



Universidad Miguel Hernández de Elche

Cartografía mediante secuenciación masiva de los genes *DEN* de Arabidopsis

Amani Toumi
Trabajo de fin de Máster
Elche, 2014

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

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Catedrática 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 realizada por Amani Toumi 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

María Rosa Ponce Molet

Elche, 10 de septiembre de 2014.

I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se sabe relativamente poco acerca de la naturaleza de los genes implicados en la morfología de las hojas de plantas, a pesar de su importancia para la biosfera en general y la productividad agraria en particular. En el laboratorio de J.L. Micol se está llevando a cabo una disección genética de la organogénesis foliar.

Hemos iniciado la caracterización de siete estirpes de *Arabidopsis thaliana* que pertenecen a la colección de mutantes foliares de J.L. Micol. 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. En este contexto, se ha intentado en este Trabajo de fin de Máster identificar los genes mutados en 7 mutantes foliares previamente aislados en el laboratorio de J.L. Micol, pertenecientes a la clase fenotípica Denticulata, cuyas hojas son apuntadas y dentadas a diferencia de las de su ancestro silvestre *Ler*. Los genes que causan este fenotipo que han sido clonados hasta la fecha en diferentes laboratorios codifican proteínas ribosómicas.

Como paso preliminar a la caracterización funcional de los genes a estudio, se determinó 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 genes candidatos más verosímiles a ser *DEN2*, *DEN3*, *DEN7*, *DEN10*, *DEN13*, *DEN15* y *DEN17*.

El mutante *den2* presentó una mutación C→T que daña el gen At2g40430 y codifica una presunta proteína Nop53p descrita en *Saccharomyces cerevisiae* como factor de la biogénesis del ribosoma. En *den3*, el gen At3g62870 resultó ser portador de una mutación C→T, que genera un codón de terminación prematuro. Este gen codifica una proteína ribosómica de la familia L7a. En *den7* se encontró una transición G→A en el gen At1g73180, que codifica el factor 2a de iniciación de la traducción eucariótica (eIF2a). El mutante *den10* muestra una mutación G→A en el primer nucleótido del séptimo exón del gen At5g64580, que podría afectar su *splicing*. Este gen codifica una proteína localizada en el cloroplasto, una presunta metaloproteasa dependiente de ATP (AtFtsHi4). En cuanto al mutante *den13*, presenta una transición C→T en el gen At3g48110 (*EMBRYO DEFECTIVE DEVELOPMENT1*; *EDD1*), que ha sido previamente clonado y codifica una Glicina-ARNt ligasa. El mutante *den15* presenta una mutación G→A en el gen letal embrionario At3g55620, que sustituye una valina por metionina en su producto proteico.

Este gen codifica el factor 6 de iniciación de la traducción eucariótica (eIF6). Por último, hemos considerado candidato más verosímil a ser *DEN17* al gen At4g23750 (*CYTOKININ RESPONSE FACTOR 2*; *CRF2*) que codifica un factor de transcripción de respuesta al etileno, portador una transición C→T en el mutante *den17*.

También hemos alineado las secuencias de las presuntas proteínas DEN con sus homólogas de otras especies. Los alineamientos así obtenidos revelaron un alto grado de conservación de casi todas estas proteínas. En la mayoría de los casos el residuo alterado en los mutantes está conservado, lo que sugiere que su contribución a la función de la proteína es relevante.

Se requerirán análisis adicionales de los mutantes *den* para confirmar que los genes que hemos considerado candidatos más verosímiles en cada mutante son los causantes de sus fenotipos: ensayos de alelismo con mutantes insercionales de ADN-T y/o complementación mediante transferencia de un transgén portador del correspondiente alelo silvestre. Una vez confirmada la causalidad, se determinarán sus patrones de expresión espacial y temporal, y la localización subcelular de su producto proteico.

El trabajo que aquí se presenta, como otros anteriores del laboratorio de J.L. Micol, confirma que el uso combinado de la cartografía génica mediante el análisis del ligamiento a marcadores moleculares y la secuenciación masivamente paralela facilita la identificación de genes causantes de los fenotipos de mutantes de interés.