



Universidad Miguel Hernández

Aislamiento y caracterización de mutantes halotolerantes en *Arabidopsis thaliana*

Víctor Manuel Quesada Pérez
San Juan de Alicante, 1999.

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

MARIA ROSA PONCE MOLET, Profesora Asociada de Genética de la Universidad Miguel Hernández,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por el Licenciado Víctor Manuel Quesada Pérez 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, 3 de mayo de 1999.

VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

La salinización progresiva de los suelos cultivables constituye un importante factor limitante para la explotación de muchas especies de utilidad agraria. Es un inconveniente que padecen algunas de las regiones agrícolas más productivas del planeta, entre ellas las de la costa mediterránea española.

Hemos iniciado una aproximación genética al problema agronómico que representa el estrés abiótico causado por la salinización de las tierras de regadío, eligiendo como objeto experimental al sistema modelo *Arabidopsis thaliana*, por su utilidad para el análisis genético y molecular. Hemos intentado el aislamiento de estirpes con capacidad para germinar en presencia de altas concentraciones salinas, tanto de origen natural como obtenidas mediante mutagénesis.

Hemos comparado la tolerancia a la salinidad de 102 estirpes silvestres o ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, constatando la existencia de grandes diferencias en su capacidad para germinar en medios suplementados con NaCl 250 mM. Esto puede interpretarse en el sentido de que existe variación continua y sugiere, pero no demuestra, que la variabilidad natural observada está controlada por loci cuantitativos. Sin embargo, la segregación de la halotolerancia en la progenie F₂ de cruzamientos entre ecotipos con respuestas al NaCl extremadamente distintas permite considerar plausible que el mayor contribuyente a su fenotipo sea un único gen.

Hemos llevado a cabo una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con germinación halotolerante, empleando varios fondos genéticos y diferentes procedimientos de mutagénesis, como el tratamiento con metanosulfonato de etilo, el bombardeo con neutrones rápidos y las inserciones del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*. Se sometieron a escrutinio 675.500 semillas, descendientes de 66.432 líneas mutagenizadas, aislándose 578 presuntos mutantes. Sólo 53 lograron completar su ciclo de vida y únicamente 36 de ellos transmitieron su fenotipo a su descendencia, aunque en todos los casos con penetrancia incompleta.

Se sometieron a análisis genético 17 líneas mutantes, presentando todas ellas salvo una, tasas de germinación superiores al 25% en NaCl 250 mM. El modo de herencia de su fenotipo mutante es monogénico y recesivo, aunque parece influido por el fondo genético de cada estirpe. Su análisis de complementación indicó que correspondían a 10 mutaciones genuinamente distintas, probablemente hipomorfas o nulas, que fueron asignadas a 5 genes, de los cuales SAÑ1 cuenta con cuatro alelos, SAÑ3 y SAÑ4 con dos y los restantes con uno. Asumiendo que todos los genes

implicados en el proceso son igualmente mutables y que sus mutaciones ocurren según una distribución de Poisson, debemos haber identificado más del 85% de los genes cuya perturbación produce un fenotipo de germinación halotolerante, no habiendo alcanzado, en consecuencia, la saturación del genoma. Los resultados de la cartografía de los genes *SAÑ* indican que no se corresponden ninguna de las mutaciones previamente descritas cuyo fenotipo incluye alteraciones en la sensibilidad al NaCl.

Los mutantes afectados en los genes *SAÑ1* a *SAÑ4* son tolerantes al estrés iónico que producen sobre la germinación los iones Na^+ y Cl^- , y al osmótico causado por el manitol. El mutante *sañ5* es además resistente al K^+ e insensible al ácido abscísico. Hemos comprobado que *sañ5* es el segundo alelo mutante descrito hasta ahora de un gen, *ABI4*, caracterizado recientemente por Finkelstein *et al.* (1998), cuyo producto es un factor de transcripción con un dominio APETALA2 de unión a ADN. Nuestros resultados genéticos y moleculares demuestran que *sañ5* es un alelo nulo de *ABI4*, ya que presenta una delección de un par de bases que genera un cambio de pauta de lectura que destruye buena parte de la proteína ABI4, incluido el dominio APETALA2.

Entre los procesos alterados en nuestros mutantes cabe proponer la homeostasis iónica, la acumulación de osmolitos y, en el caso de *sañ5*, la transducción de la señal del estrés salino a través de rutas dependientes del ABA.

El estudio de nuestros mutantes contribuirá a una mejor comprensión de los mecanismos que subyacen en la tolerancia a la salinidad de las plantas. Serán especialmente útiles para facilitar el aislamiento de los genes afectados, mediante aproximaciones basadas en la clonación posicional, ya que en su mayoría derivan de mutagénesis por bombardeo con neutrones rápidos y son probablemente portadores de delecciones. El mutante *sañ5* puede resultar especialmente útil para la identificación de los genes controlados por *ABI4*, mediante la utilización de técnicas que permitan visualizar diferencias en la expresión génica entre individuos *sañ5* y silvestres.

Hemos desarrollado un nuevo procedimiento de discriminación entre segmentos del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* y los del ADN genómico adyacente. Se basa en la restricción del ADN de individuos portadores de inserciones del ADN-T, llevada a cabo por separado con las enzimas *NdeI* y *BstI107I*, cuyas dianas son contiguas en pGV3850:1003, una construcción basada en el ADN-T. Los fragmentos de restricción de idéntico tamaño en ambas digestiones contienen exclusivamente secuencias internas del ADN-T, mientras que los de tamaños distintos contienen segmentos del locus dañado por el inserto. La discriminación entre estos dos tipos de moléculas puede realizarse tras su visualización en un análisis de Southern, por amplificación mediante PCR inversa o por el

método del rescate del plásmido. La aplicación de este método nos ha permitido identificar y caracterizar dos nuevos genes, que no habían sido descritos hasta el momento en *Arabidopsis thaliana*, a los que hemos denominado *OTC* (*ORNITINA TRANSCARBAMILASA*) y *AUL1* (*AUXILIN-LIKE 1*). Sus unidades de transcripción son convergentes y solapantes, fenómeno extraordinariamente raro en los genomas nucleares de los eucariotas pluricelulares. El gen *OTC* de *Arabidopsis thaliana* es el segundo de los que cifran una ornitina transcarbamilasa que se caracteriza en el reino vegetal. Por su parte, la proteína AUL1 presenta homología con varias proteínas de vertebrados, y parece corresponder a una nueva familia génica que no había sido descrita hasta el momento en las plantas.