



Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

El gen *APICULATA7* contribuye a la dorsoventralidad foliar en *Arabidopsis*

Carla Navarro Quiles

Tutores:

José Luis Micol Molina

Eduardo Mateo Bonmatí

Unidad de Genética

Instituto de Bioingeniería

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Curso académico 2015-2016

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

EDUARDO MATEO BONMATÍ, contratado predoctoral del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Carla Navarro Quiles como Trabajo de Fin del Máster en Biotecnología y Bioingeniería. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Eduardo Mateo Bonmatí

José Luis Micol Molina

Elche, 21 de junio de 2016.

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El producto del gen *APICULATA7* (*API7*) de *Arabidopsis* es un miembro soluble de la familia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Hemos obtenido un alelo insercional, letal recesivo y presuntamente nulo de *API7*, al que hemos denominado *api7-2*; de su estudio se concluye que *api7-1*, previamente disponible, es hipomorfo. Hemos empleado una fusión traduccional *API7:GFP* para determinar que la proteína *API7* es citoplásmica. La venación de los cotiledones es incompleta en *api7-1* y la de sus primeras hojas se desarrolla más lentamente que la silvestre, rasgos fenotípicos que sugieren la existencia de alguna alteración en la homeostasis de la auxina. En consecuencia, hemos transferido al mutante *api7-1* transgenes que permitirán la visualización del eflujo y la percepción de la auxina. También hemos realizado cruzamientos para combinar *api7-1* con alelos de genes relacionados con la señalización de la auxina. El doble mutante sinérgico *api7-1 as1-11* es portador de un alelo de *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*), que codifica un factor de transcripción implicado en el establecimiento del eje dorsoventral. Varios genes de identidad abaxial están desreprimidos en *api7-1 as1-11*. Concluimos que *API7* actúa en etapas tempranas de la formación del patrón de venación, participa en el establecimiento de la identidad adaxial y contribuye al desarrollo del gametofito, el cotiledón y la hoja.

Palabras clave: *Arabidopsis*; dorsoventralidad; *API7*; familia ABC; auxina.

The *APICULATA7* (*API7*) *Arabidopsis* gene encodes a soluble member of the ABC (ATP-binding cassette) transporter family. We obtained an insertional and likely null allele of *API7*, which we dubbed *api7-2*, concluding from its study that the previously available *api7-1* is hypomorphic. Using an *API7:GFP* translational fusion, we found the *API7* protein localized at the cytoplasm. Venation is incomplete in *api7-1* cotyledons, and that of its first leaves differentiates slower than wild type, phenotypic traits that suggest some alteration of auxin homeostasis. Hence, we transferred to the *api7-1* mutant transgenes that will allow the visualization of auxin efflux and perception, and performed crosses to combine *api7-1* with alleles of genes related to auxin signaling. The *api7-1 as1-11* synergistic double mutant carries an allele of *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*), which encodes a transcription factor involved in dorsoventral axis establishment. Several abaxial identity genes are derepressed in *api7-1 as1-11*. We conclude that *API7* functions in early stages of venation pattern formation, participates in the establishment of adaxial identity, and contributes to gametophyte, cotyledon and vegetative leaf development.

Keywords: *Arabidopsis*; dorsoventrality; *API7*; ABC family; auxin.

VI.- CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Máster hemos contribuido a la caracterización genética y molecular del gen *APICULATA7* (*API7*) de *Arabidopsis*. Hemos confirmado que *API7* es At4g19210 mediante un ensayo de alelismo. Hemos obtenido un alelo insercional de At4g19210, de dominio público, al que hemos denominado *api7-2*, que es letal recesivo y no complementa con *api7-1*, que fue aislado en el laboratorio de J.L. Micol. Del estudio de estos dos alelos *api7* concluimos que *API7* es un gen esencial, cuya ausencia de función causa letalidad temprana, y que *api7-1* es un alelo hipomorfo y *api7-2*, probablemente nulo.

El gen *API7* codifica la proteína ABCE2 (*API7*), que carece de dominio transmembrana, a diferencia de la mayoría de las proteínas ABC, razón por la que era razonable suponerle una localización subcelular citoplásmica, que hemos demostrado en plantas transgénicas en las que se expresa la proteína de fusión *API7:GFP*. También hemos generado fusiones traduccionales con tres variantes de la proteína verde fluorescente: la cian (*API7:CFP*), la amarilla (*API7:YFP*) y la roja (*API7:RFP*). Estas proteínas de fusión fluorescentes nos permitirán, más adelante, visualizar simultáneamente *API7* y la cromatina, así como realizar ensayos de coimmunoprecipitación y colocalización con los eventuales interactores de *API7*.

Dado que disponíamos de resultados previos que indicaban que la venación de las hojas del primer nudo de *api7-1* está alterada, hemos estudiado el patrón de venación de sus cotiledones, que es más denso y ramificado y presenta más venas de terminación libre que su tipo silvestre *Ler*. El gen *ATHB8* codifica un factor de transcripción que se expresa específicamente en el procámbium. Hemos visualizado el procámbium en primordios foliares de plantas *api7-1* portadoras del transgén *ATHB8_{pro}:GUS*, comprobando que el desarrollo vascular es más lento en *api7-1* que en *Ler*.

Las alteraciones del patrón de venación de los cotiledones y del tejido provascular y la vena primaria de las primeras hojas de *api7-1* sugieren que este mutante sufre alguna alteración de la homeostasis de la auxina. Para comprobarlo, hemos obtenido combinaciones dobles mutantes de *api7-1* y alelos de genes implicados en la señalización de esta fitohormona, cuyo estudio se realizará más adelante. *PIN1* es el transportador del eflujo de la auxina y *DR5_{pro}* un promotor sintético que responde a esta hormona. Hemos obtenido plantas transgénicas *api7-1 PIN1_{pro}:PIN1:GFP* y *api7-1 DR5_{pro}:GFP*, que permitirán estudiar en su momento el transporte y la percepción de la auxina en este mutante.

Se ha relacionado a las proteínas RLI1 (ABCE1) y PIXIE (ABCE1) de *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila melanogaster*, respectivamente, ortólogas de la ABCE2 de *Arabidopsis*, con la biosíntesis y el reciclaje de los ribosomas citoplásmicos. Por otro lado, las combinaciones dobles mutantes de alelos de insuficiencia de función de genes que codifican proteínas ribosómicas o factores implicados en la traducción con los de los genes *AS1* y *AS2* rinden fenotipos sinérgicos cuyo rasgo más llamativo es una pérdida severa de la dorsoventralidad foliar. Para estudiar la posible relación entre *API7*, la dorsoventralidad y la traducción, hemos estudiado los dobles mutantes *api7-1 as1-11* y *api7-1 as2-11*, cuyos fenotipos morfológicos resultaron sinérgicos: sus hojas vegetativas están parcial o totalmente ventralizadas. Hemos analizado los niveles de expresión de los genes de identidad abaxial *KAN1*, *KAN2* y *YAB5*, que están desreprimidos en *api7-1 as1-11*. Considerados en conjunto, nuestros resultados sugieren que *API7* contribuye al establecimiento de la identidad adaxial de las hojas. No obstante, será necesario estudiar la expresión de genes de identidad adaxial en el doble mutante *api7-1 as1-11* y los de identidad adaxial y abaxial en *api7-1 as2-11*.

También hemos cruzado *api7-1* por el mutante *ang1-2*, portador de un alelo de *PGY1*, que codifica la proteína ribosómica RPL10A, cuya relación con la identidad adaxial está descrita. Esperamos que la obtención y el estudio del doble mutante *api7-1 ang1-2* facilite la comprensión de la relación entre *API7*, la traducción y la dorsoventralidad foliar.