



Universidad Miguel Hernández de Elche

**Análisis genético y molecular
de mutantes alterados en la síntesis del ácido
abscísico en *Arabidopsis thaliana***



José María Barrero Sánchez

Elche, 2005

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

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Profesora Titular de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por el Licenciado José María Barrero Sánchez para optar al grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta Tesis se han desarrollado íntegramente en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

María Rosa Ponce Molet

Elche, 25 de abril de 2005

II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

La salinización de los suelos cultivados es uno de los mayores obstáculos a los que se enfrenta la agricultura. El aislamiento y la caracterización de mutantes que manifiesten alteraciones en sus respuestas a la salinidad, con el objetivo de identificar los correspondientes genes y eventualmente manipularlos, podría aportar soluciones a este problema.

Hemos caracterizado a niveles morfológico, molecular y fisiológico 15 mutantes de *Arabidopsis thaliana*, 8 de ellos aislados anteriormente en el laboratorio de J.L. Micol en base a su germinación halotolerante. Estos mutantes, inicialmente denominados *salobreño* (*sañ*), pertenecen a tres grupos de complementación (*SAÑ1*, *SAÑ3* y *SAÑ4*). Hemos demostrado que estos tres genes *SAÑ* codifican enzimas implicadas en la síntesis del ácido abscísico (ABA), lo que confirma la importancia de esta fitohormona en la percepción del estrés salino y sugiere que la manipulación de su ruta biosintética podría permitir la modulación de la halotolerancia en las plantas.

Hemos clonado posicionalmente las mutaciones *sañ1*, demostrando que el gen *SAÑ1* es *ABA1*, cuyo producto es la zeaxantina epoxidasa, la enzima que cataliza las primeras etapas de la ruta de síntesis del ABA. Hemos caracterizado estructuralmente nueve alelos *aba1*, y correlacionado su naturaleza molecular con sus efectos fenotípicos. El análisis de su fenotipo morfológico, celular y fisiológico sugiere que el ABA endógeno promueve el desarrollo vegetativo en ausencia de estrés. Los mutantes *aba1* manifiestan desetiología cuando son cultivados en oscuridad, un rasgo que no se apreciaba en otros mutantes deficitarios en ABA. Esto sugiere que la zeaxantina, el intermediario de la ruta del ABA que se acumula en los mutantes *aba1*, afecta la escotomorfogénesis.

Hemos clonado posicionalmente los genes *SAÑ3* y *SAÑ4*, que resultaron ser *ABA2* y *ABA3*. El gen *ABA2* codifica una deshidrogenasa de alcoholes de cadena corta implicada en la síntesis de ABA, y *ABA3* la sulfurasa de un cofactor de molibdeno necesario para una de las enzimas de la ruta de síntesis de esta hormona. Hemos caracterizado estructuralmente dos alelos mutantes presumiblemente nulos del gen *ABA2*, así como cuatro alelos mutantes del gen *ABA3*, dos de ellos parcialmente. El estudio de su fenotipo morfológico y fisiológico confirma que el ABA endógeno es un promotor del crecimiento.

Hemos analizado cuantitativamente la expresión de los genes *ABA1*, *ABA2*, *ABA3*, *AAO3* y *NCED3*, todos ellos implicados en la biosíntesis del ABA, en los mutantes *aba1-101*, *aba2-14*, *aba3-101* y *aao3-2*, así como en su ancestro silvestre Col-0.

También hemos analizado la respuesta de estos genes al NaCl y el ABA, lo que nos ha permitido confirmar la existencia de un mecanismo de autorregulación positiva en la ruta biosintética del ABA, llevada a cabo fundamentalmente por los genes *ABA1* y *NCED3*. Concluimos también que el elemento clave de la percepción del estrés salino es el gen *NCED3*. Hemos comprobado además que la sensibilidad al NaCl de varios ecotipos de *Arabidopsis thaliana* durante la germinación se correlaciona con la inducibilidad de la expresión del gen *NCED3* en respuesta a esa sal.