



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Los genes *DESIGUAL*
modulan la simetría bilateral
en las hojas de Arabidopsis**

David Wilson Sánchez

Elche, 2016

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

SARA JOVER GIL, Profesora Asociada de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor desarrollada por el Licenciado David Wilson Sánchez para optar al grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta Tesis se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

Sara Jover Gil

Elche, 19 de abril de 2016

II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

La hoja es el órgano más visible y fácilmente manipulable de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*). La inducción y caracterización de mutaciones que alteran su morfología permite identificar genes específicamente implicados en su organogénesis. Los mutantes foliares también sirven para esclarecer los mecanismos de proliferación, organización espacial y diferenciación que las células de la hoja comparten con las de otros órganos de las plantas.

Aunque se han descrito centenares de mutantes de *Arabidopsis* que manifiestan alteraciones en la morfología de la hoja, se acepta generalmente que no se dispone de alelos de todos los genes implicados en el desarrollo de este órgano. Con el fin de identificar nuevos genes necesarios para el desarrollo foliar o de la planta en su conjunto, hemos sometido a escrutinio una colección preexistente de dominio público: la de mutantes portadores de inserciones de ADN-T en homocigosis que se obtuvo en el Salk Institute.

Hemos analizado 19.850 líneas Salk, aislando 706 mutantes con fenotipo foliar, que se manifiesta en 98 de ellos con penetrancia incompleta. Hemos mejorado el vocabulario ontológico existente para sistematizar la descripción fenotípica de nuestros mutantes y facilitar su clasificación y la integración de la información obtenida en las bases de datos. Dado que la colección Salk está indexada, hemos intentado confirmar la presencia de las inserciones anotadas en 553 de los mutantes analizados, consiguiéndolo en el 78% de ellos. Hemos llevado a cabo búsquedas en bases de datos, ensayos de alelismo y análisis de cosegregación de las inserciones anotadas y los fenotipos observados. Hemos establecido relaciones causales inequívocas entre el 47% de las inserciones anotadas y los fenotipos mutantes a estudio. También hemos desarrollado un procedimiento sencillo y robusto para la identificación de inserciones de ADN-T no anotadas, basado en el análisis de las lecturas derivadas de la secuenciación masiva del genoma de los mutantes a estudio.

Hemos puesto nuestros resultados a disposición de la comunidad científica implementando para ello una aplicación web (PhenoLeaf; <http://genetics.umh.es/phenoleaf>) que recoge la información genotípica y fenotípica obtenida en nuestro escrutinio. Hemos donado a los centros de distribución de germoplasma de *Arabidopsis* semillas de las líneas que hemos estudiado. Como prueba de concepto de la utilidad de PhenoLeaf, hemos identificado y caracterizado parcialmente dos genes representados entre los mutantes que hemos aislado: At1g77600, que parece requerirse para la proliferación celular responsable del crecimiento proximodistal de la hoja, y At3g62870, que codifica una proteína del ribosoma citoplásmico necesaria para la proliferación celular y la función del cloroplasto.

La simetría bilateral es una propiedad estructural compartida por muchos seres vivos, y uno de los rasgos más visibles de las hojas de muchas plantas. Es sorprendente que sus alteraciones hayan brillado por su ausencia entre los mutantes Salk: solo hemos encontrado uno con hojas asimétricas, al que hemos llamado *desigual1-1* (*deal1-1*). Hemos identificado en otras colecciones públicas otros dos alelos de insuficiencia de función del gen *DEAL1* (*deal1-2* y *deal1-3*) y uno de cada uno de sus parálogos más cercanos, *DEAL2* (*deal2-1*) y *DEAL3* (*deal3-1*). El fenotipo foliar de los mutantes *deal1* se manifiesta con penetrancia incompleta; su severidad es mayor en las hojas adultas que en las juveniles, y en la región basal del limbo que en la apical. La asimetría foliar de estos mutantes se ve respectivamente incrementada o reducida mediante tratamiento con un inhibidor del transporte polar de auxina, el ácido 1-N-naftilftalámico, o una auxina sintética, el ácido naftalenacético; también es más severa en los triples mutantes *deal1 deal2 deal3*.

El margen de las hojas vegetativas de la estirpe silvestre Col-0 de *Arabidopsis* es dentado, alternándose lóbulos e indentaciones dispuestos simétricamente a ambos lados de la vena primaria. Este patrón se altera en los mutantes *deal1*, que muestran regiones lobadas de posición aleatoria, que contienen senos y lóbulos ectópicos. Estas aberraciones morfológicas son visibles muy poco después de que los primordios foliares se manifiesten, y se deben a excesos y defectos de la proliferación celular. Concuere con esta observación el comportamiento de la fusión transcripcional *DEAL1_{pro}:GUS*, que se expresa intensamente en la fase de proliferación celular del desarrollo foliar.

Autores anteriores han propuesto que la forma del margen foliar de *Arabidopsis* se debe fundamentalmente a la existencia de dominios alternos en los que se concentran de manera excluyente CUP-SHAPED COTYLEDON2 (*CUC2*, un regulador transcripcional) o la auxina; esto último depende a su vez de la polarización de PIN-FORMED1 (*PIN1*, el transportador de eflujo de auxina) en uno de los lados de las células que se coordinan para conseguir una canalización de la hormona y generar así máximos de concentración en puntos concretos del margen. Hemos demostrado que *DEAL1* interacciona genéticamente con *PIN1* y que las mutaciones *deal1* alteran espacial y cuantitativamente la expresión de *CUC2*. La asimetría de los mutantes *deal1* parece deberse a una incorrecta distribución de los máximos de auxina en el margen foliar. Hemos obtenido una fusión traduccional *35S_{pro}:DEAL1:CFP* y realizado un ensayo de doble híbrido de la levadura para proteínas de membrana por el método de la ubiquitina dividida, concluyendo que *DEAL1* es una proteína de la membrana del retículo endoplásmico cuyos extremos amino y carboxilo están orientados hacia el citoplasma. Nuestros resultados sugieren que los genes *DEAL* participan en el control de la proliferación celular durante el desarrollo foliar.