



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Identificación y caracterización
de nuevos genes *DENTICULATA*
en Arabidopsis**

Àngela Ortega Menaches

Tutores:

Carla Navarro Quiles

Raquel Sarmiento Mañús

José Luis Micol Molina

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2019-2020

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

RAQUEL SARMIENTO MAÑÚS, Profesora Ayudante Doctora de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

CARLA NAVARRO QUILES, contratada predoctoral 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 Àngela Ortega Menaches 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.

José Luis Micol Molina

Carla Navarro Quiles

Raquel Sarmiento Mañús

Elche, 13 de julio de 2020.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	III
I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
II.1.- Genética directa e inversa.....	2
II.2.- Procedimientos de mutagénesis clásica.....	2
II.2.1.- Mutagénesis química con metanosulfonato de etilo.....	2
II.2.2.- Mutagénesis física por irradiación.....	3
II.2.3.- Mutagénesis insercional.....	3
II.3.- Papel de las proteínas ribosómicas y los factores de transcripción AS1 y AS2 en el establecimiento del eje dorsoventral de las hojas de Arabidopsis	4
II.4.- Cartografía génica mediante secuenciación masiva	4
II.4.1.- Secuenciación masiva mediante la tecnología de Illumina	4
II.4.2.- Fundamentos de la cartografía génica mediante secuenciación masiva	7
III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	10
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	11
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria	11
IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas.....	11
IV.3.- Gramática y terminología.....	12
IV.4.- Nomenclatura genética.....	12
IV.5.- Estirpes empleadas en este trabajo.....	12
IV.6.- Cultivos	12
IV.6.1.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis	12
IV.6.1.1.- Cultivo en placa de Petri.....	13
IV.6.1.2.- Cultivo en maceta	14
IV.6.2.- Recolección de semillas	15
IV.7.- Disoluciones.....	15
IV.7.1.- Medios de cultivo para Arabidopsis.....	15
IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos	15
IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos	16
IV.7.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general	16
IV.7.2.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico.....	16
IV.7.2.2.- Disoluciones para electroforesis.....	17
IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos	17

IV.8.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis	17
IV.8.1.1.- Aislamiento de ADN para su amplificación por PCR.....	17
IV.8.1.2.- Aislamiento de ADN para su secuenciación masiva.....	17
IV.8.2.- Síntesis de ADN.....	18
IV.8.2.1.- Síntesis de oligonucleótidos	18
IV.8.2.2.- Amplificaciones mediante PCR.....	18
IV.8.3.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	19
IV.8.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN	19
IV.8.4.1.- Secuenciación por el método de Sanger	19
IV.8.4.2.- Secuenciación masiva y análisis de las lecturas apareadas obtenidas.....	20
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
V.1.- Cartografía mediante secuenciación masiva de los mutantes <i>den</i>	22
V.1.1.- Obtención de poblaciones cartográficas F ₂	22
V.1.2.- Extracción y secuenciación masiva de ADN genómico	23
V.1.3.- Evaluación de la calidad de las lecturas obtenidas	24
V.1.4.- Uso de EasyMap para identificar mutaciones candidatas	24
V.1.4.1.- Mutaciones candidatas a ser <i>den1</i>	25
V.1.4.2.- Mutaciones candidatas a ser <i>den4</i>	28
V.1.4.3.- Mutaciones candidatas a ser <i>den7</i>	28
V.1.4.4.- Mutaciones candidatas a ser <i>den11</i>	32
V.2.- Análisis de la estructura del gen <i>AS1</i> en el mutante <i>as1-14</i>	33
V.2.1.- Determinación de la naturaleza molecular de la mutación <i>as1-14</i>	33
V.2.2.- Diseño de transgenes para el rescate fenotípico del mutante <i>as1-14</i>	36
V.2.3.- Obtención de mutantes insercionales de colecciones de dominio público.....	37
VI.- CONCLUSIONES	38
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Fenotipo sinérgico de las combinaciones dobles mutantes de <i>den5-2</i> con <i>as1-14</i> y <i>as2-1</i>	5
Figura 2.- Tecnología y química de la secuenciación masiva de Illumina.....	6
Figura 3.- Etapas de la cartografía génica mediante secuenciación masiva en <i>Arabidopsis</i>	8
Figura 4.- Evaluación de la integridad de las muestras de ADN de las poblaciones cartográficas de la F ₂ de los exocruzamientos de <i>den1</i> , <i>den4</i> , <i>den7</i> y <i>den11</i> por Col-0	23
Figura 5.- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F ₂ derivada del exocruzamiento <i>den1</i> × Col-0.....	26
Figura 6.- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F ₂ derivada del exocruzamiento <i>den4</i> × Col-0.....	29
Figura 7.- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F ₂ derivada del exocruzamiento <i>den7</i> × Col-0.....	30
Figura 8.- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F ₂ derivada del exocruzamiento <i>den11</i> × Col-0.....	32
Figura 9.- Determinación de la naturaleza molecular de la mutación <i>as1-14</i>	34
Figura 10.- Clonación de un inserto en un vector de expresión Gateway	36
Figura 11.- Estructura de las unidades de transcripción de los genes <i>SMR12</i> y <i>ACT1</i>	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Abreviaturas empleadas en este trabajo	11
Tabla 2.- Estirpes de <i>Arabidopsis</i> usadas en este trabajo	13
Tabla 3.- Oligonucleótidos usados en este trabajo	18
Tabla 4.- Opciones del programa Easymap seleccionadas en este trabajo.....	21
Tabla 5.- Poblaciones cartográficas F ₂ cuyo análisis se ha completado en este trabajo	22
Tabla 6.- Controles de la calidad de las extracciones de ADN genómico realizadas para su secuenciación masiva	24
Tabla 7.- Parámetros de la secuenciación masiva de los mutantes <i>den</i>	24
Tabla 8.- Mutaciones candidatas a causar el fenotipo del mutante <i>den1</i>	28
Tabla 9.- Mutaciones candidatas a causar el fenotipo del mutante <i>den4</i>	29
Tabla 10.- Mutaciones candidatas a causar el fenotipo del mutante <i>den7</i>	32
Tabla 11.- Mutaciones candidatas a causar el fenotipo del mutante <i>den11</i>	33
Tabla 12.- Tamaño de los productos de PCR obtenidos empleando como molde ADN genómico de <i>Ler</i> y <i>as1-14</i> y los cebadores que se indican	34

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Las hojas de los mutantes *denticulata* (*den*) de *Arabidopsis* son pequeñas, apuntadas e indentadas, rasgos que les hacen candidatos a ser portadores de mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en la traducción. En este trabajo hemos completado la cartografía mediante secuenciación masiva de las mutaciones *den1*, *den4*, *den7* y *den11*, y hemos iniciado las de *den9*, *den14*, *den15*, *den16* y *den17*, con el objetivo de identificar sus genes mutados. Los genes *ASYMMETRIC LEAVES 1* (*AS1*) y *AS2* codifican factores de transcripción implicados en el establecimiento del eje dorsoventral de las hojas de *Arabidopsis*, e interaccionan sinérgicamente con algunos genes *DEN* previamente descritos. Hemos establecido que la mutación *as1-14* es una delección de 5.880 pb, que elimina parte del gen *AS1* y la totalidad de los genes adyacentes *ACTIN1* (*ACT1*) y *SIAMESE-RELATED12* (*SMR12*). Con el fin de establecer si el fenotipo morfológico del mutante *as1-14* se debe a la disfunción individual o conjunta de estos tres genes, hemos diseñado e iniciado la construcción de transgenes portadores de sus alelos silvestres y obtenido mutantes insercionales *act1* y *smr12* de colecciones de dominio público.

Palabras clave: *Arabidopsis*, *DENTICULATA*, cartografía mediante secuenciación masiva, *ASYMMETRIC LEAVES*.

The *Arabidopsis denticulata* (*den*) mutants exhibit small, pointed and dentate leaves, traits that make them candidates to carry mutations in genes encoding proteins involved in translation. In this work, we accomplished the mapping by sequencing of *den1*, *den4*, *den7* and *den11*, and initiated that of *den9*, *den14*, *den15*, *den16*, and *den17*, in order to identify their mutated genes. The *ASYMMETRIC LEAVES 1* (*AS1*) and *AS2* genes encode transcription factors involved in leaf dorsoventral axis specification, and these genes synergistically interact with some *DEN* genes already described. We found that the *as1-14* mutation is a 5,880-bp deletion that spans part of the *AS1* gene and the whole *ACTIN1* (*ACT1*) and *SIAMESE-RELATED12* (*SMR12*) genes. To ascertain if the morphological phenotype of the *as1-14* mutant is caused by the individual or combined loss of function of these three genes, we designed and initiated the construction of transgenes harboring their wild-type alleles, and obtained insertional mutants from public collections as well.

Keywords: *Arabidopsis*, *DENTICULATA*, mapping by sequencing, *ASYMMETRIC LEAVES*.

II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- Genética directa e inversa

La disección genética clásica de un proceso biológico en un organismo experimental tiene como punto de partida una mutagénesis, seguida de una selección de mutantes que manifiesten alguna alteración del proceso a estudio. El análisis genético y molecular de dichos mutantes permite identificar los genes implicados en el proceso de interés, cuya pérdida de función causa el fenotipo seleccionado. Se ha dado en llamar Genética directa a este abordaje experimental, que ha predominado durante casi todo el siglo XX (Takahashi *et al.*, 1994).

El advenimiento de la Genómica en las dos últimas décadas del siglo XX conllevó la secuenciación completa de los genomas de las especies modelo de uso más común, como la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el insecto díptero *Drosophila melanogaster* y el ratón *Mus musculus*. Se obtuvieron las secuencias de casi todos los genes de dichos genomas y se generaron colecciones de mutantes señalizados, cada uno de los cuales era portador de una mutación nula en un gen concreto. Estos mutantes no habían sido seleccionados por su fenotipo, sino por ser portadores de una mutación en un determinado gen. Mientras que en la Genética directa se parte del fenotipo de un mutante para identificar el gen que lo causa, se denomina Genética inversa al abordaje experimental opuesto, en el que se parte del conocimiento de la secuencia de un gen para mutarlo de manera más o menos precisa y poder estudiar los efectos fenotípicos de su inactividad. Se va del fenotipo al gen en la Genética directa, y del gen al fenotipo en la inversa (Wu *et al.*, 2005).

Una vertiente de la Genética inversa es la mutagénesis dirigida, que a su vez tiene numerosas variantes. Existen procedimientos para eliminar y reemplazar genes, así como para inducir mutaciones en posiciones específicas de un gen. La tecnología de mutagénesis dirigida que más se ha extendido en los últimos años es la denominada CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; Belhaj *et al.*, 2015).

II.2.- Procedimientos de mutagénesis clásica

II.2.1.- Mutagénesis química con metanosulfonato de etilo

El más común de los procedimientos químicos de inducción de mutaciones en posiciones aleatorias de un genoma que caracterizan a la Genética directa es la mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS). Este compuesto induce la alquilación de los residuos de guanina (G), generando O⁶-etilguanina, que es complementaria de la timina (T), pero no de la citosina (C). En consecuencia, un par de bases G/C es sustituido por un

par A/T tras una mutagénesis con EMS y dos rondas de replicación del ADN (Qu y Qin, 2014).

II.2.2.- Mutagénesis física por irradiación

Se conocen varios agentes físicos cuya utilidad como mutágenos ha sido ampliamente probada. Se trata de radiaciones de diferentes longitudes de onda, que causan un amplio espectro de daños en el ADN, desde mutaciones puntuales hasta grandes reordenamientos cromosómicos, como las inversiones, deleciones y translocaciones. Constituyen ejemplos de ello los rayos X y los neutrones rápidos, que son radiaciones electromagnéticas ionizantes de longitudes de onda inferiores a los 10 nm. Los rayos X suelen producir inversiones, rupturas cromosómicas y translocaciones (Muller, 1927). El bombardeo con neutrones rápidos induce deleciones y sustituciones puntuales, como las transiciones A/T → G/C (Belfield *et al.*, 2012).

II.2.3.- Mutagénesis insercional

Una técnica empleada profusamente para la inducción de mutaciones en plantas como *Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*) o el arroz (*Oryza sativa*) consiste en la inserción de una molécula de ADN exógeno en posiciones aleatorias del genoma (Feldmann, 1991). La herramienta más usada para este procedimiento, que se denomina mutagénesis insercional, es el ADN transferente (ADN-T) de los plásmidos pTi de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Ortega *et al.*, 2002; Mohammed *et al.*, 2019).

Se han obtenido centenares de miles de mutantes de *Arabidopsis* portadores de inserciones de ADN-T, que forman parte de colecciones de dominio público como la del SALK Institute (Alonso *et al.*, 2003) o la del GABI-Kat (Kleinboelting *et al.*, 2012). El ADN-T no solo es útil como mutágeno, sino también como herramienta para la obtención de líneas transgénicas en *Arabidopsis*. La capacidad del ADN-T de integrarse en el genoma de las plantas infectadas con *Agrobacterium tumefaciens* radica en dos secuencias, denominadas Right Border (RB) y Left Border (LB); se han desarrollado vectores plasmídicos basados en los pTi de esta bacteria, que permiten construir transgenes flanqueados por las secuencias RB y LB, susceptibles por tanto de integrarse en el genoma de una planta. Tanto la mutagénesis como la obtención de líneas transgénicas de *Arabidopsis* basadas en el ADN-T suelen realizarse mediante transformación por infección de órganos florales con *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998).

II.3.- Papel de las proteínas ribosómicas y los factores de transcripción AS1 y AS2 en el establecimiento del eje dorsoventral de las hojas de Arabidopsis

Las células de las hojas de la roseta de Arabidopsis manifiestan diferentes morfologías a lo largo del eje dorsoventral, que son el resultado de su especialización en diferentes facetas de la fotosíntesis. Las epidermis adaxial y abaxial, que constituyen el haz y el envés, y sus tejidos subepidérmicos, el mesófilo en empalizada y el lagunar, están especializados en la captación de la luz solar y el intercambio gaseoso, respectivamente. En el establecimiento del eje dorsoventral participan pequeños ARN reguladores y varias familias de factores de transcripción que determinan la identidad abaxial, como AUXIN RESPONSE FACTOR 3 (ARF3; Pekker *et al.*, 2005), o la adaxial, como ASYMMETRIC LEAVES 1 (AS1) y AS2 (Byrne *et al.*, 2000; Iwakawa *et al.*, 2002; Pinon *et al.*, 2008; Horiguchi *et al.*, 2011; Iwasaki *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2013; Machida *et al.*, 2015; Matsumura *et al.*, 2016; Luong *et al.*, 2018), que pertenecen a las familias MYELOBLASTOSIS (MYB) y LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB), respectivamente. AS1 y AS2 forman un heterodímero que reprime a ARF3 (Husband *et al.*, 2015; Iwasaki *et al.*, 2013), entre otras funciones. Los alelos hipomorfos y nulos de AS1 y AS2 deforman las hojas, haciéndolas asimétricas, lobuladas y triangulares, con márgenes ligeramente recurvados hacia el envés (Tsukaya y Uchimiya, 1997; Robles Ramos, 1999; Semiarti *et al.*, 2001; Figura 1B y C, en la página 5).

Las mutaciones de insuficiencia de función en algunos genes de Arabidopsis que codifican proteínas implicadas en la traducción, incluidas las ribosómicas, causan fenotipos foliares similares: las hojas de los mutantes son apuntadas y ligeramente indentadas (Pinon *et al.*, 2008; Casanova-Sáez *et al.*, 2014). La combinación de mutaciones en estos genes con alelos mutantes de los genes AS1 y AS2 rinden fenotipos sinérgicos, cuyo rasgo más característico es la abaxialización de las hojas, que en los casos más extremos se radializan por completo (Tsukaya y Uchimiya, 1997; Robles Ramos, 1999; Horiguchi *et al.*, 2011). Un ejemplo de ello es el alelo *den5-2* del gen *RPL7B*, que codifica una proteína ribosómica de la subunidad 60S (Figura 1D), cuyos dobles mutantes con *as1-14* o *as2-1* manifiestan una pérdida parcial o total de la dorsoventralidad foliar (Figura 1E y F; Horiguchi *et al.*, 2011).

II.4.- Cartografía génica mediante secuenciación masiva

II.4.1.- Secuenciación masiva mediante la tecnología de Illumina

La tecnología desarrollada por la empresa Illumina es la de mayor cuota de mercado en el ámbito de la secuenciación masivamente paralela de ADN. Se denomina

“secuenciación por síntesis” a este método, que conduce a la obtención de decenas, o incluso centenares, de millones de lecturas simultáneas de los fragmentos del ADN de una muestra (van Dijk *et al.*, 2014).

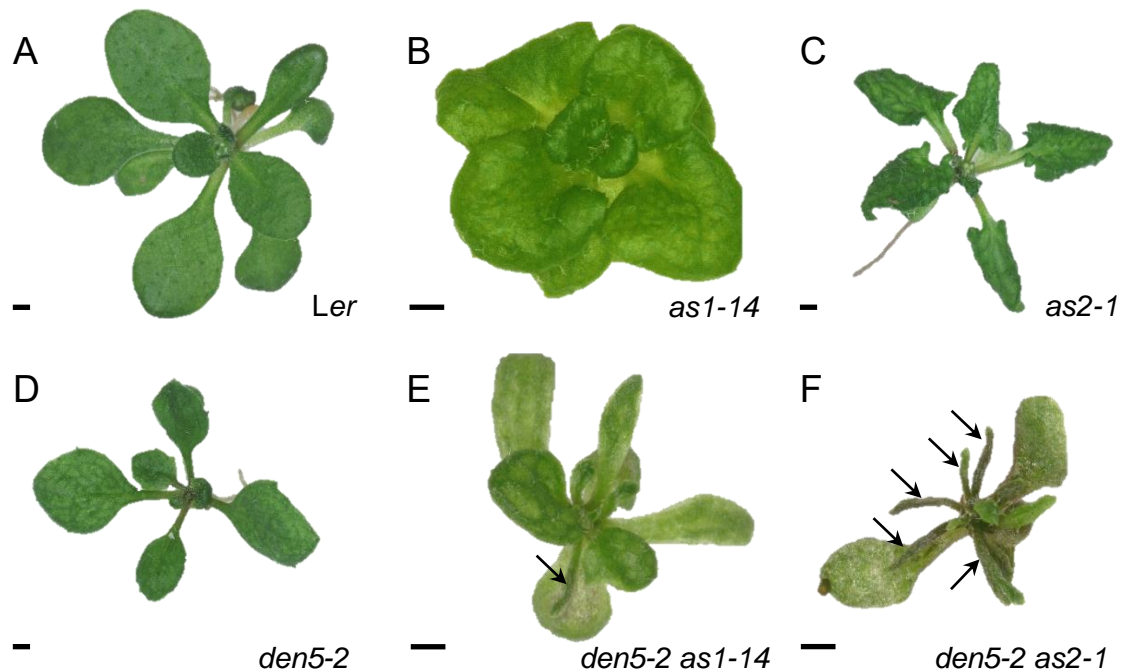


Figura 1.- Fenotipo sinérgico de las combinaciones dobles mutantes de *den5-2* con *as1-14* y *as2-1*. Rosetas de (A) el tipo silvestre Landsberg *erecta* (*Ler*), los mutantes simples (B) *as1-14*, (C) *as2-1* y (D) *den5-2*, y los dobles mutantes (E) *den5-2 as1-14* y (F) *den5-2 as2-1*. Las flechas señalan hojas radializadas. Estas imágenes se obtuvieron en el laboratorio de J.L. Micol antes del comienzo de este TFM (A, B, E y F) 21, (C) 19 y (D) 20 días después de la estratificación (dde). Las barras de escala representan 1 mm.

La primera etapa de esta técnica de secuenciación masiva es la fragmentación del ADN a estudio, que suele hacerse por sonicación. A continuación, se añaden oligonucleótidos sintéticos (adaptadores) a los extremos de los fragmentos (Figura 2A, en la página 6) y se lleva a cabo su amplificación clonal. Para ello, los fragmentos modificados se desnaturalizan alcalinizando la disolución que los contiene, que se vierte sobre una celda de flujo, a cuya superficie se han anclado por su extremo 5' numerosos oligonucleótidos de dos tipos, complementarios de los adaptadores. El número de oligonucleótidos inmovilizados en la celda de flujo es sustancialmente mayor que el de los fragmentos de ADN en disolución.

La hibridación de un fragmento con un oligonucleótido inmovilizado permite una síntesis mediante PCR en la que este último actúa como cebador. Se denomina a esta

amplificación “PCR puente”, ya que a continuación el fragmento que ha servido de molde se separa por calentamiento de la molécula de nueva síntesis, que sigue anclada a la celda de flujo, cuya movilidad permite que su extremo 3’ colisione e hibride con algún oligonucleótido cercano, formando un puente que se hará totalmente bicatenario en un segundo ciclo de PCR. Una segunda desnaturalización por calentamiento separa las dos cadenas de la molécula bicatenaria, rindiendo dos moléculas monocatenarias inmovilizadas por sus extremos 5’, cada una de las cuales repetirá el proceso de hibridación con un oligonucleótido inmovilizado cercano y nuevas síntesis en sucesivos ciclos de PCR.

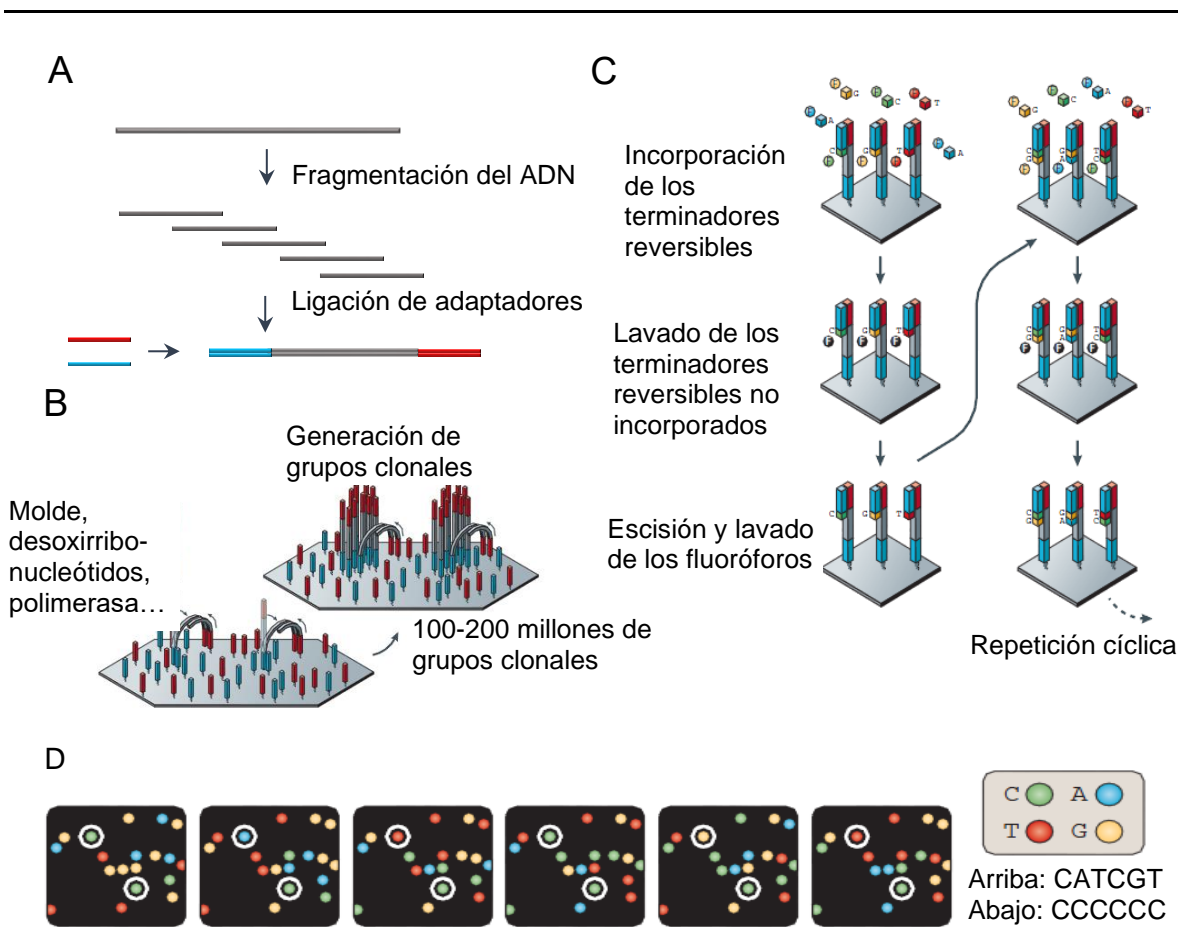


Figura 2.- Tecnología y química de la secuenciación masiva de Illumina. (A) Preparación de las muestras: unión de adaptadores a los extremos de los fragmentos del ADN, amplificación e introducción de las regiones complementarias a los oligonucleótidos de las celdas de flujo. (B) Generación de grupos clonales: cada fragmento se amplifica de manera simultánea en todos los grupos, generando una amplificación clonal de todos los fragmentos. (C) Secuenciación: se incorporan nucleótidos marcados fluorescentemente que compiten por unirse a la cadena molde, generando fluorescencia. (D) Captación por un sensor CCD de la señal fluorescente emitida por el nucleótido recién incorporado. Tomado, con ligeras modificaciones, de Mateo-Bonmatí (2013), que a su vez lo tomó de Metzker (2010).

Este procedimiento conduce a la formación de grupos o colonias clonales (Figura 2B), constituidos por dos tipos de moléculas monocatenarias complementarias. En cada grupo clonal se elimina a continuación uno de los tipos de moléculas complementarias, para que las restantes sirvan de molde en otra amplificación de PCR, que se realiza empleando cebadores en disolución y nucleótidos marcados diferencialmente con fluoróforos, que actúan como terminadores reversibles de la síntesis de ADN. Cuando la síntesis comienza, la unión del primer nucleótido bloquea la incorporación de otros. La excitación, con un láser, del fluoróforo del nucleótido incorporado y el registro de la emisión fluorescente resultante, con un sensor CCD, permiten la identificación y el registro de la primera base de la lectura. Se escinden a continuación del nucleótido incorporado al cebador tanto su fluoróforo como el grupo azida que actúa como terminador, lo que a su vez permite la incorporación de un segundo nucleótido a la cadena en síntesis (Palla *et al.*, 2014). Este proceso se repite sucesivamente hasta generar el resto de la secuencia de la lectura. Se denomina pareadas a las lecturas, de unos 150 pb, que generan los secuenciadores de Illumina, ya que corresponden a los dos extremos de un fragmento del genoma a estudio, cuya parte central no se secuencia (Figura 2, en la página 6).

II.4.2.- Fundamentos de la cartografía génica mediante secuenciación masiva

La cartografía génica mediante secuenciación masiva (mapping-by-sequencing) permite identificar la mutación que causa un fenotipo de interés a partir de la secuenciación masiva del ADN genómico de los individuos de fenotipo recesivo de una población cartográfica. Una de las poblaciones cartográficas más utilizada en *Arabidopsis* para este fin es la segunda generación filial (F_2) de un exocruzamiento (outcross): el cruzamiento de un mutante a estudio, aislado tras la mutagénesis de un tipo silvestre dado, por otra estirpe silvestre, polimórfica de la anterior.

En el caso de *Arabidopsis* es relativamente común trabajar con poblaciones cartográficas derivadas de un cruzamiento entre un mutante cuyo fondo genético es Landsberg *erecta* (*Ler*) y Columbia-0 (*Col-0*), o viceversa (Figura 3, en la página 8). La secuencia del genoma de *Col-0* es la más detallada de las disponibles y suele usarse como referencia para alinear las lecturas obtenidas en cualquier secuenciación masiva (Austin *et al.*, 2011). La del genoma de *Ler* es también de dominio público. Se conocen más de 50.000 polimorfismos (Minteer, 2006) que permiten determinar de qué estirpe proviene cualquier segmento del genoma de un individuo de la F_2 procedente de la autofecundación de un individuo F_1 obtenido a partir de un cruzamiento *Ler* x *Col-0* (Schneeberger *et al.*, 2009).

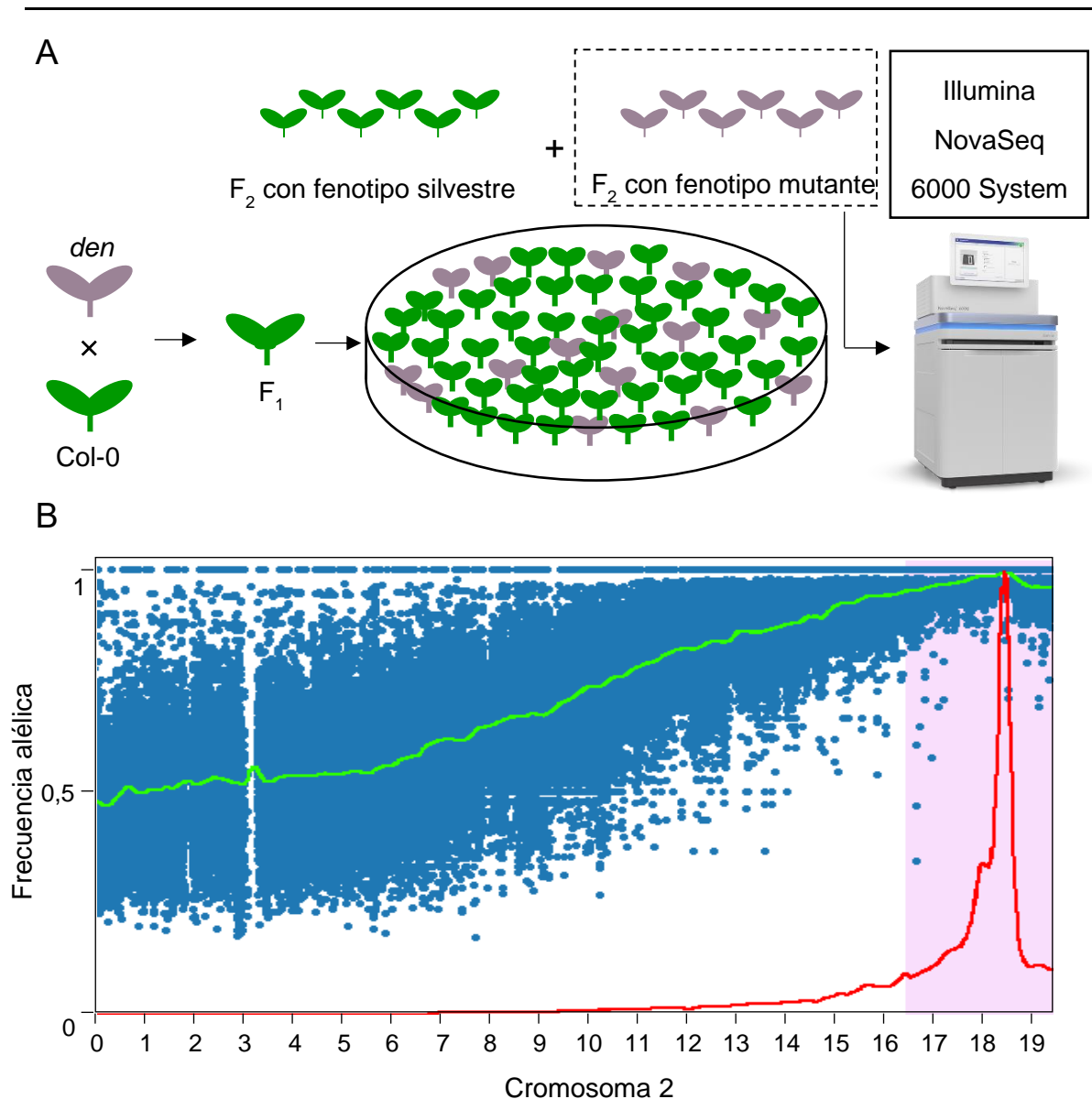


Figura 3.- Etapas de la cartografía génica mediante secuenciación masiva en *Arabidopsis*. (A) Representación esquemática de un cruzamiento entre una planta homocigótica para una mutación recesiva (*den*), con fondo genético *Ler*, y otra silvestre (*Col-0*). La progenie F_1 es heterocigótica para la mutación *den* y fenotípicamente silvestre; su autofecundación rinde una población cartográfica F_2 en la que se observa una segregación fenotípica 3:1 (silvestre:mutante). Se seleccionan las plantas fenotípicamente mutantes, y se extraen y mezclan sus ADN genómicos, que se someten a secuenciación masiva. (B) Análisis del ligamiento a los SNP de *Col-0* y *Ler*, realizado a partir de las lecturas obtenidas. Cada círculo azul representa una de las variantes bialélicas de un SNP. Solo se representa el cromosoma 2, ya que no se encontró desequilibrio de ligamiento en ninguno de los otros cuatro. La figura se obtuvo con el programa Easymap, desarrollado por S. Lup, D. Wilson-Sánchez, S. Andreu-Sánchez y J.L. Micol (sin publicar).

En consecuencia, es teóricamente posible identificar una región candidata a contener una mutación recesiva de posición previamente desconocida, por el

procedimiento de seleccionar plantas de fenotipo recesivo de la F_2 de un exocruzamiento entre Col-0 y un mutante cuyo fondo genético es *Ler*, y llevar a cabo su análisis del ligamiento a marcadores moleculares bialélicos, más concretamente los polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms; SNP) naturales que existen entre Col-0 y *Ler*. La extracción del ADN de unas 100-150 plantas F_2 de fenotipo recesivo es suficiente para encontrar una región que manifieste inequívocamente desequilibrio de ligamiento, es decir, un segmento del genoma en el que los alelos de los SNP de Col-0 y *Ler* no segreguen independientemente (en una proporción 1:1) (Figura 3, en la página 8; Michelmore *et al.*, 1991). Tras delimitar así un intervalo candidato e identificar las mutaciones puntuales que contiene, se analiza cada una de ellas: se predice el cambio que causaría en el producto proteico del gen mutado. En base a las funciones demostradas o predichas de los genes mutados, se propone finalmente a algunos de ellos como mejores candidatos a ser los causantes del fenotipo mutante a estudio (Schneeberger *et al.*, 2009).

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el laboratorio de José Luis Micol se han realizado varias búsquedas de mutantes con el propósito de identificar genes implicados en el desarrollo foliar (Berná *et al.*, 1999; Wilson-Sánchez *et al.*, 2014). Se llevaron a cabo abordajes experimentales basados en la Genética directa (apartado II.1, en la página 2), realizando mutagénesis mediante bombardeo con neutrones rápidos (apartado II.2.2, en la página 3) y con EMS (apartado II.2.1, en la página 2), y se aislaron centenares de mutantes foliares fértiles y viables que fueron agrupados en clases fenotípicas para facilitar su análisis genético. La clase fenotípica más numerosa fue la denominada Denticulata (Den), que incluía 30 mutantes, que fueron asignados a 19 grupos de complementación (Robles Ramos, 1999).

Mediante análisis iterativo del ligamiento a marcadores moleculares se delimitaron en el laboratorio de J.L. Micol intervalos candidatos a contener las mutaciones *denticulata5* (*den5*) y *den12*. La secuenciación por el método de Sanger de varios de los genes contenidos en dichos intervalos permitió establecer que los genes *DEN5* y *DEN12* codifican las proteínas ribosómicas RPL7B y RPL10aB, respectivamente (Horiguchi *et al.*, 2011). Combinando la cartografía génica tradicional y la secuenciación masiva, se estableció posteriormente que los productos de los genes *DEN3*, *DEN6*, *DEN10* y *DEN13* son RPL7aB, RPL16B, FILAMENTING TEMPERATURE SENSITIVE HI4 (FTSHI4) y EMBRYO DEFECTIVE DEVELOPMENT 1 (EDD1). FTSHI4 es una proteína del tilacoide del cloroplasto, cuya función molecular concreta se desconoce (Gutiérrez Nájera, 2018). EDD1 es una glicil-ARNt sintetasa de los plástidos y las mitocondrias (Berg *et al.*, 2005; Moschopoulos *et al.*, 2012). En síntesis, de los 6 genes *DEN* identificados en el laboratorio de J.L. Micol antes del comienzo de este Trabajo de Fin de Máster (en adelante, TFM), 5 codifican proteínas implicadas en la traducción (*DEN3*, *DEN5*, *DEN6*, *DEN12* y *DEN13*). Para obtener más información sobre el papel de la traducción en el establecimiento del eje dorsoventral de la hoja (apartado II.3, en la página 4), se generaron dobles mutantes *den as*, que en muchos casos manifestaron fenotipos sinérgicos (Robles Ramos, 1999; Mollá Morales, 2011).

Los objetivos iniciales de este TFM fueron (1) identificar los genes mutados responsables de los fenotipos de los mutantes *den1*, *den4*, *den7*, *den9*, *den11*, *den14*, *den15*, *den16* y *den17*, usando para ello la cartografía mediante secuenciación masiva, (2) determinar la naturaleza molecular de la mutación *as1-14*, y (3) diseñar y construir transgenes y estudiar mutantes insercionales para confirmar que la insuficiencia de la función del gen *AS1* es la causa del fenotipo del mutante *as1-14*.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria

Para la redacción de esta memoria se han seguido las pautas definidas en varias Tesis (Ponce Molet, 1996; Berná Amorós, 1997; Serrano Cartagena, 1998; Quesada Pérez, 1999; Robles Ramos, 1999; Candela Antón, 2001; Pérez Pérez, 2003; Aguilera Díaz, 2009; Sarmiento Mañús, 2011; Ferrández Ayela, 2012; Micol Ponce, 2017) y Trabajos de Fin de Grado (Navarro Quiles, 2015; Gutiérrez Nájera, 2018; Penalva Pérez, 2019), realizados en los laboratorios de J.L. Micol y M.R. Ponce. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunos párrafos de dichos trabajos anteriores.

IV.2.- Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas

Se ha procurado obedecer la normativa de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en lo referente a la formulación química y a las denominaciones de los compuestos empleados en este trabajo. No obstante, se ha preferido usar los acrónimos castellanizados ADN y ARN —de uso común en los medios de comunicación españoles—, en lugar de los recomendados por la IUPAC, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente. Esta elección no está basada en ningún argumento que se considere incontestable; ambas opciones son aceptadas por el Diccionario de la lengua española (vigésimotercera edición, 2014) de la Real Academia Española (RAE).

En esta memoria se emplean numerosas abreviaturas y acrónimos, la mayoría de los cuales se definen la primera vez que aparecen en el texto. Además, se han utilizado las abreviaturas de la Tabla 1, correspondientes en su mayoría a las unidades de medida empleadas, que son las del Sistema Internacional.

Tabla 1.- Abreviaturas empleadas en este trabajo

cm: centímetros.	Mb: Megabases.	rpm: revoluciones por minuto.
<i>et al.</i> : <i>et alii</i> (y otros).	mg: miligramos.	s: segundos.
g: aceleración de la gravedad.	min: minutos.	UV: ultravioleta.
g: gramos.	ml: mililitros.	v/v: volumen/volumen.
h: horas.	mm: milímetros.	W: vatios.
kb: kilobases.	mM: milimolar.	μl: microlitros.
kg: kilogramos.	MΩ: megaohmios.	μM: micromolar.
l: litros.	m/v: masa/volumen.	°C: grados centígrados
M: molar.	pb: pares de bases.	

IV.3.- Gramática y terminología

Tal como recomienda la RAE en su Ortografía de la lengua española (2010), en esta memoria no se realiza el plural de las siglas añadiendo al final una s minúscula: se escribe “el ADN” y también “los ADN”. Se emplean aquí algunos extranjerismos de uso común que carecen de una traducción al español generalmente aceptada, como *eppendorf*. El carácter foráneo de estas palabras se ha destacado en cursiva. No hemos traducido al español muchos de los nombres de genes y proteínas que se mencionan en esta memoria; en estos casos solo hemos usado la cursiva para los genes.

IV.4.- Nomenclatura genética

La nomenclatura que se aplica en esta memoria a genes, mutaciones y fenotipos se atiene estrictamente a las pautas propuestas para *Arabidopsis* por Meinke y Koornneef (1997), cuya versión más reciente puede encontrarse en <http://www.arabidopsis.org>. Los alelos de un gen se indican con abreviaturas en cursiva, empleándose las mayúsculas para el silvestre y las minúsculas para los mutantes. Las proteínas se indican en tipografía normal, con mayúsculas. Si existen diferentes genes que han recibido la misma denominación, se les distingue añadiendo un número al grupo de dos, tres o cuatro letras que les denota. Los diferentes alelos mutantes de un gen reciben un distintivo numérico, separado por un guion del identificador del gen. Sirva como ejemplo de lo anterior que hemos estudiado el mutante *denticulata5-2* (*den5-2*), portador del alelo *den5-2* del gen *DENTICULATA5* (*DEN5*), cuyo producto es la proteína *DENTICULATA5* (*DEN5*).

No existe una nomenclatura de aceptación general para los genotipos de *Arabidopsis*. Hemos empleado la expresión línea (también estirpe, planta, individuo, semilla, plántula o cualquier órgano) *den5-2* para referirnos a cualquier homocigoto para esta mutación. Salvo que se indique lo contrario, las plantas que se describen en este trabajo son homocigóticas para las mutaciones que se mencionan en cada caso.

IV.5.- Estirpes empleadas en este trabajo

Hemos empleado las estirpes silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. que se listan en la Tabla 2, en la página 13. Sus semillas se conservaron a 4°C.

IV.6.- Cultivos

IV.6.1.- Condiciones de cultivo de *Arabidopsis*

Los cultivos de *Arabidopsis* se realizaron en placa de Petri o en maceta a partir de

semillas que habían sido previamente conservadas a 4°C durante al menos un día.

Tabla 2.- Estirpes de *Arabidopsis* usadas en este trabajo

Estirpe	Código del NASC	Fondo genético	Mutágeno (mutación)	Gen(es) mutado(s)	Origen
Ler	NW20		Tipo silvestre		1
Col-0	N1092		Tipo silvestre		1
<i>as1-14</i>		Ler	Neutrones rápidos (deleción)	At2g37610* At2g37620* At2g37630*	2
<i>den1</i>		Ler	EMS	Por identificar	3
<i>den4</i>		Ler	EMS	Por identificar	3
<i>den7</i>		Ler	EMS	Por identificar	3
<i>den9</i>		Ler	EMS	At1g17960	3
<i>den11</i>		Ler	EMS	Por identificar	3
<i>den14</i>		Ler	EMS	Por identificar	3
<i>den15</i>		Ler	EMS	Por identificar	3
<i>den16</i>		Ler	EMS	Por identificar	3
<i>den17</i>		Ler	EMS	Por identificar	3

*Genes identificados en este TFM. ¹Estirpes obtenidas inicialmente del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) y replicadas varias veces por autofecundación en el laboratorio de J.L. Micol. ²Robles Ramos (1999). ³Berná *et al.* (1999).

IV.6.1.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.7.1.2, en la página 16). La siembra de las semillas de *Arabidopsis* se llevó a cabo tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8 min, en una disolución acuosa del 40% en lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 2 ml/l de Triton X-100 al 1% v/v, realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril.

La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Se sembraron entre 16 y 100 semillas por placa, espaciándolas regularmente sobre la superficie del medio de cultivo con una pipeta Pasteur y una plantilla dispuesta bajo la placa. Tras su siembra, las placas fueron precintadas con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula en aerosol, sin impedir el intercambio de gases.

Las placas de Petri con las semillas se estratificaron durante 24 h en posición invertida, a 4°C y en la oscuridad, con el fin de sincronizar su germinación, tras lo que

fueron cultivadas a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de unos $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White en cámaras de cultivo Conviron TC16.

Las plantas de interés, cuyo cultivo se había iniciado mediante siembra en placa de Petri, fueron posteriormente trasplantadas a macetas, en las que completaron su ciclo de vida en las condiciones que se detallan en el apartado siguiente.

IV.6.1.2.- Cultivo en maceta

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28×50 cm, con 42 alveolos, cada uno de ellos de 5×5 cm (diámetro \times altura), introducidas en cubetas de unos 7 cm de profundidad. Se introdujo en cada alveolo, previamente a su relleno con el sustrato, una maceta de rejilla de 5×5 cm (diámetro \times altura). Las macetas de rejilla impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, facilitando la extracción de las plantas. Se empleó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; $105\text{-}125 \text{ kg/m}^3$), vermiculita (granulometría de 1 a 3 mm; $80\text{-}100 \text{ kg/m}^3$) y turba no fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobmul Neuhaus), en una proporción volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que en la mayoría de los casos había sido trasplantada, con ayuda de unas pinzas, desde la placa de Petri en la que había permanecido durante las primeras 3 semanas de su ciclo de vida.

Estos cultivos permanecieron cubiertos con un plástico transparente, en el que se realizaron algunos agujeros a fin de evitar una excesiva condensación de agua, durante 6 días. Cuando se produjo el alzado y la elongación de los entrenudos, al término de la etapa vegetativa, se aisló a las plantas trasplantadas enfundándolas con cilindros de plástico transparente, denominados aracones (aracons; Beta Tech), que impiden el contacto entre individuos adyacentes y facilitan la recolección de las semillas.

Los cultivos en maceta se mantuvieron en una cámara climatizada visitable, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua, con luz blanca suministrada por tubos fluorescentes Sylvania 160 W F72T12 CW VHO Cool White o Philips F72T12/D/VHO 160 W 1500 SF, totalizando unos $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$.

Las bandejas estuvieron permanentemente subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se llevó a cabo dos veces por semana, mediante la adición de medio mínimo ATM (apartado IV.7.1.1, en la página 15). A partir del momento en que la floración se interrumpe, se suspende el riego,

propiciándose así el secado de las plantas, que son mantenidas en la cámara de cultivo al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

IV.6.2.- Recolección de semillas

Para la recolección de todas las semillas de una planta seca, producto de su autofecundación, se presionó contra un colador que se sujetó sobre un papel de filtro, en el que cayeron las semillas. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta que se acumuló sobre el papel fue cribada a través de un colador de malla más fina que la del primero, para eliminar en lo posible todas las partículas más grandes que las semillas. Las semillas de las estirpes de *Arabidopsis* usadas en este trabajo se almacenaron en tubos *ependorf*, que se conservaron a 4°C.

IV.7.- Disoluciones

Se empleó siempre agua desionizada, con una resistividad media de 15 M Ω /mm²·m, y las disoluciones se conservaron a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

IV.7.1.- Medios de cultivo para *Arabidopsis*

Los medios de cultivo mencionados en este apartado se prepararon disolviendo sus componentes en agua. Todas las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a 1 kg/cm² y 121°C durante 20 min. Las sustancias termolábiles fueron esterilizadas mediante filtración forzada por aspiración, a través de filtros Millipore de 0,22 o 0,45 μ m de diámetro de poro. Su adición a un medio de cultivo esterilizado en autoclave se realizó después de que este último fuera estabilizado a 55°C.

IV.7.1.1.- Medios de cultivo líquidos

Medio mínimo ATM: KNO₃ 5 mM; KH₂PO₄ 2,5 mM; MgSO₄ 2 mM; Ca(NO₃)₂ 2 mM; FeNaEDTA 51 μ M; H₃BO₃ 70 μ M; MnCl₂ 14 μ M; CuSO₄ 0,5 μ M; ZnSO₄ 1 μ M; NaMoO₄ 0,2 μ M; NaCl 10 μ M, y CoCl₂ 0,01 μ M (Kranz y Kirchheim, 1987).

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 5 ml de KNO₃ 1 M; 2,5 ml de KH₂PO₄ 1 M; 2 ml de MgSO₄ 1 M; 2 ml de Ca(NO₃)₂ 1 M; 2 ml de FeNaEDTA 20 mM, y 1 ml de la disolución de micronutrientes, ajustando el volumen final a 1 l. Todas las disoluciones madre se prepararon en las concentraciones indicadas y se esterilizaron por

filtración. Las disoluciones madre de las sales deben añadirse a los 900 ml de agua, y no a la inversa, a fin de evitar la precipitación de complejos insolubles de fosfato cálcico.

La composición de la disolución de micronutrientes es la siguiente: H_3BO_3 70 mM; MnCl_2 14 mM; CuSO_4 0,5 mM; ZnSO_4 1 mM; NaMoO_4 0,2 mM; NaCl 10 mM, y CoCl_2 0,01 mM. Se preparó añadiendo, a 900 ml de agua, 4,32 g de H_3BO_3 ; 2,77 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 124 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 287 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 48,7 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 584,4 mg de NaCl, y 2,38 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Finalmente, se añadió agua hasta 1 l.

IV.7.1.2.- Medios de cultivo sólidos

Los medios de cultivo sólidos se prepararon por adición de agar para plantas (Plant Agar; Duchefa), a una concentración final del 0,7% m/v, tras la disolución del resto de los componentes en agua. Una vez finalizada su esterilización en autoclave, los medios de cultivo se mantuvieron durante 30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Las placas de Petri con medio sólido se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida y precintadas.

Medio GM (Germination Medium): NH_4NO_3 10,3 mM; H_3BO_3 50,1 μM ; CaCl_2 1,5 mM; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; Na_2EDTA 55,4 μM ; MgSO_4 0,75 mM; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 μM ; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 μM ; KI 2,5 μM ; KNO_3 9,4 mM; KH_2PO_4 0,62 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 μM ; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 7 g/l de agar para plantas.

Para su preparación, se añadieron, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES (ácido 2-[N-morfolino]etano sulfónico). Se agitó la suspensión hasta la total disolución de sus componentes y se ajustó el pH a 5,7 con KOH 1 M. Posteriormente, se ajustó el volumen a 1 l y se añadieron 7 g de agar para plantas. Se esterilizó en autoclave.

IV.7.2.- Tampones y otras disoluciones de uso general

IV.7.2.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM pH 8,0; Na_2EDTA 50 mM, y NaCl 0,5 M. Se preparó a partir de disoluciones madre Tris-HCl 1 M; Na_2EDTA 0,5 M, y NaCl 5 M. Puede conservarse varios meses a 4°C.

SDS al 20%: Se preparó disolviendo, a 68°C, 100 g de SDS (dodecilo sulfato de sodio) en 500 ml de agua y ajustando el pH a 7,2 con HCl 1 N.

IV.7.2.2.- Disoluciones para electroforesis

TAE 50x: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% de ácido acético, y Na₂EDTA 50 mM pH 8,0. El pH final debe ser 7,6. Para preparar un litro se mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de Na₂EDTA 0,5 M pH 8,0.

Tampón de carga 6x para electroforesis en geles de agarosa: 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol, y Na₂EDTA 10 mM.

Marcador de peso molecular para electroforesis en geles de agarosa: Se diluyó el marcador (1 kb Plus DNA ladder de Invitrogen; 1 µg/µl) en tampón de carga hasta una concentración de 0,1 µg/µl. Se utilizaron 6 µl por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conservó a -20°C.

IV.8.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.8.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis

IV.8.1.1.- Aislamiento de ADN para su amplificación por PCR

El ADN genómico utilizado como molde en las mezclas de PCR fue purificado mediante el método de Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones. Se introdujo en un tubo *ependorf* una planta entera o parte de ella, y se le añadieron 500 µl de tampón de extracción y 3 o 4 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, para macerarla en un macerador automático (Mixermill 300, Qiagen 85120). A continuación, se añadieron 35 µl de SDS al 20%, incubando la mezcla durante 5 min en un baño termostatizado a 65°C. Después, se añadieron 130 µl de KCH₃COO 5 M, incubando durante 15 min a 4°C, y centrifugando durante 10 min a 13.000 rpm en una microfuga. El sobrenadante se transfirió a un tubo *ependorf* vacío, se precipitó durante 20 min a -20°C con 640 µl de isopropanol y 60 µl de NaCH₃COO 3 M, y se centrifugó durante otros 10 min a 10.000 rpm. Finalmente, el precipitado se lavó con 300 µl de etanol del 70% y se centrifugó una vez más durante 5 min a 10.000 rpm, tras lo cual se dejó secar a temperatura ambiente, para resuspenderlo después en 300 µl de agua y almacenar la disolución a 4°C.

IV.8.1.2.- Aislamiento de ADN para su secuenciación masiva

Para la secuenciación masiva de genomas completos, se extrajo ADN genómico con un kit DNeasy Plant Maxi de Qiagen. Este método permite obtener ADN genómico libre de contaminantes e inhibidores de enzimas. Cada muestra incluyó 1 g de material vegetal, de plantas que se recolectaron 14 días después de la estratificación (dde), a las que se les cortó la raíz, que se desechó. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se

almacenaron a -80°C hasta su extracción con los reactivos proporcionados por el kit, siguiendo sus indicaciones.

La calidad de las disoluciones de ADN genómico se evaluó midiendo su absorbancia a 260 (A_{260}), 208 y 230 nm, en un espectrofotómetro *NanoPhotometer* (IMPLEN). El valor de los cocientes A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} informa del grado de contaminación por proteínas o sales, respectivamente; sus rangos óptimos son 1,8-2,0 y 2,0-2,2, respectivamente. Se verificó la integridad estructural del ADN genómico mediante la visualización de una alícuota de 150 ng tras una electroforesis en un gel del 1% en agarosa teñido con bromuro de etidio.

IV.8.2.- Síntesis de ADN

IV.8.2.1.- Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo (Tabla 3) fueron sintetizados por Sigma-Aldrich UK.

Tabla 3.- Oligonucleótidos usados en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Genotipado de dobles mutantes	AS1_F2	CCGTCTCTGTGGTCTAATCG
	AS1_R2	CTCTTCTCTCTGTTGCTTCTC
	AS1_F3	AAAGCGGTTAGGGAAGTGGT
	AS1_F4	GGAAACGTAAAGGCAGATGTC
	AS1_R4	GCAAGAACTCAACCGTCTC
	AS1_F5	GCTGCTGGATGTTTAGAGAG
	AS1_R5	CAGTTGGGACAAGTTTATTTCG
	AS1_F6	GTAGGGTTTTGTCTTTTGTTCG
	AS1_R6	GCTTACCCATATCACAAAGGC
Construcción de transgenes	ACT1pro ^a	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctTATAAGGAGGAGACCCACTCT
	ACT1stop ^b	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtGAGGTGTGACTTATTCACTC
	AS1pro ^a	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctCGGAGGGTGTGAGTGAGTAGT
	AS1stop ^b	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtCCGACCATTCTCAAGCCGGG
	SMR12pro ^a	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctGGTGGTAGTAGTGTCTACATA
	SMR12stop ^b	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtCTTTCTCTCTCTCATTAAATCT

^{a,b}Sus extremos 5' incluyen las secuencias ^a*attB1* y ^b*attB2*, que se indican en minúsculas.

IV.8.2.2.- Amplificaciones mediante PCR

Hemos realizado amplificaciones mediante PCR con varios propósitos. Se usó la enzima GoTaq Flexi (Promega) para las amplificaciones de ADN genómico de *Arabidopsis*;

es una versión recombinante, barata y suficientemente procesiva, de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*.

Los cebadores y los desoxirribonucleótidos se añadieron a una concentración final de 0,4 μ M y 0,2 mM, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos *ependorf* de pared fina de 0,2 ml, en termocicladores Applied Biosystems 2700 o 9800fast, o T100 de Bio-Rad. Los volúmenes de reacción oscilaron entre 10 y 20 μ l, dependiendo del uso posterior de los productos de amplificación.

Los programas de PCR que hemos usado incluían una etapa previa de calentamiento a 94°C durante 1 min y 30 s, seguida de 35-40 ciclos en los que se repetía una fase de 30 s a 94°C para desnaturalizar los moldes, otra de 20 s a la temperatura de hibridación de los cebadores, y una final a 72°C para la polimerización, cuya duración dependió del tamaño del fragmento a amplificar (1 min/kb). Se programó una etapa final, no cíclica, de 10 min a 72°C para el rellenado de las moléculas bicatenarias con colas 5' sobresalientes.

Se programaron temperaturas de apareamiento entre 5 y 10°C inferiores a la de fusión (T_m), que se calcularon con los programas *Tm Calculator* y *Multiple Primer Analyzer* (Thermo Fisher Scientific); este último calcula también la probabilidad de que un oligonucleótido forme apareamientos intracatenarios y autodímeros.

IV.8.3.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Se utilizaron geles del 1% m/v en agarosa. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1 \times (apartado IV.7.2.2, en la página 17). La disolución de la agarosa en el tampón se llevó a cabo mediante calentamiento en un microondas. Una vez enfriada la disolución a 55°C se añadió bromuro de etidio hasta una concentración de 0,5 μ g/ml. Las electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo a voltaje constante (90-120 V), cuyo valor dependió del tamaño de las moléculas de ADN y las dimensiones de la cubeta. La visualización de las moléculas se consiguió iluminando los geles con luz UV de 312 nm, obteniéndose las correspondientes fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

IV.8.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

IV.8.4.1.- Secuenciación por el método de Sanger

Se utilizó la variante del método de Sanger semiautomatizada, que se basa en el uso de didesoxinucleótidos terminadores (Smith *et al.*, 1986) marcados con fluorocromos

(dye terminator sequencing), que permite realizar las cuatro reacciones de secuenciación en un solo tubo, empleando cebadores sin marcar. Las secuencias fueron obtenidas por STAB VIDA, a la que se enviaron muestras de 15 µl, que contenían 300 ng (de productos de PCR previamente tratados con una mezcla de Exonucleasa I y FastAp (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante; la primera de estas enzimas es una nucleasa de cadena sencilla que elimina los cebadores no incorporados; FastAp es una fosfatasa alcalina que desfosforila los nucleótidos no incorporados durante la amplificación. Algunas posiciones ambiguas en las secuencias obtenidas pudieron esclarecerse mediante la magnificación de los electroferogramas, usando el programa FinchTV v1.4.0 (<http://www.geospiza.com>).

IV.8.4.2.- Secuenciación masiva y análisis de las lecturas pareadas obtenidas

Se usó un secuenciador masivo Illumina NovaSeq 6000 para obtener las secuencias de los genomas de los mutantes a estudio. Las muestras de ADN genómico, que se enviaron a la empresa Novogene, contenían al menos 20 ng/µl en un volumen de 50 µl, en tubos *ependorf* sellados con Parafilm (Sigma-Aldrich).

Antes de generar las librerías para la secuenciación masiva, Novogene confirmó la calidad de las muestras (apartado IV.8.1.2, en la página 17), comprobando la integridad estructural del ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa, y la ausencia de contaminantes, estimando su concentración con un fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific).

Las lecturas obtenidas por Novogene fueron analizadas en el laboratorio de J.L. Micol empleando para ello el programa Easymap (Lup, Wilson-Sánchez, Andreu y Micol, sin publicar). Una de las opciones que se seleccionaron en Easymap (Tabla 4, en la página 21) fue el tipo de población cartográfica analizada: plantas fenotípicamente mutantes, como consecuencia de la presunta homocigosis para una mutación recesiva, de la F₂ de un exocruzamiento entre la estirpe mutante a estudio, cuyo fondo genético es Ler, y la estirpe silvestre Col-0. Se eligió como genoma de referencia para alinear las lecturas el de Col-0, y se filtraron los polimorfismos naturales existentes entre Ler y Col-0, identificados en la población cartográfica con las secuencias obtenidas de otra población cartográfica F₂ *den* × Col-0 cuya mutación se había identificado previamente mediante análisis del ligamiento a un cromosoma distinto. No obstante, en la Tabla 4 se indica que la opción empleada para realizar este filtrado (Origin of the control reads) es “F₂ wild types” pese a que realmente la muestra usada como control es una población cartográfica F₂ de otro mutante con idéntico

fondo genético. Esto se debe a que el mutante problema y el de control comparten los polimorfismos naturales que existen entre *Ler* y *Col-0*, pero no los causados por el EMS.

Tabla 4.- Opciones del programa Easymap seleccionadas en este trabajo

Parámetro	Opción seleccionada
Mapping-by-sequencing strategy	Linkage analysis mapping
Data source	Use my own reads
GFF3 file	TAIR10.gff
Gene functional annotation file	TAIR10_gene_info.txt
Mutant background	Non-reference
Mapping cross performed	Outcross
Origin of the control reads	F ₂ wild types

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.- Cartografía mediante secuenciación masiva de los mutantes *den*

V.1.1.- Obtención de poblaciones cartográficas F₂

Los fenotipos foliares de los mutantes *denticulata1* (*den1*), *den4*, *den7*, *den9*, *den11*, *den14*, *den15*, *den16* y *den17* sugieren que son portadores de mutaciones en genes cuyos productos participan en la traducción y el establecimiento del eje dorsoventral de las hojas de *Arabidopsis* (apartado II.3, en la página 4). En este TFM nos propusimos inicialmente identificar las mutaciones que causan los fenotipos de dichos mutantes (apartado III, en la página 10). La primera etapa de este proceso es la obtención de poblaciones cartográficas de plantas F₂ fenotípicamente mutantes, derivadas de los cruzamientos de los mutantes —cuyo fondo genético es *Ler*— por *Col-0* (apartado II.4.2, en la página 7).

Las circunstancias sobrevenidas solo nos han permitido completar los análisis de los mutantes *den1*, *den4*, *den7* y *den11*, cuyas poblaciones cartográficas F₂ fueron obtenidas en el laboratorio de J.L. Micol antes del comienzo de este TFM. También hemos cruzado por *Col-0* los mutantes *den9*, *den14*, *den15*, *den16* y *den17*, obteniendo su progenie F₁, que fue sembrada y cultivada, y se autofecundó, rindiendo semillas F₂ (apartado IV.6.1.1, en la página 13). Las semillas F₂ de la progenie de *den1*, *den4*, *den7* y *den11* se sembraron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, a razón de unas 105 semillas por placa (apartado IV.6.1.1, en la página 13). Se recolectaron, 14 dde, entre 96 y 185 plantas F₂ fenotípicamente mutantes de cada cruzamiento (Tabla 5). Las partes aéreas de las plantas así obtenidas se mezclaron, desechando sus raíces, hasta alcanzar aproximadamente 1 g de peso fresco, se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

Tabla 5.- Poblaciones cartográficas F₂ cuyo análisis se ha completado en este trabajo

Mutante a estudio	Semillas sembradas	Plantas obtenidas	Plantas recolectadas	Proporción observada (silvestres/mutantes) ^a	Peso fresco de tejidos aéreos obtenido (g)
<i>den1</i>	1995	1731	185	9,36	0,9957
<i>den4</i>	840	741	159	4,66	1,0013
<i>den7</i>	630	558	96	5,81	1,0334
<i>den11</i>	945	714	137	5,21	1,0444

^aLas proporciones que se ajustan a una segregación fenotípica esperada 3:1 suelen ser cercanas a 3.

La segregación fenotípica esperada para un rasgo monogénico en la F₂ de un exocruzamiento entre un homocigoto recesivo y un tipo silvestre es 3:1 (silvestre:mutante).

Sin embargo, hemos constatado desviaciones de dicha proporción en todas las poblaciones F₂ estudiadas (Tabla 5, en la página 22). La causa que consideramos más verosímil es la variabilidad fenotípica derivada de la mezcla de los fondos genéticos de Ler y Col-0, que en el caso más extremo, el de *den1*, impide distinguir los individuos silvestres de los de fenotipo mutante más débil. En consecuencia, hemos optado por recolectar únicamente las plantas F₂ de fenotipo más extremo, las inequívocamente mutantes.

V.1.2.- Extracción y secuenciación masiva de ADN genómico

Se extrajo el ADN genómico del material biológico, previamente congelado, de las poblaciones cartográficas de *den1*, *den4*, *den7* y *den11*, usando para ello un kit DNeasy Plant Maxi de Qiagen (apartado IV.8.1.2, en la página 17), que incluye una columna que retiene los restos celulares del homogeneizado vegetal obtenido siguiendo las instrucciones del fabricante, cuyo eluido se hace pasar por la segunda. Esta última retiene el ADN, eliminándose sus contaminantes mediante dos lavados sucesivos con los tampones proporcionados por el fabricante. El ADN fue eluido con agua, y su integridad, evaluada mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 4). Su concentración y grado de contaminación por proteínas se estimaron en un espectrofotómetro, resultando óptimos todos los valores del cociente A_{260}/A_{280} (apartado IV.8.1.2, en la página 17).

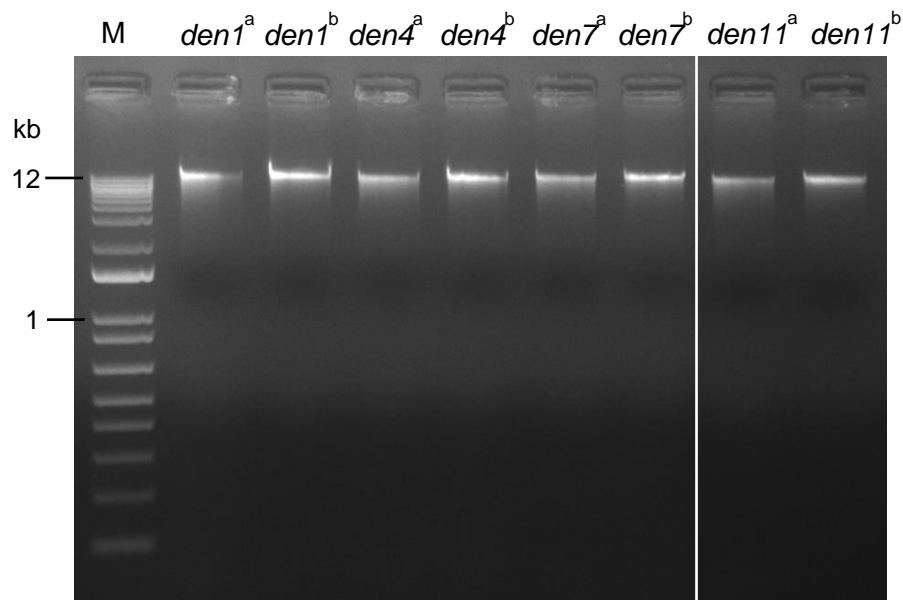


Figura 4.- Evaluación de la integridad de las muestras de ADN de las poblaciones cartográficas de la F₂ de los exocruzamientos de *den1*, *den4*, *den7* y *den11* por Col-0. Visualización, en un gel del 1% en agarosa, teñido con bromuro de etidio, del ADN del ^aprimer y ^bsegundo eluidos, con agua como eluyente, de la segunda columna de un kit DNeasy Plant Maxi. M: Marcador de peso molecular.

Novogene, la empresa a la que se enviaron las muestras para su secuenciación masiva, realizó un control de calidad adicional, midiendo la concentración del ADN en un fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific), que rinde estimaciones más precisas, y usualmente más bajas, que las espectrofotométricas (Tabla 6 y Tabla 7).

Tabla 6.- Controles de la calidad de las extracciones de ADN genómico realizadas para su secuenciación masiva

Mutante a estudio	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentración (ng/μl) estimada en un		ADN enviado a Novogene (ng)
		NanoPhotometer	fluorímetro Qubit	
<i>den1</i>	2,1	26,5	18,3	1.325
<i>den4</i>	2,0	44,5	31,6	2.225
<i>den7</i>	1,8	41,5	31,2	2.075
<i>den11</i>	2,0	38,5	31,2	1.925

Los valores representados corresponden al primer eluido en todos los casos.

V.1.3.- Evaluación de la calidad de las lecturas obtenidas

Novogene secuenció nuestras muestras de ADN en un NovaSeq 6000 de Illumina (apartado II.4.1, en la página 4) y nos proporcionó las lecturas obtenidas y una estimación del rendimiento del proceso (Tabla 7). Se obtuvieron valores medios de 10,7 Gb de secuencia y 71.222.034 lecturas, de las que más del 96% resultaron óptimas. Este último valor es el porcentaje de las lecturas limpias respecto de las totales, siendo las primeras las que no son descartadas por (1) corresponder a las secuencias de los adaptadores (apartado II.4.1, en la página 4), (2) contener un 10% o más de posiciones no identificadas, y (3) incluir un 50% o más de sus posiciones identificadas con baja fiabilidad.

Tabla 7.- Parámetros de la secuenciación masiva de los mutantes *den*

Mutante	Nucleótidos leídos (total; Gb)	Número de lecturas (total)	Lecturas óptimas (%)
<i>den1</i>	10,1	66.692.826	99,08
<i>den4</i>	11,1	74.140.618	98,99
<i>den7</i>	9,8	65.405.838	98,98
<i>den11</i>	11,8	78.648.856	96,96

V.1.4.- Uso de Easymap para identificar mutaciones candidatas

Easymap es un programa de dominio público y código abierto, que permite automatizar el análisis de las lecturas obtenidas mediante secuenciación masiva, para delimitar un intervalo candidato a contener la mutación que causa un fenotipo de interés (Lup, Wilson-Sánchez, Andreu y Micol, sin publicar). Hemos empleado Easymap en este

TFM para cartografiar mediante secuenciación masiva las mutaciones responsables del fenotipo de los mutantes *den1*, *den4*, *den7* y *den11*.

Para ejecutar Easymap, el usuario debe elegir opciones que corresponden a parámetros de la población cartográfica a estudio (apartado IV.8.4.2, en la página 20). En nuestro caso, se seleccionaron como poblaciones cartográficas las F₂ de individuos fenotípicamente mutantes, derivadas de exocruzamientos de los mutantes a estudio, cuyo fondo genético es *Ler*, por la estirpe silvestre Col-0. Se eligió como genoma de referencia para alinear las lecturas obtenidas el de Col-0 y se filtraron sus polimorfismos con *Ler*. Para esto último se tomó como referencia otra de las poblaciones cartográficas F₂ a estudio: la de *den4* para *den1*, *den7* y *den11*, y la de *den1* para *den4*.

Tras el alineamiento de las lecturas obtenidas con la secuencia del genoma de referencia, Easymap proporcionó información sobre la cobertura media obtenida, que fue de 52x para *den1* y *den7*, 54x para *den4*, y 57x para *den11*. Se recomienda una cobertura mínima de 25x para cada muestra en este tipo de análisis (Lup, Wilson-Sánchez, Andreu y Micol, sin publicar). Easymap también calculó las frecuencias de cada uno de los polimorfismos bialélicos (de Col-0 o *Ler*) de un solo nucleótido que encontró en las lecturas, con cuyos valores identificó regiones del genoma de *Arabidopsis* en las que se manifestaba el desequilibrio de ligamiento que cabe esperar de la proximidad entre la mutación causante del fenotipo seleccionado en la población cartográfica y los polimorfismos de un solo nucleótido adyacentes, uno de los cuales, de hecho, puede ser la propia mutación causal.

V.1.4.1.- Mutaciones candidatas a ser *den1*

Los informes que genera Easymap incluyen representaciones gráficas de la frecuencia de los polimorfismos entre *Ler* y Col-0 identificados en la población cartográfica estudiada, para cada uno de los 5 cromosomas de *Arabidopsis* (Figura 5, en la página 26). Se representa con un punto azul cada una de las dos variantes bialélicas de cada SNP, y con una línea verde, su media móvil simple (SMA): la media de las frecuencias alélicas de grupos de polimorfismos vecinos, agrupados por su posición en regiones del genoma a las que se denomina ventanas, de un tamaño medio predeterminado. Los valores de SMA pueden transformarse de un modo exponencial en función de su proximidad a 1, rindiendo el denominado *boost value*, que genera la línea roja de la figura, en la que puede apreciarse que se generan picos en las regiones de mayor ligamiento entre el fenotipo a estudio y un grupo de polimorfismos vecinos. Esta línea roja facilita la delimitación del intervalo candidato, correspondiendo su pico al punto del genoma con mayor desequilibrio de

ligamiento (Figura 5). La región candidata a contener la mutación responsable del fenotipo se resalta en rosa y tiene un tamaño de 4 Mb, preestablecido en Easymap, siendo su centro la posición de valor más alto de SMA.

Easymap proporciona también un listado de las mutaciones G/C → A/T (las que con más frecuencia causa el EMS; apartado II.2.1, en la página 2) del intervalo candidato, indicando su frecuencia alélica, si alteran una región codificante del genoma, y si perturban presuntamente la secuencia de una proteína o el *splicing* del transcrito del gen afectado. En los casos en los que las mutaciones identificadas dañan una unidad de transcripción, Easymap también aporta información sobre la función del gen mutado, que conviene completar consultando la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>).

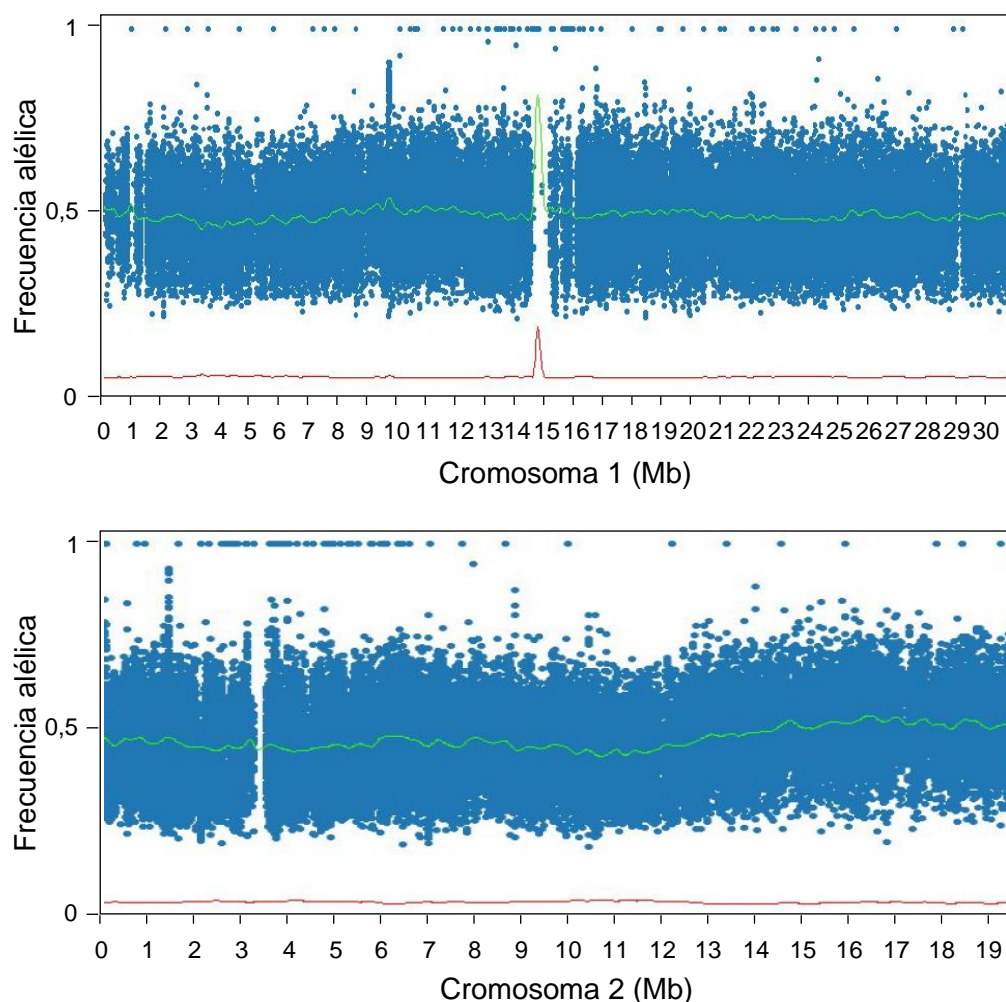


Figura 5.- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F_2 derivada del exocruzamiento *den1* × Col-0. Continúa en la página siguiente.

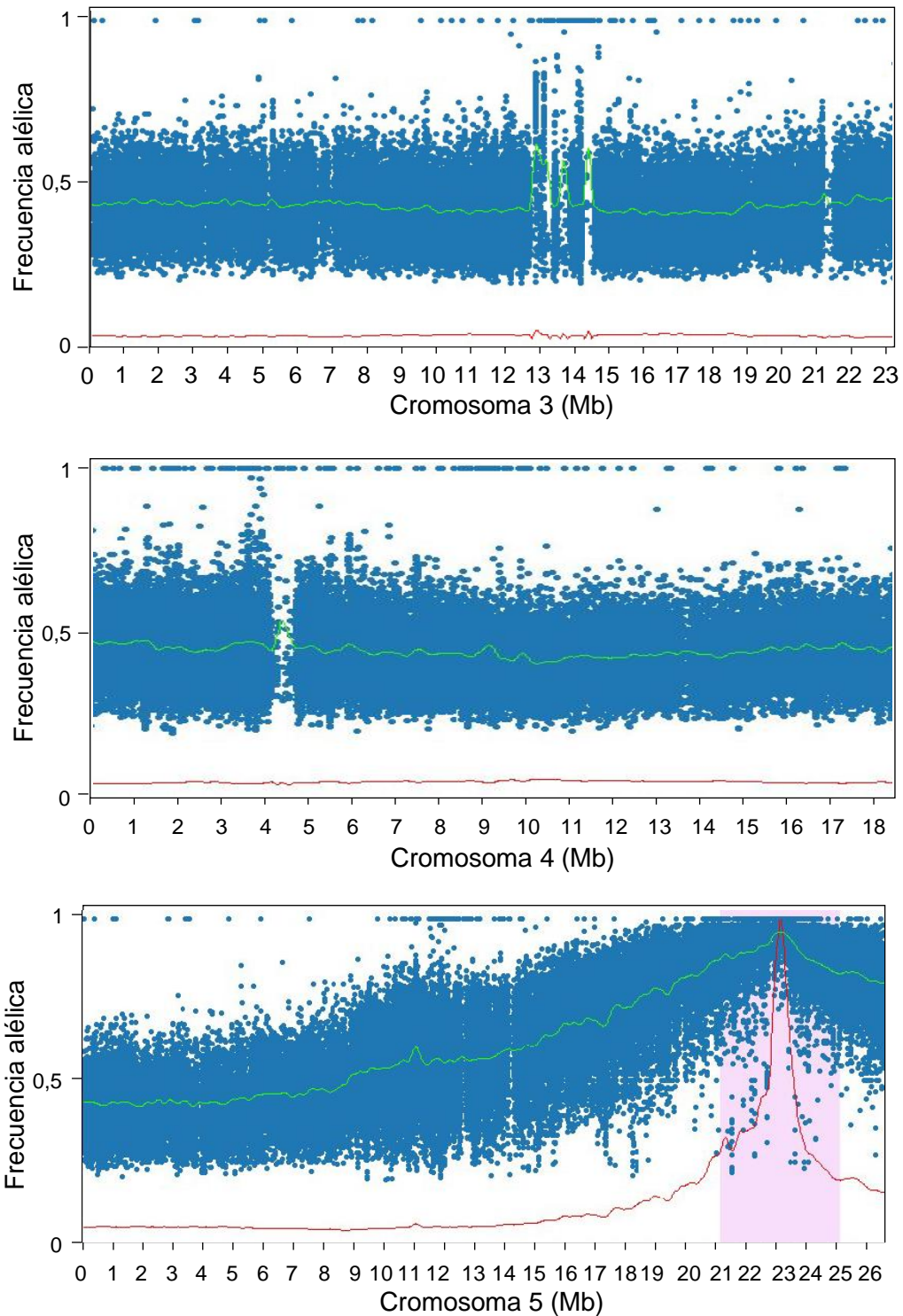


Figura 5 (continuación).- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F_2 derivada del exocruzamiento *den1* \times Col-0. El eje de abscisas representa la posición de cada polimorfismo dentro del cromosoma, y el de ordenadas, la frecuencia alélica. Los puntos azules y las líneas verde y roja representan, respectivamente, las variantes bialélicas de los SNP, la media móvil simple (SMA), y el *boost value*.

La Figura 5 recoge los resultados del análisis de las lecturas de la secuenciación masiva de la población cartográfica de *den1* realizado por Easymap. Se representan los 5 cromosomas de Arabidopsis, en 4 de los cuales no se aprecia desequilibrio de ligamiento. En todos ellos la frecuencia alélica de los polimorfismos identificados oscila en torno a 0,5 a lo largo de todo el cromosoma, excepto en el 5, en el que se aprecia un aumento progresivo de la frecuencia alélica hasta alcanzar valores cercanos a 1. Easymap delimitó un intervalo candidato a contener la mutación causante del fenotipo de *den1*, entre las posiciones 21.498.701 y 25.433.137 pb del cromosoma 5, en el que se identificaron 31 mutaciones. Se seleccionaron 4 de estas mutaciones (Tabla 8), por sus presuntos efectos sobre la proteína codificada por cada gen candidato. Tres de ellas causarían sustituciones de aminoácidos (en At5g55210, At5g58270 y At5g59090), y la cuarta alteraría el *splicing* (At5g54920). Ninguno de estos genes parece relacionado con la traducción.

Tabla 8.- Mutaciones candidatas a causar el fenotipo del mutante *den1*

Gen	Mutación	Efecto	Anotación de la función de la proteína en TAIR10
At5g54920	G → A	Alteración del <i>splicing</i>	Interacciona con proteínas de unión a poliadenilato
At5g55210	G → A	Ser → Phe	Implicada en la resistencia a la higromicina
At5g58270	G → A	Gly → Glu	Transportador mitocondrial del tipo ABC
At5g59090	C → T	Met → Ile	Subtilasa

V.1.4.2.- Mutaciones candidatas a ser *den4*

Se procedió para *den4* tal como se indica en el apartado V.1.4.1, en la página 25. Solo se encontró desequilibrio de ligamiento en el cromosoma 2, que es por ello el único que se representa en la Figura 6, en la página 29. Easymap delimitó un intervalo candidato a contener la mutación causante del fenotipo mutante de *den4* entre las posiciones 15.851.250 y 19.091.517 pb. De las 21 mutaciones identificadas en dicho intervalo, se seleccionaron 4 (Tabla 9, en la página 29) según los criterios mencionados en el apartado V.1.4.1, en la página 25, todas las cuales causarían sustituciones de aminoácidos. Hemos considerado que el gen At2g40780 es el candidato más verosímil a causar el fenotipo de *den4*, ya que su producto proteico es un presunto factor de inicio de la traducción.

V.1.4.3.- Mutaciones candidatas a ser *den7*

En nuestro análisis de *den7* también se procedió tal como se indica en el apartado V.1.4.1, en la página 25. Se obtuvieron histogramas de los polimorfismos identificados

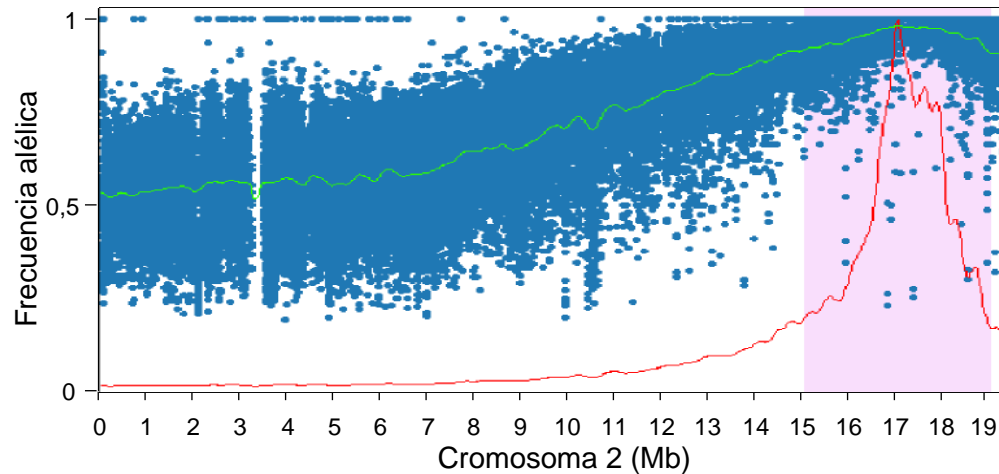


Figura 6.- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F_2 derivada del exocruzamiento *den4* × Col-0. Se siguen las pautas definidas para la Figura 5, en la página 27.

Tabla 9.- Mutaciones candidatas a causar el fenotipo del mutante *den4*

Gen	Mutación	Efecto	Anotación de la función de la proteína en TAIR10
At2g40340	C → T	Gly → Asp	Presunto factor de transcripción de la familia AP2-EREBP
At2g40780	C → T	Ala → Val	Presunto factor de inicio de la traducción
At2g43010	C → T	Pro → Leu	Phytochrome interacting factor 4
At2g45310	G → A	Ser → Asn	UDP-D-glucuronato 4-epimerasa

entre *den7* y Col-0 (Figura 7, en la página 31) que difieren sustancialmente de los de *den1* (Figura 5, en la página 26) y *den4* (Figura 6). Todos los cromosomas parecen contener regiones con muy pocos cambios respecto al genoma de referencia. Esta observación sugiere que la planta que se cruzó por Col-0 para obtener la población cartográfica F_2 que hemos estudiado no pertenecía a una línea pura, de fondo Ler. Por el contrario, es verosímil que formara parte de una población cartográfica derivada de un cruzamiento del mutante *den7* original por Col-0, realizado con el propósito de llevar a cabo un análisis del ligamiento a marcadores moleculares (Robles y Micol, 2001). Esta hipótesis justifica que una gran parte de su genoma sea casi idéntica al de Col-0. Esta estructura del genoma de las plantas a estudio dificultó el establecimiento de un intervalo candidato a contener la mutación causante del fenotipo de *den7*. De hecho, Easymap delimitó en el cromosoma 5 un intervalo candidato manifiestamente erróneo (Figura 7, en la página 31).

La mutación causante del fenotipo mutante de *den7* debe estar en una de las regiones de fondo genético Ler inequívoco. Se observó que solo una de ellas, entre las

posiciones 25.000.000 y 30.000.000 pb del cromosoma 1, mostraba valores de SMA que se acercaban progresivamente a 1. Se seleccionaron en dicha región los polimorfismos

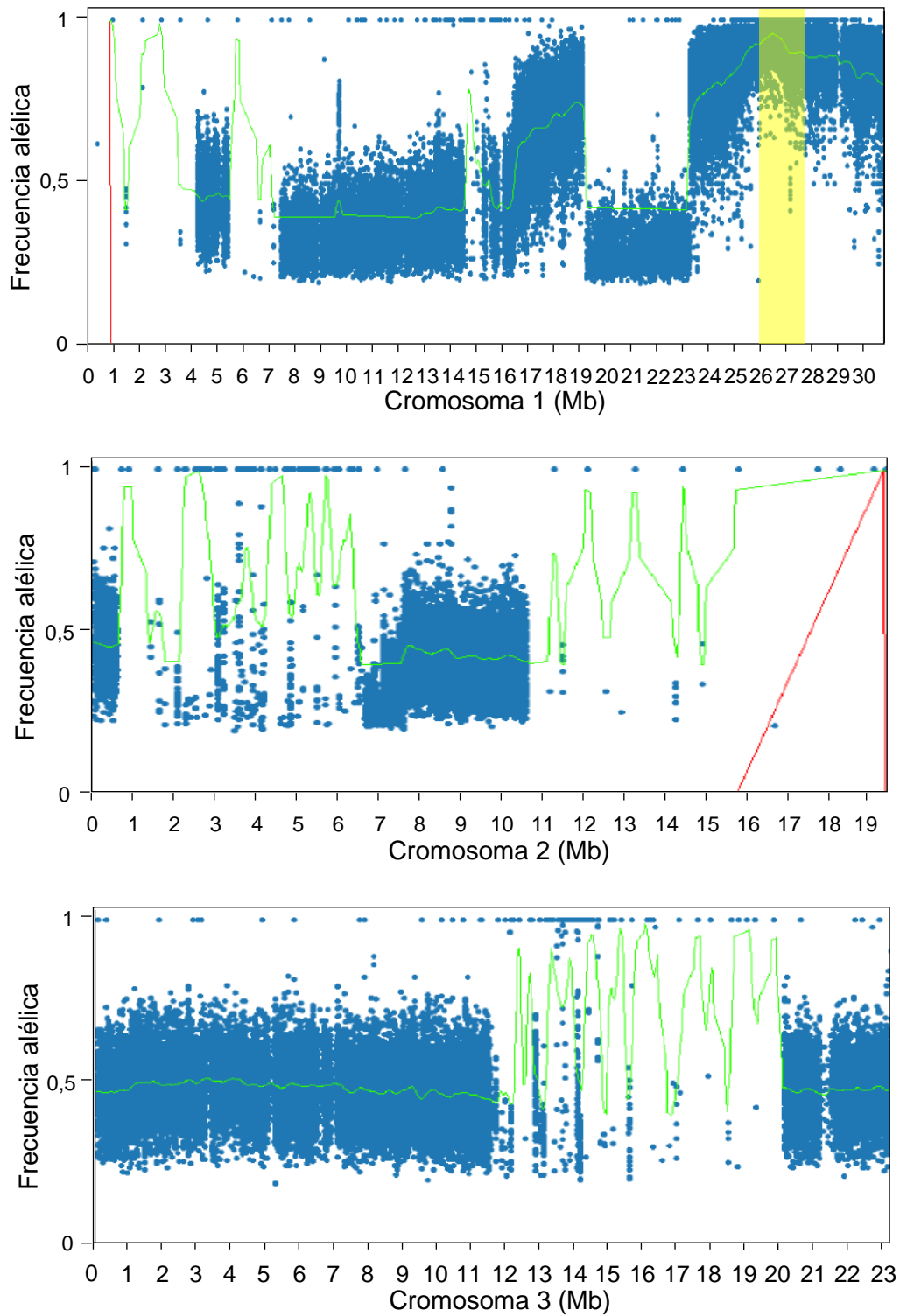


Figura 7.- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F_2 derivada del exocruzamiento *den7* × Col-0. Continúa en la página siguiente.

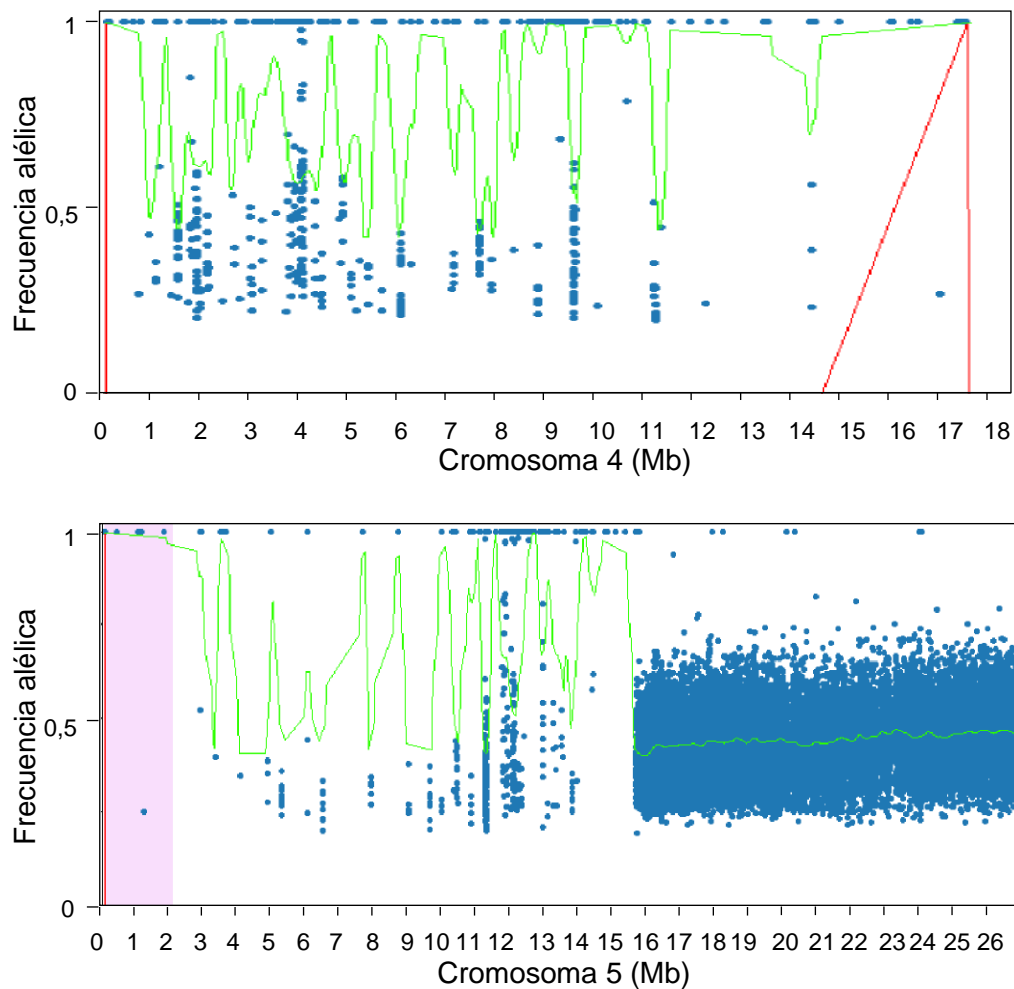


Figura 7 (continuación).- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F_2 derivada del exocruzamiento *den7* \times Col-0. Se siguen las pautas definidas para la Figura 5, en la página 27. El intervalo candidato elegido por Easymap en el cromosoma 5 se representa en color rosa (en el cromosoma 5), y el que hemos delimitado en base a sus altos valores de SMA, en amarillo (en el cromosoma 1).

con frecuencias alélicas superiores a 0,8, delimitando así un intervalo comprendido entre las posiciones 25.890.333 y 27.535.212 pb. Estos resultados coinciden en líneas generales con los de una cartografía génica de baja resolución, realizada previamente en el laboratorio de J.L. Micol mediante análisis del ligamiento a marcadores moleculares (Robles Ramos, 1999).

Se seleccionaron 4 de las 44 mutaciones que incluía el intervalo candidato (Tabla 10, en la página 32). Tres de ellas, las que dañan los genes *At1g70290*, *At1g71890* y *At1g69490*, causarían sustituciones de aminoácidos, y la cuarta alteraría el *splicing* del transcrito primario del gen *At1g69620*, que codifica la proteína ribosómica RPL34. Hemos

considerado a este gen el candidato más verosímil a contener la mutación causante del fenotipo de *den7*.

Tabla 10.- Mutaciones candidatas a causar el fenotipo del mutante *den7*

Gen	Mutación	Efecto	Anotación de la función de la proteína en TAIR10
At1g69620	G → A	Alteración del <i>splicing</i>	Proteína ribosómica RPL34B
At1g70290	G → A	Pro → Leu	Trehalosa-6-fosfato sintasa
At1g71890	G → A	Val → Ile	Transportador de sacarosa
At1g69490	G → A	Asp → Asn	Factor de transcripción de la familia NAC

V.1.4.4.- Mutaciones candidatas a ser *den11*

Tras el análisis de *den11* (según se indica en el apartado V.1.4.1, en la página 25), Easymap solo delimitó un intervalo candidato a contener la mutación causante del fenotipo de *den11* (Figura 8), entre las posiciones 410.262 y 3.783.046 pb del cromosoma 5, que contiene 49 mutaciones, de las que se seleccionaron 13 (Tabla 11). Once de estas mutaciones causarían sustituciones de aminoácidos, dos alterarían el *splicing*, y una genera un codón de terminación de la traducción prematuro. Esta última daña el gen At5g06360, al que hemos considerado candidato más verosímil a ser *DEN11*, ya que codifica una proteína ribosómica de la familia S8e.

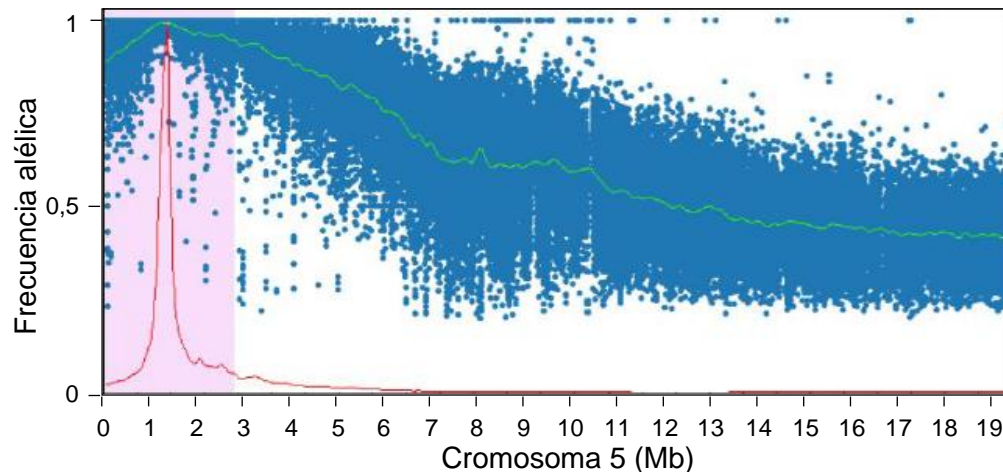


Figura 8.- Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos identificados por Easymap en una población cartográfica F_2 derivada del exocruzamiento *den11* × Col-0. Se siguen las pautas definidas para la Figura 5, en la página 27.

Tabla 11.- Mutaciones candidatas a causar el fenotipo del mutante *den11*

Gen	Mutación	Efecto	Anotación de la función de la proteína en TAIR10
At5g02320	C → T	Gly → Asp	Desconocida
At5g04070	C → T	His → Tyr	Desconocida
At5g05040	G → A	Pro → Ser	Desconocida
At5g05090	C → T	Gln → STOP	Desconocida
At5g05200	C → T	Alteración del <i>splicing</i>	Quinasa
At5g06260	C → T	Alteración del <i>splicing</i>	Proteína de resistencia a la oxidación 3
At5g06360	C → T	Arg → Cys	Proteína ribosómica de la familia S8e
At5g07650	C → T	Asp → Asn	Proteína FH2 de unión a actina
At5g09440	C → T	Ser → Leu	Desconocida
At5g10550	C → T	Val → Ile	Desconocida
At5g10650	C → T	Val → Ile	Ligasa de ubiquitina E3 del tipo RING JUL
At5g11080	C → T	Ala → Thr	Desconocida
At5g11260	C → T	Ala → Thr	Participa en la activación transcripcional de genes con promotores con motivos G-box

V.2.- Análisis de la estructura del gen *AS1* en el mutante *as1-14*

V.2.1.- Determinación de la naturaleza molecular de la mutación *as1-14*

Antes del comienzo de este TFM, se obtuvieron varios dobles mutantes *den as1-14* (apartado III, en la página 10), cuyo fenotipo resultó sinérgico. Dado que se desconocía la naturaleza molecular de la mutación *as1-14*, nos propusimos determinarla. El mutante *as1-14* fue aislado tras una mutagénesis por bombardeo con neutrones rápidos, que suele producir deleciones de entre 2 y 10 kb (apartado II.2.2, en la página 3). El fenotipo de *as1-14* es muy similar al de otros mutantes portadores de alelos del gen *AS1* (Byrne *et al.*, 2000). Con el fin de establecer la naturaleza molecular de esta mutación, se intentó amplificar por PCR el gen *AS1*, con diferentes parejas de cebadores, usando como molde ADN genómico de *as1-14* y *Ler* (Tabla 12; Figura 9A, en la página 34; apartado IV.8.2.1, en la página 18).

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en geles del 1% en agarosa (Figura 9, en la página 34; apartado IV.8.3, en la página 19). Se constató en primer lugar que las amplificaciones realizadas con las parejas de cebadores *AS1_F2* + *AS1_R2*, *AS1_F5* + *AS1_R5* y *AS1_F6* + *AS1_R5* rendían productos del tamaño esperado con ambos moldes. Estos resultados revelaron la integridad estructural de los segmentos del genoma flanqueados por dichos cebadores en el mutante *as1-14*; el gen *RPL36e*, parte del segmento intergénico flanqueado por *RPL36e* y *SMR12*, y la región 5' del gen *AS1* no están delecionados en este mutante.

Tabla 12.- Tamaño de los productos de PCR obtenidos empleando como molde ADN genómico de *Ler* y *as1-14* y los cebadores que se indican

	AS1_F2	AS1_F3	AS1_F4	AS1_F5	AS1_F6
AS1_R2	0,85 (0,85)	-	-	-	-
AS1_R4	6,48 (NA)	5,64 (NA)	0,68 (NA)	-	-
AS1_R5	-	8,45 (NA)	-	2,38 (2,38)	1,22 (1,22)
AS1_R6	7,04 (1,16)	6,20 (0,32)	1,24 (1,24)	-	-

Se indica el tamaño, en kilobases, del producto de PCR obtenido empleando los cebadores que encabezan las filas y columnas de la tabla, y como molde ADN de *Ler* o *as1-14* (entre paréntesis). NA: no se obtuvo ningún producto de la amplificación. -: no se usó esta pareja de cebadores.

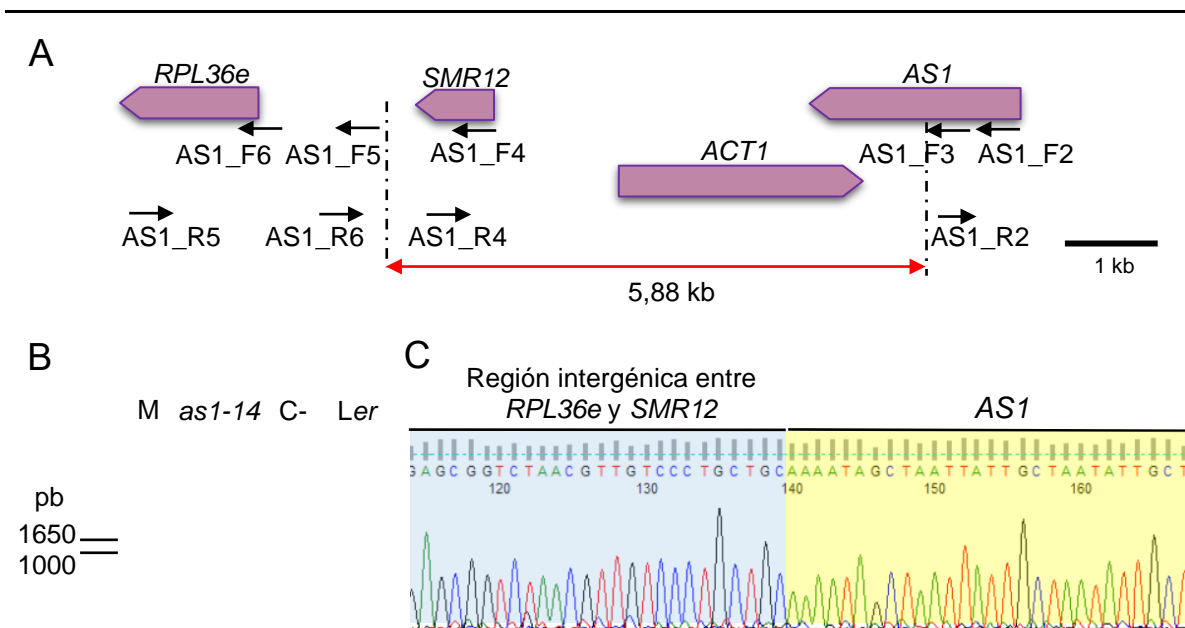


Figura 9.- Determinación de la naturaleza molecular de la mutación *as1-14*. (A) Representación esquemática de los genes *AS1* (At2g37630), *ACT1* (At2g37620), *SMR12* (At2g37610) y *RPL36e* (At2g37600), con indicación de los oligonucleótidos empleados para delimitar eventualmente una deleción en *as1-14*, que no se han dibujado a escala. (B) Visualización, en un gel del 1% en agarosa, teñido con bromuro de etidio, del producto de amplificación por PCR obtenido con los cebadores AS1_F2 y AS1_R6, y ADN genómico de *as1-14* o *Ler* como moldes, o sin molde (C-; control negativo). Se obtuvo un producto de PCR de 1,16 kb con ADN de *as1-14* como molde. El tamaño del producto esperado en *Ler* es 7,08 kb, superior al máximo que puede amplificar la polimerasa empleada. (C) Visualización con el programa FinchTV (apartado IV.8.4.1, en la página 19) de un electroferograma obtenido mediante secuenciación de ADN por el método de Sanger, que corresponde al punto de ruptura del que es portador el mutante *as1-14*. Se han sombreado en azul y amarillo las secuencias que flanquean la deleción.

Las amplificaciones realizadas con las parejas de cebadores AS1_F4 + AS1_R4 y AS1_F4 + AS1_R6 rindieron productos del tamaño esperado con ADN de *Ler* como molde,

pero ninguno con el de *as1-14*. Estos resultados indicaron que la secuencia de AS1_F4 se encontraba dentro de la región delecionada en *as1-14*.

También se realizaron amplificaciones con las parejas de cebadores AS1_F2 + AS1_R4, AS1_F3 + AS1_R4 y AS1_F3 + AS1_R5. No se obtuvieron productos de PCR empleando ADN de *Ler* como molde, ya que sus tamaños esperados superaban las 5 kb: 6,48, 5,64 y 8,45 kb (Tabla 12, en la página 34), que exceden la capacidad de amplificación de la polimerasa GoTaq Flexi (Promega) que se usó (apartado IV.8.2.2, en la página 18). La ausencia de productos de PCR en las amplificaciones en las que se empleó como molde ADN de *as1-14* indica que las secuencias con las que hibridan los cebadores AS1_F4 y AS1_R4 en el tipo silvestre no existen en el mutante; debe tenerse en cuenta que habíamos demostrado previamente que las secuencias complementarias a los cebadores AS1_F2 y AS1_R5 sí están presentes en *as1-14*.

Para confirmar la ausencia de las secuencias complementarias a los cebadores AS1_F4 y AS1_R4 en el mutante *as1-14*, se realizaron amplificaciones con las parejas de cebadores AS1_F2 + AS1_R6 y AS1_F3 + AS1_R6. No se obtuvieron productos de PCR usando como molde ADN de *Ler*, por el tamaño de los productos esperados: 7,04 y 6,20 kb, respectivamente (Tabla 12, en la página 34). Empleando ADN de *as1-14* como molde, se obtuvieron productos de PCR de tamaños netamente inferiores a los esperados para *Ler*: 1,16 y 0,32 kb, también respectivamente. Este último resultado nos permitió establecer que *as1-14* ha sufrido la deleción de buena parte del segmento genómico flanqueado por AS1_F3 y AS1_R6. Además, confirmamos que la región con la que hibrida AS1_R4 está delecionada en *as1-14*, que sin embargo conserva la complementaria de AS1_F3.

Una vez acotada de forma aproximada la región delecionada en el mutante *as1-14*, se secuenció por el método de Sanger el producto de PCR de 1,16 kb que se había obtenido usando la pareja de cebadores AS1_F2 + AS1_R6 (Figura 9B; apartado IV.8.4.1, en la página 19). Se estableció así que el tamaño de la deleción es 5,88 kb, entre las posiciones 15.782.542 y 15.776.622 pb del cromosoma 2 y que elimina la región 3' de la unidad de transcripción de *AS1* y totalmente las de *ACTIN 1 (ACT1)* y *SIAMESE-RELATED12 (SMR12)*; Figura 9A, en la página 34).

El gen *ACT1* codifica una de las 8 actinas de *Arabidopsis* y se expresa fundamentalmente en los órganos reproductivos (Vitale *et al.*, 2003). Aunque el gen *SMR12* ha sido poco estudiado, las bases de datos Transcriptome Variation Analysis (TraVA; Klepikova *et al.*, 2016) y *Arabidopsis* eFP Browser (Winter *et al.*, 2007) indican que, como *ACT1*, se expresa en los órganos reproductivos. La aparente inactividad de *ACT1* y *SMR12*

en la fase vegetativa del ciclo de vida de *Arabidopsis* sugiere que el fenotipo foliar de *as1-14* se debe fundamental o exclusivamente a la insuficiencia de la función de *AS1*.

V.2.2.- Diseño de transgenes para el rescate fenotípico del mutante *as1-14*

Con el fin de contrastar la hipótesis formulada en el párrafo anterior, hemos diseñado los transgenes *AS1_{pro}:AS1*, *ACT1_{pro}:ACT1* y *SMR12_{pro}:SMR12*, cuya transferencia a plantas *as1-14* contribuirá a determinar la contribución individual de cada uno de estos genes al fenotipo del mutante. Hemos diseñado oligonucleótidos para usarlos como cebadores en amplificaciones de los alelos silvestres de los genes *AS1*, *ACT1* y *SMR12*, con el fin de clonarlos mediante la tecnología Gateway (Invitrogen). Estos cebadores incorporan colas 5' que incluyen las secuencias *attB* (Tabla 3, en la página 18), que hacen posible la integración del producto de PCR en un vector de entrada, en una reacción mediada por la clonasa BP (Invitrogen). La recombinación específica de sitio entre las secuencias *attP* y *attB* rinde una construcción de entrada, que contiene el gen de interés flanqueado por secuencias *attL* (Figura 10A).

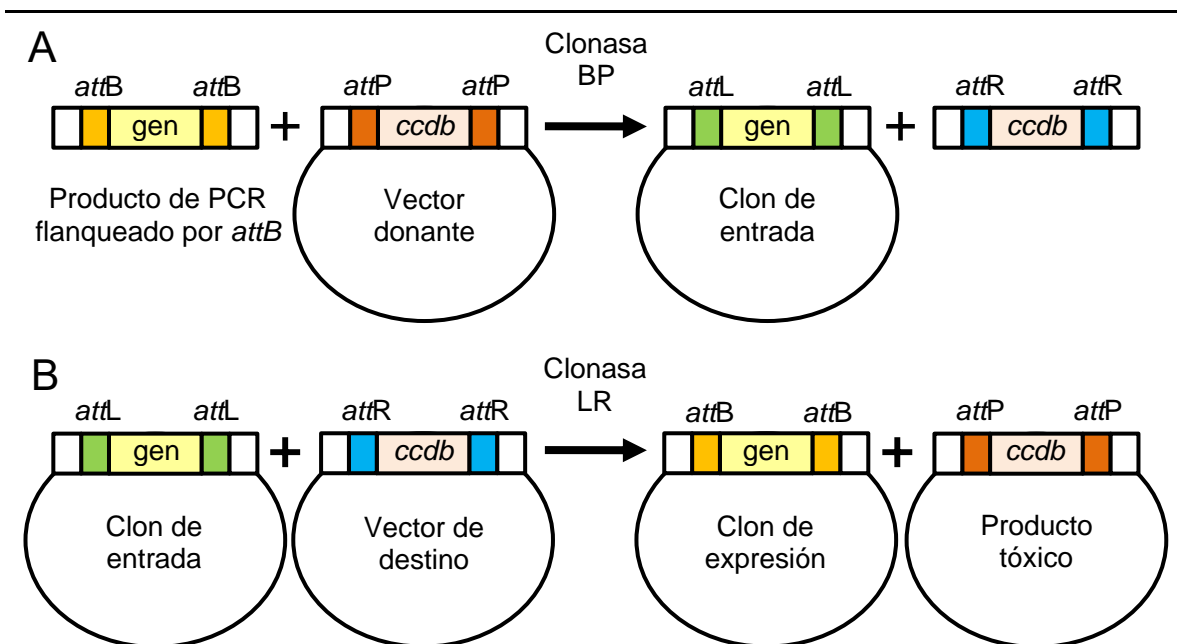


Figura 10.- Clonación de un inserto en un vector de expresión Gateway. Se representa esquemáticamente el proceso de generación de los clones de (A) entrada y (B) expresión. Tomada de Micol Ponce (2011), que a su vez la modificó del catálogo *Gateway Technology* de Invitrogen.

El inserto del vector de entrada puede ser subclonado en un vector de destino, mediante otra recombinación específica de sitio entre secuencias *attR* y *attL*, mediada por

la clonasa LR. En la construcción de destino, el inserto de interés queda finalmente flanqueado por secuencias *attB* (Figura 10B). Los vectores de destino que se usarán más adelante en el laboratorio de J.L. Micol contienen las secuencias de los bordes derecho e izquierdo (RB y LB) del ADN-T de los plásmidos pTi de *Agrobacterium tumefaciens*, que hacen posible la integración del gen a estudio en el genoma de *Arabidopsis*.

V.2.3.- Obtención de mutantes insercionales de colecciones de dominio público

Adicionalmente, hemos realizado una búsqueda en colecciones de líneas insercionales de dominio público, portadoras de alelos presuntamente nulos de *ACT1* y *SMR12*, cuyo estudio debería ser informativo sobre la contribución de cada uno de estos dos genes al fenotipo del mutante *as1-14* (apartado II.2.3, en la página 3). Dado que en el laboratorio de J.L. Micol disponemos de otros alelos del gen *AS1*, hemos excluido de este TFM la búsqueda de mutantes *as1* insercionales.

Hemos seleccionado para su estudio las líneas insercionales SALK_122160 y SAIL_548_A02, que son portadoras de inserciones de ADN-T en el primer exón del gen *SMR12*, así como las SALK_093023 y SALK_122160, en las que la inserción de ADN-T daña los exones tercero y cuarto, respectivamente, de *ACT1* (Figura 11). Se formuló el correspondiente pedido de estas líneas NASC, que se recibieron, aunque no resultó posible su estudio, que se hará más adelante en el laboratorio de J.L. Micol.

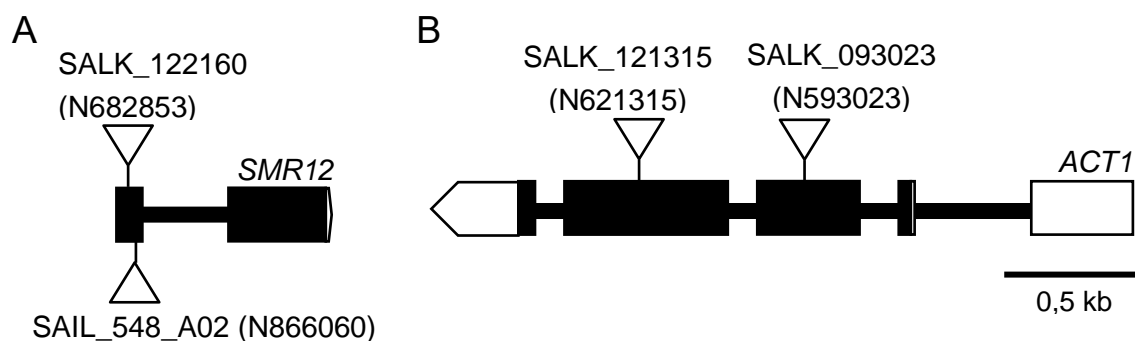


Figura 11.- Estructura de las unidades de transcripción de los genes *SMR12* y *ACT1*. Los exones e intrones están representados por rectángulos y líneas, respectivamente. Se indican en blanco las regiones 5' y 3' no traducidas. Los triángulos indican inserciones de ADN-T.

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

En este TFM se ha completado la cartografía mediante secuenciación masiva de las mutaciones recesivas *denticulata1* (*den1*), *den4*, *den7* y *den11* de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y se han iniciado las de *den9*, *den14*, *den15*, *den16* y *den17*, con el objetivo de identificar sus genes mutados. Estos mutantes fueron aislados en el laboratorio de J.L. Micol tras una mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS), y su fenotipo es similar al causado por la insuficiencia de función de genes previamente descritos, todos los cuales codifican componentes de la maquinaria de la traducción de los ARN mensajeros a proteínas y comparten dos características: la forma de sus hojas, que son pequeñas, dentadas y apuntadas, y la interacción genética de sus alelos de insuficiencia de función con los de los genes *ASYMMETRIC LEAVES 1* (*AS1*) y *AS2*, que codifican factores de transcripción implicados en el establecimiento del eje dorsoventral de las hojas.

Hemos empleado la cartografía génica mediante secuenciación masiva de ADN para definir intervalos candidatos a contener las mutaciones a estudio. Con este fin, hemos realizado exocruzamientos de las estirpes *den*, cuyo fondo genético es Landsberg *erecta* (*Ler*), por Columbia-0 (*Col-0*). Hemos recolectado entre 96 y 185 plantas fenotípicamente mutantes en la segunda generación filial (F_2) de dichos exocruzamientos y extraído su ADN para su secuenciación masiva en una plataforma basada en la tecnología de Illumina.

Se obtuvieron entre 9,8 y 11,8 Gb de secuencia nucleotídica, que correspondieron a unos 65 y 78 millones de lecturas, respectivamente. El análisis de estas lecturas con el programa Easymap, desarrollado en el laboratorio de J.L. Micol, permitió delimitar intervalos candidatos de unas 4 Mb, en los que se identificaron 4 (*den1*), 4 (*den4*), 4 (*den7*) y 13 (*den11*) mutaciones de las que habitualmente causa el EMS con presuntos efectos en la secuencia de los productos de los genes mutados. Ninguno de los genes candidatos a ser portadores de la mutación *den1* está obviamente relacionado con la traducción. Las listas de los productos de los genes candidatos a ser *DEN4*, *DEN7* y *DEN11*, sin embargo, incluyen, respectivamente, un presunto factor de inicio de la traducción y dos proteínas ribosómicas: RPL34B y uno de los miembros de la familia S8e. También hemos realizado exocruzamientos de *den9*, *den14*, *den15*, *den16* y *den17* por *Col-0*, obteniendo semillas F_2 que serán estudiadas más adelante.

Se han obtenido en el laboratorio de J.L. Micol numerosos dobles mutantes *den as1*, cuyos fenotipos morfológicos son sinérgicos. Uno de los mutantes *as1* empleado para este fin es *as1-14*, que fue inducido mediante bombardeo con neutrones rápidos de la estirpe *Ler* y cuya naturaleza molecular no se había determinado. Mediante amplificaciones por PCR de la región del genoma de *Arabidopsis* en la que radica el gen *AS1* y la

secuenciación por el método de Sanger de los productos obtenidos, hemos establecido que la mutación *as1-14* es una delección de 5.880 pb. Esta mutación elimina parte del gen *AS1* y la totalidad de los genes adyacentes *ACTIN1 (ACT1)* y *SIAMESE-RELATED12 (SMR12)*. Con el fin de establecer si el fenotipo morfológico del mutante *as1-14* se debe a la disfunción individual o conjunta de estos tres genes, hemos construido transgenes portadores de sus alelos silvestres, mediante la tecnología Gateway, y obtenido mutantes insercionales *act1* y *smr12* de colecciones de dominio público. Los transgenes se transferirán a plantas *as1-14*. Los mutantes insercionales serán cruzados por *as1-14*. En ambos casos se estudiará la progenie que se obtenga para estudiar en qué medida se restaura el fenotipo silvestre.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera Díaz, V. (2009). Búsqueda de modificadores del fenotipo morfológico de un mutante *argonaute1* viable. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., y Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Austin, R.S., Vidaurre, D., Stamatiou, G., Breit, R., Provar, N.J., Bonetta, D., Zhang, J., Fung, P., Gong, Y., Wang, P.W., McCourt, P., y Guttman, D.S. (2011). Next-generation mapping of *Arabidopsis* genes. *Plant Journal* **67**, 715-725.
- Belfield, E.J., Gan, X., Mithani, A., Brown, C., Jiang, C., Franklin, K., Alvey, E., Wibowo, A., Jung, M., Bailey, K., Kalwani, S., Ragoussis, J., Mott, R., y Harberd, N.P. (2012). Genome-wide analysis of mutations in mutant lineages selected following fast-neutron irradiation mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research* **22**, 1306-1315.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N.J., y Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology* **32**, 76-84.
- Berg, M., Rogers, R., Muralla, R., y Meinke, D. (2005). Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for gametogenesis and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **44**, 866-878.
- Berná Amorós, G. (1997). Disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*: aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metanosulfonato de etilo. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Berná, G., Robles, P., y Micol, J.L. (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729-742.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., y Martienssen, R.A. (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-971.
- Candela Antón, H. (2001). Análisis genético de la formación del patrón de venación de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Casanova-Sáez, R., Candela, H., y Micol, J.L. (2014). Combined haploinsufficiency and purifying selection drive retention of RPL36a paralogs in *Arabidopsis*. *Scientific Reports* **4**, 4122.
- Clough, S.J., y Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 735-743.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **4**, 19-21.
- Feldmann, K.A. (1991). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant Journal* **1**, 71-82.
- Ferrández Ayela, A. (2012). Caracterización genética y molecular de los mutantes *transcurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Gutiérrez Nájera, N. (2018). *DENTICULATA10* codifica FTSH14, una proteína del cloroplasto implicada en la dorsoventralidad foliar en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Horiguchi, G., Mollá-Morales, A., Pérez-Pérez, J.M., Kojima, K., Robles, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., y Tsukaya, H. (2011). Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant Journal* **65**, 724-736.

- Husbands, A.Y., Benkovics, A.H., Nogueira, F.T., Lodha, M., y Timmermans, M.C. (2015). The ASYMMETRIC LEAVES complex employs multiple modes of regulation to affect adaxial-abaxial patterning and leaf complexity. *Plant Cell* **27**, 3321-3335.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., y Machida, Y. (2002). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant and Cell Physiology* **43**, 467-478.
- Iwasaki, M., Takahashi, H., Iwakawa, H., Nakagawa, A., Ishikawa, T., Tanaka, H., Matsumura, Y., Pekker, I., Eshed, Y., Vial-Pradel, S., Ito, T., Watanabe, Y., Ueno, Y., Fukazawa, H., Kojima, S., Machida, Y., y Machida, C. (2013). Dual regulation of *ETTIN* (*ARF3*) gene expression by *AS1-AS2*, which maintains the DNA methylation level, is involved in stabilization of leaf adaxial-abaxial partitioning in *Arabidopsis*. *Development* **140**, 1958-1969.
- Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., y Weisshaar, B. (2012). GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* **40**, D1211-1215.
- Klepikova, A.V., Kasianov, A.S., Gerasimov, E.S., Logacheva, M.D., y Penin, A.A. (2016). A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant Journal* **88**, 1058-1070.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Luong, T.Q., Keta, S., Asai, T., Kojima, S., Nakagawa, A., Micol, J.L., Xia, S., Machida, Y., y Machida, C. (2018). A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and DNA replication factors in establishment of adaxial-abaxial leaf polarity of *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* **35**, 39-49.
- Machida, C., Nakagawa, A., Kojima, S., Takahashi, H., y Machida, Y. (2015). The complex of ASYMMETRIC LEAVES (AS) proteins plays a central role in antagonistic interactions of genes for leaf polarity specification in *Arabidopsis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology* **4**, 655-671.
- Matsumura, Y., Ohbayashi, I., Takahashi, H., Kojima, S., Ishibashi, N., Keta, S., Nakagawa, A., Hayashi, R., Saez-Vasquez, J., Echeverria, M., Sugiyama, M., Nakamura, K., Machida, C., y Machida, Y. (2016). A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of *Arabidopsis*. *Biology Open* **5**, 942-954.
- Micol Ponce, R. (2011). Aislamiento y caracterización de nuevas mutaciones supresoras del fenotipo de *argonaute1-52*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández.
- Michelmore, R.W., Paran, I., y Kesseli, R.V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**, 9828-9832.
- Minteer, S.D. (2006). *Microfluidic techniques: reviews and protocols*. Springer Science & Business Media.
- Mohammed, U., Caine, R.S., Atkinson, J.A., Harrison, E.L., Wells, D., Chater, C.C., Gray, J.E., Swarup, R., y Murchie, E.H. (2019). Rice plants overexpressing OsEPF1 show reduced stomatal density and increased root cortical aerenchyma formation. *Scientific Reports* **9**, 1-13.
- Mollá Morales, A. (2011). Caracterización genética y molecular de los mutantes *venosa* y *denticulata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Moschopoulos, A., Derbyshire, P., y Byrne, M.E. (2012). The *Arabidopsis* organelle-localized glycyl-tRNA synthetase encoded by EMBRYO DEFECTIVE DEVELOPMENT1 is required for organ patterning. *Journal of Experimental Botany* **63**, 5233-5243.
- Muller, H.J. (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science* **66**, 84-87.

- Navarro Quiles, C. (2015). Obtención de transgenes para el análisis funcional de los genes *DEN3*, *DEN7* y *DEN9* en *Arabidopsis*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Ortega, D., Raynal, M., Laudie, M., Llauro, C., Cooke, R., Devic, M., Genestier, S., Picard, G., Abad, P., Contard, P., Sarrobert, C., Nussaume, L., Bechtold, N., Horlow, C., Pelletier, G., y Delseny, M. (2002). Flanking sequence tags in *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion lines: a pilot study. *Comptes Rendus Biologies* **325**, 773-780.
- Palla, M., Guo, W., Shi, S., Li, Z., Wu, J., Jockusch, S., Guo, C., Russo, J.J., Turro, N.J., y Ju, J. (2014). DNA sequencing by synthesis using 3'-O-azidomethyl nucleotide reversible terminators and surface-enhanced Raman spectroscopic detection. *Royal Society of Chemistry* **4**, 49342-49346.
- Pekker, I., Alvarez, J.P., y Eshed, Y. (2005). Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* **17**, 2899-2910.
- Penalva Pérez, P.A. (2019). Expresión heteróloga de genes de la familia CUPULIFORMIS en *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de fin de Grado. Universidad Miguel Hernández.
- Pérez Pérez, J.M. (2003). Caracterización genética y molecular de los mutantes *ultracurvata* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Pinon, V., Etchells, J.P., Rossignol, P., Collier, S.A., Arroyo, J.M., Martienssen, R.A., y Byrne, M.E. (2008). Three *PIGGYBACK* genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins. *Development* **135**, 1315-1324.
- Ponce Molet, M.R. (1996). Aislamiento y caracterización molecular de genes de la superfamilia del TGF-beta que se expresan en el embrión de *Stroglyocentrotus purpuratus*. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Qu, L.J., y Qin, G. (2014). Generation and identification of *Arabidopsis* EMS mutants. *Methods in Molecular Biology* **1062**, 225-239.
- Quesada Pérez, V.M. (1999). Aislamiento y caracterización molecular de mutantes halotolerantes en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Robles, P., y Micol, J.L. (2001). Genome-wide linkage analysis of *Arabidopsis* genes required for leaf development. *Molecular Genetics and Genomics* **266**, 12-19.
- Robles Ramos, P. (1999). Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Sarmiento Mañús, R. (2011). Análisis genético de mutantes variegados de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A.H., Nielsen, K.L., Jorgensen, J.E., Weigel, D., y Andersen, S.U. (2009). SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature Methods* **6**, 550-551.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C., y Machida, Y. (2001). The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**, 1771-1783.
- Serrano-Cartagena, J., Robles, P., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (1999). Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection. *Molecular and General Genetics* **261**, 725-739.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., y Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Takahashi, H., Iwakawa, H., Ishibashi, N., Kojima, S., Matsumura, Y., Prananingrum, P., Iwasaki, M., Takahashi, A., Ikezaki, M., Luo, L., Kobayashi, T., Machida, Y., y Machida, C. (2013). Meta-analyses of microarrays of *Arabidopsis* asymmetric leaves1 (as1), as2 and their modifying mutants reveal a critical role for the ETT pathway in stabilization of adaxial-abaxial patterning and cell division during leaf development. *Plant and Cell Physiology* **54**, 418-431.

- Takahashi, J.S., Pinto, L.H., y Vitaterna, M.H. (1994). Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse. *Science* **264**, 1724-1733.
- Tsukaya, H., y Uchimiya, H. (1997). Genetic analyses of the formation of the serrated margin of leaf blades in Arabidopsis: combination of a mutational analysis of leaf morphogenesis with the characterization of a specific marker gene expressed in hydathodes and stipules. *Molecular Genetics and Genomics* **256**, 231-238.
- van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., y Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics* **30**, 418-426.
- Vitale, A., Wu, R.J., Cheng, Z., y Meagher, R.B. (2003). Multiple conserved 5' elements are required for high-level pollen expression of the Arabidopsis reproductive actin ACT1. *Plant Molecular Biology* **52**, 1135-1151.
- Wilson-Sánchez, D., Rubio-Díaz, S., Muñoz-Viana, R., Pérez-Pérez, J.M., Jover-Gil, S., Ponce, M.R., y Micol, J.L. (2014). Leaf phenomics: a systematic reverse genetic screen for Arabidopsis leaf mutants. *Plant Journal* **79**, 878-891.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., y Provart, N.J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* **2**, 718.
- Wu, J.L., Wu, C., Lei, C., Baraoidan, M., Bordeos, A., Madamba, M.R., Ramos-Pamplona, M., Mauleon, R., Portugal, A., Ulat, V.J., Bruskiwich, R., Wang, G., Leach, J., Khush, G., y Leung, H. (2005). Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Molecular Biology* **59**, 85-97.