



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Contribución de los genes *ANGULATA10*
y *APICULATA2* a la morfogénesis foliar
en *Arabidopsis thaliana***

Rubén Casanova Sáez
Elche, 2014

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 el Licenciado Rubén Casanova Sáez 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

Héctor Candela Antón

Elche, 18 de junio de 2014

II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Esta Tesis forma parte de la disección genética del desarrollo foliar que se está llevando a cabo en el laboratorio de J.L. Micol. Hemos definido mediante análisis del ligamiento a marcadores moleculares las posiciones de mapa de 23 mutaciones que perturban la organogénesis foliar en *Arabidopsis*, que fueron inducidas con metanosulfonato de etilo. Hemos clonado así posicionalmente los genes mutados en *angulata10-1* (*anu10-1*) y *apiculata2* (*api2*), mutantes que hemos caracterizado en detalle.

Las hojas de *anu10-1* son pálidas, pequeñas y presentan indentaciones marginales prominentes. El mesófilo en empalizada de *anu10-1* presenta menos células y de mayor tamaño que el tipo silvestre, así como grandes espacios intercelulares. Sus niveles de clorofilas a y b y de carotenoides son inferiores a los silvestres. También presenta un incremento en los niveles de H₂O₂, lo que sugiere que padece estrés fotooxidativo.

Hemos establecido que *ANU10* es At1g28530, un gen de copia única en *Arabidopsis* que está conservado en las plantas terrestres y que codifica una proteína de función desconocida. La expresión constitutiva del alelo silvestre de *ANU10* en plantas *anu10-1* portadoras del transgén *35S_{pro}:ANU10* rescató completamente el fenotipo mutante. Hemos confirmado la identidad de *ANU10* mediante ensayos de complementación con dos alelos insercionales de dominio público. Hemos visualizado el patrón de expresión de *ANU10* concluyendo que se transcribe ubicuamente. Hemos generado un transgén portador de una fusión traduccional de *ANU10* con la proteína GFP, comprobando que se localiza en las membranas tilacoidales de los cloroplastos de las hojas. Hemos detectado también la proteína *ANU10:GFP* en los amiloplastos de los ápices radiculares. Los cloroplastos de *anu10-1* son pequeños y deformes, y presentan menos membranas tilacoidales y grana que el tipo silvestre. También están reducidos en *anu10-1* los niveles de trímeros LHCII (*Light-Harvesting Complex associated with photosystem II*), que participan en la adhesión de membranas tilacoidales.

Dado que el desarrollo foliar y la biogénesis de los cloroplastos se coordinan mediante señalización retrógrada, hemos estudiado la expresión de los genes *LHCB1* (*Light Harvesting Chlorophyll a/b Binding1*), *LHCB2*, *LHCB3* y *HEMA1* (*HEMIN A1*), comprobando que es inferior a la silvestre; esto confirma que el fenotipo foliar de *anu10-1* es consecuencia de las alteraciones funcionales y del desarrollo de sus cloroplastos.

Los rasgos más conspicuos del mutante *api2* son sus hojas apuntadas y una reducción del tamaño de la roseta y la estatura de la planta adulta. Hemos clonado posicionalmente el gen *API2*, que codifica la proteína ribosómica RPL36aB. El mutante

api2 es portador de una transición G→A en la región 5' no traducida del gen *API2*. Hemos aislado y caracterizado un alelo insercional de At3g23390, un parálogo de *API2* que codifica la proteína RPL36aA, idéntica a RPL36aB. Hemos determinado mediante RT-PCR cuantitativa que la expresión de *API2* está reducida en el mutante *api2*, y que *rpl36aa* es un alelo nulo. Hemos obtenido combinaciones dobles mutantes de *api2* y *rpl36aa* con alelos de los genes *AS1* (*ASYMMETRIC LEAVES1*) y *AS2*: resultaron sinérgicos los fenotipos de los dobles mutantes *api2 as2-1* y *rpl36aa as2-1*, lo que indica que *API2* y *RPL36aA* participan en el desarrollo foliar. Dos observaciones sugieren que al contenido de las células en proteínas RPL36a contribuye más *RPL36aA* que *API2*: el fenotipo de *rpl36aa as2-1* es más extremo que el de *api2 as2-1*, y *RPL36aA* se expresa más del doble que *API2* en el tipo silvestre.

Hemos demostrado que *API2* y *RPL36aA* son genes funcionalmente redundantes, tal como sugiere su idéntico patrón de expresión y la no complementación no alélica que muestra el diheterocigoto *API2/api2;RPL36aA/rpl36aa*, cuyo fenotipo es mutante. Esta pareja de parálogos manifiesta haploinsuficiencia combinada: cualquier genotipo con dos alelos silvestres y dos mutantes rinde un fenotipo mutante y son letales los de tres alelos mutantes y uno silvestre. Aunque los productos proteicos de *API2* y *RPL36aA* son idénticos, sus secuencias codificantes presentan sustituciones nucleotídicas en el 34% de sus codones. Esto sugiere que las sustituciones no sinónimas han sufrido selección purificadora: han sido seleccionadas en contra durante la evolución de ambos parálogos. El bajo cociente entre la tasa de sustituciones no sinónimas y sinónimas de *API2* y *RPL36aA*, así como otros grupos de parálogos que codifican proteínas ribosómicas idénticas, sugiere que la selección purificadora y la haploinsuficiencia combinada son las causas principales de la retención de los genes duplicados que codifican proteínas ribosómicas en las plantas.

Hemos obtenido además la secuencia completa del genoma de los mutantes *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1*, *anu12*, *apiculata7-1* (*api7-1*), *scabra1* (*sca1*) y *sca5*. El análisis bioinformático de las lecturas obtenidas nos ha permitido identificar mutaciones en los intervalos candidatos previamente definidos mediante análisis de ligamiento; *anu1-1*, *anu4-1*, *anu9-1* y *anu12* han resultado ser nuevos alelos de genes previamente descritos, que codifican proteínas del cloroplasto. Nuestros resultados demuestran que la resecuenciación de genomas de *Arabidopsis* es un abordaje útil para la identificación de un número relativamente bajo de mutaciones candidatas, entre ellas la que causa el fenotipo de interés, incluso en fondos genéticos diferentes del de referencia.