



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Los genes *ANGULATA7* y *ORBICULATA1*
participan en la biogénesis del cloroplasto
y la organogénesis foliar en *Arabidopsis***

Tamara Muñoz Nortes
Elche, 2017

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

HÉCTOR CANDELA ANTÓN, Profesor Contratado Doctor de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor desarrollada por la Licenciada Tamara Muñoz Nortes para optar al grado de Doctora. 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

Héctor Candela Antón

Elche, 31 de mayo de 2017

II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con el fin de identificar y caracterizar genes implicados en el desarrollo foliar de *Arabidopsis*, hemos estudiado en esta Tesis los mutantes *angulata7-1* (*anu7-1*), *orbiculata1-1* (*orb1-1*), *orb1-2* y *orb1-3*, obtenidos en el laboratorio de J.L. Micol mediante tratamiento de la estirpe silvestre Landsberg *erecta* (*Ler*) con metanosulfonato de etilo.

Las hojas vegetativas de *anu7-1* son pálidas y dentadas. El tamaño de la roseta y la estatura de las plantas adultas de este mutante son menores que los de *Ler*. Sus niveles de clorofilas y carotenoides son inferiores a los silvestres. El mesófilo en empalizada de *anu7-1* presenta células de tamaños irregulares y grandes espacios intercelulares. Las membranas tilacoidales de sus cloroplastos están parcialmente desapiladas.

Hemos identificado en el mutante *anu7-1*, mediante clonación posicional, una mutación puntual en At5g53860, un gen nuclear de copia única que codifica una proteína de los nucleoides de los cloroplastos. La proteína ANU7 presenta dos de los cuatro motivos C-X-X-C-X-G-X-G que caracterizan al dominio rico en cisteína (CR) de las proteínas DnaJ, que está conservado en la mayoría de las plantas terrestres, excepto en las gimnospermas y las gramíneas. Hemos confirmado que At5g53860 es ANU7 mediante ensayos de alelismo entre *anu7-1* y dos líneas insercionales. También hemos comprobado que el transgén *35S_{pro}:At5g53860* restablece completamente el fenotipo silvestre en las plantas *anu7-1*. La visualización de la expresión de un transgén *At5g53860_{pro}:GUS* indica que ANU7 se expresa en todos los tejidos y estados de desarrollo estudiados.

Hemos analizado el transcriptoma de *anu7-1* en micromatrices. Los genes nucleares sobreexpresados en *anu7-1* incluyen 7 de los que codifican componentes del complejo plastid transcriptionally active chromosome (pTAC) del cloroplasto. La sobreexpresión de estos genes puede ser una respuesta del núcleo a la señal retrógrada emitida por el cloroplasto como consecuencia de la disfunción de este orgánulo causada por la mutación *anu7-1*. En este mutante también se sobreexpresan algunos genes del genoma del cloroplasto transcritos por la polimerasa de ARN codificada por el núcleo (NEP, de nuclear-encoded RNA polymerase) y ninguno de los que dependen solamente de la polimerasa de ARN codificada por el cloroplasto (PEP, de plastid-encoded RNA polymerase), lo que sugiere que ANU7 participa en el ensamblaje de la maquinaria transcripcional del cloroplasto.

Hemos estudiado las interacciones genéticas entre *anu7-1* y alelos mutantes de *GENOMES UNCOUPLED 1* (*GUN1*), que está implicado en la señalización retrógrada del cloroplasto al núcleo. El fenotipo morfológico del doble mutante *anu7-1 gun1-1* es

sinérgico: el margen de sus hojas es entero y en su mesófilo en empalizada se normaliza el tamaño de las células y no se observan espacios intercelulares. Las hojas *anu7-1 gun1-1* son variegadas, con sectores de diferentes grados de pigmentación, lo que sugiere que la ausencia de ANU7 y GUN1 potencia ciertas actividades de los cloroplastos, restableciéndose la morfología normal de la hoja pero alterándose localmente la función de este orgánulo y la distribución espacial de las clorofilas.

Las mutaciones *orb1* también reducen el tamaño de la roseta y las hojas vegetativas, que son pálidas, con niveles de clorofilas y carotenoides inferiores a los de *Ler*. Las células del mesófilo en empalizada de los mutantes *orb1* son menores que las silvestres, pero el cociente entre su tamaño y el de la superficie de la hoja es similar al de *Ler*. Hemos establecido que *ORB1* es At5g04140 combinando el análisis iterativo del ligamiento a marcadores moleculares y la secuenciación masiva. At5g04140 es un gen previamente descrito, que codifica una glutamato sintasa dependiente de ferredoxina, localizada en los cloroplastos: esta enzima sintetiza glutamato y 2-oxoglutarato a partir de glutamina y amonio. Hemos confirmado la identidad de *ORB1* mediante un ensayo de alelismo con un mutante insercional y hemos generado una construcción *At5g04140_{pro}:GUS* para visualizar el patrón de expresión de *ORB1*, que es generalizado.

Hemos secuenciado masivamente el ARN de *orb1-3*. Varios de los genes que hemos encontrado desregulados en las rosetas de este mutante están relacionados con el metabolismo del nitrógeno y la biosíntesis de aminoácidos, lo que sugiere que su expresión depende de los niveles de glutamato y/o glutamina. También se sobreexpresan de manera concertada muchos genes que codifican proteínas ribosómicas. Esta observación sugiere una respuesta compensatoria de la célula ante el déficit de glutamato, a fin de incrementar la síntesis de proteínas.

Hemos generado herramientas para el estudio de las funciones postembrionarias de genes letales embrionarios (*EMB*, de embryo defective) mediante análisis clonal. Hemos empleado las líneas CAUT (de cell autonomy) para obtener líneas transgénicas con el genotipo apropiado para el estudio de 24 genes *EMB*. Estas líneas pueden ser irradiadas con rayos X y examinadas posteriormente para encontrar sectores mutantes que manifiesten los efectos de la ausencia de la función de los genes a estudio en tejidos postembrionarios. También hemos adaptado el vector pCB1 a la tecnología Gateway, generando construcciones para el estudio de las funciones postembrionarias de 20 genes letales embrionarios mediante la escisión, mediada por la recombinasa Cre, de una copia *EMB* silvestre inserta en el genoma de plantas homocigóticas para los correspondientes alelos nulos *emb*.