



Programa de Doctorado en Bioingeniería

**Funciones morfogénicas de los genes
ANU1, ANU4, ANU9, ANU12, SCA1, SCA5,
*ICU11 y CP2 de Arabidopsis***

Eduardo Mateo Bonmatí
Elche, 2018

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche

HAGO CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor desarrollada por el Licenciado Eduardo Mateo Bonmatí para optar al grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta Tesis se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

Elche, 25 de junio de 2018

II.- RESUMEN

En esta Tesis hemos sometido a análisis genético y molecular a varios mutantes foliares previamente aislados en el laboratorio de José Luis Micol, en el que habían sido asignados a las clases fenotípicas Angulata (Anu), Scabra (Sca) e Incurvata (Icu). Los mutantes *anu* presentan hojas de tamaño inferior al silvestre, parcialmente despigmentadas e indentadas. Las hojas de los mutantes *sca* son variegadas e indentadas y su haz y envés son irregulares. El limbo foliar de los mutantes *icu* se recurva hacia al haz.

Hemos contribuido a la caracterización de los mutantes *anu1-1*, *anu4*, *anu9-1*, *anu12*, *sca1*, *sca5* e *icu11-1*. La despigmentación parcial y la indentación de las hojas de los mutantes *anu* y *sca* nos condujo a considerarlos candidatos a padecer alguna disfunción del cloroplasto y potencialmente informativos sobre la relación entre la biogénesis de este orgánulo y el desarrollo foliar. La curvatura de las hojas de los mutantes *icu* indicó una alteración de la dorsoventralidad y sugirió su utilidad para el estudio del crecimiento de los tejidos dorsales (adaxiales) y ventrales (abaxiales) y/o su coordinación.

Todos los mutantes mencionados habían sido sometidos previamente a análisis del ligamiento a marcadores moleculares, que delimitó intervalos de 30-750 kb, candidatos a contener los genes causantes del fenotipo a estudio. Hemos caracterizado las mutaciones de dichos intervalos mediante secuenciación masiva, estrategia que nos ha permitido identificar los genes *ANU1*, *ANU4*, *ANU9*, *ANU12*, *SCA1* y *SCA5*. Hemos confirmado la identidad de estos genes mediante ensayos de alelismo y de complementación fenotípica mediada por transgenes portadores de los correspondientes alelos silvestres.

ANU1 es At1g21650, al que autores anteriores denominaron *SECRETIONA2* (*SECA2*), que codifica una proteína con actividad ATPasa localizada en el estroma de los cloroplastos; participa en el sistema Sec de importación de proteínas a los tilacoides. *ANU4* es At1g02280, que codifica TRANSLOCON AT THE OUTER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS 33 (TOC33), uno de los componentes del sistema TOC de la envoltura de los cloroplastos, que importa proteínas del citoplasma. *ANU9* es At5g14100, que codifica NON-INTRINSIC ABC PROTEIN 14 (NAP14), otro transportador de la envoltura del cloroplasto. *ANU12* es At1g49970, que codifica la subunidad CASEINOLYTIC PROTEASE RING 1 (ClpR1) del complejo Clp de degradación de proteínas del cloroplasto. Hemos empleado los mutantes *anu1*, *anu4*, *anu9* y *anu12* para contrastar la validez de la secuenciación masiva para identificar genes causantes de fenotipos de interés. No hemos considerado conveniente continuar su estudio, dado que los correspondientes cuatro genes habían sido caracterizados en mayor o menor medida por autores anteriores.

El ribosoma citoplásmico contribuye a la polaridad dorsoventral de las hojas de *Arabidopsis*. Son prueba de ello los alelos hipomorfos y nulos de varios genes que codifican proteínas ribosómicas, que incrementan la severidad de la ventralización causada por la insuficiencia de función de *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* y *AS2*; el complejo represor *AS1-AS2* es esencial para la especificación de la identidad de los tejidos dorsales de la hoja. Los dobles mutantes *sca1 as2* manifiestan un fenotipo sinérgico. Hemos establecido que *SCA1* es At2g33800, cuyo producto es RPS5, un componente de la subunidad menor del ribosoma del cloroplasto. Se demuestra así que el ribosoma del cloroplasto participa, como el citoplásmico, en la formación del patrón adaxial-abaxial. Por su parte, *SCA5* es At5g20040, que codifica la TRNA ISOPENTENYL TRANSFERASE 9 (IPT9), que participa en la síntesis de la cis-zeatina, una citoquinina.

Los mutantes foliares no solo son útiles para identificar genes específicamente implicados en la organogénesis de la hoja: también sirven para desentrañar los mecanismos de desarrollo que la hoja comparte con otros órganos de las plantas. Este ha sido el caso de *icu11-1*. En el laboratorio de J.L. Micol se concluyó antes del comienzo de esta Tesis que *icu11-1* (a) interacciona con alelos mutantes de genes que codifican componentes de la maquinaria epigenética, como *ICU1* (más conocido como *CURLY LEAF*; *CLF*) e *ICU2*, (b) causa la desrepresión ectópica y heterocrónica de genes de identidad floral en sus hojas, y (c) es un alelo de At1g22950, que codifica una presunta dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato y Fe²⁺ (2OGD).

Hemos establecido que *ICU11* pertenece a una familia de cinco genes de la superfamilia de las 2OGD, a la que hemos llamado CUPULIFORMIS (CP). *ICU11* y *CP2*, su parálogo más próximo, son funcionalmente redundantes: los dobles mutantes *icu11 cp2* carecen de desarrollo vegetativo y florecen inmediatamente después de la germinación. Este fenotipo letal es muy similar al de los alelos de insuficiencia de función de *EMBRYONIC FLOWER 1 (EMF1)* y *EMF2*, que codifican proteínas del grupo Polycomb con funciones epigenéticas conocidas. La secuenciación masiva del ARN de *icu11-1* ha revelado la desregulación de cientos de genes, algunos de los cuales modulan el desarrollo floral, como los de la familia MADS-box. La desrepresión de uno de estos últimos, *SEPALLATA3 (SEP3)*, causa la curvatura foliar de *icu11-1*. Hemos demostrado mediante secuenciación masiva del genoma de *icu11-1* tras su tratamiento con bisulfito e inmunoprecipitación de su cromatina que *ICU11* y *CP2* participan en la modificación química de las histonas, pero no en la metilación del ADN. El resultado más importante de esta Tesis es la identificación de una familia de componentes de la maquinaria epigenética cuya actividad parece distinta de las previamente descritas.