIVE 6); ATP Binding / ATP-Dependent DNA Helicase/ ATP-Dependent Helicase/ DNA Binding / Hydrolase, Acting On Acid Anhydrides, In Phosphorus-Containing Anhydrides / Nucleic Acid Binding	ATXPD
At3g26570	-1.456	PHT2;1 (Phosphate Transporter 2;1)	ORF02
At2g34620	-1.438	Mitochondrial Transcription Termination Factor-Related / Mterf-Related	
At4g28250	-1.430	Arabidopsis Thaliana Expansin B3	ATEXPB3
At2g25080	-1.420	GLUTATHIONE PEROXIDASE 1; Glutathione Peroxidase	ATGPX1
At1g03130	-1.420	Photosystem I Subunit D-2	PSAD-2
At3g63140	-1.409	RANGAP1 (RAN GTPASE ACTIVATING PROTEIN 1); RAN Gtpase Activator	CSP41A
At3g62030	-1.385	ROC4 (Rotamase Cyp 4); Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase	CYP20-3
At1g70850	-1.374	Mlp-Like Protein 34	MLP34
At2g05540	-1.370	Glycine-Rich Protein	
At5g09530	-1.362	Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Family Protein	PELPK1
At4g33010	-1.358	Glycine Dehydrogenase (Decarboxylating), Putative / Glycine Decarboxylase, Putative / Glycine Cleavage System P-Protein, Putative	AtGLDP1
At3g59400	-1.358	Genomes Uncoupled 4	GUN4
At1g65230	-1.344	Similar To Mtrdraft_AC148171g2v1	
At1g45201	-1.343	Triacylglycerol Lipase	ATLL1
At2g40100	-1.342	LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII; Chlorophyll Binding	LHCB4.3
At5g45820	-1.331	CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 20; Kinase	CIPK20
At1g52870	-1.325	Peroxisomal Membrane Protein-Related	
At3g61870	-1.315	Similar To Conserved Hypothetical Protein [Medicago Truncatula] (GB:ABE93513.1)	
At1g16720	-1.313	Oxidoreductase/ Transcriptional Repressor	HCF173
At5g35170	-1.309	Nucleotide Kinase	
At1g75460	-1.305	ATP-Dependent Protease La (LON) Domain-Containing Protein	
At5g20250	-1.305	DARK INDUCIBLE 10; Hydrolase, Hydrolyzing O-Glycosyl Compounds	DIN10
At2g39730	-1.301	Rubisco Activase	RCA
At3g55850	-1.300	LAF3/LAF3 ISF1/LAF3 ISF2 (LONG AFTER FAR-RED 3); Hydrolase	LAF3
At5g01530	-1.285	Chlorophyll A-B Binding Protein CP29 (LHCB4)	LHCB4.1
At3g47070	-1.273	Similar To GB:CAD45559.1	
At4g32260	-1.243	ATP Synthase Family	PDE334
At4g27700	-1.241	Rhodanese-Like Domain-Containing Protein	
At1g76080	-1.212	ATCDSP32/CDSP32 (CHLOROPLASTIC DROUGHT-	ATCDSP32

INDUCED STRESS PROTEIN OF 32 KD); Thiol-Disulfide Exchange Intermediate			
At3g52720	-1.211	Carbonic Anhydrase Family Protein	ACA1
At4g39010	-1.184	Glycosyl Hydrolase Family 9 Protein	AtGH9B18
At5g47040	-1.167	Lon Protease Homolog 1, Mitochondrial (LON)	LON2
At2g33850	-1.163	Similar To TAIR:AT1G28400.1	
At3g46780	-1.159	Plastid Transcriptionally Active18	PTAC16
At2g26080	-1.158	Glycine Dehydrogenase (Decarboxylating), Putative / Glycine Decarboxylase, Putative / Glycine Cleavage System P-Protein, Putative	AtGLDP2
At5g65730	-1.149	Xyloglucan:Xyloglucosyl Transferase, Putative / Xyloglucan Endotransglycosylase, Putative / Endo-Xyloglucan Transferase, Putative	XTH6
At1g51400	-1.137	Photosystem II 5 Kd Protein	
At5g21222	-1.131	Protein Kinase Family Protein	
At1g77490	-1.130	L-Ascorbate Peroxidase	TAPX
At2g05880	-1.127	Replication Protein-Related	
At5g51010	-1.124	Rubredoxin Family Protein	
At1g15380	-1.122	Lactoylglutathione Lyase	GLY14
At1g68010	-1.120	HPR (Hydroxypyruvate Reductase); NAD Binding / Cofactor Binding / Oxidoreductase, Acting On The CH-OH Group Of Donors, NAD Or NADP As Acceptor	ATHPR1
At5g17320	-1.071	Homeobox-Leucine Zipper Family Protein / Lipid-Binding START Domain-Containing Protein	HDG9
At4g12830	-1.067	Hydrolase, Alpha/Beta Fold Family Protein	
At3g14420	-1.067	(S)-2-Hydroxy-Acid Oxidase, Peroxisomal, Putative / Glycolate Oxidase, Putative / Short Chain Alpha-Hydroxy Acid Oxidase, Putative	
At4g09650	-1.060	ATP Synthase Delta Chain, Chloroplast, Putative / H(+)-Transporting Two-Sector Atpase, Delta (OSCP) Subunit, Putative	ATPD
At1g43040	-1.027	Auxin-Responsive Protein, Putative	

4. REGULACIÓN TEMPORAL DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE

4.1 análisis teórico de la secuencia promotora de los genes de homeostasis del cobre y del reloj circadiano

Varios resultados mostrados en los Capítulos anteriores sugieren que la homeostasis del Cu está relacionada con el reloj circadiano en *Arabidopsis*. El análisis por qPCR de la expresión relativa de *COPT2* y *FSD1* en plántulas transferidas de condiciones óptimas de crecimiento a deficiencia de Cu, muestra que la inducción de la expresión de ambos genes presenta oscilaciones con una periodicidad en torno a 24 h (Figura R.1.9). Además, se observa que los máximos de expresión se producen en diferentes momentos del ciclo, siendo el máximo a 0 h en el caso de *COPT2* y a 6 h para la expresión de *FSD1* (Figura R.1.9).

Por otro lado, el análisis transcriptómico global llevado a cabo en nuestro laboratorio, en el que se compara la expresión génica en condiciones de deficiencia frente a exceso de Cu en plántulas WT, desveló que la expresión de los miembros nucleares del reloj circadiano *LHY* (*late elongated hypocotyl*) y *CCA1* (*circadian clock associated 1*) está inducida en deficiencia de Cu (Andrés-Colás et al., 2013). En cambio, los genes *PRR5* y *GRP7* se encuentran inducidos en exceso de Cu (Figura R.1.6). Además, los resultados del Capítulo 3 revelan que entre los genes reprimidos en las plantas *COPT1*^{OE} se encuentra la familia *LHCB* (*light harvesting chlorophyll binding*) (Tabla R.3.3 y R.A4), implicada en la respuesta del reloj circadiano (Lu et al., 2009).

Tras los resultados mencionados, postulamos la existencia de una regulación recíproca entre el ritmo circadiano y la homeostasis de Cu (Andrés-Colás et al., 2010). Para estudiar esta posibilidad, en primer lugar, se analizaron los elementos *cis* reguladores presentes en las secuencias promotoras (región de

1000 pb previas al inicio de la traducción) de los genes implicados en la homeostasis del Cu, usando las herramientas PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) y PATMACH (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl>). Las secuencias consenso analizadas para los elementos circadianos son: *Circadian* (Piechulla et al., 1998), CAANNNNATC; *Evening element* (EE) (Harmer et al., 2000), AAATATCT; *CCA1 binding site* (Wang and Tobin, 1998), AAAAATCT; *Morning element* (ME) (Harmer and Kay, 2005), AACCCAC; *Sequence Over-Represented in Light-Induced Promoters* (SORLIP 1) (Hudson and Quail, 2003), GCCAC; *Late night-specific telo box* (TBX), AAACCCT; *Starch box* (SBX), AAGCCC; *Protein box* (PBX), ATGGGCC (Michael et al., 2008). A estas cajas, se añadieron los motivos GTAC responsables de la regulación por Cu: (Yamasaki et al., 2009).

Como se muestra en la Tabla R.4.1, en casi todos los promotores de los genes que participan en la red homeostática del Cu existen posibles elementos asociados con la regulación circadiana. Dentro de la familia COPT, cabe destacar que, a diferencia de *COPT1*, que no contiene ningún elemento de los estudiados en su región promotora, la región promotora de *COPT2* presenta 3 elementos *Circadian* (Piechulla et al., 1998) y el promotor de *COPT3* destaca por sus elementos EE/CCA1 (Wang and Tobin, 1998; Harmer et al., 2000). Por otro lado, el gen *FSD1* posee dos elementos asociados a la regulación circadiana del tipo ME/SORLIP1 (Hudson and Quail, 2003; Harmer and Kay, 2005) y el promotor del factor transcripcional *SPL7* muestra elementos de ambos tipos, *Circadian* y ME/SORLIP1.

Tabla R.4.1. Análisis teórico de los promotores de los componentes de la homeostasis de Cu. Se muestra el código MIPS, el número de motivos GTAC y de los elementos asociados con la regulación circadiana indicados en el texto. Las regiones promotoras analizadas son las 1000 pb previas al inicio de la traducción, a excepción de COPT5 (480 pb), HMA6 (443 pb) y HMA8 (363 pb).

Componentes de la homeostasis de Cu	Código MIPS	GTAC	CIRCADIAN	EE/CCA1	ME/SORLIP1	TBX/SBX/PBX
COPT1	At5g59030	4	0	0	0	0
COPT2	At3g46900	4	3	2	1	1
COPT3	At5g59040	3	1	4	0	3
COPT5	At5g20650	0	0	1	0	2
HMA5	At1g63440	0	2	0	1	2
HMA6 (PAA1)	At4g33520	1	1	0	2	0
HMA7 (RAN1)	At5g44790	4	0	4	0	1
HMA8 (PAA2)	At5g21930	0	0	0	1	0
SPL7	At5g18830	0	1	0	1	1
FSD1	At4g25100	6	0	0	2	0

Además de los motivos circadianos, se analizaron los posibles elementos circadianos enumerados anteriormente y los motivos GTAC en los promotores de los genes de los componentes nucleares del reloj circadiano. Se estudiaron los tres componentes nucleares del reloj circadiano: los miembros del oscilador nocturno *CCA1* y *LHY* y el miembro del oscilador matutino *TOC1*, así como el regulador de seudorespuesta *PRR5*, descrito previamente en el Capítulo 1.

Tabla R.4.2. Análisis teórico de los promotores de los componentes nucleares del reloj circadiano. Se muestra el código MIPS, el número de motivos GTAC y de los elementos asociados con la regulación circadiana indicados en el texto. Las regiones promotoras analizadas son las 1000 pb previas al sitio de inicio de la traducción.

Componentes del reloj circadiano	Código MIPS	GTAC	CIRCADIAN	EE/CCA1	ME/SORLIP1	TBX/SBX/PBX
LHY	At1g01060	3	1	1	2	0
CCA1	At2g46830	1	1	0	3	2
TOC1	At5g61380	2	5	2	1	1
PRR5	At5g24470	2	1	2	3	0

Como se muestra en la Tabla R.4.2, los componentes nucleares del reloj circadiano (*LHY*, *CCA1* y *TOC1*), así como el miembro de la familia de reguladores de seudorespuesta *PRR5*, presentan cajas GTAC, posibles elementos reguladores por deficiencia de Cu (Yamasaki et al., 2009), siendo el promotor del gen *LHY* el que mayor número posee.

Por lo tanto, existen posibles elementos reguladores en los promotores de los genes que podrían sustentar la hipotética regulación recíproca entre la homeostasis del Cu y el reloj circadiano (Tablas R.4.1 y R4.2).

4.2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TEMPORAL DE GENES DEL RELOJ CIRCADIANO Y DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE

Para estudiar si la expresión de los genes del reloj circadiano es dependiente de Cu, se cultivaron plántulas WT durante 7 d en medios con diferentes concentraciones del metal. Se analizó la expresión relativa de dos genes marcadores de deficiencia de Cu, *FSD1* y *COPT2*, y de dos genes componentes del reloj circadiano, *LHY* y *CCA1*, en muestras recogidas al amanecer (0 h), que es el momento de mayor expresión de los genes del reloj. La expresión de los genes *LHY* y *CCA1* disminuye a medida que se incrementa el contenido de Cu en el medio de cultivo. Esta respuesta al Cu es similar a la de los genes *FSD1* y *COPT2*, usados como marcadores del estatus de Cu (Figura R.4.1).

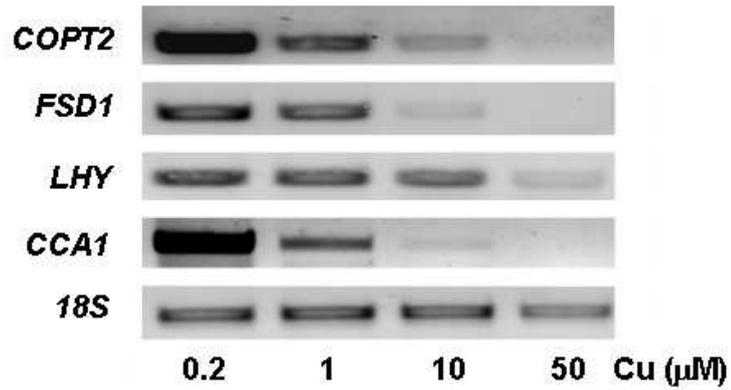


Figura R.4.1. Expresión de los genes *COPT2*, *FSD1*, *LHY* y *CCA1* en diferentes concentraciones de Cu. Se cultivaron plántulas WT durante 6 d en medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con diferentes concentraciones de Cu (0.2, 1, 10 y 50 μM Cu). La expresión relativa de los genes *COPT2*, *FSD1*, *LHY* y *CCA1* se analizó por sqPCR. El gen *18S* se usó como control de carga.

Para analizar el papel del Cu en la expresión de los genes *LHY* y *CCA1*, se cultivaron plántulas WT en condiciones LDHC durante 7 d en dos tipos de medios: $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 10 μM de Cu. Las muestras se recogieron cada 4 h en los 2 d siguientes y se analizaron los niveles de expresión por sqPCR. En este ensayo se muestra que la presencia de Cu en el medio produce la disminución de la expresión de ambos genes prácticamente a todos los tiempos estudiados. Este hecho conduce a la reducción de la amplitud de las oscilaciones, más marcada en el caso de *CCA1* (alrededor del 50 %) (Figura R.4.2).

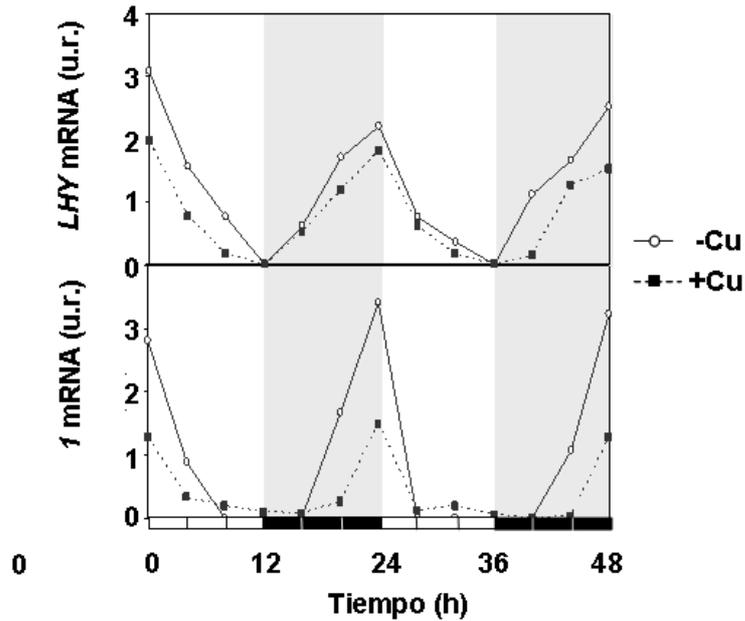


Figura R.4.2. Expresión diurna de *LHY* y *CCA1* en bajo y alto contenido de Cu. Se cultivaron plántulas WT durante 6 d en medio deficiente en Cu (medio MS ½; -Cu; línea continua) o en exceso de Cu (medio MS ½ con 10 μ M de Cu; +Cu; línea punteada) en ciclos LDHC. Las muestras se recogieron cada 4 h durante 48 h. La expresión relativa de los genes *LHY* y *CCA1* se analizó por sqPCR. El gen *18S* se usa como control de carga.

Además, estudiamos la expresión a lo largo del ciclo diurno de los genes *COPT2* y *FSD1*. Como se muestra en la Figura R.4.3, en plántulas cultivadas en deficiencia de Cu, la expresión de *COPT2* oscila con un máximo al amanecer (alrededor de 0 h). Sin embargo, en plantas cultivadas en las mismas condiciones, la expresión de *FSD1* parece oscilar con un máximo al anochecer (alrededor de 12 h) (Figura R.4.3). En condiciones de exceso de Cu, la oscilación se pierde en el caso de la expresión de *COPT2*, mientras que para *FSD1* todavía se percibe con un máximo cercano a 12 h, como se observa en deficiencia de Cu.

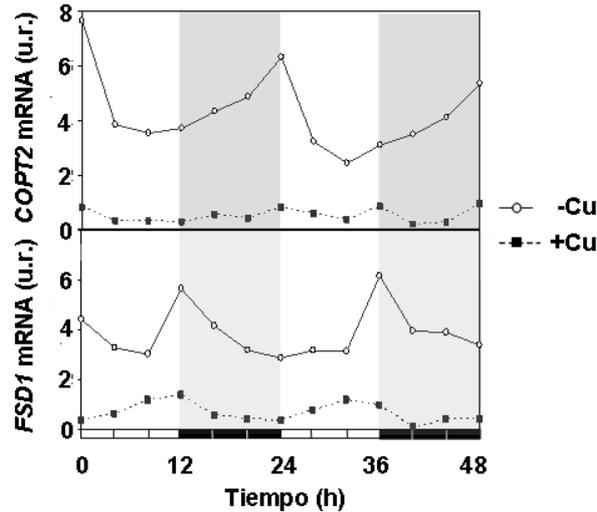


Figura R.4.3. Expresión diurna de *COPT2* y *FSD1* en bajo y alto contenido de Cu. Se cultivaron plántulas WT durante 6 d en medio deficiente en Cu (medio MS ½; -Cu; línea continua) o en exceso de Cu (medio MS ½ con 10 μ M de Cu; +Cu; línea punteada) en ciclos LDHC. Las muestras se recogieron cada 4 h durante 48 h. La expresión relativa de los genes *COPT2* y *FSD1* se analizó por sqPCR. El gen *18S* se usa como control de carga.

Dada la dificultad experimental para determinar los patrones temporales de expresión génica mediante múltiples extracciones puntuales de RNA a diferentes tiempos, se consideró la posibilidad de obtener un registro continuado de la expresión con el tiempo en plantas transgénicas en las que se exprese la fusión de los promotores de los genes a estudiar al gen chivato de la luciferasa (LUC). Inicialmente se utilizaron plantas transgénicas *PLHY:LUC* (cedidas por la Dra. Isabelle Carré de la Universidad de Warwick, Reino Unido).

Con el objetivo de poner a punto los ensayos y averiguar si la adición de Cu afecta a los mismos, se obtuvieron extractos de proteína total de plántulas *PLHY:LUC* cultivadas durante 7 d en medio ½ MS y, a continuación, se les añadió Cu en un rango de concentraciones desde 2 a 500 μ M. Se utilizó como control positivo de la actividad luciferasa, las plántulas cultivadas en medio

½ MS sin Cu y como control negativo, el extracto sin sustrato. De los resultados obtenidos se concluye que sólo concentraciones superiores a 100 µM de Cu tienen efectos en el ensayo (Figura R.4.4).

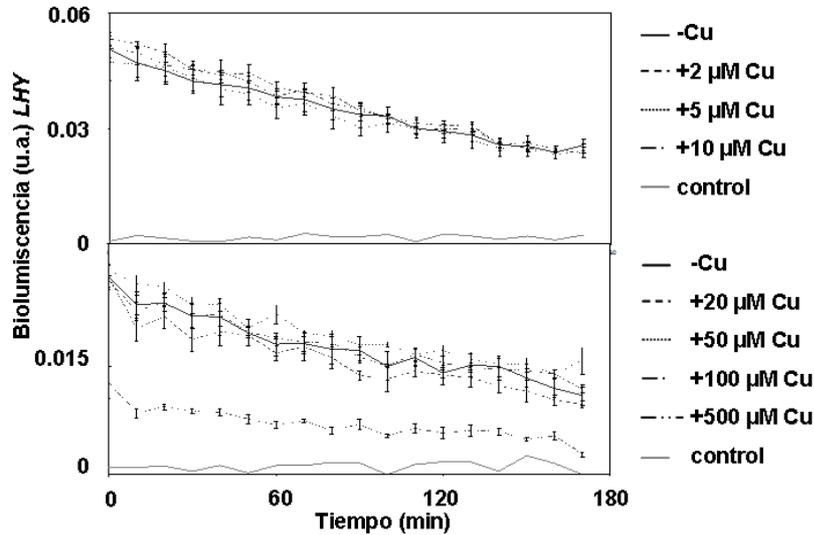


Figura R.4.4. Actividad luciferasa en diferentes concentraciones de Cu. Actividad luciferasa medida en extractos de proteínas totales de plántulas *PLHY:LUC* cultivadas durante 7 d en medio deficiente en Cu (-Cu; medio ½ MS comercial). Las medidas cinéticas empiezan tras añadir a tiempo 0 las concentraciones de Cu indicadas a una cantidad constante de luciferina (0.42 mg/mL). La actividad se registra cada 10 min durante un total de 180 min. El extracto sin sustrato se usa como control negativo (control).

Para determinar si el Cu afecta a la expresión circadiana de los componentes del reloj, se evaluó la actividad luciferasa en plántulas *PLHY:LUC* en diferentes condiciones de Cu en el medio de cultivo (½ MS, ½ MS + 5 µM de Cu o ½ MS + 10 µM de Cu). Previamente, las plántulas *PLHY:LUC*, en los tres medios de cultivo mencionados, se entrenaron durante 7 d en condiciones LDHC. Posteriormente, se midió la actividad luciferasa de las plántulas *PLHY:LUC*, durante 3 d, en condiciones LLHH o DDHH. El análisis de la

actividad luciferasa en condiciones LLHH o DDHH durante los 3 d evaluados (3 ciclos), afecta a la amplitud de la oscilación que disminuye en presencia de Cu (Figura R.4.5).

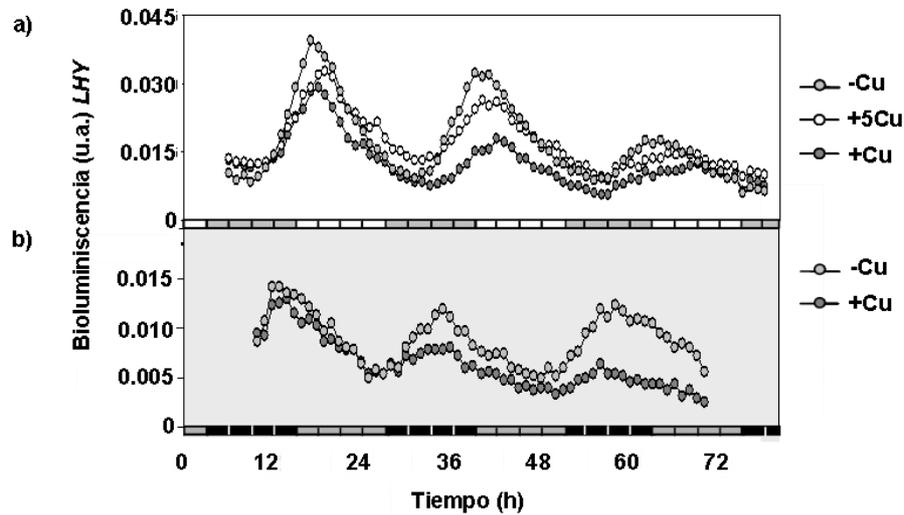


Figura R.4.5. Regulación por Cu de la actividad luciferasa dirigida por el promotor *LHY*. a) Bioluminiscencia de plántulas *PLHY:LUC* cultivadas en condiciones de deficiencia de Cu (-Cu; medio ½ MS comercial, círculos gris claro), con 5 μ M Cu (+5Cu; círculos blancos), o con 10 μ M Cu (+Cu; círculos gris oscuro), entrenados en condiciones LDHC y transferidas a LLHH. b) Bioluminiscencia de plántulas *PLHY:LUC* cultivadas en deficiencia de Cu (-Cu; medio ½ MS comercial, círculos gris claro), o con 10 μ M Cu (+Cu; círculos gris oscuro), entrenados en condiciones LDHC y transferidas a DDHH. La bioluminiscencia se midió cada hora después de transferir a LLHH. Los valores son la media de n= 4-10 réplicas biológicas. Las barras grises y blancas indican, respectivamente, la noche y el día subjetivos.

Para estudiar de forma continua la expresión de genes diana de la respuesta a deficiencia de Cu, se construyeron quimeras en las que se utilizaron los promotores de *COPT2* (*PCOPT2*) y de *FSD1* (*PFSD1*) fusionados al gen delator de la luciferasa (*LUC*) y con dichas construcciones se transformaron plantas WT de *Arabidopsis*. En el caso del *PCOPT2*, se subclonó un fragmento

de 1246 pb, que contiene 4 motivos GTAC próximos al inicio traduccional (*PCOPT2:LUC*). Para el *PFSDI*, se subclonó un fragmento de 1193 pb que contiene 6 cajas GTAC (*PFSDI:LUC*). Dado que 4 de las 6 cajas se encuentran en una región de 65 nucleótidos próxima al inicio traduccional, con el objetivo de evaluar el efecto de esas 4 cajas en la regulación del promotor en condiciones de déficit de Cu, se realizó una construcción del *PFSDI* con esa región de 64 nucleótidos delecionada, por lo que se subclonó un fragmento de 1128 pb fusionado a *LUC* (*PFSDI (4GTAC):LUC*).

A continuación, averiguamos si la expresión de la luciferasa de las plantas transgénicas sigue el patrón de expresión del gen endógeno. Para ello, se cultivaron durante 7 d plantas transgénicas *PFSDI:LUC* y *PCOPT2:LUC* en condiciones de deficiencia severa (medio ½ MS comercial suplementado con 50 µM de BCS), deficiencia (medio ½ MS comercial), suficiencia (medio ½ MS comercial suplementado con 1 µM de Cu) y exceso de Cu (medio ½ MS comercial suplementado con 10 µM de Cu). Se extrajo RNA y se analizó la expresión de la luciferasa por sqPCR con cebadores específicos. La expresión relativa del gen *FSDI* se utilizó como control del efecto del Cu en el medio y la expresión del gen *ACT1* como control de carga de la cantidad de RNA por pocillo. En la Figura R.4.6 se observa la expresión relativa de *FSDI* y de la luciferasa de las plantas transgénicas *PFSDI:LUC* y *PCOPT2:LUC*. En ambos casos, la expresión del transgén *LUC* está regulada por la concentración de Cu en el medio de cultivo, de forma similar al control *FSDI*, lo que indica la idoneidad de las plantas transgénicas obtenidas para estudiar la respuesta al Cu de forma continua.

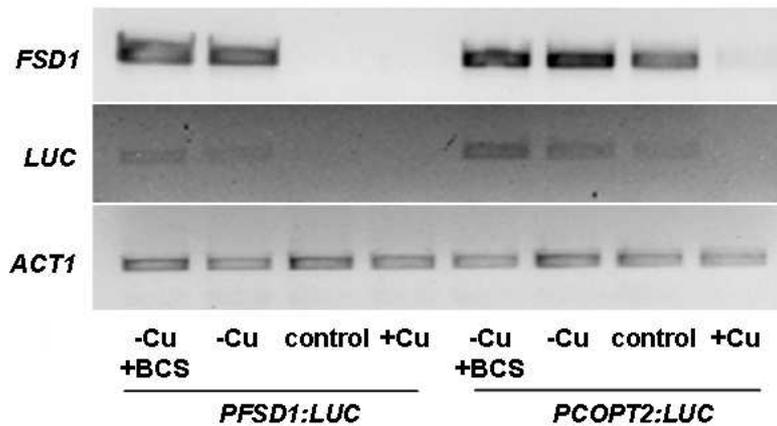


Figura R.4.6. Expresión de los genes *FSD1* y *LUC* en función del contenido de Cu. Productos sqPCR de plántulas *PFSD1:LUC* y *PCOPT2:LUC* de 6 d crecidas en deficiencia severa (medio ½ MS comercial con 50 µM de BCS; -Cu + BCS), deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu), suficiencia (medio ½ MS comercial con 1 µM de Cu; control) o en exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu; +Cu) en ciclos LDHC. Las muestras se recogieron a las 4 h desde el inicio del ciclo de luz. El gen *ACT1* se usa como control de carga.

Después de los ensayos mencionados, se cultivaron plántulas *PCOPT2* y *PFSD1:LUC* durante 7 d en deficiencia severa de Cu. Transcurridos éstos, y tras la adición de la luciferina, se registró la actividad luciferasa por plántula en condiciones LDHC. Como se observa en la Figura R.4.7, la actividad luciferasa registrada para las plántulas *PCOPT2:LUC* y *PFSD1:LUC* oscila de forma cíclica en ambos casos con un periodo en torno a las 24 h. Además, se observa que los máximos de actividad son distintos para las plántulas *PCOPT2:LUC*, que presentan el pico de actividad al amanecer (alrededor de las 0 h) y para las plántulas *PFSD1:LUC*, cuyo máximo se alcanza al anochecer (alrededor de las 12 h).

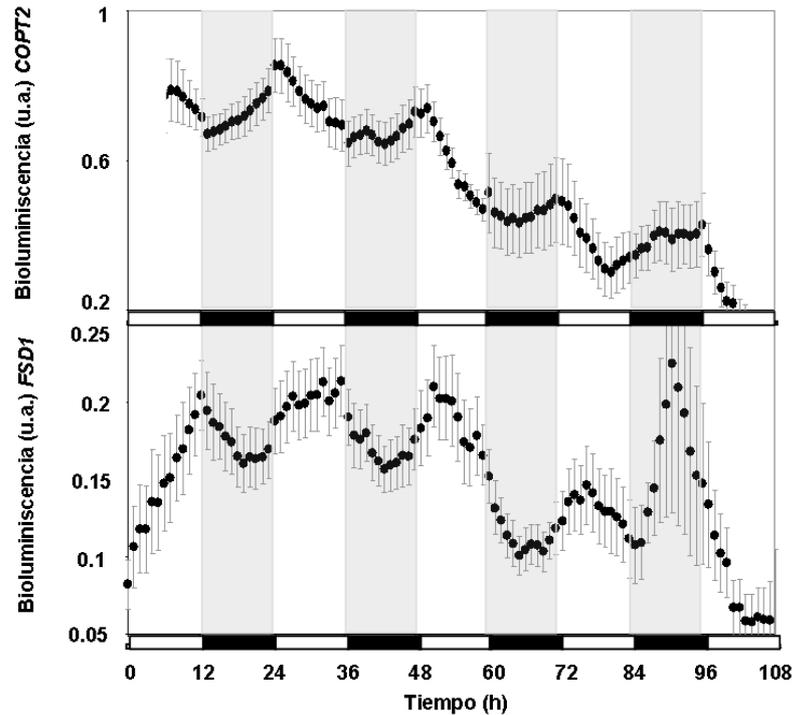


Figura R.4.7. Regulación por Cu de la actividad luciferasa dirigida por los promotores de *COPT2* y de *FSD1*. Bioluminiscencia de plántulas *PCOPT2:LUC* y *PFSD1:LUC* cultivadas en deficiencia severa de Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS comercial con $50 \mu\text{M}$ de BCS), entrenadas durante 7 d en condiciones LDHC. La bioluminiscencia se mide cada hora después de 7 d de crecimiento. Los valores son la media \pm SEM de 6-11 réplicas biológicas. Las barras grises y blancas indican la noche y el día respectivamente.

Para evaluar si las oscilaciones observadas son circadianas, es decir si se mantienen en ausencia de ciclos de luz y temperatura (LLHH), se midió la actividad luciferasa en plántulas *PCOPT2:LUC* y *PFSD1:LUC* cultivadas durante 7 d en medio deficiente en Cu. Transcurridos esos 7 d y tras la adición de la luciferina, se registró la actividad luciferasa por plántula en condiciones de luz y temperatura continuas (LLHH). En estas condiciones, se observa que, para el caso de las plántulas *PCOPT2:LUC*, la oscilación se mantiene con una periodicidad en torno a 24 h (Figura R.4.8a). Sin embargo, para las plántulas

PFSD1:LUC, ya no se detecta oscilación significativa de la bioluminiscencia con los programas utilizados (Figura R.4.8b).

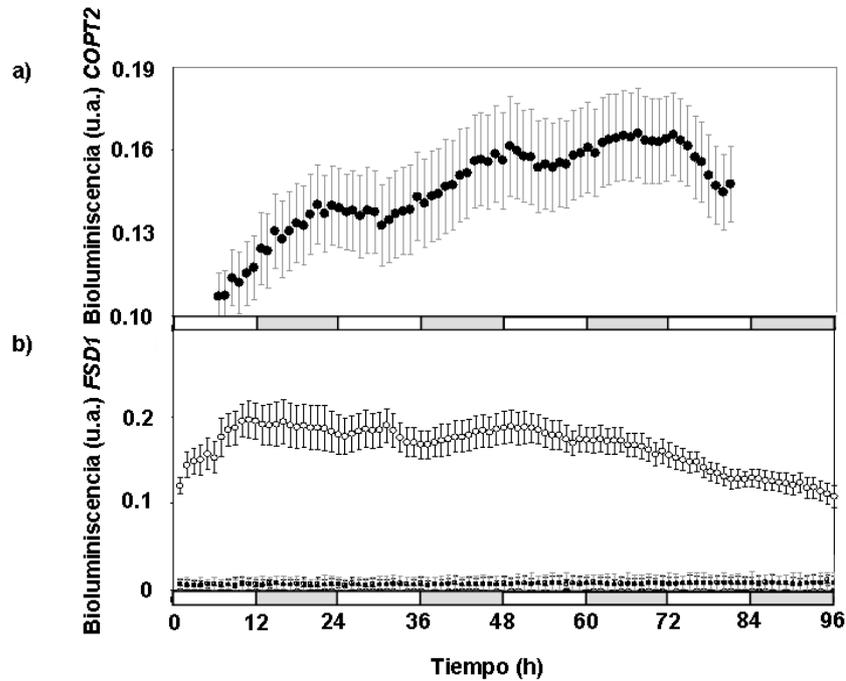


Figura R.4.8. Actividad luciferasa dirigida por los promotores *COPT2*, *FSD1* y *FSD1(4GTAC)*. Bioluminiscencia de plántulas *PCOPT2:LUC* (a), *PFSD1:LUC* y *PFSD1(4GTAC):LUC* (b) cultivadas en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; círculos) y en exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu; cuadrados) entrenadas durante 7 d en condiciones LDHC y transferidas a condiciones LLHH. La bioluminiscencia se mide cada hora después de la transferencia a condiciones LLHH. Los valores son la media ± SEM de 6-14 réplicas biológicas. Las barras grises y blancas indican la noche y el día subjetivo respectivamente.

Por último, las plántulas *PFSD1(4GTAC):LUC* pierden la inducción del gen en deficiencia de Cu, comportándose como las plántulas *PFSD1:LUC* cultivadas en condiciones de exceso de Cu (Figuras R.4.6 y R.4.8), lo que indica que las 4 cajas GTAC delecionadas en este promotor, son las responsables de la inducción en deficiencia de Cu.

4.3. Estudio del efecto del cobre sobre parámetros circadianos

Con el objetivo de conocer si el efecto producido por el Cu es dependiente del tiempo de adición del mismo, las plántulas *PLHY:LUC*, se entrenaron durante 7 d en condiciones LDHC y se transfirieron posteriormente a luz continua (LLHH), para someterlas a la adición de Cu en diferentes fases de la oscilación circadiana (Figura R.4.9). A cualquier tiempo de la adición del Cu, se observa que éste afecta a la amplitud y a la fase de la expresión del gen *LHY*, pero no al período (Figura R.4.9).

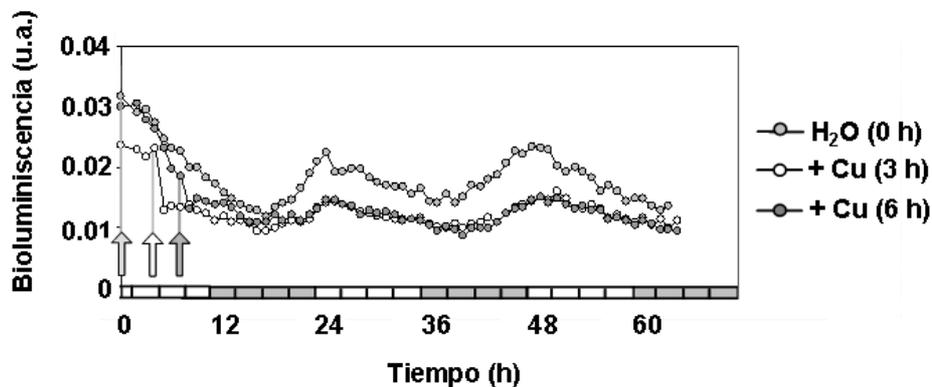


Figura R.4.9. Estudio del efecto del Cu sobre la fase de la actividad luciferasa dirigida por el promotor *LHY*. Bioluminiscencia de plántulas *PLHY:LUC* cultivadas durante 7 d en deficiencia de Cu (medio $\frac{1}{2}$ MS comercial) en condiciones de LDHC y transferidas a LLHH (tiempo cero) y sometidas a la adición de H₂O a 0 h (círculos gris claro), 10 μ M Cu a las 3 h (círculos blanco) o 10 μ M Cu a las 6 h (círculos gris oscuro). Los valores son la media de 9 réplicas biológicas. Las barras grises y blancas indican, respectivamente, la noche y el día subjetivos. Las flechas indican el tiempo de las adiciones.

Además, cuando las plántulas *PLHY:LUC* cultivadas en LDHC durante 7 d en placas con Cu se transfirieron a condiciones LLHH en presencia del quelante específico de Cu, BCS (ácido 2, 9-dimetil-4,7-difenil-1, 10-

fenantrolina-disulfónico), se observa un aumento de la amplitud de la oscilación, lo que indica la reversibilidad del efecto del Cu (Figura R.4.10).

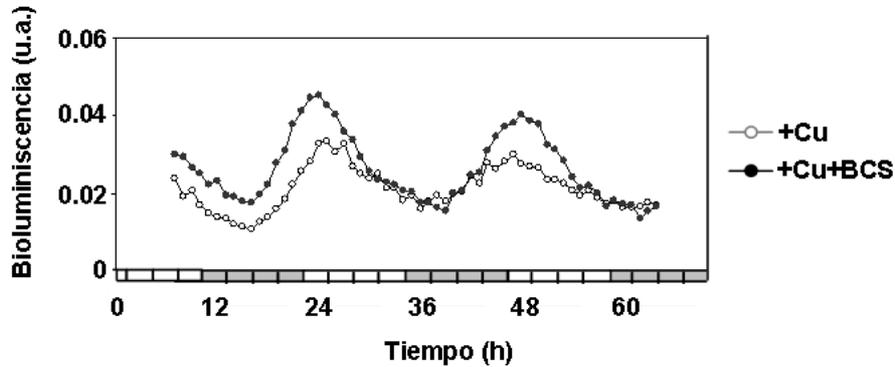


Figura R.4.10. Regulación por Cu de la actividad luciferasa dirigida por el promotor *LHY*. Bioluminiscencia de plántulas *PLHY:LUC* cultivadas durante 6 d en exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 μ M Cu; +Cu, círculos blancos) o en deficiencia de Cu (círculos negros; +10 μ M Cu, 100 μ M BCS) un día más, entrenados en condiciones LDHC y transferidas a LLHH. La bioluminiscencia se midió cada hora después de transferir a LLHH. Los valores son la media de 3 réplicas biológicas. Las barras grises y blancas indican, respectivamente, la noche y el día subjetivos.

Para profundizar en la evaluación del papel del Cu en el reloj circadiano, junto con la expresión de los genes *LHY* y *CCA1*, se estudió la expresión de los genes *COL1* (*constans-like1*) y *LHCb1.1* (*light harvesting chlorophyll binding1.1*), ambos de expresión regulada en respuesta al reloj (Mizoguchi et al., 2002; Salomé et al., 2008).

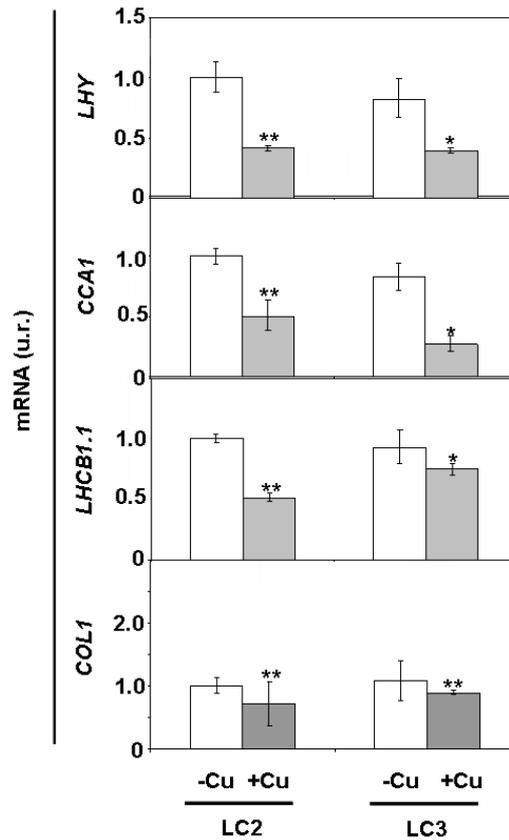


Figura R.4.11. Regulación por Cu de la expresión génica de componentes del reloj y genes de respuesta al reloj. Cuantificación por qPCR de la expresión relativa de los genes *CCA1*, *LHY*, *LHCb1.1* y *COL1* de plántulas WT cultivadas en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu, barras blancas) o en exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu; +Cu, barras grises), en condiciones LDHC y transferidas a LLHC. Las muestras se tomaron a las 0 h para los ciclos 2º y 3º en condiciones LLHC. El gen *UBQ10* se usa como control de carga. Las barras representan la media ± DE de tres réplicas biológicas. u.r., unidades relativas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente diferentes con respecto a deficiencia de Cu (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Para ello, se utilizaron plántulas WT, previamente entrenadas durante 7 d en condiciones LDHC y transferidas a condiciones LLHC, de las cuales se tomaron muestras a 0 h y durante el día subjetivo en los ciclos 2 (LC2) y 3 (LC3). Los resultados se muestran en la Figura R.4.11 y reflejan que, en

ausencia de ciclos, el Cu también regula la expresión de los genes de respuesta al reloj circadiano.

4.4. Fenotipos de las plantas sobreexpresoras de COPT1 y de COPT3 en condiciones continuas

Para exacerbar los efectos de la desregulación de la homeostasis de Cu, se analizaron las consecuencias de la ausencia de ciclos de luz y temperatura en el desarrollo de las plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE}. Para ello, ambas líneas transgénicas se cultivaron en placas con medio ½ MS o en el mismo medio suplementado con 10 µM de Cu en las siguientes condiciones: día intermedio con ciclos de luz y temperatura (LDHC) y temperatura y luz continuas (LLHH) (Figura R.4.12).

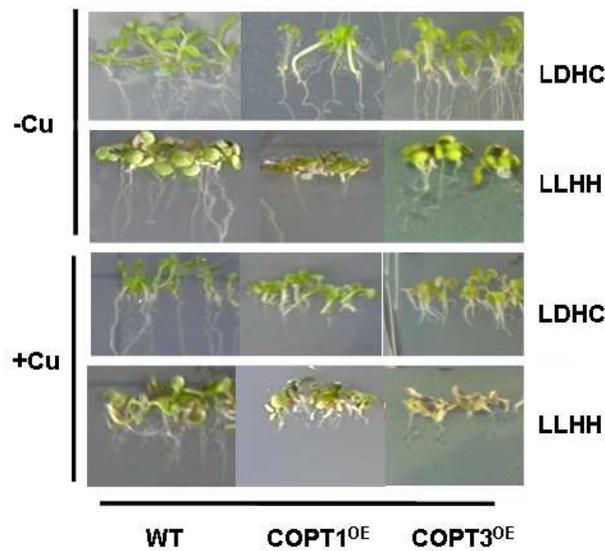


Figura R.4.12. Efecto de la ausencia de ciclos de luz y temperatura en plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE}. Plántulas WT, COPT1^{OE} y COPT3^{OE} cultivadas durante 6 d en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu) o exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu; +Cu) en condiciones LDHC o LLHH.

La ausencia de ciclos ambientales, afecta al crecimiento de todos los genotipos evaluados, pero las plántulas de las líneas COPT1^{OE} y COPT3^{OE} están peor que las WT (Figura R.4.12).

Aunque en condiciones LDHC, la longitud de la raíz de las plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE} es igual que la de las WT en medio ½ MS (Figura R.4.12), sin embargo, en condiciones LLHH la longitud de la raíz disminuye significativamente más en las plantas COPT1^{OE} y COPT3^{OE} que en las WT, tanto en medio ½ MS como en medio ½ MS con 10 µM CuSO₄ (Figura R.4.13).

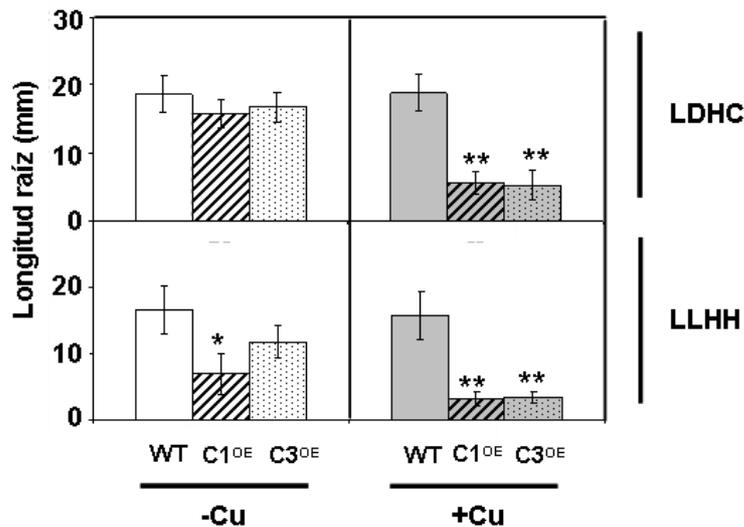


Figura R.4.13. Efecto de la ausencia de ciclos de luz y temperatura sobre la longitud de la raíz en plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE}. Medida de la longitud de la raíz de plántulas WT (barras lisas), COPT1^{OE} (C1^{OE}, barras rayadas) y COPT3^{OE} (C3^{OE}, barras punteadas) cultivadas durante 6 d en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu, barras blancas) o exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu; +Cu, barras grises) en condiciones LDHC o LLHH. Las barras representan la media ± DE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente diferentes con respecto al WT (* p < 0.05, ** p < 0.01).

En condiciones LLHH también se observa la reducción del peso fresco en las plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE} en comparación con las WT (Figura R.4.14).

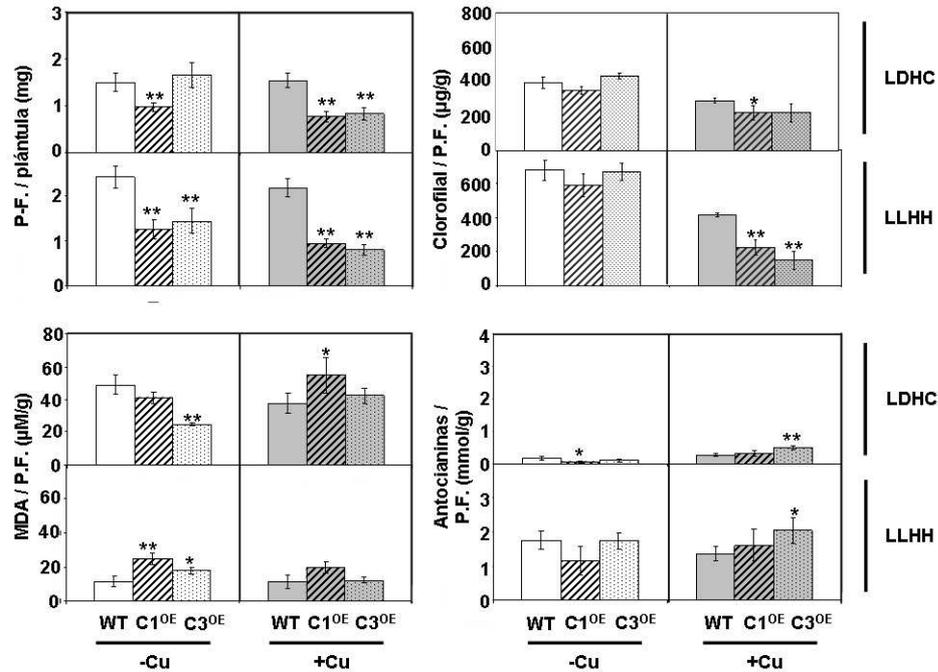


Figura R.4.14. Efecto de la ausencia de ciclos de luz y temperatura sobre el peso fresco, contenido en clorofila, MDA y antocianinas en plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE} . Peso fresco y contenido de clorofila total, MDA y antocianinas de plántulas WT (barras lisas), COPT1^{OE} (C1^{OE}, barras rayadas) y COPT3^{OE} (C3^{OE}, barras punteadas) cultivadas durante 6 d en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu, barras blancas) o exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu; +Cu, barras grises) en LDHC o LLHH. Las barras representan la media ± DE de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente diferentes con respecto al WT (* p < 0.05, ** p < 0.01).

Con el objetivo de conocer si el daño oxidativo en dichas plántulas es mayor en condiciones LLHH, se determinó el grado de peroxidación lipídica, medido como contenido de malondialdehído (MDA), junto con el contenido total de clorofila y de antocianinas. Cuando las plántulas de los tres genotipos (COPT1^{OE}, COPT3^{OE} y WT) se cultivan en condiciones LDHC, no se observan diferencias entre ellas en el contenido de MDA, de clorofilas totales y de antocianinas. Sin embargo, si comparamos entre condiciones LDHC y LLHH, se observa que a menor contenido total de MDA, se produce un aumento en el nivel de antocianinas, sobretodo en el medio con Cu.

Por otro lado, se estudiaron los efectos de la ausencia de luz y temperatura por separado y para ello, se cultivaron los mismos genotipos en condiciones de temperatura constante (LDHH) y luz constante (LLHC) (Figura R.4.15). En ambas condiciones, las plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE}, cultivadas en medio MS con 10 μ M de Cu, muestran una menor longitud de la raíz y del peso fresco que las WT. Estos resultados concuerdan con los observados anteriormente en condiciones LDHC y LLHH (Figura R.4.15a).

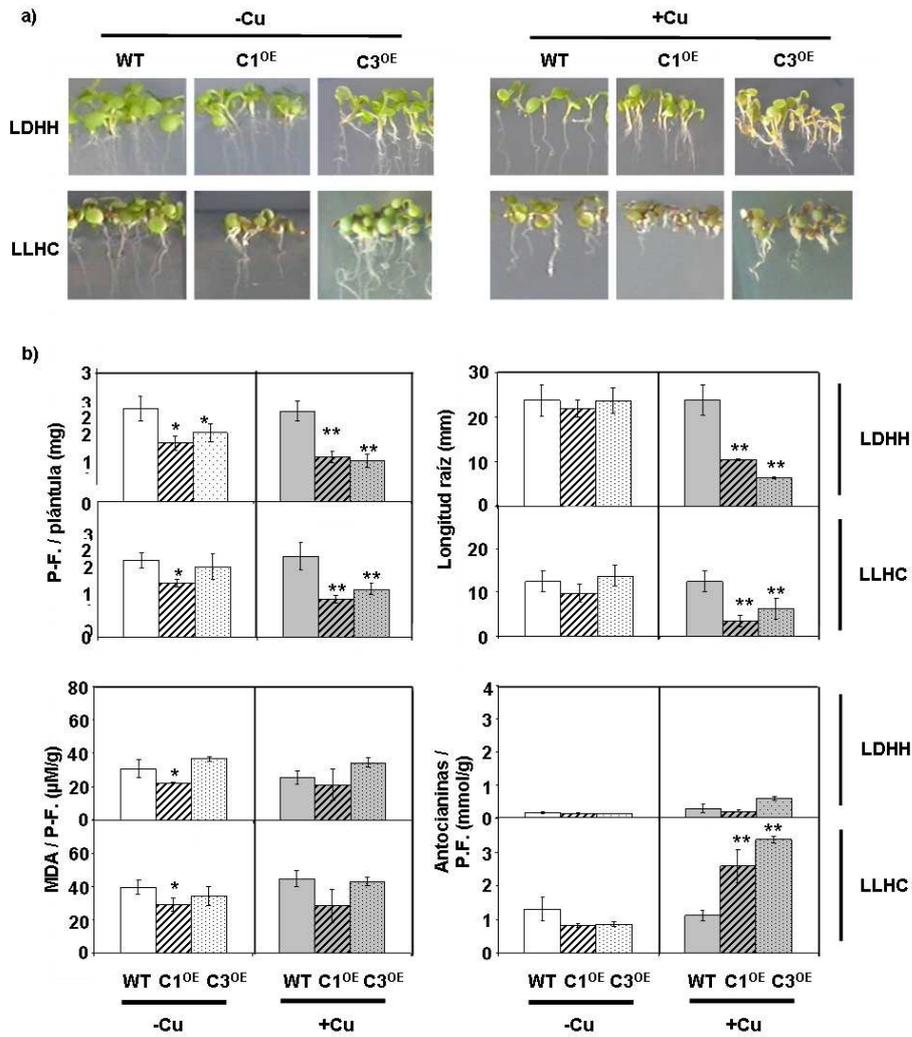


Figura R.4.15. Efecto de la ausencia de ciclos de luz o temperatura en plántulas $COPT1^{OE}$ y $COPT3^{OE}$. a) Plántulas WT (barras lisas), $COPT1^{OE}$ (C1^{OE}, barras rayadas) y $COPT3^{OE}$ (C3^{OE}, barras punteadas) cultivadas durante 6 d en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu, barras blancas) o exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu; +Cu, barras grises) en LLHC o LDHH. b) Peso fresco, contenido de clorofila, MDA y antocianinas en las mismas condiciones que el Apartado a). Las barras representan la media ± DE de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente diferentes con respecto al WT (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Por otro lado, se detecta un aumento de las antocianinas en plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE} respecto a las WT en las condiciones LLHC y en el medio suplementado con Cu (Figura R.4.15b).

4.5. Las alteraciones en el contenido de cobre en *Arabidopsis* influyen en la expresión de los componentes del reloj circadiano *LHY* y *CCA1*

Con el objetivo de conocer si los fenotipos observados en las plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE}, en ausencia de ciclos de luz y temperatura, tienen su origen en alteraciones del ritmo circadiano de las plantas, se analizaron por qPCR los niveles de expresión relativa de dos genes nucleares del reloj circadiano: *LHY* y *CCA1*. Para ello, las muestras se recogieron al amanecer (0 h), cuando los niveles de mRNA de *LHY* y *CCA1* muestran el máximo de su expresión.

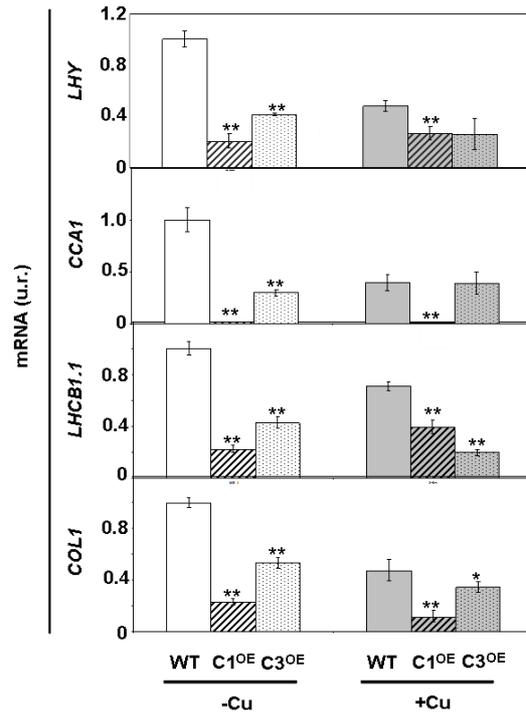


Figura R.4.16. Regulación de la expresión génica de los componentes del reloj circadiano y genes de respuesta del reloj en las plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE}. Cuantificación por qPCR de la expresión relativa de los genes *CCA1*, *LHY*, *LHCb1.1* y *COL1* en plántulas WT (barras lisas), COPT1^{OE} (C1^{OE}, barras rayadas) y COPT3^{OE} (C3^{OE}, barras punteadas) cultivadas durante 6 d en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu, barras blancas) o en exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM Cu; +Cu, barras grises) en LDHC. Las muestras se recogieron a 0 h. El gen *UBQ10* se usa como control interno. Los barras representan la media ± DE de 3 réplicas biológicas. u.r., unidades relativas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al WT (* p < 0.05, ** p < 0.01).

Como se puede observar en la Figura R.4.16, tanto las plántulas COPT1^{OE} y COPT3^{OE} cultivadas en medio ½ MS como en medio suplementado con 10 µM de Cu muestran una reducción en los niveles de expresión relativos de los genes *LHY* y *CCA1* respecto a las WT en condiciones LDHC. Probablemente, como resultado de esta reducción, también se observa que la

expresión de genes de respuesta del reloj circadiano, como *COL1* y *LHCBI.1*, está alterada en las plántulas *COPT1*^{OE} y *COPT3*^{OE}.

4.6. Influencia de la luz en los genes de respuesta cíclica a la deficiencia de cobre

Con la finalidad de evaluar el efecto de la luz y su posible interacción con la respuesta a deficiencia de Cu, plántulas WT se cultivaron durante 7 d en medios con deficiencia o con exceso de Cu y se recogieron muestras a 0 y 12 h para corroborar la expresión cíclica de los genes. Las muestras se obtuvieron de plántulas en LDHC (ciclos de luz y temperatura) y etioladas (DDHC, oscuridad continua con ciclo de temperatura). A continuación, se analizó por qPCR la expresión relativa de 5 tipos de genes descritos en el Capítulo 1:

- a) inducidos en deficiencia de Cu: *COPT2*, *FSD1* y *ZIP2*
- b) inducidos en exceso de Cu: *CSD1*, *CCS* y *SDHI-2*
- c) otros miembros de la familia COPT: *COPT3*
- e) inducidos en exceso de Cu y regulados por el reloj: *PRR5*
- f) factores de transcripción de la familia SPL: *SPL7* y *SPL3*

En primer lugar, se han estudiado los genes marcadores de la respuesta a deficiencia de Cu. Como cabía esperar, en condiciones LDHC la expresión de los genes *COPT2*, *FSD1* y *ZIP2* se induce en deficiencia de Cu, tanto a 0 como a 12 h, siendo esta inducción mayor a 0 h en los tres casos (Figura R.4.17). Sin embargo, en plantas etioladas, aunque todavía se mantiene la inducción por deficiencia de Cu y las diferencias temporales, la expresión relativa es mucho menor. Por tanto, la luz no es determinante en la inducción de la expresión génica por deficiencia de Cu, ni para mantener las diferencias entre 0 y 12 h, pero es clave para potenciar los niveles de expresión génica.

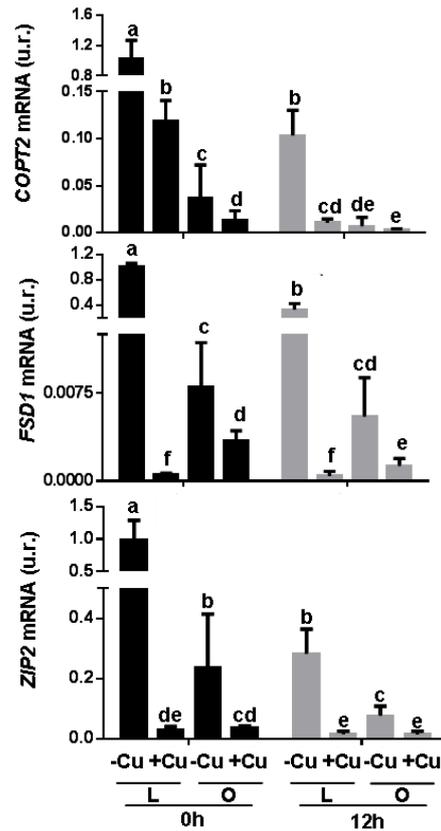


Figura R.4.17. Regulación de la expresión génica por Cu y por la luz. Expresión relativa determinada por qPCR de los genes *COPT2*, *FSD1* y *ZIP2* de plántulas WT cultivadas durante 7 d en deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu) o en exceso de Cu (medio ½ MS comercial con 10 µM de Cu; +Cu), en condiciones LDHC (L) o DDHC (O). Las muestras se recogieron a 0 (barras negras) y 12 h (barras grises). El gen *UBQ10* se usa como control interno y la muestra de 0 h luz y -Cu se usa como referencia. Las barras representan la media ± DE de tres réplicas biológicas. u.r., unidades relativas.

Por el contrario, en exceso de Cu se induce la expresión de los genes marcadores *CSD1*, *CCS* y *SDHI-2*, tanto a 0 como a 12 h, siendo de nuevo mayor a 0 h en los tres casos, en condiciones LDHC (Figura R.4.18). Sin embargo, en plantas etioladas, esta inducción es mínima o no se mantiene, como

en el caso de *SDH1-2* (Figura R.4.18), lo que indica que, al menos en algunos casos, la luz es fundamental para mantener las respuestas a exceso de Cu.

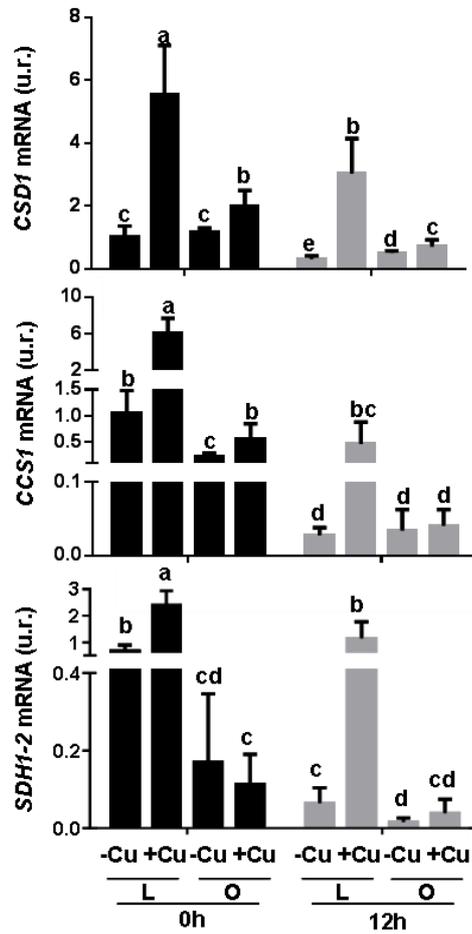


Figura R.4.18. Regulación de la expresión génica por Cu y por la luz. Expresión relativa determinada por qPCR de los genes *CCS1*, *CSD1* y *SDH2-1* de plántulas WT cultivadas durante 7 d en las mismas condiciones mostradas en la Figura R.4.17.

Además, se analizó la expresión relativa de otro miembro de la familia COPT (*COPT3*) en las mismas condiciones descritas previamente. En este caso, en plantas etioladas se produce una ligera inducción de la expresión de *COPT3*

con respecto a las cultivadas en condiciones LDHC (Figura R.4.19). Esta inducción es independiente de la hora y del nivel de Cu en el medio, lo que sugiere que la función de *COPT3* podría estar potenciada en la oscuridad, al contrario que la de otros miembros de la familia, como *COPT2*.

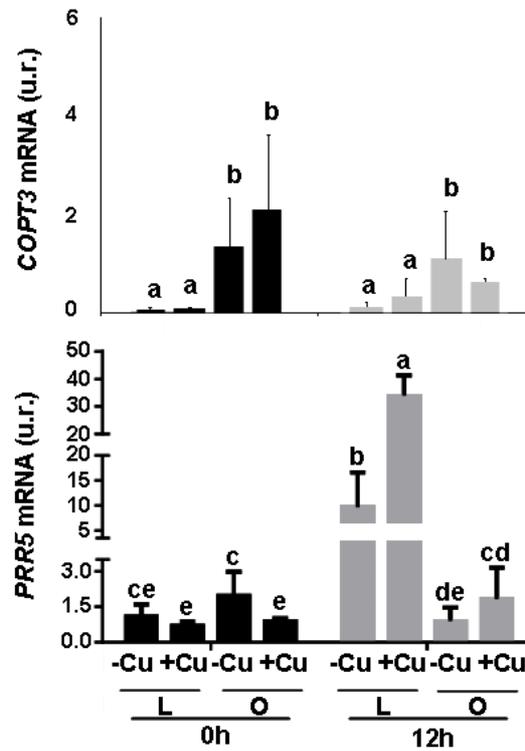


Figura R.4.19. Regulación de la expresión génica por Cu y por la luz en plántulas de *Arabidopsis*. Expresión relativa por qPCR del gen *COPT3* y *PRR5* de plántulas WT cultivadas durante 7 d en las mismas condiciones mostradas en la Figura R.4.17

A continuación, se evaluó la expresión de *PRR5*, cuya inducción por exceso de Cu, descrita en el Capítulo 1, se observa a 12 h en condiciones LDHC, pero dicha regulación se pierde a 0 h y en plantas etioladas (Figura R.4.19).

La expresión de los factores de transcripción *SPL7* y *SPL3* (mencionados en el Capítulo 1) presenta un patrón diferencial entre 0 y 12 h, siendo de nuevo mayor su expresión a 0 h. En el caso de la expresión relativa del gen *SPL7*, no hay regulación por Cu (Yamasaki et al., 2009; Bernal et al., 2012). Sin embargo, si se observa una ligera inducción de la expresión relativa de *SPL3* en deficiencia de Cu a 0 h en condiciones LDHC (Figura R.4.20). La expresión génica de ambos genes se atenúa en plantas etioladas, independientemente de las condiciones (Figura R.4.20).

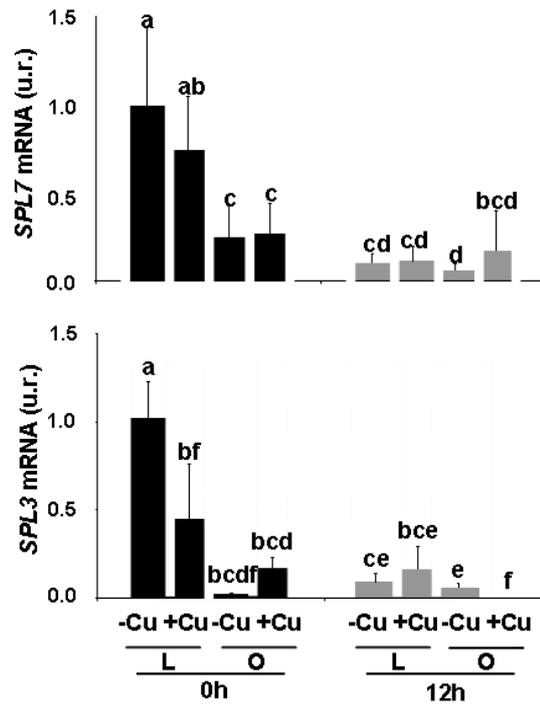


Figura R4.20. Regulación de la expresión génica por Cu y por la luz. Expresión relativa por qPCR de los genes *SPL3* y *SPL7* de plántulas WT cultivadas durante 7 d en las mismas condiciones mostradas en la Figura R.4.17

El análisis teórico llevado a cabo con el software DIURNAL (<http://diurnal.mocklerlab.org/>), permite obtener los patrones temporales de expresión de genes a partir de los resultados obtenidos de micromatrices realizadas a diferentes tiempos, lo que permite comprobar si la expresión es o no circadiana. Hemos realizado este tipo de análisis para la expresión de *SPL7*, que mantiene una periodicidad alrededor de 24 h y su fase muestra un adelanto de unas 4 h con respecto a la registrada por *COPT2* en condiciones LLHH (Figura R.4.21).

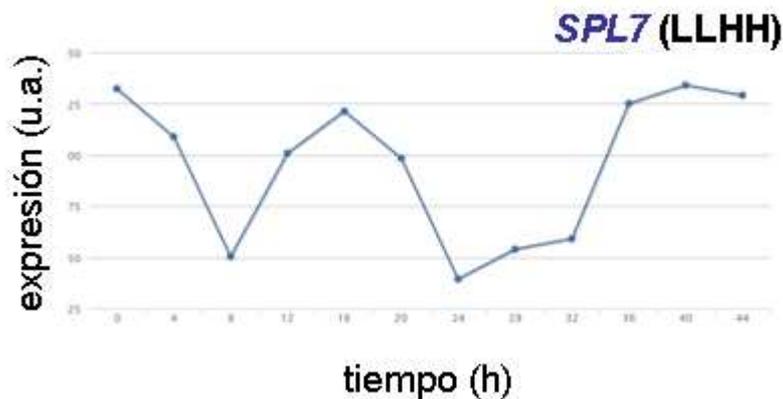


Figura R.4.21. Patrón de expresión *in silico* del factor transcripcional *SPL7*. Patrones de expresión del gen *SPL7* en condiciones LLHH (ausencia de ciclos) llevado a cabo con el software DIURNAL <http://diurnal.mocklerlab.org/>. La línea azul indica los datos experimentales.

Por último, y con el objetivo de constatar que la regulación de la expresión génica en deficiencia de Cu afecta al oscilador central, se analizaron algunos parámetros relacionados con el ritmo circadiano en el mutante *spl7*. Uno de los parámetros más estudiados para comprobar si existen alteraciones del ritmo es el movimiento cíclico de los cotiledones, conocido como aleteo (Millar et al., 1995). El siguiente experimento se realizó en colaboración con el

Dr. Seth Davis (Instituto Max Planck de Colonia) durante la estancia en el laboratorio del Dr. Peter Huijser.

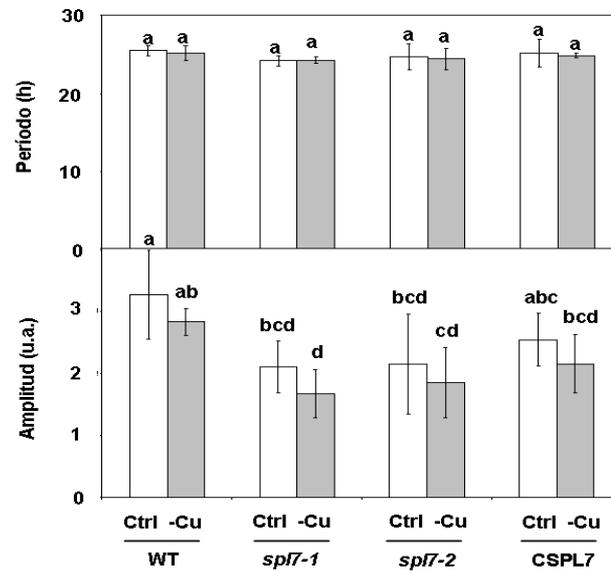


Figura R.4.22. Período y amplitud del movimiento de los cotiledones del mutante *spl7*. Las plántulas WT, *spl7-1*, *spl7-2* y CSPL7 (línea complementada de *spl7-2*) se cultivaron durante 5 d en suficiencia de Cu (control, medio ½ MS comercial con 0.5 µM de Cu; Ctrl, barras blancas) y deficiencia de Cu (medio ½ MS comercial; -Cu, barras grises) en condiciones de fotoperíodo intermedio. Las plántulas se transfieren a nuevas placas con medio ½ MS 1.5 % fitoagar. Tras 24 h, las placas se colocan delante de cámaras web en condiciones de luz continua y se toman fotografías cada 30 min durante 6 d. u.a.: unidades arbitrarias. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Las plántulas WT, los mutantes *spl7-1* y *spl7-2* y la línea complementada SPL7 (CSPL7), cedidas por el Dr. Peter Huijser (Bernal et al., 2012) se cultivaron en deficiencia y suficiencia de Cu durante 6 d con fotoperíodo intermedio y condiciones LDHC. A continuación, se transfieren a una placa multipocillo en las mismas condiciones, pero donde se colocan individualmente y se mantienen durante un día más para su aclimatación. Por

último, se transfieren a condiciones continuas (LLHH), donde se adquiere una fotografía de la placa cada 30 min durante 6 d. Las fotografías obtenidas se cuantifican con los programas *Metamorph* y se analizan con el software *BRASS* (<http://millar.bio.ed.ac.uk/>).

Como se muestra en la Figura R.4.22, el período en la oscilación del aleteo de los cotiledones del mutante *spl7* cultivado en deficiencia y suficiencia de Cu permanece invariable. Sin embargo, la amplitud de las oscilaciones disminuye en las dos líneas del mutante *spl7*, siendo las diferencias todavía mayores en deficiencia de Cu. En la línea complementada se observa una situación intermedia entre el WT y los mutantes *spl7*, por lo que el restablecimiento del fenotipo es parcial.

Todos estos resultados apoyan la posible interacción entre el oscilador central del reloj y la homeostasis del Cu regulada por SPL7, que incluye a los transportadores COPT1 y COPT2 que median el propio transporte del metal.

DISCUSIÓN

1. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO EN COBRE, EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA SEÑALIZACIÓN POR ÁCIDO ABCSÍCO

En el presente trabajo se han evaluado los efectos moleculares provocados por el contenido en Cu de los medios de cultivo en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se han utilizado dos estrategias: la variación en el contenido del metal en el medio de crecimiento en plantas silvestres (WT) y la alteración del transporte de Cu en plantas transgénicas con expresión modificada de los transportadores COPT, tanto que los sobreexpresan (plantas COPT1^{OE}), como que tienen expresión reducida (plantas *copt2*).

En primer lugar para estudiar los efectos derivados del distinto contenido en Cu en plantas WT, se han utilizado condiciones suaves de crecimiento, tanto de deficiencia como de exceso del metal, como demuestra el hecho de que no se detecten cambios en parámetros como el contenido en clorofila total y la peroxidación lipídica, en las condiciones utilizadas (Figura R.1.5) (Andrés-Colás et al., 2013). Estas concentraciones están en el rango de las usadas por otros autores (Lequeux et al., 2010) y se consideran dentro de las condiciones fisiológicas que pueden encontrar las plantas en su ambiente natural.

El medio ½ MS (*Sigma*) supone un suministro de Cu subóptimo para la planta, con un contenido en Cu inferior a las condiciones de suficiencia (Marschner, 2002). Como consecuencia de la ligera deficiencia a la que están sometidas las plántulas cultivadas en el medio ½ MS, se induce la expresión de algunos miembros de la familia de transportadores de alta afinidad de Cu, COPT (Sancenón et al., 2003). Otros laboratorios, también han indicado que las plantas cultivadas en este medio presentan defectos en el transporte de electrones fotosintético, confirmando la ligera deficiencia de Cu en el mismo (Abdel-Ghany et al., 2005; Yamasaki et al., 2009).

Por otro lado, las plántulas cultivadas en Cu 10 μM se ven sometidas a un ligero exceso del metal, en base al contenido de Cu endógeno de dichas plántulas (20-30 $\mu\text{g/g}$ de peso seco) (Märschner, 2002). En las concentraciones de exceso del metal utilizadas en este trabajo no se detectan cambios en la longitud de las raíces, que es un parámetro sensible a los niveles de Cu del medio (Andrés-Colás et al., 2013).

La comparación de la expresión génica global entre condiciones de deficiencia y exceso de Cu indica que en plantas WT se activan respuestas al estrés en ambas condiciones. En concreto, el análisis de las categorías funcionales preponderantes en cada caso sugiere que parte de las respuestas obedecen a diferentes tipos de estrés oxidativo que se desencadenan en las dos condiciones de disponibilidades opuestas de Cu (Figuras R.1.6 y R.1.7). Efectivamente, el exceso de metales provoca la aparición de radicales hidroxilo a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Halliwell and Gutteridge, 1984) y la deficiencia de Cu, afecta al funcionamiento de las cadenas de transporte de electrones organulares, lo que incrementa la producción del radical superóxido (Abdel-Ghany et al., 2005; Gadjev et al., 2006; Yamasaki et al., 2009). Por lo tanto, el tipo de ROS mayoritario sería diferente en condiciones de deficiencia o de exceso del metal.

En este sentido, entre las enzimas generadoras de ROS que muestran resultados diferenciales en los análisis globales de expresión génica, se encuentran las NADPH oxidasas. Mientras que la NADPH oxidasa, codificada por *RbohI*, se induce en exceso de Cu, la expresión de *RbohD* se induce en deficiencia (Figura R.1.7) (Andrés-Colás et al., 2010). La expresión de *RbohD* se ha relacionado con la señalización por la hormona ABA y el calcio (Kwak et al., 2003; Zhang et al., 2009), lo que sugiere que, junto al estrés oxidativo, ambos podrían participar en la señalización en deficiencia de Cu. De acuerdo con esto, un transductor primario de señales externas de calcio, *CAS*, está inducido en condiciones de deficiencia de Cu (Figura R.1.7). Entre otros

procesos, el ABA regula el cierre estomático y la inhibición de las transiciones de fase embrionaria al crecimiento germinativo y desde éste al reproductivo (Leung and Giraudat, 1998). En este trabajo se muestra que el contenido en ABA es mayor en deficiencia de Cu (Figuras R.3.12 y R.3.13) y que el mutante *spl7* presenta dificultades en la apertura estomática (Figura R.3.14). Además, las semillas que proceden de plantas cultivadas sin Cu en la solución de riego muestran una menor tasa de germinación que las semillas de plantas que han sido cultivadas en suficiencia de Cu (Figura R.1.4). Todos estos resultados indican que el estrés oxidativo, el ABA y el calcio pueden jugar un papel clave en la señalización de la deficiencia de Cu (Figura D.1).

La síntesis de hormonas está controlada por el reloj circadiano (Robertson et al., 2009). En el caso concreto del ABA, se ha descrito la interacción directa con el reloj mediante la unión *in vivo* de TOC1, componente del núcleo del oscilador, al gen de respuesta a ABA, ABAR (Legnaioli et al., 2009). En nuestras condiciones experimentales, el Cu afecta tanto a la biosíntesis de ABA como a la expresión de los genes nucleares del reloj circadiano, *LHY* y *CCA1*, como se discutirá más adelante, lo que pone de manifiesto que el contenido del metal podría influir en la interacción entre ambos procesos, produciendo una compleja modulación temporal de las respuestas a la deficiencia de Cu.

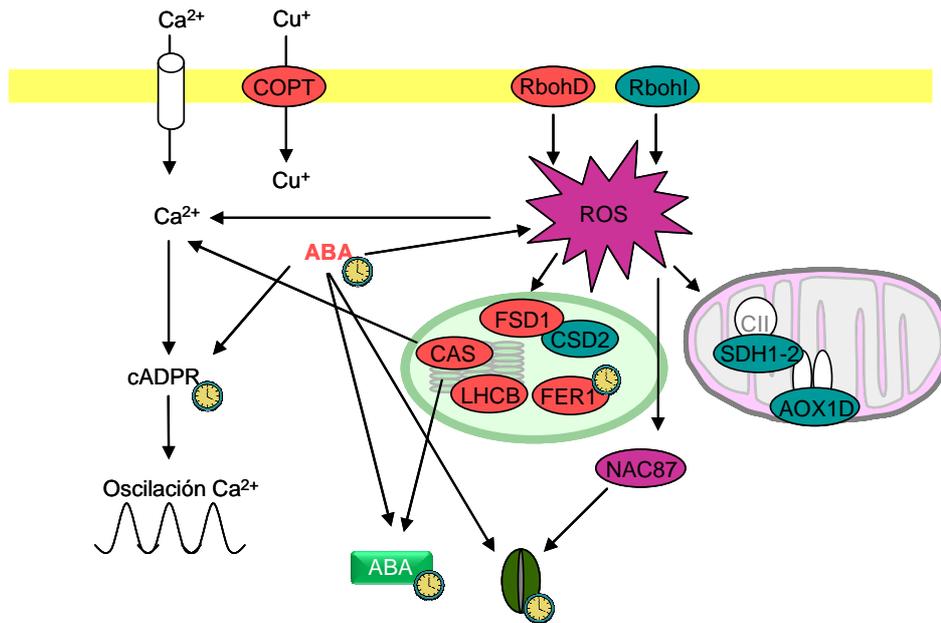


Figura D.1. Esquema de la relación entre el estrés oxidativo y la homeostasis del Cu. Los genes y procesos inducidos en deficiencia de Cu se representan en color rojo, los genes regulados en exceso de Cu, en color azul y genes y procesos inducidos en ambas condiciones, en color fucsia. Los relojes indican procesos que se han relacionado previamente en la bibliografía con el ritmo circadiano. Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

Por otro lado, uno de los genes que más se expresan en condiciones de exceso de Cu es *SDH1-2* (Figura R.1.6), una isoforma de baja expresión de la succinato deshidrogenasa mitocondrial (Huang et al., 2010). Se ha demostrado que la expresión de la isoforma principal, *SDH1-1*, desempeña un papel importante en la producción de ROS mitocondriales, que a su vez, desencadenan la expresión de genes de respuesta al estrés y de defensa (Gleason et al., 2011). En este sentido, la inducción de *SDH1-2* sugiere que la mitocondria percibe el exceso de Cu en la célula, lo que desencadena cambios en la expresión génica, probablemente encaminados a mejorar su funcionamiento (Andrés-Colás et al., 2013).

El uso de marcadores moleculares para determinar el estado nutricional de los niveles de Cu en las plantas es de gran interés agronómico para seguir las respuestas a deficiencia y exceso de Cu. La baja disponibilidad de un nutriente reduce el valor nutricional de los cultivos, lo que afecta en último término a la alimentación humana. Por otro lado, la Comisión Europea ya ha mostrado su preocupación por las consecuencias del uso abusivo de tratamientos que contienen Cu en cultivos de consumo humano (Houlton 2009). En este sentido, la expresión de *CAS* y *SDHI-2*, podría ser utilizada como marcador molecular de condiciones medioambientales que conducen, bien a una deficiencia o a un exceso de Cu, respectivamente, ya que en nuestro laboratorio hemos demostrado la especificidad de la regulación de estos genes por Cu (Andrés-Colás et al., 2013).

Con el objetivo de ahondar en los efectos provocados por una incorporación de Cu extracelular incrementada y constitutiva, hemos trabajado con plantas COPT1^{OE}. Los niveles ligeramente más altos de Cu endógeno en las plantas COPT1^{OE} son percibidos a través del factor transcripcional SPL7, como sugieren los cambios leves en la expresión de marcadores del estado nutricional de Cu (*FSD1* para la deficiencia y *CSD2* para el exceso de Cu) (Abdel-Ghany et al., 2005; Andrés-Colás et al., 2010). Este mayor contenido en Cu de las plantas COPT1^{OE} desencadena una respuesta que incluye la expresión de genes relacionados con el incremento del estrés oxidativo, como *AOX1D* y *LSU1* (Tabla R.3.3 y R.A3). Los miembros de la familia LSU, de función desconocida en *Arabidopsis thaliana*, están inducidos en deficiencia de sulfuro y, en menor medida, por estrés salino y limitación de nitrato (Lewandowska et al., 2010). A su vez, parte de la respuesta a deficiencia de sulfuro es inducida por el *miR395* (Matthewman et al., 2012), cuya expresión también está alterada en las plantas COPT1^{OE} (Tabla R.A3), lo que corrobora que la deficiencia de sulfuro constituye una parte de las respuestas de las plantas COPT1^{OE}, probablemente debido a la necesidad de compuestos azufrados en la defensa antioxidativa

(Maruyama-Nakashita et al., 2003). Por otro lado, se considera que la expresión de algunos miembros de la familia AOX, es un marcador de la adaptación de las plantas frente al estrés, ya que actúan como una ruta alternativa a la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Arnholdt-Schmitt et al., 2006). Además de los procesos descritos en las mitocondrias, el análisis funcional indica que los cloroplastos son el compartimento subcelular más afectado en las plantas COPT1^{OE} (Tabla R.3.2 y D.1).

Por otro lado, el análisis de la ontología génica a partir de los cambios de expresión obtenidos con micromatrices en plántulas COPT1^{OE}, revela que la familia de factores de transcripción NAC está entre las más representadas en dichas plantas (Tablas R.3.4 y R.A3). Recientemente, la expresión de *NAC87* se ha relacionado con la señalización dependiente de peróxido de hidrógeno que desencadena el cierre estomático (Legnaioli, 2013). Previamente a nuestro trabajo, se había relacionado a los metales con el comportamiento de los estomas en *Vicia faba*. Dicha conexión está basada en la formación de peróxido de hidrógeno catalizada por una metaloproteína, en concreto una amino oxidasa de Cu (An et al., 2008). En nuestro caso, la especificidad de la inducción de la expresión de *NAC87* por Cu, sugiere su participación en la señalización del metal mediada por ROS.

Tomados en conjunto, nuestros resultados ponen de manifiesto que el diferente contenido de Cu desencadena cascadas de señalización distintas en las que participa el estrés oxidativo generado en ambas condiciones (Figura D.1). De este modo, el aumento de Cu endógeno producido en las plantas COPT1^{OE} podría activar la maquinaria transcripcional, en gran parte mediada por los factores de tipo NAC, con el objetivo de aumentar la tolerancia al estrés oxidativo generado en estas plantas.

2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL TRANSPORTE DE COBRE

El factor transcripcional SPL7 se considera el regulador clave de la respuesta transcripcional en deficiencia de Cu (Kropat et al., 2005; Yamasaki et al., 2009; Bernal et al., 2012). Entre los principales genes regulados por SPL7 se encuentra *COPT2* (Figura R.1.7). Sin embargo, la regulación de la expresión de *COPT2* por SPL7 es parcial, como se observa al comparar la expresión del mutante *copt2-1* con la del mutante *spl7* (Figura R.2.1). Además, el nivel de inducción de los genes de respuesta a deficiencia de Cu, disminuye notablemente en las plantas que sobreexpresan constitutivamente otro miembro de la familia SPL, SPL3. Esta atenuación de la respuesta sugiere que en las plantas SPL3^{OE} se produciría una competencia entre los factores SPL3 y SPL7 por los motivos de unión GTAC de los promotores de los genes diana, como *FSD1* y *COPT2* (Figura R.1.10 y D.2a). Sin embargo, la ocupación de los sitios de unión por SPL3 no desencadenaría la activación transcripcional de los genes diana, lo que explicaría la atenuación de la expresión de los mismos en las plantas SPL3^{OE} (Figura D.2b).

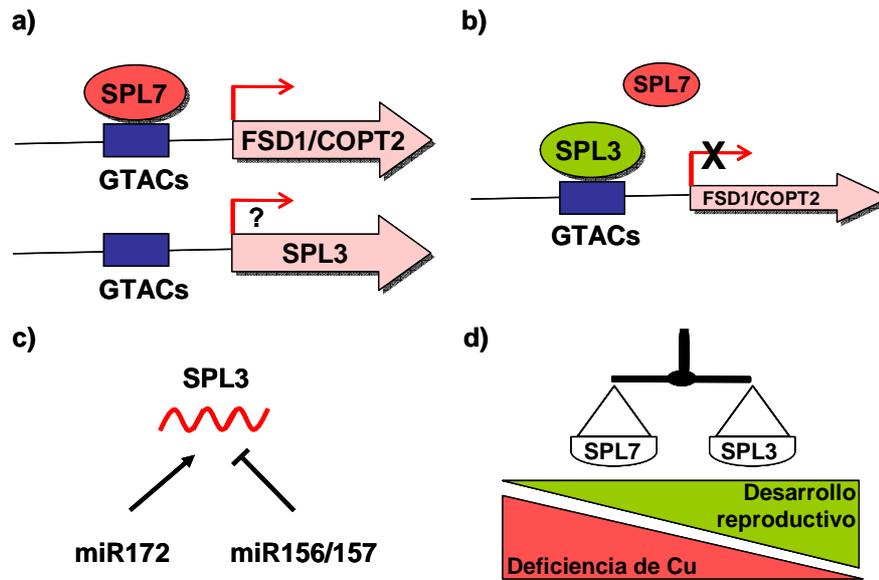


Figura D.2. Esquema de la regulación transcripcional mediada por SPL7 y de la regulación postranscripcional de SPL3. a) Respuesta transcripcional de la deficiencia de Cu en plantas WT. b) Respuesta transcripcional de la deficiencia de Cu en plantas *SPL3*^{OE}. c) Regulación postranscripcional de la expresión de *SPL3* mediada por los *miR156/157* y *172*. d) Esquema representativo del balance entre SPL7 y SPL3 en función de las condiciones ambientales y el estado de desarrollo de las plantas. Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

A pesar de que el promotor de *SPL3* contiene 5 motivos GTAC en las 1500 pb previas al inicio de la traducción (datos no mostrados), la expresión de *SPL3* no está regulada por *SPL7* según el análisis por RNA-Seq realizado con el mutante *spl7* (Bernal et al., 2012). En nuestros resultados tampoco se observa una dependencia clara de *SPL7* en la expresión de *SPL3* (Figura R.1.13). Estudios previos indican que la regulación de la familia SPL es compleja y que diferentes miRNAs juegan un papel importante en la misma. A nivel postranscripcional, la mayoría de SPLs de tamaño pequeño y mediano, entre las que se encuentra *SPL3*, se degradan por la acción de los *miR156/157* (Cardon et al., 1997; Schwab et al., 2005; Wu and Poethig, 2006; Gandikota et al., 2007).

Por otro lado, se ha descrito que el *miR172* induce, a través de sus dianas, a un conjunto de SPLs, entre las que se encuentra *SPL3* (Jung et al., 2011). Esto significa que los *miRNAs 156* y *172* ejercen efectos contrapuestos sobre la expresión de *SPL3* (Figura D.2c). Nuestros datos indican que el Cu afecta notablemente a la expresión de estos miRNAs. En este sentido, la inducción del *miR172* en deficiencia de Cu (Figura R.1.17) revela que podría participar en la inducción de la expresión de *SPL3*. Sin embargo, el *miR156* también se induce ligeramente en deficiencia de Cu (Figura R.1.17), lo que sugiere una compleja red de regulación espacio-temporal de *SPL3*. Como resultado observamos una ligera inducción de *SPL3*, parcialmente dependiente de *SPL7*, en condiciones de deficiencia severa de Cu (Figuras R.1.12 y R.1.13). La sensibilidad de las plantas *SPL3^{OE}* en dichas condiciones (Figura R.1.15) apoya la función de *SPL3* en la regulación por deficiencia de Cu y sugiere que, de manera similar, otros miembros de la misma subfamilia SPL, dependientes de la acción de estos miRNAs y con afinidad por los sitios GTAC, podrían competir también con *SPL7* en la regulación de la homeostasis de Cu (Figura D.2d).

El fenotipo principal de las plantas *SPL3^{OE}* es el de floración temprana, de acuerdo con la función de *SPL3* en la transición de la fase vegetativa a la reproductiva (Cardon et al., 1997). El papel que juega *SPL3* en el desarrollo reproductivo, donde el Cu es especialmente necesario, podría adquirir una mayor importancia en condiciones de deficiencia de Cu (Jewell et al., 1988). Como se muestra en el Capítulo 1, la menor tasa de germinación de las semillas WT (Figura R.1.4), obtenidas en cultivo hidropónico, en condiciones de deficiencia de Cu, confirma que la escasez de Cu, afecta a la productividad de las semillas. Estos resultados son un reflejo del delicado compromiso al que se ven sometidas las plantas en condiciones de deficiencias nutricionales, donde dependiendo del estado de desarrollo y ante el incremento del estrés y la disminución de la tasa de crecimiento, prevalece bien el desarrollo reproductivo,

mediado por SPL3, o bien las respuestas a la deficiencia del metal, mediadas por SPL7 (Figura D.2d).

3. RELACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE CON LA DE OTROS NUTRIENTES

Las respuestas a la deficiencia de Cu incluyen la expresión de genes relacionados con el metabolismo de otros nutrientes, como el Fe. En el presente trabajo, se ha evaluado la interacción entre ambos nutrientes a partir de dos aproximaciones experimentales: los estudios realizados en plantas WT con diferentes contenidos en Cu y en Fe y los análisis de expresión génica globales realizados con los mutantes *copt2* y *COPT1*^{OE}.

La proteína COPT2 es el miembro de la familia con mayor similitud a COPT1 (78% de identidad) y ambos transportadores se expresan en la membrana plasmática (Sancenón et al., 2003; Andrés-Colás et al., 2010; Perea-García et al., 2013). Aunque podrían desempeñar funciones parcialmente redundantes en la homeostasis del Cu en la parte aérea de la planta, una diferencia fundamental entre *COPT1* y *COPT2* es el patrón contrapuesto de la expresión de ambos en la raíz. Así, mientras que *COPT1* se expresa exclusivamente en el ápice de las raíces primarias y secundarias (Sancenón et al., 2004), *COPT2* se expresa en las regiones subapicales de las raíces (Figuras R.2.2 y R.2.3). Otra diferencia clave, es la regulación de la expresión de ambos transportadores en condiciones de deficiencia de Fe. Efectivamente, en un medio deficiente en Cu y Fe, la expresión relativa de *COPT1* disminuye (Figura R.2.12 y D.3), mientras que la expresión de *COPT2* aumenta respecto a la de un medio deficiente sólo en Cu (Figura R.2.1). Estudios recientes en arroz también indican que algunos miembros de la familia COPT están regulados por las deficiencias de Cu y de Fe (Yuan et al., 2011), lo que nos permite afirmar que la

relación entre el Cu y el Fe es un hecho extendido en otras plantas y que podría tener relevancia agronómica.

La expresión de *COPT2* se induce en deficiencia de Fe (Figura R.2.1), de acuerdo con la presencia de una caja de unión del factor transcripcional FIT en su promotor (Colangelo and Guerinot, 2004). Sin embargo, el hecho de que en suficiencia de Cu desaparezca la expresión en las raíces sugiere que el Cu juega un papel importante en las respuestas a deficiencia de Fe mediadas por FIT. Por otro lado, la expresión de *COPT2* en los cotiledones en condiciones de deficiencia de Fe no se altera en niveles altos de Cu (Figura R.2.3) y debe atribuirse a otro mecanismo independiente de FIT, ya que este factor de transcripción no se expresa en la parte aérea (Perea-García et al., 2013).

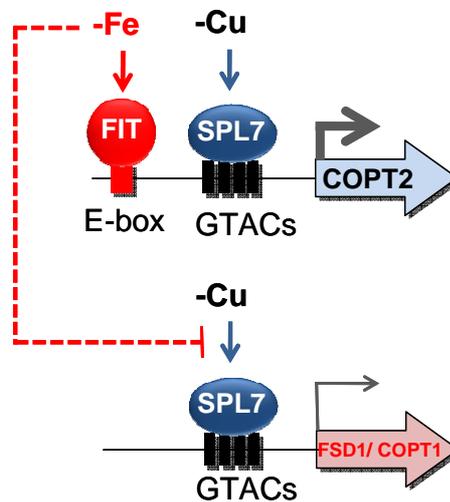


Figura D.3. Regulación de la expresión de *COPT2*, *FSD1* y *COPT1* según el estado nutricional de Fe y de Cu. La expresión de *COPT2* está mediada por los factores transcripcionales FIT y SPL7 y se incrementa en la deficiencia simultánea de Fe y de Cu. La expresión de *FSD1* y *COPT1* está mediada por SPL7 en deficiencia de Cu y está atenuada en condiciones de doble deficiencia metálica. Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

La mayor resistencia a la clorosis férrica de las plantas *copt2-1* sugiere una aplicación biotecnológica de gran interés agronómico debido a la baja biodisponibilidad del Fe en los suelos de cultivo, donde la eliminación de la expresión de *COPT2* podría retrasar la clorosis provocada por una deficiencia de Fe. Aunque todavía son necesarios más ensayos para entender los mecanismos que desencadenan el fenotipo de *copt2-1*, uno de los posibles motivos para explicar el aumento de los niveles endógenos de Cu en condiciones de deficiencia de Fe (Figura R.2.11) es el de favorecer el suministro de Cu como cofactor a enzimas que sustituyen funcionalmente a ferroproteínas, optimizando así, la utilización del Fe disponible (Waters et al., 2012). En este sentido, las plántulas *copt2-1* muestran un ligero aumento de la expresión de *FSD1* en relación a las plántulas WT, en la doble deficiencia metálica (Figura R.2.13), lo que quizás podría indicar una mejor protección frente al estrés oxidativo. Acorde con la resistencia a la clorosis férrica observada, los parámetros indicativos de la situación del aparato fotosintético, tales como el contenido de clorofila, son más altos en *copt2-1* que en las plantas WT (Figuras R.2.5 y R.2.7), lo que indica que la ausencia de la expresión de *COPT2* provoca un mejor mantenimiento temporal del aparato fotosintético de la planta, y que este efecto, se intensifica en la deficiencia de ambos metales (Figuras R.2.5, R.2.6 y R.2.7). Sin embargo, las medidas de actividad SOD y el crecimiento de estas plantas en medios con paraquat o agua oxigenada, ponen de manifiesto que las plántulas *copt2-1* no presentan una mayor resistencia al estrés oxidativo en general (Figuras R.2.14 y R.2.15).

Otras pistas sobre las posibles causas moleculares del fenotipo de resistencia a clorosis férrica observado las proporciona el análisis de los cambios globales de expresión génica en las plántulas *copt2-1*. Una de las categorías alteradas en la línea *copt2-1* es la respuesta al ayuno de Pi, independientemente de la condición nutricional del medio (Tablas R.2.1 y R.A2 y Figura R.2.19). Previamente, se había descrito que *COPT2* se reprime por

deficiencia de Pi (Thibaud et al., 2010) y que existen conexiones entre las respuestas al ayuno de Pi y la homeostasis de otros iones (Abel, 2011; Chiou and Lin, 2011). En concreto, las respuestas a la deficiencia de Fe actúan antagónicamente al ayuno de Pi en el crecimiento de la raíz (Svistonoff et al., 2007; Ward et al., 2008; Abel, 2011).

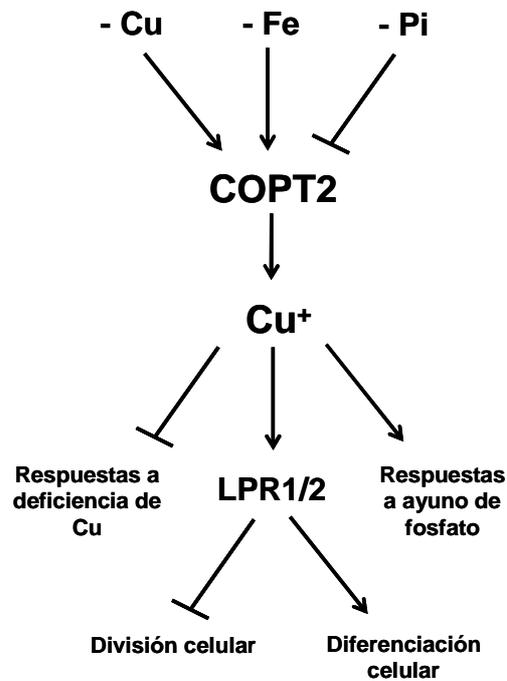


Figura D.4. Modelo de la expresión de *COPT2* en condiciones de deficiencia de Cu, Fe y Pi. Las deficiencias de Cu, Fe y Pi ejercen efectos antagónicos en la expresión de *COPT2*. La incorporación de Cu extracelular al citosol, atenúa la respuesta a deficiencia de Cu y podría participar en la respuesta local y en la señalización sistémica por ayuno de Pi. La respuesta local está mediada por las multicobre oxidadas LPR1 y LPR2 que participan en la diferenciación e inhiben la división celular. Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

Por tanto, a la inducción de la expresión génica de *COPT2* en las deficiencias de Fe y de Cu, hay que añadir la represión descrita en ayuno de Pi (Figura D.4) (Thibaud et al., 2010). De este modo, *COPT2* podría participar en la detección del ayuno de Pi mediante el transporte de Cu a cuproproteínas, como las multicobre oxidasas LPR1 y LPR2, implicadas en el crecimiento de las raíces en respuesta al ayuno de Pi (Svistoonoff et al., 2007). De acuerdo con esta hipótesis, se observa un ligero aumento en la longitud de la raíz en la línea *copt2-1*, en comparación con las plántulas WT en ayuno de Pi (Figura R.2.20), lo que también está apoyado por el fenotipo observado en los mutantes simples *lpr1* y *lpr2* (Svistoonoff et al., 2007).

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos de la caracterización del mutante *copt2-1* apoyan la conexión entre las homeostasis del Cu y del Fe, así como la interacción de ambas con las respuestas al ayuno de Pi (Figura D.4).

Por otro lado, esta relación entre la homeostasis del Cu y del Fe también se pone de manifiesto en las plantas *COPT1^{OE}*. Estas plantas muestran un ligero aumento de los niveles endógenos de Cu en comparación con las plantas WT (Andrés-Colás et al., 2010). El aumento de los niveles endógenos de Cu, puede interferir con la homeostasis de otros metales, como el Fe (Abdel-Ghany et al., 2005; Madejón et al., 2009; Bernal et al., 2012; Perea-García et al., 2013). Efectivamente, esta interacción se observa en las plantas *COPT1^{OE}* que presentan alterada la expresión de genes relacionados con la homeostasis de Fe (Tabla R.3.3 y Figura R.3.6). Entre ellos, la expresión de *FER1* está reprimida en las plántulas *COPT1^{OE}* (Figura R.3.6). Recientemente, la expresión de *FER1* se ha relacionado con el ritmo circadiano, ya que el regulador TIC, *time for coffee*, actúa como represor transcripcional de *FER1* en condiciones de deficiencia de Fe (Duc et al., 2009). Por otro lado, UPB1 es un factor transcripcional que participa en el equilibrio entre proliferación y división celular en la raíz. Entre las categorías funcionales reprimidas por UPB1, se encuentran genes de la homeostasis del Cu y del Fe (Tsukagoshi et al., 2010).

La expresión de *UPB1* está inducida en las plántulas *COPT1^{OE}* en condiciones de deficiencia de Cu (Tabla R.A3 y Figura R.3.6). Fenotípicamente, las plántulas *COPT1^{OE}* presentan una reducción de la longitud de la raíz en condiciones de exceso de Cu (Andrés-Colás et al., 2010), acorde con la disminución de los niveles basales de peróxido de hidrógeno, debido a la formación de radicales hidroxilo (OH^\cdot) citosólicos (Rodrigo-Moreno et al., 2012). *UPB1* regula directamente la expresión de diversas peroxidasas que modulan el incremento de ROS que tiene lugar antes de la proliferación celular (Tsukagoshi et al., 2010). En este sentido, *UPB1* podría participar en la modulación del estrés oxidativo generado por los desbalances nutricionales de metales como el Cu y el Fe.

Los resultados obtenidos en la caracterización de las plantas *COPT1^{OE}* sugieren que el incremento constitutivo en el contenido en Cu altera la expresión de genes que participan en el metabolismo oxidativo y la homeostasis del Fe y ponen de manifiesto las repercusiones que genera el posible desequilibrio nutricional.

4. ASPECTOS TEMPORALES DE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE Y SU RELACIÓN CON LOS RITMOS CIRCADIANOS

En las plantas *COPT1^{OE}*, además del incremento en el contenido endógeno del Cu, tiene lugar la desregulación de su transporte. Efectivamente, este transporte de Cu, mediado por los miembros de la familia *COPT*, está inhibido por el propio metal, ya que cuando éste alcanza niveles altos en el citosol, la expresión de los transportadores se reprime. Este mecanismo provoca un circuito de auto-regulación del nivel de Cu citosólico, mediado por la expresión de sus propios transportadores, a través de *SPL7* (Figura D.5a) (Peñarrubia et al., 2010). Por lo tanto, en las plantas *COPT1^{OE}* se produce una desregulación de la homeostasis de Cu, ya que la expresión ectópica de *COPT1*

es independiente del Cu del medio, por lo que el bucle de retroalimentación generado por el Cu y sus transportadores queda suprimido en esta línea transgénica (Figura D.5b).

Los bucles de retroalimentación constan de un componente negativo y otro positivo que tienden a compensar el sistema, por lo que son muy utilizados por los seres vivos para mantener la homeostasis de un determinado compuesto (Novak and Tyson, 2008). Estos bucles de retroalimentación pueden, a su vez, estar relacionados entre sí, llegando a alcanzar gran nivel de complejidad las interacciones entre ellos, lo que dificulta el estudio de la regulación de los mismos. Un ejemplo de la complejidad que pueden alcanzar las interacciones entre bucles, lo estamos empezando a observar en el estudio de los relojes biológicos y los ritmos circadianos que generan (Sanchez and Yanovsky, 2013). Estas interacciones permiten la regulación fina e integral de los sistemas biológicos y es necesario su estudio y comprensión para abordar las respuestas globales a los cambios en el desarrollo y a las situaciones ambientales en los seres vivos.

En el presente trabajo, hemos evaluado la posibilidad de que exista una regulación recíproca entre los bucles de retroalimentación que forman el reloj circadiano y el transporte de Cu mediado por los transportadores COPT. Inicialmente, nuestra hipótesis propone que el reloj ejerce una influencia positiva sobre la homeostasis del Cu y que ésta tiene un efecto negativo sobre el reloj (Figura D.5c). En este sentido, hemos estudiado el efecto del Cu en la expresión de genes del núcleo del oscilador central en plantas WT y mutantes COPT1^{OE}. Y por otro lado, hemos estudiado la expresión temporal de genes que participan en la homeostasis de Cu.

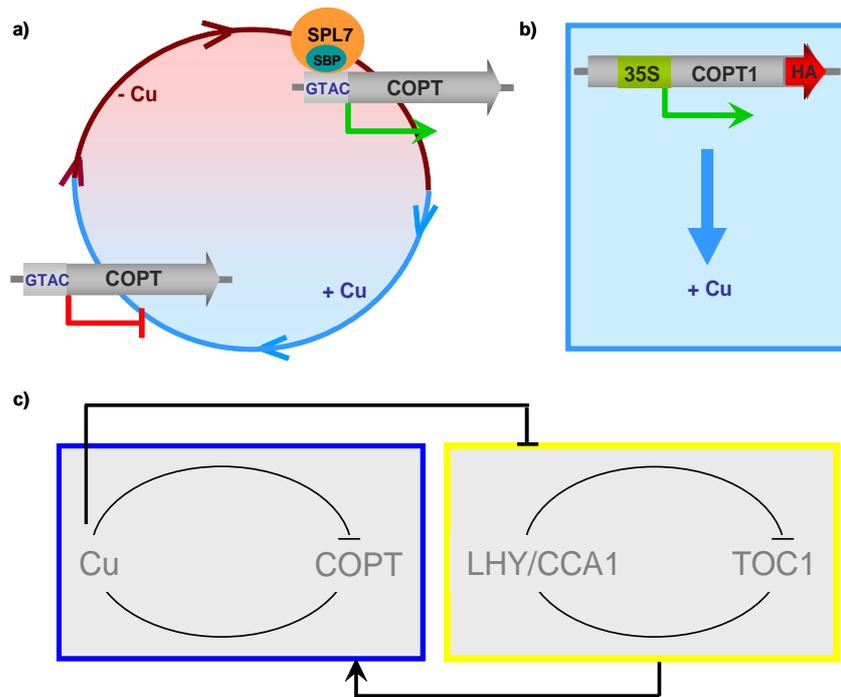


Figura D.5. Circuitos de retroalimentación del transporte de Cu y el reloj circadiano en *Arabidopsis*. a) Bucle de auto-regulación del transporte de Cu en plantas WT. b) Desregulación del transporte de Cu en plantas $COPT1^{OE}$. c) Modelo de regulación recíproca entre el ritmo circadiano y la homeostasis de Cu. Las explicaciones correspondientes se comentan en el texto. Los nombres de los genes que se muestran en la Figura se indican en el índice de abreviaturas (Páginas vi-x).

Los resultados del análisis de las micromatrices citadas en el Capítulo 1, fueron los primeros en sugerir la relación entre la homeostasis del Cu y el reloj circadiano, ya que diferentes miembros de la categoría del ritmo circadiano se inducen tanto en deficiencia como en exceso de Cu (Andrés-Colás et al., 2013). Los genes *PRR5* y *GRP7*, inducidos en exceso de Cu (Figura R.1.6), son genes que codifican a proteínas involucradas en el reloj circadiano y, más en concreto, relacionadas con el oscilador nocturno (Fujimori et al., 2005; Schöning et al., 2008). Por el contrario, la deficiencia de Cu induce la expresión de dos componentes del reloj circadiano del oscilador matutino *LHY* y *CCA1* (Figuras

R.4.1, R.4.2 y R.4.5) (Andrés-Colás et al., 2010). Además, esta regulación depende de la dosis de Cu y se mantiene en condiciones continuas de luz y temperatura, afectando sobretodo, a la amplitud de la oscilación de *LHY* (Figura D.6). La pérdida de función o la sobreexpresión de dichos genes vinculados al reloj provoca arritmicidad y/o alteraciones de parámetros tales como el período, la amplitud o la fase de las oscilaciones de expresión génica dependientes del reloj (McClung, 2006), por lo que cabe esperar que la desregulación del transporte de Cu, afecte a dichos parámetros.

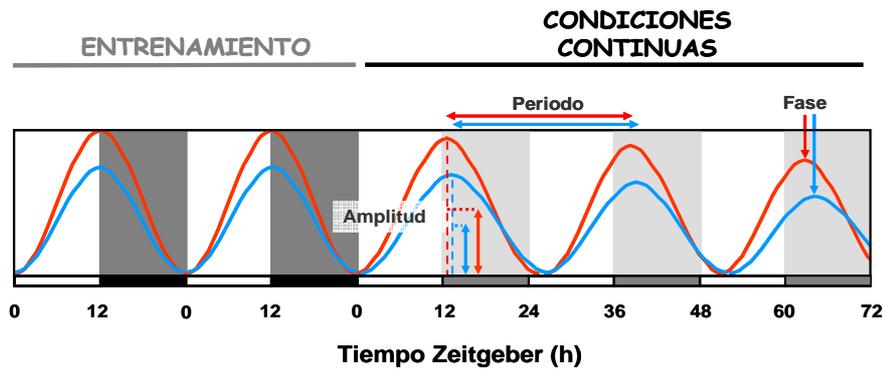


Figura D.6. Esquema de la oscilación de las plántulas *PLHY:LUC*. Plántulas *PLHY:LUC* se cultivaron en medio ½ MS (línea roja) y ½ MS con 10 μM de Cu (línea azul). Después del entrenamiento en condiciones de LDHC, se midió la actividad luciferasa en condiciones LLHH durante los 3 d siguientes. La franja blanca representa el día; la gris oscuro, la noche; y la franja gris claro, la noche subjetiva.

En este sentido, las plantas *COPT1^{OE}* muestran fenotipos que podrían estar asociados a alteraciones del reloj circadiano (Figura R.3.3). Por ejemplo, el número de hojas de la roseta en la transición a la fase reproductiva está alterado en dichas plantas con respecto a las plantas WT y dicha alteración es dependiente de las condiciones del fotoperíodo en el que crecen (Figura D.7) (Andrés-Colás et al., 2010). Además, otro parámetro relacionado con el ritmo circadiano, como es la elongación del hipocotilo en respuesta a la luz (Ito et al.,

2007), también está alterado en dichas plantas transgénicas (Figuras R.3.3 y D.7). Más importante aún, el desarrollo de las plantas $COPT1^{OE}$ está alterado en condiciones ambientales continuas (Figuras R.4.12 y R.4.13), lo que sugiere que dichas plantas presentan problemas para prosperar en ausencia de las principales entradas externas del reloj circadiano, como son los ciclos de luz y de temperatura.

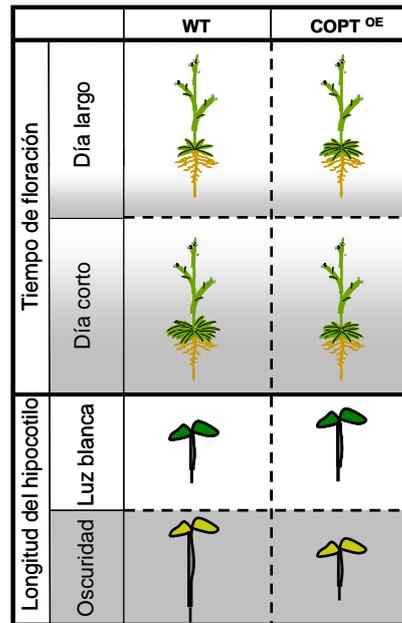


Figura D.7. Fenotipos de las plantas $COPT1^{OE}$ asociados al ritmo circadiano. El tiempo de floración se determina como el número de hojas de la roseta en la transición floral en plantas cultivadas en maceta y en condiciones de fotoperíodo de día largo y corto. La longitud del hipocotilo se mide en plántulas cultivadas 7 d en medio ½ MS en condiciones de luz u oscuridad continuas.

Aunque el mecanismo de regulación del Cu sobre el reloj está lejos de ser entendido, la existencia de elementos GTAC en los promotores de los genes *LHY* y *CCA1* sugiere un posible efecto regulador mediado por *SPL7*. De

acuerdo con esta hipótesis, el mutante *spl7* muestra alteraciones en la ritmicidad del movimiento foliar, un parámetro dependiente del reloj circadiano (Figura R.4.23). Curiosamente, otros miembros de la familia SPL, como SPL3 y SPL8, participan en procesos mediados por el reloj, tales como la floración y la fertilidad (Cardon et al., 1999; Unte et al., 2003; Wu and Poethig, 2006; Gandikota et al., 2007; Zhang et al., 2007). Nuestros datos sugieren que algunos miembros de la familia SPL, como SPL3, pero no SPL8, podrían participar en la integración del estado nutricional de Cu y las respuestas circadianas de las plantas.

De acuerdo con el bucle de retroalimentación que el Cu ejerce sobre su propio transporte, hemos elaborado un modelo matemático que predice la existencia de una posible oscilación circadiana en los niveles citosólicos de Cu con un máximo próximo al anochecer (Peñarrubia et al., 2010). Experimentalmente, tenemos datos que muestran que, efectivamente, la oscilación de los niveles del mensajero del transportador *COPT2*, tanto en ciclos de luz/oscuridad como en condiciones continuas, muestra una periodicidad de 24 h, siendo su máximo de expresión cercano al amanecer (Figuras R.4.3, R.4.7 y R.4.8). De este modo, el pico máximo de la concentración citosólica del metal y la expresión del transportador podrían producirse con un desfase de alrededor de 12 horas.

Además, diferentes herramientas informáticas (Figura R.4.22) y nuestros propios resultados (Figura R.4.21) muestran que *SPL7* y *SPL3* tienen el mismo patrón de oscilación que *COPT2* en condiciones de ciclos luz/oscuridad. Curiosamente, los máximos de expresión de *COPT2* y *SPL7* coinciden con los descritos para los genes nucleares del reloj *LHY* y *CCA1* (Mizoguchi et al., 2002).

También se ha descrito la oscilación diurna de los niveles de cuatro miRNAs de *Arabidopsis*, incluyendo el *miR398* y su diana *CSD2* (Siré et al., 2009), lo que sugiere que la influencia de la luz es clave en la respuesta a la

deficiencia de Cu. Efectivamente, aunque las plantas etioladas todavía mantienen la regulación de genes en deficiencia de Cu en la mayoría de los casos (Figuras R.4.17, R.4.18, R.4.19, R.4.20 y R.4.21), la luz exagera notablemente la expresión de los genes diana de la homeostasis del Cu. En concreto, la expresión de *COPT2* se encuentra atenuada en plantas etioladas, pero todavía es cíclica entre 0 y 12 h con respecto a condiciones LDHC (Figuras R.4.3 y R.4.7). Sin embargo, la expresión de otro transportador de la familia COPT, *COPT3*, que no tiene elementos de regulación por deficiencia de Cu en su promotor, se induce en plantas etioladas con respecto a las condiciones LDHC. Este hecho sugiere que la entrada de Cu del exterior, a través de transportadores de la membrana plasmática como *COPT1* y *COPT2*, podría estar separada temporalmente de la entrada de Cu a partir de compartimentos internos, mediada entre otros por *COPT3*.

Las diferencias de regulación observadas podrían residir en la presencia de diferentes combinaciones de elementos reguladores presentes en los promotores de los genes estudiados. El análisis de los promotores de los miembros de las familias COPT y de las ATPasas tipo P (HMA) indica la presencia de posibles elementos asociados con la regulación circadiana (Tabla R.4.1). Por otra parte, el promotor del factor de transcripción *SPL7* también posee elementos circadianos (Tabla R.4.1). Sin embargo, el promotor de *FSD1* carece de éstos, aunque tiene elementos reguladores diurnos (Tabla R.4.1), lo que podría explicar la pérdida de la oscilación en condiciones continuas (Figura R.4.8) y sugiere un papel de *FSD1* en la destoxificación de ROS generados de la exposición a la luz, como ya se ha descrito para *CSD2* (Sunkar et al., 2006).

Tomados en conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que el oscilador central del reloj circadiano, compuesto de bucles de retroalimentación transcripcionales y postraduccionales, se podría considerar como un integrador entre los ciclos ambientales externos de luz y temperatura y los ciclos internos de transporte de metabolitos citosólicos (Figura D.8). Dicha integración

permitiría aumentar la robustez del oscilador central para, de ese modo, compensar la falta de ritmicidad de los ciclos externos e internos podrían provocar en el reloj.

Además del transporte de Cu, se ha descrito la influencia recíproca entre el reloj circadiano y otras oscilaciones tales como la concentración de calcio citosólico, el cambio de pH del estroma y los cambios redox intracelulares (Figura D.8). Las oscilaciones circadianas de la concentración de calcio adquieren especial importancia para la actividad de numerosas enzimas dependientes de calcio y en procesos regulados por el reloj (Johnson et al., 1995). Por otro lado, las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis desencadenan cambios en la concentración de protones, lo que produce fluctuaciones diurnas en el pH del estroma que participan en la activación/desactivación de enzimas como la RubisCo. Además, el estado redox de los grupos tiol de determinados residuos de cisteína claves para la estructura y función de las proteínas, puede verse afectado por la unión de Cu a dichos grupos (Ochiai, 1995; Koch et al., 1997; Desideri and Falconi, 2003; Yang et al., 2006). Recientemente, también se ha añadido la homeostasis del Fe a la creciente lista de bucles interconectados con el oscilador central (Chen et al., 2013; Hong et al., 2013; Salome et al., 2013), lo que apoya y amplía la interconexión entre los metales de transición y el reloj circadiano descritos en el presente trabajo.

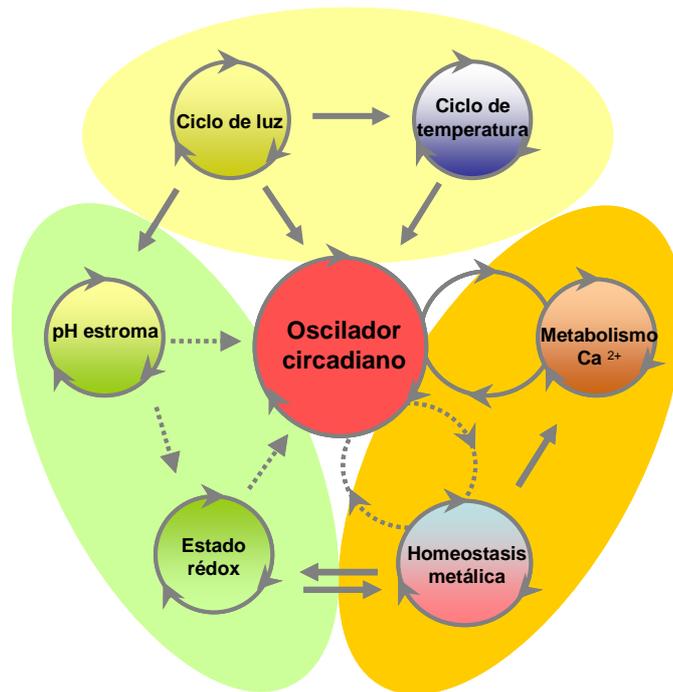


Figura D.8. Modelo global de bucles de retroalimentación interconectados con el oscilador circadiano. El núcleo del oscilador central está entrenado por señales medioambientales, como los ciclos de luz y temperatura y conectado con osciladores bioquímicos endógenos, tales como el metabolismo del calcio (Ca^{2+}) o la homeostasis metálica, lo que le permite adaptarse a las oscilaciones en las condiciones intracelulares derivadas de los cambios en el estado redox o en el pH del estroma. Modificado de (Perea-García et al., 2010).

Este trabajo muestra la necesidad de añadir las dimensiones espaciales y temporales al estudio de las redes de la homeostasis de metales de transición, como el Cu y el Fe, y de incluir su conexión con los ritmos circadianos y con las oscilaciones en las condiciones bioquímicas intracelulares. De este modo, se pueden llegar a integrar los mecanismos de asimilación y transporte de metales de forma global en las plantas superiores para interpretar e incluso poder llegar a predecir las respuestas a los cambios ambientales, tanto internos como externos.

CONCLUSIONES

- Se han establecido las condiciones para el crecimiento de plantas en medios deficientes y con exceso de Cu en diferentes sistemas de cultivo.
- La validación de la expresión génica tras un análisis global realizado en condiciones de deficiencia y exceso de Cu ha permitido determinar si existe dependencia del factor transcripcional SPL7.
- Las expresiones de los genes *CAS* y *SDHI-2* implican al cloroplasto y la mitocondria, respectivamente, en las respuestas al Cu y se pueden utilizar como nuevos marcadores moleculares del contenido endógeno de Cu.
- Las cinéticas de expresión de dos marcadores de deficiencia de Cu, *FSD1* y *COPT2*, cuando las plantas se transfieren a medios con diferente contenido metálico, indican que los tiempos de respuesta son diferentes para ambos genes y que su expresión es cíclica.
- El factor de transcripción SPL3 participa en la respuesta mediada por SPL7 en condiciones de deficiencia severa de Cu, ya que la sobreexpresión de SPL3 provoca la atenuación de dicha respuesta y compromete el desarrollo de las plantas SPL3^{OE} en estas condiciones. Además, la regulación ejercida por los *miR156* y *172* sobre SPL3 es dependiente del contenido de Cu.
- El mutante de pérdida de función *copt2-1* presenta una mayor resistencia a la clorosis férrica, lo que pone de manifiesto la relación entre los micronutrientes Cu y Fe. La expresión de *COPT2* está potenciada en la doble deficiencia metálica, mientras que otras respuestas a la deficiencia de Cu están atenuadas en la doble deficiencia, lo que implica una mayor expresión de las SOD en el mutante. Sin embargo, el análisis global de los

cambios de expresión génica en el mutante revela que la base del fenotipo podría radicar en el papel del transporte de Cu, mediado por *COPT2*, en la señalización por ayuno de Pi.

- El análisis global de los cambios de expresión génica en plantas WT y *COPT1^{OE}* indica que la homeostasis del Fe y el estrés oxidativo, así como la señalización por ABA, en la que podría participar el factor NAC87, forman parte de la respuesta diferencial del mutante.
- Para testar la hipótesis de la regulación recíproca entre el reloj circadiano y la homeostasis del Cu, hemos determinado que la expresión de los genes nucleares del reloj *LHY* y *CCA1*, así como la de algunas de sus dianas, está regulada por Cu en plantas WT y *COPT1^{OE}*, las cuales muestran fenotipos asociados a alteraciones del reloj circadiano y presentan dificultades para progresar en condiciones continuas.
- La detección continua de la actividad luciferasa dirigida por promotores inducibles por deficiencia de Cu pone de manifiesto la regulación diurna y circadiana en la expresión de los genes *FSD1* y *COPT2*, respectivamente. Además, la luz juega un papel intensificador de la expresión de éstos y de otros genes, lo que muestra la necesidad de integrar los aspectos temporales en la caracterización de la homeostasis metálica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Ghany SE, Burkhead JL, Gogolin KA, Andres-Colas N, Bodecker JR, Puig S, Penarrubia L, Pilon M** (2005) AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Letters* **579**: 2307-2312
- Abdel-Ghany SE, Muller-Moule P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T** (2005) Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *The Plant Cell* **17**: 1233-1251
- Abel S** (2011) Phosphate sensing in root development. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 303-309
- Alabadí D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay S** (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**: 880-883
- Alloway BJ** (1995) Heavy metals in soils. Chapman & Hall, London
- An Z, Jing W, Liu Y, Zhang W** (2008) Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany* **59**: 815-825
- Andrés-Colás N** (2007) Caracterización de transportadores de cobre de *Arabidopsis thaliana*. Universitat de València, Valencia
- Andrés-Colás N, Perea-García A, Mayo de Andrés S, García-Molina A, Dorcey E, Rodríguez-Navarro S, Pérez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L** (2013) Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in *Arabidopsis* seedlings. *Metallomics* **5**: 1234-1246
- Andrés-Colás N, Perea-García A, Puig S, Peñarrubia L** (2010) Deregulated copper transport affects *Arabidopsis* development especially in the absence of environmental cycles. *Plant Physiology* **153**: 170-184
- Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Peñarrubia L** (2006) The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *The Plant Journal* **45**: 225-236
- Andrews NC** (2002) Metal transporters and disease. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**: 181-186
- Arnholdt-Schmitt B, Costa JH, de Melo DF** (2006) AOX a functional marker for efficient cell reprogramming under stress?. *Trends in Plant Science* **11**: 281-287
- Arnon DI, Hoagland DR** (1938) A comparison of water culture and soil as media for crop production. *Science* **89**: 1938-1940
- Aukerman MJ, Sakai H** (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell* **15**: 2730-2741
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K** (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons (Eds). New York
- Balandin T, Castresana C** (2002) AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiology* **129**: 1852-1857
- Beauclair L, Yu A, Bouche N** (2010) microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **62**: 454-462
- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ** (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Genetics* **6**: 544-556
- Bernal M, Casero D, Singh V, Wilson GT, Grande A, Yang H, Dodani SC, Pellegrini M, Huijser P, Connolly EL, Merchant SS, Kramer U** (2012) Transcriptome sequencing

- identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**: 738-761
- Bhardwaj V, Meier S, Petersen LN, Ingle RA, Roden LC** (2011) Defence responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Pseudomonas syringae* are regulated by the circadian clock. *PLoS One* **6**: 1-8
- Bieniawska Z, Espinoza C, Schlereth A, Sulpice R, Hinch DK, Hannah MA** (2008) Disruption of the *Arabidopsis* circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive transcriptome. *Plant Physiology* **147**: 263-279
- Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P** (2005) Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *Journal of Molecular Biology* **352**: 585-596
- Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P, Van de Peer Y** (2004) Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics* **101**: 11511-11516
- Borjigin J, Payne AS, Deng J, Li X, Wang MM, Ovodenko B, Gitlin JD, Snyder SH** (1999) A novel pineal night-specific ATPase encoded by the Wilson disease gene. *The Journal of Neuroscience* **19**: 1018-1026
- Bowler C, Alliotte T, Loose MD, Montagu MV, Inze D** (1989) The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. *The EMBO Journal* **8**: 31-38
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Briat JF** (1996) Roles of ferritin in plants. *Journal of Plant Nutrition* **19**: 1331-1342
- Buchanan BB, Balmer Y** (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 187-220
- Buege J, Aust S** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology* **52**: 302-310
- Buhtz A, Pieritz J, Springer F, Kehr J** (2010) Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biology* **10**: 64-77
- Burgess A, Searle I** (2011) The clock primes defense at dawn. *Immunology & Cell Biology* **89**: 661-662
- Burkhead JL, Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M** (2009) Copper homeostasis. *New Phytologist* **182**: 799-816
- Cai X, Davis EJ, Ballif J, Liang M, Bushman E, Haroldsen V, Torabinejad J, Wu Y** (2006) Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2563-2569
- Caillaud M-C, Paganelli L, Lecomte P, Deslandes L, Quentin M, Pecrix Y, Le Bris M, Marfaing N, Abad P, Favery B** (2009) Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division. *PLoS One* **4**: 1-9
- Cardon G, Hohmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P** (1999) Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* **237**: 91-104
- Cardon GH, Hohmann S, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P** (1997) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. *The Plant Journal* **12**: 367-377
- Clough SJ, Bent FA** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735-743
- Cobine PA, Pierrel F, Bestwick ML, Winge DR** (2006) Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 36552-36559
- Colangelo EP, Guerinot ML** (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *The Plant Cell* **16**: 3400-3412
- Covington MF, Harmer SL** (2007) The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* **5**: 1773-1784

- Crichton RR, Pierre JL** (2001) Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals* **14**: 99-112
- Crouch PJ, White AR, Bush AI** (2007) The modulation of metal bio-availability as a therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *FEBS Journal* **274**: 3775-3783
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S** (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annual Botany* **103**: 1-11
- Chang C, Shockey JA** (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 352-358
- Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE** (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 19861-19866
- Chen YY, Wang Y, Shin LJ, Wu JF, Shanmugam V, Tsednee M, Lo JC, Chen CC, Wu SH, Yeh KC** (2013) Iron is involved in maintenance of circadian period length in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**: 778-789
- Chiou TJ, Lin SI** (2011) Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 185-206
- Desideri A, Falconi M** (2003) Prokaryotic Cu, Zn superoxide dismutases. *Biochemical Society Transactions* **31**: 1322-1325
- Devlin PF, Kay SA** (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *The Plant Cell* **12**: 2499-2510
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C** (2008) InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SMN, Baier M, Finkemeier I** (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1697-1709
- Dong J, Kim ST, Lord EM** (2005) Plantacyanin plays a role in reproduction. *Plant Physiology* **138**: 778-789
- Dowson-Day MJ, Millar AJ** (1999) Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **17**: 63-71
- Drazkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z** (2004) Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* **17**: 379-387
- Duc C, Cellier F, Lobreaux S, Briat JF, Gaymard F** (2009) Regulation of iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by the clock regulator time for coffee. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 36271-36281
- Dugas DV, Bartel B** (2008) Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Molecular Biology* **67**: 403-417
- Dunlap JC, Loros JJ, Merrow M, Crosthwaite S, Bell-Pedersen D, Garceau N, Shinohara M, Cho H, Luo C** (1996) The genetic and molecular dissection of a prototypic circadian system. *Progress in Brain Research* **111**: 11-27
- Edwards, Miller** (2007) Analysis of Circadian Leaf Movement Rhythms in *Arabidopsis thaliana*, in *Circadian Rhythms: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology* **362**: 103-113
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **93**: 5624-5628
- Feng H, An F, Zhang S, Ji Z, Ling HQ, Zuo J** (2006) Light-regulated, tissue-specific, and cell differentiation-specific expression of the *Arabidopsis* Fe(III)-chelate reductase gene AtFRO6. *Plant Physiology* **140**: 1345-1354
- Fernandes AP, Holmgren A** (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & Redox Signaling* **6**: 63-74

- Fiorani F, Umbach A, Siedow J** (2005) The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature: a study of *Arabidopsis* AOX1a transgenic plants. *Plant Physiology* **139**: 1795–1805
- Fowler SG, Cook D, Thomashow MF** (2005) Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiology* **137**: 961-968
- Fujimori T, Sato E, Yamashino T, Mizuno T** (2005) PRR5 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5) plays antagonistic roles to CCA1 (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1) in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**: 426-430
- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Mittler R, Breusegem FV, Shulaev V, Apel K, Inze D** (2006) Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**: 436-445
- Gandikota M, Birkenbihl RP, Hohmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P** (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal* **49**: 683-693
- Garcia-Molina A** (2010) Funció de membres de la família de transportadors COPT en l'homeostasi del coure d'*Arabidopsis thaliana*. Universitat de València, Valencia
- Garcia-Molina A, Andres-Colas N, Perea-Garcia A, Del Valle-Tascon S, Penarrubia L, Puig S** (2011) The intracellular *Arabidopsis* COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency. *The Plant Journal* **65**: 848-860
- Garcia-Molina A, Andrés-Colás N, Perea-García A, Neumann U, Dodani SC, Huijser P, Peñarrubia L, Puig S** (2013) The *Arabidopsis* COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions. *Plant & Cell Physiology* **54**: 1378-1390
- Gavnholt B, Larsen K** (2002) Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiologia Plantarum* **116**: 273-280
- Genoud T, Millar AJ, Nishizawa N, Kay SA, Schafer E, Nagatani A, Chua NH** (1998) An *Arabidopsis* mutant hypersensitive to red and far-red light signals. *The Plant Cell* **10**: 889-904
- Gleason C, Huang S, Thatcher LF, Foley RC, Anderson CR, Carroll AJ, Millar aH, Singh KB** (2011) Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 10768-10773
- Gould PD, Locke JC, Larue C, Southern MM, Davis SJ, Hanano S, Moyle R, Milich R, Putterill J, Millar AJ, Hall A** (2006) The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* **18**: 1177-1187
- Graham RD** (1975) Male sterility in wheat plants deficient in copper. *Nature* **254**: 514–515
- Gredilla R, Grief J, Osiewacz HD** (2006) Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Experimental Gerontology* **41**: 439-447
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 7220-7224
- Guerinot ML** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 190-198
- Guo A, He K, Liu D, Bai S, Gu X, Wei L, Luo J** (2005) DATF: a database of *Arabidopsis* transcription factors. *Bioinformatics* **21**: 2568-2569
- Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J** (2008) Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* **418**: 1-8

- Guo H, Ecker JR** (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 40-49
- Gutiérrez Ra, Stokes TL, Thum K, Xu X, Obertello M, Katari MS, Tanurdzic M, Dean A, Nero DC, McClung CR, Coruzzi GM** (2008) Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 4939-4944
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (1984) Oxygen toxicity. *Biochemical Journal* **219**: 1-14
- Han S, Tang R, Anderson LK, Woerner TE, Pei Z-m** (2003) A cell surface receptor mediates extracellular Ca²⁺ sensing in guard cells. *Nature* **425**: 196-200
- Hanke G, Mulo P** (2013) Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. *Plant, Cell & Environment* **36**: 1071-1084
- Harmer SL** (2009) The circadian system in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 357-377
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA** (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**: 2110-2113
- Harmer SL, Kay SA** (2005) Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**: 1926-1940
- Hartmann U, Sagasser M, Mehrrens F, Stracke R, Weisshaar B** (2005) Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Molecular Biology* **57**: 155-171
- Haydon MJ, Bell LJ, Webb AAR** (2011) Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2333-2348
- Hermans C, Vuylsteke M, Coppens F, Craciun A, Inzé D, Verbruggen N** (2010) Early transcriptomic changes induced by magnesium deficiency in *Arabidopsis thaliana* reveal the alteration of circadian clock gene expression in roots and the triggering of abscisic acid-responsive genes. *New Phytologist* **187**: 119-131
- Himelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Penarrubia L, Amasino RM** (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **117**: 1227-1234
- Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A, Ecker JR** (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**: 383-393
- Hong S, Kim SA, Guerinot ML, McClung CR** (2013) Reciprocal interaction of the circadian clock with the iron homeostasis network in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**: 893-903
- Huang S, Taylor NL, Narsai R, Eubel H, Whelan J, Millar AH** (2010) Functional and composition differences between mitochondrial complex II in *Arabidopsis* and rice are correlated with the complex genetic history of the enzyme. *Plant Molecular Biology* **72**: 331-342
- Hudson ME, Quail PH** (2003) Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiology* **133**: 1605-1616
- Huijser P, Klein J, Lonig WE, Meijer H, Saedler H, Sommer H** (1992) Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *The EMBO Journal* **11**: 1239 - 1249
- Huijser P, Schmid M** (2011) The control of developmental phase transitions in plants. *Development* **138**: 4117-4129
- Ito S, Nakamichi N, Nakamura Y, Niwa Y, Kato T, Murakami M, Kita M, Mizoguchi T, Niinuma K, Yamashino T, Mizuno T** (2007) Genetic linkages between circadian clock-associated components and phytochrome-dependent red light signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **48**: 971-983

- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: B-glucuronidase. The EMBO Journal **6**: 3901-3907
- Jewell AW, Murray BG, Alloway BJ** (1988) Light and electron microscope studies on pollen development in barley (*Hordeum vulgare L.*) grown under copper-sufficient and deficient conditions. Plant Cell & Environment **11**: 273-301
- Johnson CH, Knight MR, Kondo T, Masson P, Sedbrook J, Haley A, Trewavas A** (1995) Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. Science **269**: 1863-1865
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP** (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Molecular Cell **14**: 787-799
- Jung HI, Gayomba SR, Rutzke MA, Craft E, Kochian LV, Vatamaniuk OK** (2012) COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in *Arabidopsis* and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7. Journal of Biological Chemistry **287**: 33252-33267
- Jung JH, Seo PJ, Kang SK, Park CM** (2011) miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3/4/5 genes in *Arabidopsis* developmental transitions. Plant Molecular Biology **76**: 35-45
- Kampfenkel K, Kushnir S, Babiyshuk E, Inze D, Van Montagu M** (1995) Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. Journal of Biological Chemistry **270**: 28479-28486
- Kim S, Mollet JC, Dong J, Zhang K, Park SY, Lord EM** (2003) Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. Proceedings of the National Academy of Sciences **100**: 16125-16130
- Kispal G, Sipos K, Lange H, Fekete Z, Bedekovics T, Janáky T, Bassler J, Aguilar Netz DJ, Balk J, Rotte C, Lill R** (2005) Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. The EMBO Journal **24**: 589-598
- Klaumann S, Nickolaus SD, Furst SH, Starck S, Schneider S, Ekkehard Neuhaus H, Trentmann O** (2011) The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist **192**: 393-404
- Klein J, Saedler H, Huijser P** (1996) A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA. Molecular and General Genetics **250**: 7-16
- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL** (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. Plant Physiology **118**: 637-650
- Koch KA, Pena MM, Thiele DJ** (1997) Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. Chemistry & Biology **4**: 549-560
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. Plant Molecular Biology **40**: 37-44
- Krämer U** (2010) Metal hyperaccumulation in plants. Annual Review of Plant Biology **61**: 517-534
- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depège N, Huijser P, Merchant S** (2005) A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. Proceedings of the National Academy of Sciences **102**: 18730-18735
- Kumar V, Dooley DM, Freeman HC, Guss JM, Harvey I, McGuirl MA, Wilce MC, Zubak VM** (1996) Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. Structure **4**: 943-955
- Kuper J, Llamas A, Hecht H-J, Mendel RR, Schwarz G** (2004) Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. Nature **430**: 803-806

- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JDG, Schroeder JI** (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **22**: 2623-2633
- La Fontaine S, Quinn JM, Nakamoto SS, Page MD, Gohre V, Moseley JL, Kropat J, Merchant S** (2002) Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* **1**: 736-757
- Lafuente MT, Marti MA** (1997) Abscisic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. *Molecular Systems Biology* **10**: 494-502
- Lai AG, Doherty CJ, Mueller-Roeber B, Kay SA, Schippers JH, Dijkwel PP** (2012) CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 17129-17134
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal* **24**: 4041-4051
- Lawson T, James W, Weyers J** (1998) A surrogate measure of stomatal aperture. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1397-1403
- Legnaioli T** (2013) Nuevos mecanismos y factores de transcripción involucrados en el control del comportamiento estomático en *Arabidopsis thaliana*. Universitat de Barcelona, Barcelona
- Legnaioli T, Cuevas J, Mas P** (2009) TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. *The EMBO Journal* **28**: 3745-3757
- Leon G, Holuigue L, Jordana X** (2007) Mitochondrial complex II is essential for gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**: 1534-1546
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N** (2010) Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 673-682
- Leung J, Giraudat J** (1998) Abscisic Acid Signal Transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 199-222
- Lewandowska M, Wawrzynska A, Moniuszko G, Lukomska J, Zientara K, Piecho M, Hodurek P, Zhukov I, Liszewska F, Nikiforova V, Sirko A** (2010) A contribution to identification of novel regulators of plant response to sulfur deficiency: characteristics of a tobacco gene UP9C, its protein product and the effects of UP9C silencing. *Molecular Plant* **3**: 347-360
- Liang X, Nazarens TJ, Stone JM** (2008) Identification of a consensus DNA-binding site for the *Arabidopsis thaliana* SBP domain transcription factor, AtSPL14, and binding kinetics by surface plasmon resonance. *Biochemistry* **47**: 3645-3653
- Lill R, Mühlenhoff U** (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual Review of Biochemistry* **77**: 669-700
- Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N** (1998) Copper transport. *The American Journal of Clinical Nutrition* **67**: 965S-971S
- Ling HQ, Bauer P, Berezky Z, Keller B, Ganai M** (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 13938-13943
- Lippard S, Berg J** (1994) Principles of bioinorganic chemistry. University Science Books. New York, NY, USA

- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC** (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal* **52**: 133-146
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**: 402-408
- Locke JCW, Southern MM, Kozma-Bognár L, Hibberd V, Brown PE, Turner MS, Millar AJ** (2005) Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Molecular Systems Biology* **1**: 4292-4305
- Lu SX, Knowles SM, Andronis C, Ong MS, Tobin EM** (2009) CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL function synergistically in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **150**: 834-843
- Madejón P, Ramírez-Benítez JE, Corrales I, Barceló J, Poschenrieder C** (2009) Copper-induced oxidative damage and enhanced antioxidant defenses in the root apex of maize cultivars differing in Cu tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **67**: 415-420
- Makino S, Kiba T, Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T** (2000) Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **41**: 791-803
- Märschner H** (2002) Mineral Nutrition in Higher Plants. Academic Press, London, UK.
- Martin RC, Liu PP, Goloviznina NA, Nonogaki H** (2010) microRNA, seeds, and Darwin?: diverse function of miRNA in seed biology and plant responses to stress. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2229-2234
- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H** (2003) Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiology* **132**: 597-605
- Más P** (2008) Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends in Cell Biology* **18**: 273-281
- Más P, Yanovsky MJ** (2009) Time for circadian rhythms: plants get synchronized. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 574-579
- Maser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML** (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 1646-1713
- Matthewman Ca, Kawashima CG, Húska D, Csorba T, Dalmay T, Kopriva S** (2012) miR395 is a general component of the sulfate assimilation regulatory network in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **586**: 3242-3250
- Mayo S** (2007) Regulación de la expresión génica en deficiencia de Cu en *Arabidopsis thaliana*. Universitat de València, Valencia
- McClung CR** (2006) Plant circadian rhythms. *The Plant Cell* **18**: 792-803
- McClung CR** (2008) Comes a time. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 514-520
- Mendel RR, Schwarz G** (2011) Molybdenum cofactor biosynthesis in plants and humans. *Coordination Chemistry Reviews* **255**: 1145-1158
- Meng Y, Ma X, Chen D, Wu P, Chen M** (2010) MicroRNA-mediated signaling involved in plant root development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **393**: 345-349
- Michael TP, Mockler TC, Breton G, McEntee C, Byer A, Trout JD, Hazen SP, Shen R, Priest HD, Sullivan CM, Givan SA, Yanovsky M, Hong F, Kay SA, Chory J** (2008) Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genetics* **4**: 0001-0017
- Millar J, Carré I, Strayer C, Chua NH, Kay S** (1995) Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* **267**: 1161-1163

- Mira H, Martínez-García F, Penarrubia L** (2001) Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *The Plant Journal* **25**: 521-528
- Mizoguchi T, Wheatley K, Hanzawa Y, Wright L, Mizoguchi M, Song HR, Carre IA, Coupland G** (2002) LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Development Cell* **2**: 629-641
- Mizuno T, Yamashino T** (2008) Comparative transcriptome of diurnally oscillating genes and hormone-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*: insight into circadian clock-controlled daily responses to common ambient stresses in plants. *Plant Cell Physiology* **49**: 481-487
- Moshelion M, Becker D, Biela A, Uehlein N, Hedrich R, Otto B, Levi H, Moran N, Kaldenhoff R** (2002) Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *The Plant Cell* **14**: 727-739
- Mukherjee I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL** (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* **223**: 1178-1190
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 493-497
- Nagae M, Nakata M, Takahashi Y** (2008) Identification of negative cis-acting elements in response to copper in the chloroplastic iron superoxide dismutase gene of the moss *Barbula unguiculata*. *Plant Physiology* **146**: 1687-1696
- Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, Kita M, Ito S, Yamashino T, Saito K, Sakakibara H, Mizuno T** (2009) Transcript profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiology* **50**: 447-462
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* **1819**: 97-103
- Norman S, Poling S, Maier V** (1988) An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for (+)-abscisic acid in *Citrus*, *Ricinus*, and *Xanthium* Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**: 225-231
- Novak B, Tyson JJ** (2008) Design principles of biochemical oscillators. *Nature Review of Molecular and Cell Biology* **9**: 981-991
- Novakova M, Motyka V, Dobrev PI, Malbeck J, Gaudinova A, Vankova R** (2005) Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2877-2883
- Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN** (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* **448**: 358-361
- Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S** (2010) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* **465**: 30-44
- Ochiai EI** (1995) Toxicity of heavy metals and biological defense. Principles and applications in bioinorganic chemistry-VII. *Journal of Chemical Education* **72**: 479-484
- Parsons T, Strickland J** (1963) Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophyll-a and carotenoids. *Journal of Marine Research* **21**: 105-156
- Peñarrubia L, Andrés-Colás N, Moreno J, Puig S** (2010) Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: a biochemical oscillator? *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **15**: 29-36
- Perea-García A, Andrés-Colás N, Peñarrubia L** (2010) Copper homeostasis influences the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 1237-1240
- Perea-García A, García-Molina A, Andrés-Colás N, Vera-Sirera F, Pérez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L** (2013) *Arabidopsis* copper transport protein COPT2 participates

- in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling. *Plant Physiology* **162**: 180-194
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L** (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**: 1-10
- Piechulla B, Merforth N, Rudolph B** (1998) Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Molecular Biology* **38**: 655-662
- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH** (2003) The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology* **132**: 1631-1641
- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H** (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion of Plant Biology* **9**: 256-263
- Pilon M, Cohu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE, Gaymard F** (2009) Essential transition metal homeostasis in plants. *Current Opinion of Plant Biology* **12**: 347-357
- Plautz JD, Straume M, Stanewsky R, Jamison CF, Brandes C, Dowse HB, Hall JC, Kay SA** (1997) Quantitative analysis of *Drosophila* period gene transcription in living animals. *Journal of Biological Rhythms* **12**: 204-217
- Preston JC, Hileman LC** (2013) Functional evolution in the plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) gene family. *Frontiers in Plant Science* **4**: 80-80
- Puig S, Andres-Colas N, Garcia-Molina A, Penarrubia L** (2007) Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell & Environment* **30**: 271-290
- Puig S, Lee J, Lau M, Thiele DJ** (2002) Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 26021-26030
- Ratcliffe OJ, Riechmann JL** (2002) Arabidopsis transcription factors and the regulation of flowering time: a genomic perspective. *Current Issues of Molecular Biology* **4**: 77-91
- Rausser WE** (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochemistry and Biophysics* **31**: 001-019
- Rawat R, Takahashi N, Hsu PY, Jones MA, Schwartz J, Salemi MR, Phinney BS, Harmer SL** (2011) REVEILLE8 and PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 form a negative feedback loop within the *Arabidopsis* circadian clock. *PLoS Genetics* **7**: 1350-1371
- Reddy MC, Majumdar S, Harris ED** (2000) Evidence for a Menkes-like protein with a nuclear targeting sequence. *Biochemical Journal* **350**: 855-863
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP** (2002) Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* **110**: 513-520
- Robertson FC, Skeffington AW, Gardner MJ, Webb AA** (2009) Interactions between circadian and hormonal signalling in plants. *Plant Molecular Biology* **69**: 419-427
- Roden LC, Song HR, Jackson S, Morris K, Carre IA** (2002) Floral responses to photoperiod are correlated with the timing of rhythmic expression relative to dawn and dusk in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 13313-13318
- Rodrigo-Moreno A, Andrés-Colás N, Poschenrieder C, Gunsé B, Peñarrubia L, Shabala S** (2012) Calcium- and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in *Arabidopsis* root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. *Plant Cell & Environment* **36**: 844-855
- Ruts T, Matsubara S, Wiese-Klinkenberg A, Walter A** (2012) Aberrant temporal growth pattern and morphology of root and shoot caused by a defective circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **72**: 154-161
- Salinas M, Xing S, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P** (2012) Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. *Planta* **235**: 1171-1184
- Salome PA, McClung CR** (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell* **17**: 791-803

- Salome PA, Oliva M, Weigel D, Kramer U** (2013) Circadian clock adjustment to plant iron status depends on chloroplast and phytochrome function. *The EMBO Journal* **32**: 511-523
- Salomé Pa, Xie Q, McClung CR** (2008) Circadian timekeeping during early *Arabidopsis* development. *Plant Physiology* **147**: 1110-1125
- Sancenón V, Puig S, Mateu-Andrés I, Dorcey E, Thiele DJ, Peñarrubia L** (2004) The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 15348-15355
- Sancenón V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Peñarrubia L** (2003) Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **51**: 577-587
- Sanchez SE, Yanovsky MJ** (2013) Time for a change. *Elife* **2**: 473-473
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carré IA, Coupland G** (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**: 1219-1229
- Schlieff ML, West T, Craig AM, Holtzman DM, Gitlin JD** (2006) Role of the Menkes copper-transporting ATPase in NMDA receptor-mediated neuronal toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 14919-14924
- Schöning JC, Streitner C, Meyer IM, Gao Y, Staiger D** (2008) Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **36**: 6977-6987
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D** (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell* **8**: 517-527
- Sharma SS, Dietz KJ** (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany* **57**: 711-726
- Shikanai T, Müller-Moulé P, Munekage Y, Niyogi KK, Pilon M** (2003) PAA1, a P-Type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *The Plant Cell* **15**: 1333-1346
- Siefritz F, Otto B, Bienert GP, Van der Krol A, Kaldenhoff R** (2004) The plasma membrane aquaporin NtAQP1 is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco. *The Plant Journal* **37**: 147-155
- Siré C, Moreno AB, Garcia-Chapa M, López-Moya JJ, San Segundo B** (2009) Diurnal oscillation in the accumulation of *Arabidopsis* microRNAs, miR167, miR168, miR171 and miR398. *FEBS Letters* **583**: 1039-1044
- Sommer F, Kropat J, Malasarn D, Grosseohme NE, Chen X, Giedroc DP, Merchant SS** (2010) The CRR1 nutritional copper sensor in *Chlamydomonas* contains two distinct metal-responsive domains. *The Plant Cell* **22**: 4098-4113
- Sønderby IE, Geu-Flores F, Halkier Ba** (2010) Biosynthesis of glucosinolates-gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science* **15**: 283-290
- Song HR, Carre IA** (2005) DET1 regulates the proteasomal degradation of LHY, a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Molecular Biology* **57**: 761-771
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA, Kay SA** (2000) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**: 768-771
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK** (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell* **18**: 2051-2065
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R** (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 691-699
- Svistoonoff S, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T** (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* **39**: 792-796

- 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
- Thibaud MC, Arrighi JF, Bayle V, Chiarenza S, Creff A, Bustos R, Paz-Ares J, Poirier Y, Nussaume L** (2010) Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **64**: 775-789
- Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal* **34**: 685-695
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC** (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**: 639-642
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN** (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**: 606-616
- Unte US, Sorensen AM, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser P** (2003) SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**: 1009-1019
- Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inzé D, Slooten L** (1996) Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* **112**: 1703-1714
- Van Der Mark F, Van Den Briel W, Huisman HG** (1983) Phytoferritin is synthesized in vitro as a high-molecular-weight precursor. *Biochemical Journal* **214**: 943-950
- Walker-Simmons M** (1987) ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiology* **84**: 61-66
- Wang W, Barnaby JY, Tada Y, Li H, Tor M, Caldelari D, Lee DU, Fu XD, Dong X** (2011) Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature* **470**: 110-114
- Wang ZY, Tobin EM** (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**: 1207-1217
- Ward JT, Lahner B, Yakubova E, Salt DE, Raghothama KG** (2008) The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiology* **147**: 1181-1191
- Warren D, Wilkins M** (1961) An endogenous rhythm in the rate of dark-fixation of carbon dioxide in leaves of *Bryophyllum Fedtschenkoi*. *Nature* **191**: 686-688
- Waters BM, McInturf SA, Stein RJ** (2012) Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**: 5903-5918
- Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F, Leister D** (2003) Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 31286-31289
- Weiler EW** (1979) Radioimmunoassay for the determination of free and conjugated abscisic acid. *Planta* **144**: 255-263
- Westergard L, Christensen HM, Harris DA** (2007) Role in Disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1772**: 629-644
- Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C** (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 47644-47653
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang J-W, Weigel D, Poethig RS** (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* **138**: 750-759
- Wu G, Poethig RS** (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* **133**: 3539-3547

- Wu H, Li L, Du J, Yuan Y, Cheng X, Ling HQ** (2005) Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* **46**: 1505-1514
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC** (2005) Expression of *Arabidopsis* miRNA genes. *Plant Physiology* **138**: 2145-2154
- Xing S, Salinas M, Hohmann S, Berndtgen R, Huijser P** (2010) miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**: 3935-3950
- Yamamoto A, Bhuiyan MNH, Waditee R, Tanaka Y, Esaka M, Oba K, Jagendorf AT, Takabe T** (2005) Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1785-1796
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M** (2007) Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 16369-16378
- Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T** (2009) SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 347-361
- Yang H, Pritzker M, Fung SY, Sheng Y, Wang W, Chen P** (2006) Anion effect on the nanostructure of a metal ion binding self-assembling peptide. *The EMBO Journal* **22**: 8553-8562
- Yarunin A, Panse VG, Petfalski E, Dez C, Tollervey D, Hurt EC** (2005) Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *The EMBO Journal* **24**: 580-588
- Yazdanbakhsh N, Sulpice R, Graf A, Stitt M, Fisahn J** (2011) Circadian control of root elongation and C partitioning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell & Environment* **34**: 877-894
- Yuan M, Li X, Xiao J, Wang S** (2011) Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. *BMC Plant Biology* **11**: 69-69
- Zhang Y, Schwarz S, Saedler H, Huijser P** (2007) SPL8, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **63**: 429-439
- Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, Wang X** (2009) Phospholipase α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 2357-2377
- Zhou J, Jiao F, Wu Z, Li Y, Wang X, He X, Zhong W, Wu P** (2008) OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiology* **146**: 1673-1686