



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

Identificación de mutaciones *denticulata* mediante secuenciación masiva en *Arabidopsis*

Manuela Boluda Mora

Tutores:

José Luis Micol Molina

María Rosa Ponce Molet

Amani Toumi

Área de Genética

Departamento de Biología aplicada

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico: 2013/2014

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

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

AMANI TOUMI, becaria predoctoral del Programa Santiago Grisolia de la Generalitat Valenciana

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Manuela Boluda Mora como Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología. 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

Maria Rosa Ponce Molet

Amani Toumi

Elche, 3 de septiembre de 2014.

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Hemos iniciado la caracterización de tres 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 *denticulata* (*den*) son apuntadas y con margen dentado, rasgos que les hacen candidatos a estar alterados en algún gen implicado en procesos necesarios para la proliferación y/o la diferenciación celular.

Como paso preliminar a la caracterización funcional de los genes a estudio, se determinó antes del inicio de este trabajo su posición de mapa mediante análisis del ligamiento a marcadores moleculares, estableciéndose intervalos candidatos a contener cada una de las mutaciones *den*. Hemos identificado todas las mutaciones presentes en dichos intervalos mediante secuenciación masiva en un secuenciador Ion Proton de Life Technologies, eligiendo los tres genes candidatos más verosímiles a ser *DEN3*, *DEN10* y *DEN15*; para confirmar que causan el fenotipo de nuestro interés, hemos obtenido alelos insercionales y de dominio público de estos genes, que han sido genotipados mediante PCR a fin de seleccionar plantas homocigóticas que se usarán más adelante en pruebas de complementación.

Palabras clave: Arabidopsis, mutantes foliares, secuenciación masiva, líneas de ADN-T, clonación posicional, cartografía mediante secuenciación.

In this work, we initiated the genetic characterization of three *Arabidopsis thaliana* mutants belonging to the leaf mutant collection of the laboratory of J.L. Micol, where a genetic dissection of plant leaf development is being carried out. The *denticulata* mutants exhibit pointed and dentate leaves, traits that make them candidates to be altered in genes required for cell proliferation and/or differentiation.

As a preliminary step to the functional characterization of the genes under study, their map positions were determined by linkage to molecular markers, establishing candidate intervals for each mutation. We identified all the mutations present in every candidate interval by sequencing in a Life Technologies Ion Proton massive sequencer, and selected the most likely candidates for the *DEN3*, *DEN10* and *DEN15* genes. To confirm that these genes cause the mutant phenotypes of interest, T-DNA insertional lines were obtained and genotyped by PCR in order to select homozygous plants to be used for complementation tests.

Keywords: Arabidopsis, leaf mutants, massive sequencing, T-DNA lines, positional cloning, mapping by sequencing.