



División de Genética  
Departamento de Genética y Microbiología  
Universidad de Alicante

**Disección genética del desarrollo  
de la hoja en *Arabidopsis thaliana*:  
Aislamiento y caracterización de mutantes  
inducidos mediante metanosulfonato de etilo**

Genoveva Berná Amorós  
San Juan de Alicante, 1997

JOSE LUIS MICOL MOLINA, Profesor Titular de Genética de la Universidad de Alicante,

HAGO CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor realizada por la Licenciada Genoveva Berná Amorós para optar al Grado de Doctor en Biología.

San Juan de Alicante, 3 de mayo de 1997.

## VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con la intención de contribuir a una mejor comprensión de los procesos de desarrollo que son específicos de las plantas y les distinguen de los animales, hemos iniciado una aproximación genética al análisis causal de la ontogenia de la hoja en el sistema modelo *Arabidopsis thaliana*.

Hemos llevado a cabo una búsqueda de mutantes con alteraciones en la morfología de la hoja, inducidos mediante inserciones del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* o por tratamiento con metanosulfonato de etilo (EMS). Se sometieron a escrutinio 11.005 semillas  $T_3$  procedentes de unos 1.500 grupos parentales  $T_2$ , y 46.159 semillas  $M_2$  derivadas de 5.770 líneas parentales  $M_1$ . La búsqueda de mutaciones señalizadas por ADN-T resultó infructuosa.

Con el fin de aproximarnos en la medida de lo posible a un estado de saturación del genoma de *Arabidopsis* en mutaciones inducidas por EMS que causaran alteraciones en la morfología foliar, hemos llevado a cabo una serie de siembras sucesivas, de unas 5.000 semillas cada una, en las que se identificaron y aislaron presuntos mutantes, clasificándolos en clases fenotípicas. Se determinó el número de clases a las que cabía asignar los presuntos mutantes obtenidos en cada siembra, que osciló entre 30 y 54, así como el de las que eran nuevas, que varió desde 30 en la primera hasta ninguna en la última. Se consideró que se había alcanzado un grado razonablemente aceptable de saturación del genoma cuando todos los presuntos mutantes aparecidos en una siembra, la octava, correspondieron a clases fenotípicas preexistentes.

Se aislaron 1.926 presuntos mutantes  $M_2$ , que fueron asignados a un total de 85 clases fenotípicas, correspondientes a la presencia de alteraciones en las proporciones o el tamaño del limbo, en el margen de las hojas o en la estructura de la roseta basal. Un total de 853 resultaron viables y fértiles, 333 de los cuales transmitieron su fenotipo mutante con penetrancia completa y expresividad poco variable. Se eligieron 252 para someterlos a análisis genético, los que presentaban alteraciones morfológicas que afectaban fundamentalmente a la forma o el tamaño de la hoja y no a la estructura de la roseta basal, agrupándolos en 19 clases fenotípicas.

El análisis genético se inició con el retrocruzamiento de los individuos  $M_3$  por Landsberg *erecta*, su estirpe silvestre de procedencia, y consistió en el seguimiento del fenotipo mutante (a) en  $F_1$ , para determinar su modo de herencia, (b) en  $F_2$ , para comprobar su carácter monogénico, y (c) en  $F_3$ , para corroborar su heredabilidad. Finalmente, se seleccionaron individuos  $F_3$  de las 153 líneas mutantes cuyo fenotipo era

heredable y presuntamente monogénico, para implicarlos en cruzamientos destinados al análisis de complementación, la obtención de dobles mutantes y la generación de recombinantes para la cartografía génica mediante análisis de ligamiento a polimorfismos en la longitud de secuencias simples.

El análisis de complementación indica que las 153 líneas analizadas corresponden a 94 genes, de los cuales 76 presentan un solo alelo, 11 cuentan con dos, 6 con tres, y 1 con cuatro. Asumiendo que todos los genes implicados en el proceso a estudio son igualmente mutables y que sus mutaciones ocurren según la distribución de Poisson, debemos haber identificado entre un 71 y un 80% de los loci cuyas mutaciones modifican la forma o el tamaño de la hoja en *Arabidopsis*, no habiendo alcanzado, en consecuencia, la saturación del genoma.

La mayoría de las mutaciones estudiadas son recesivas, probablemente hipomorfas o nulas. Sólo en seis casos se constató semidominancia y en uno dominancia completa, lo que pudiera corresponder a alelos neomorfos, hipermorfos, antimorfos, de depresión ectópica o a lesiones en genes haploinsuficientes.

Aunque todos los genes cuya existencia evidencian nuestros mutantes son candidatos a estar implicados en el control de la morfogénesis de las hojas vegetativas, los productos de algunos de ellos participan también en otras facetas de la biología de *Arabidopsis*. De hecho, 60 de los mutantes sometidos a análisis de complementación muestran anomalías morfológicas apreciables exclusivamente en sus hojas vegetativas, mientras que en otros 15 se observan también perturbaciones en la estructura de las hojas caulinares, y 78 exhiben alteraciones adicionales, patentes en otros órganos, fundamentalmente los florales.

En relación a los procesos alterados en los mutantes, hemos considerado razonables las hipótesis siguientes: la determinación del tamaño y/o el número final de células en el organismo (en la clase Exigua), la coordinación de los mecanismos de división y/o expansión de las células dorsales y ventrales de la hoja (en Asymmetric leaves, Transcurvata, Ultracurvata e Incurvata), los controles polares de expansión celular lateral (en Rotunda y Erosa) o próximo-distal (en Elongata y Angusta), la integración de la división y/o expansión de grupos de células adyacentes (en Scabra y Rugosa), y la definición del número y la posición de los hidatodos (en las clases Denticulata, Apiculata y Angulata). Los mutantes de las clases Venosa, Exigua, Orbiculata y Angusta muestran alteraciones en la síntesis o la distribución espacial de pigmentos fotosintéticos, adicionales a sus anomalías en la forma de la hoja.

Hemos denominado *ICU1* a uno de los genes cuyos alelos mutantes causan el fenotipo *Incurvata*, caracterizado por la curvatura del margen hacia el haz. Su naturaleza estructural y funcional ha sido determinada recientemente por otros autores, quienes le han denominado *CURLY LEAF* (Goodrich *et al.*, 1997). Su producto es un factor de transcripción, cuya disfunción causa la desrepresión ectópica en la hoja de genes que dotan de identidad a los órganos florales. Este resultado se obtiene también tras hipometilación generalizada del genoma de *Arabidopsis* (Finnegan *et al.*, 1996). En base a estos datos, proponemos que nuestros mutantes *incurvata* y *ultracurvata* pueden corresponder a daños en genes reguladores, cuya función es la de salvaguardar la identidad foliar mediante la represión en la hoja de los genes que intervienen en la especificación de los órganos florales.

La amplia colección de mutantes que hemos obtenido provee a la comunidad científica de nuevas herramientas para el estudio de la ontogenia foliar. El trabajo realizado en esta Tesis sienta las bases de estudios posteriores, que consistirán en la cartografía génica de los mutantes y su análisis histológico y molecular, lo que permitirá determinar el papel de cada uno de los genes afectados, así como las relaciones funcionales entre estos últimos en la ruta del desarrollo de la hoja.