



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Caracterización genética y molecular
de los mutantes *transcurvata*
de *Arabidopsis thaliana***

Almudena Ferrández Ayela
Elche, 2006

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

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Profesora Titular de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

MARÍA MAGDALENA ALONSO PERAL, Becaria Predoctoral de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por la alumna Almudena Ferrández Ayela. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

María Rosa Ponce Molet

María Magdalena Alonso Peral

Elche, 1 de septiembre de 2006.

V.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

V.1.- Contribuciones al análisis genético y molecular del gen *TCU2*

V.1.1.- Caracterización fenotípica de los mutantes *tcu2-1*

En este trabajo se presenta una caracterización fenotípica de los mutante *tcu2-1*. Hemos llevado a cabo un análisis morfológico de varios órganos de las plantas mutantes *tcu2-1a/tcu2-1a* y *tcu2-1b/tcu2-1b*, que nos ha permitido describir en detalle sus diferencias fenotípicas con el tipo silvestre del que procede (*Ler*), que serán de utilidad para definir las funciones del gen *TCU2*.

Las rosetas de los mutantes *tcu2-1* son ligeramente más pequeñas que las de *Ler* y sus hojas vegetativas se recurvan asimétricamente hacia el envés de manera oblicua a la vena primaria, tienen una superficie rugosa y poseen una venación protuberante. Las raíces primarias de las plantas *tcu2* son más delgadas que las de *Ler*, y tienen los pelos radiculares mucho más largos.

Los mutantes *tcu2-1* presentan una floración mucho más temprana y un porte menor que las plantas silvestres. Mientras que en la inflorescencia de *Ler* las flores permanecen agregadas en racimo y sólo empiezan a separarse cuando comienza la fructificación, en las plantas *tcu2-1/tcu2-1* se separan del racimo antes de la formación de la silicua. Las flores de los mutantes *tcu2-1* son visiblemente más pequeñas que las silvestres. Los frutos de estos mutantes son más pequeños y gruesos que los de *Ler*, con una superficie rugosa y menor cantidad de semillas, y muchos de ellos están constituidos por tres valvas.

Algunos de estos rasgos también aparecen en mutantes que tienen alterada la integridad del meristemo apical del tallo. Este es el caso de los mutantes *clavata1 (clv1)*, *clv2* y *clv3*, que presentan el tallo fasciado, una filotaxia alterada y algunos de sus frutos están formados por más de dos valvas (Clark *et al.*, 1993; 1995; Kayes y Clark, 1998; Brand *et al.*, 2000). Los genes *CLAVATA* participan en una ruta de transducción de señales implicada en la diferenciación de las células meristemáticas y su delimitación territorial en el meristemo. Aunque los rasgos comunes a los mutantes *tcu2* y *clv* sugieren una relación funcional entre los genes *TCU2* y *CLV*, no se podrán obtener conclusiones a este respecto antes de la clonación posicional de *TCU2* y la determinación de la naturaleza de su producto proteico.

V.1.2.- Clonación posicional del gen *TCU2*

Estamos llevando a cabo un análisis de ligamiento de la mutación *tcu2-1*, con el fin de lograr la clonación posicional del gen *TCU2*. En este trabajo hemos partido de resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio de J.L. Micol, que permitieron definir un intervalo candidato a contener al gen *TCU2*, flanqueado por los marcadores SNP124 y MUA2, un segmento de 1,6 Mb de la región telomérica del cromosoma 5.

Hemos desarrollado 4 nuevos marcadores polimórficos para la región candidata, que hemos empleado para genotipar 424 plantas de una población cartográfica F₂. Hemos conseguido así reducir a 638,65 kb la longitud del intervalo candidato, que queda flanqueado por los marcadores K19M22 y MUA2. Hemos diseñado y encargado la síntesis de cebadores para la amplificación mediante PCR de otros 3 marcadores adicionales, que resultarán de utilidad para continuar y eventualmente finalizar la cartografía de alta resolución del gen *TCU2*.

V.2.- Contribuciones al análisis genético y molecular del gen *TCU1*

V.2.1.- Rescate fenotípico del mutante *tcu1-1*

Con anterioridad a este trabajo se aisló en el laboratorio de J.L. Micol el mutante *tcu1-1*, cuyo fenotipo es similar al de *tcu2-1*. La clonación posicional del gen *TCU1* permitió identificar un gen candidato, At4g37130 (Alonso-Peral, Ponce y Micol, sin publicar), portador de una mutación C→T, que introduce un codón de terminación prematuro en la correspondiente proteína. Para confirmar que At4g37130 es *TCU1*, hemos obtenido una construcción que contiene el alelo silvestre de At4g37130, que hemos transferido a plantas *tcu1-1/tcu1-1*. Para ello, hemos insertado una copia del alelo de At4g37130 de *Ler* en el vector pGreen0179, clonando en *Escherichia coli* la construcción así obtenida. La secuenciación del inserto en varios clones portadores de la construcción permitió la selección de dos de ellos, cuya secuencia era la esperada, con los que se transformó *Agrobacterium tumefaciens*. Uno de los clones transformantes obtenidos de este modo se empleó para infectar plantas *tcu1-1/tcu1-1*.

Finalmente, se seleccionaron plantas transgénicas *tcu1-1/tcu1-1* resistentes al herbicida higromicina (resistencia conferida por un gen marcador incluido en pGreen0179) y comprobamos que eran portadoras de transgenes. Las plantas *tcu1-1/tcu1-1* que fueron transformadas con el ADN genómico del alelo de *Ler* de At4g37130 inserto en el vector pGreen0179 manifestaron fenotipo silvestre. Por su parte, las plantas de control, que habían sido transformadas con el vector pGreen0179 sin inserto, manifestaron el mismo fenotipo mutante que sus parentales *tcu1-1/tcu1-1*. Dado que la

mutación *tcu1-1* es recesiva, puede concluirse que el rescate fenotípico del mutante *tcu1-1* se ejecutó con éxito, lo que permite concluir que la mutación C→T que hemos encontrado en el gen At4g37130 causa el fenotipo del mutante *tcu1-1*.

V.2.2.- Determinación de la localización subcelular de la proteína TCU1

Dado que la proteína TCU1 presenta un 40% de semejanza con la nucleoporina 58/45 de otros organismos, es pertinente establecer si se localiza en la membrana nuclear, lo que apoyaría la hipótesis de que forma parte del complejo del nucleoporo, tal como lo hacen sus homólogas en otras especies.

Para determinar la localización subcelular de TCU1 hemos fusionado el ADNc del gen *TCU1* al de la proteína verde fluorescente (GFP) contenida en el vector pEGAD, cuya expresión está controlada por un promotor constitutivo. La síntesis de la proteína de fusión GFP-TCU1 en el interior de las células de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* permitirá determinar la localización intracelular exacta de TCU1 mediante la detección confocal de la fluorescencia de la proteína GFP.

Hemos obtenido plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* resistentes al herbicida BASTA (resistencia conferida por el gen marcador que incluye el vector pEGAD), confirmando mediante PCR que algunas son portadoras de la construcción *GFP-TCU1*. En estas plantas transgénicas se intentará más adelante la detección de la fluorescencia de la proteína de fusión GFP-TCU1 mediante microscopía confocal.