



Universidad Miguel Hernández

**Análisis genético de mutantes
de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones
en la morfología de la hoja**

Pedro Robles Ramos
San Juan de Alicante, 1999.

JOSE LUIS MICOL MOLINA, Profesor Titular de Genética de la Universidad Miguel Hernández,

HAGO CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor realizada por el Licenciado Pedro Robles Ramos para optar al Grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la División de Genética, inicialmente en la Universidad de Alicante y, desde el 1 de octubre de 1997, en la Universidad Miguel Hernández.

San Juan de Alicante, 7 de diciembre de 1999.

VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

A lo largo de los últimos seis años, el grupo de J.L. Micol ha seguido tres aproximaciones experimentales paralelas en un intento de disección genética del desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*, estudiando la variabilidad natural de algunos elementos de la arquitectura foliar en ecotipos, analizando fenotípica y genéticamente mutantes aislados por autores anteriores, y llevando a cabo una búsqueda de mutantes inducidos mediante tratamiento con metanosulfonato de etilo. En esta Tesis se ha completado esta última aproximación, obteniendo mutantes inducidos mediante bombardeo con neutrones rápidos.

Se sometieron a escrutinio 23.445 semillas M_2 , procedentes de 2.931 líneas parentales M_1 , aislando 904 mutantes con alteraciones en la morfología de la hoja, de los que 523 resultaron fértiles. Se estudiaron 28 estirpes que presentaron penetrancia completa y expresividad poco variable y fueron agrupadas en 5 clases fenotípicas para su análisis de complementación, del que se concluyó que correspondían a 8 genes. Cuatro de estos grupos de complementación están integrados por nuevos alelos de genes previamente descritos: *AS1*, *ICU1*, *ICU8* e *ICU15*.

Los mutantes aislados y analizados genéticamente en esta Tesis manifiestan diferentes anomalías en el desarrollo foliar. Las estirpes *asymmetric leaves* presentan hojas lobuladas (*as1*) o fuertemente indentadas (*as3*), así como una alteración en la simetría bilateral del órgano, probablemente como consecuencia de la aparición ectópica de ciertos elementos de patrón tales como algunos nervios primarios supernumerarios. El fenotipo de estos mutantes podría deberse a la desrepresión ectópica en la hoja de algún gen *KNOX*.

El limbo de las estirpes que hemos llamado *incurvata* está recurvado hacia el haz. Autores anteriores han demostrado que este fenotipo está asociado a la expresión ectópica en la hoja de algunos genes de identidad de órgano floral (en los mutantes *clf*), o la anticipación de la fase vegetativa adulta (en los mutantes *hst*). Nuestras observaciones permiten considerar plausible esta última hipótesis para explicar el fenotipo de las estirpes *icu8* e *icu15*, que serían presuntamente portadoras de mutaciones heterocrónicas.

Las hojas de los mutantes *denticulata* estudiados en esta Tesis muestran alteraciones muy severas en la estructura y la distribución espacial de las células de sus tejidos internos, lo que podría deberse a una pérdida parcial de la dorsoventralidad del mesófilo.

Las estirpes *exigua* muestran hojas cuyas células son más pequeñas que las de su ancestro silvestre, que manifiestan necrosis prematura, lo que podría corresponder a la activación constitutiva de alguna respuesta de defensa frente a patógenos.

La estirpe *ultracurvata2* presenta hojas enrolladas en espiral hacia el envés, cuya expansión proximodistal es incompleta, un fenotipo que puede deberse a la alteración de algún control polar de la división o la elongación celular en la dirección longitudinal del crecimiento.

Hemos estudiado las posibles interacciones entre las mutaciones obtenidas en esta Tesis, encontrando sinergia sólo en un caso, el de *as1* y *den29*. El fenotipo del doble mutante sugiere que ambos genes están implicados en el establecimiento y/o el mantenimiento de los dominios dorsal y ventral de la hoja.

Hemos introducido mejoras significativas en los protocolos de uso común en *Arabidopsis thaliana* para el análisis de ligamiento mediante SSLP, que han hecho posible la amplificación simultánea de 21 microsatélites, en una sola mezcla de reacción de PCR múltiple, utilizando para ello 21 parejas de cebadores. Los microsatélites fueron elegidos en virtud de su posición en el mapa genético de *Arabidopsis thaliana*, y de su grado de polimorfismo entre los ecotipos *Ler*, *Col-0* y *En-2*. Se emplearon para ello tres fluoróforos distintos (HEX, TET y 6-FAM), lo que facilita la discriminación de moléculas de igual tamaño en aquellos casos en que dos microsatélites diferentes presentan longitudes similares. Los productos de estas PCR múltiples, cuyo número oscila entre 21 y 42, según el genotipo de la planta estudiada, fueron resueltos en un secuenciador automatizado Perkin Elmer ABI Prism 377 y sometidos a análisis de fragmentos mediante el programa GeneScan 2.0.

La aproximación descrita en el párrafo anterior permite realizar análisis de ligamiento a razón de sólo un gel por cada gen, empleando 19 plantas de la F_2 de un cruzamiento entre una estirpe mutante y un ecotipo distinto de su ancestro silvestre. El procedimiento es particularmente útil en proyectos de mutagénesis a gran escala, dado que hace posible establecer la posición de mapa de un gen en menos de 24 horas tras la obtención de los correspondientes individuos F_2 .

El desarrollo de un método de cartografía de alto rendimiento nos ha permitido determinar la posición de mapa de 91 genes cuyas mutaciones perturban el desarrollo de la hoja, algo que no hubiera sido posible con los procedimientos convencionales de análisis de ligamiento. Hemos contrastado la fidelidad de nuestro método comprobando que nuestras distancias de mapa entre marcadores no difieren significativamente de las de otros autores.