



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

Clonación posicional mediante secuenciación masiva en Arabidopsis

Eduardo Mateo Bonmatí

Elche, 2013

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 realizada por el Licenciado Eduardo Mateo Bonmatí como trabajo final del Máster de Bioingeniería. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

Elche, 10 de junio de 2013.

I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Hemos iniciado la caracterización de 9 estirpes de *Arabidopsis thaliana* que pertenecen a la colección de mutantes foliares del laboratorio de J.L. Micol, en el que se está llevando a cabo una disección genética del desarrollo de las hojas de las plantas. Las hojas de los mutantes *angulata* (*anu*) y *scabra* (*sca*) comparten ciertos rasgos fenotípicos como su despigmentación y margen dentado. Esos rasgos los hacen candidatos a estar alterados en algún gen implicado en las funciones del cloroplasto y a ser informativos acerca de la relación entre la biogénesis de este orgánulo y el desarrollo foliar.

Como paso preliminar a la caracterización molecular de las mutaciones a estudio, se determinó antes del inicio de este trabajo su posición de mapa mediante análisis del ligamiento a marcadores moleculares, estableciéndose intervalos candidatos de entre 30 y 750 kb. Hemos intentado identificar las mutaciones presentes en dichos intervalos haciendo uso de tecnologías de secuenciación masiva. Esta estrategia nos ha permitido identificar 6 de los genes a estudio: *ANU1*, *ANU4*, *ANU9*, *ANU12*, *SCA1* y *SCA5*.

En el mutante *anu1-1* hemos identificado una transición C→T en el decimocuarto exón del gen At1g21650. Hemos confirmado que At1g21650 es el gen que causa el fenotipo del mutante *anu1-1* mediante un ensayo de complementación con un alelo insercional. Este gen había sido estudiado anteriormente por otros autores, que lo denominaron *SECRETIONA2* (*SECA2*), y codifica una proteína localizada en el estroma de los cloroplastos que participa en el sistema Sec de transporte de proteínas hacia el tilacoide.

En el mutante *anu4* hemos identificado una transición G→A en el sitio aceptor del *splicing* del cuarto exón del gen At1g02280. Hemos confirmado que At1g02280 es el gen causante del fenotipo del mutante *anu4* mediante un ensayo de complementación mediada por un transgén portador de su alelo silvestre. Este gen codifica la proteína TOC33 (TRANSLOCON AT THE OUTER ENVELOPE MEMBRANE OF CHLOROPLASTS), uno de los componentes del sistema TOC de la envoltura de los cloroplastos, que importa proteínas del citosol.

En el mutante *anu9-1* hemos identificado una transición C→T en el décimo exón del gen At5g14100. Hemos confirmado que At5g14100 es el gen causante del fenotipo del mutante *anu9-1* mediante un ensayo de complementación mediada por un transgén portador de su alelo silvestre. Este gen codifica NAP14, que pertenece a la familia NAP

(NON-INTRINSIC ABC PROTEINS), un transportador de tipo ABC no intrínseco de la envoltura de los cloroplastos.

En el mutante *anu12* hemos identificado una transición G→A en el sexto exón del gen At1g49970. Hemos confirmado que At1g49970 es el gen causante del fenotipo del mutante *anu12* mediante un ensayo de complementación mediada por un transgén portador de su alelo silvestre. *ANU12* codifica la subunidad ClpR1 (CASEINOLYTIC PROTEASE RING1) del complejo Clp (CASEINOLYTIC PROTEASE) de degradación de proteínas del cloroplasto.

En el mutante *sca1* hemos identificado una transición G→A en el segundo exón del gen At2g33800. Hemos confirmado que At2g33800 es el gen causante del fenotipo del mutante *sca1* mediante un ensayo de complementación mediada por un transgén portador de su alelo silvestre. *SCA1* codifica una proteína de la subunidad menor del ribosoma del cloroplasto (RP5S).

En el mutante *sca5* hemos identificado una transición C→T en el primer exón del gen At5g20040. Hemos confirmado que At5g20040 es el gen causante del fenotipo del mutante *sca5* mediante un ensayo de complementación mediada por un transgén portador de su alelo silvestre. *SCA5* codifica la isopenteniltransferasa 9 de ARNt (*AtIPT9*), enzima que participa en la síntesis de las cis-zeatinas, hormonas vegetales de la familia de las citoquininas.

Se requerirán análisis adicionales de los mutantes *anu2*, *api1* y *api7-1*, tanto bioinformáticos como funcionales, dado que aún no hemos identificado las mutaciones que causan sus fenotipos.