



Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Caracterización genética y molecular
de los mutantes *ultracurvata*
de *Arabidopsis thaliana***

José Manuel Pérez Pérez

Elche, 2003

JOSÉ 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 Manuel Pérez Pérez para optar al Grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la División de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Elche, 26 de mayo de 2003.

VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se sabe relativamente poco acerca de la naturaleza y las funciones de los genes responsables de la dorsoventralidad de las hojas de las plantas, una característica que las distingue de otros órganos vegetales, cuya simetría es radial. En esta Tesis se han caracterizado 7 estirpes mutantes de *Arabidopsis thaliana*, cuyas hojas vegetativas están enrolladas hacia el envés, a diferencia de las de sus ancestros silvestres, que son aplanadas. Hemos denominado *ultracurvata* (*ucu*) a estos mutantes, a los que hemos considerado candidatos a ser portadores de mutaciones en genes relacionados con la dorsoventralidad foliar.

El análisis de complementación de los mutantes *ucu* nos ha permitido asignarlos a dos genes, *UCU1* y *UCU2*. Al grupo de complementación *UCU1* pertenecen tres alelos inducidos mediante metanosulfonato de etilo, dos de ellos semidominantes e indistinguibles en sus efectos fenotípicos (*ucu1-1* y *ucu1-2*), y el tercero recesivo y más débil (*ucu1-3*). Los alelos de *UCU2* son recesivos y fueron inducidos mediante bombardeo con neutrones rápidos (*ucu2-1*), rayos X (*ucu2-2*) y mutagénesis insercional con el ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (*ucu2-3* y *ucu2-4*). Los mutantes *ucu1-1*, *ucu1-2*, *ucu1-3*, *ucu2-1* y *ucu2-3* fueron aislados en el laboratorio de J.L. Micol, mientras que *ucu2-2* y *ucu2-4* formaban parte de colecciones de dominio público obtenidas por otros investigadores.

Hemos estudiado la morfología de los mutantes *ucu*. Los alelos semidominantes *ucu1-1* y *ucu1-2* y todos los *ucu2* causan enanismo, dado que reducen el crecimiento de todos los órganos a lo largo de su eje proximodistal. Este rasgo se manifiesta claramente en las hojas de los mutantes, que son similares en anchura a las silvestres pero apreciablemente más cortas. Las células de los mutantes *ucu1* muestran una expansión longitudinal insuficiente. Todos los órganos de morfología radial de los mutantes *ucu2* presentan además rotación helicoidal. La reducción del tamaño de las células de los mutantes *ucu1* con respecto a las silvestres es mucho mayor en la epidermis abaxial que en otros tejidos foliares, lo que explica la forma circinada de sus hojas.

También hemos analizado algunos aspectos de la fisiología de estos mutantes, comprobando que su gravitropismo no está alterado. Los mutantes *ucu1* manifiestan fotomorfogénesis constitutiva, generando hojas tras su germinación y cultivo en la oscuridad, a diferencia de los *ucu2*, que se comportan en este aspecto como sus ancestros silvestres. Hemos analizado los efectos de la administración de citoquininas, giberelinas, brasinosteroides, auxinas y algunos inhibidores del transporte de estas

últimas sobre el crecimiento de los mutantes *ucu*. La adición de estas sustancias al medio de cultivo no restauró el fenotipo silvestre en ningún caso. Los homocigotos *ucu1-1/ucu1-1* y *ucu1-2/ucu1-2* son muy insensibles a la inhibición del crecimiento radicular causada por el 24-epibrasinólido, un brasinosteroide, e hipersensibles al 2,4-D, una auxina sintética. Los mutantes *ucu2* presentan una respuesta de hipersensibilidad a la adición al medio de cultivo de los inhibidores del transporte de auxinas.

Hemos identificado los genes *UCU1* y *UCU2* siguiendo un abordaje posicional. Su cartografía de baja resolución se llevó a cabo mediante análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos y la de alta resolución tras desarrollar nuevos marcadores moleculares a fin de estrechar las regiones candidatas y finalmente secuenciar varios genes de estas últimas. El producto del gen *UCU1* pertenece a la subfamilia de las quinasas de serina y treonina representada por SHAGGY en *Drosophila melanogaster* y por GSK3 en los vertebrados, que participan en la ruta de transducción de señales de Wingless y Wnt, respectivamente. Las mutaciones *ucu1* son cambios de base que causan la sustitución de aminoácidos muy conservados entre los miembros de la subfamilia y alteran un dominio proteico cuya función se desconoce.

El producto del gen *UCU2* es una peptidil prolil *cis/trans* isomerasa, similar a las inmunofilinas de tipo FKBP (*FK506-binding protein*), cuyos homólogos en los animales participan en la modificación postraducciona de los receptores de los esteroides, entre otros procesos. Las mutaciones *ucu2-1* y *ucu2-2* son deleciones que eliminan a *UCU2* y a varios genes vecinos. Por su parte, *ucu2-3* es una reorganización que altera un segmento de 40 pb del último exón del gen y trunca su producto proteico. No hemos determinado la naturaleza molecular de *ucu2-4*, una mutación presuntamente insercional.

Los rasgos mutantes de los homocigotos para los alelos semidominantes *ucu1* se manifiestan también en las plantas transgénicas *ucu1/ucu1* portadoras de un transgén que contiene el alelo silvestre *UCU1*. En consecuencia, las mutaciones *ucu1* son antimorfos o neomorfos. La naturaleza estructural de las mutaciones *ucu2*, dos de las cuales son deleciones, indica su carácter nulo.

Con el propósito de establecer la eventual existencia de interacciones genéticas, hemos cruzado los mutantes *ucu* entre sí y con otros previamente descritos, que fueron elegidos por sus alteraciones en la ontogenia foliar o en la síntesis o la señalización de fitohormonas. Los dobles mutantes *ucu1 ucu2* muestran un fenotipo aditivo y son semejantes a los mutantes *bri1*, en los que no se transduce la señal hormonal de los brasinosteroides. Casi todos los demás dobles mutantes manifestaron aditividad

fenotípica. Se constató sinergia en los dobles mutantes en los que participaban mutaciones en genes relacionados con la señalización de las auxinas.

Considerados en conjunto, nuestros resultados sugieren que los genes *UCU1* y *UCU2* están implicados en la señalización de las auxinas y los brasinosteroides. Aunque la actividad de estos dos genes es necesaria para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, la de *UCU1* se requiere en mayor medida en la epidermis abaxial de la hoja que en otros histotipos de este órgano.