



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Caracterización de mutantes
que manifiestan perturbaciones locales
en el desarrollo de los tejidos internos
de la hoja de Arabidopsis**

David Esteve Bruna
Elche, 2013

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

JOSÉ MANUEL PÉREZ PÉREZ, Profesor 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 desarrollada por el Licenciado David Esteve Bruna para optar al grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta Tesis se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

José Manuel Pérez Pérez

Elche, 13 de mayo de 2013

II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con el fin de contribuir a la disección genética del desarrollo foliar en las plantas, hemos estudiado en esta Tesis mutaciones que perturban localmente el crecimiento de los tejidos internos de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. En los mutantes *incurvata* (*icu*) el limbo foliar se recurva hacia al haz; este rasgo fenotípico sugiere una alteración en la polaridad dorsoventral de las hojas, más concretamente en el crecimiento de los tejidos adaxiales o abaxiales, o en su coordinación. En los mutantes *reticulata* (*re*) la proliferación y la diferenciación de las células vasculares y de la vaina es aparentemente normal, pero los tejidos intervenales no completan su desarrollo; esta observación sugiere que la proteína RE es necesaria para el correcto desarrollo del mesófilo intervenal, pero no para el de las venas y el mesófilo perivasculoso.

Hemos demostrado en esta Tesis que el mutante *icu13* es portador de un nuevo alelo del gen *AUXIN RESISTANT6* (*AXR6*), que codifica la proteína CULLIN1 (*CUL1*), un componente del complejo ligasa de ubiquitina SCF (Skp1-Cul1-Fbox). Al igual que otros alelos de *AXR6*, *icu13* es insensible a la auxina. Este mutante presenta una venación foliar más simple que la silvestre, como consecuencia de la reducción en la expresión de genes necesarios para el desarrollo vascular, la percepción y el transporte de la auxina. Hemos visualizado los patrones de expresión espacial y temporal del gen *AXR6* y su producto proteico. Su expresión en el embrión, los meristemos, los tejidos vasculares y los hidatodos sugiere que su función es esencial en varios programas de desarrollo dependientes de la auxina.

Con el fin de establecer el papel de *AXR6* en el desarrollo de la hoja y la formación de su patrón de venación, hemos obtenido combinaciones dobles mutantes de *icu13* y mutaciones en genes que codifican otros componentes de la ruta de señalización de la auxina en la que participa el complejo SCF. Resultaron sinérgicas las interacciones con mutaciones en genes que codifican enzimas implicadas en la modificación covalente de *CUL1* por RELATED TO UBIQUITIN (*RUB*). Resultaron aditivas las interacciones con mutaciones de ganancia de función en genes Aux/IAA (Auxin/Indole-3-Acetic Acid), cuyos productos son dianas de la ubiquitinación mediada por la auxina, excepto en los dobles mutantes de *icu13* con *bodenlos* (*bdl*) cuyo fenotipo es sinérgico. Además, los dobles mutantes de *icu13* con *monopteros* (*mp*), un alelo del gen *MP*, que codifica un ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) que es inhibido por BDL, son sinérgicos y letales embrionarios. Hemos demostrado que el fenotipo de *icu13* se debe fundamentalmente a la insuficiencia de función de *MP* causada por la estabilización de BDL, su represor

directo. Apoyan esta hipótesis la acumulación de la proteína de fusión BDL:GFP en *icu13*, el rescate del fenotipo de *icu13* en plantas transgénicas en las que se expresa *MP* constitutivamente, y la supresión del fenotipo de *icu13* por *iaa12-1*, un alelo nulo de *BDL*. Nuestros resultados indican que el módulo BDL-MP es necesario además para que la hoja de *Arabidopsis* alcance la forma plana que la caracteriza.

Hemos clonado posicionalmente en esta Tesis el gen *ICU11*, que codifica una oxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato y Fe^{2+} . El mutante *icu11* presenta floración temprana y desrepresión ectópica de genes de identidad floral en sus hojas, e interacciona sinérgicamente con alelos mutantes de los genes *ICU1* (también denominado *CURLY LEAF*) e *ICU2*, que han sido estudiados anteriormente en el laboratorio de J.L. Micol y están relacionados con la memoria celular mediada por la cromatina. Se ha descrito en *Arabidopsis* y otras especies que oxigenasas similares a *ICU11* hidroxilan el grupo metilo de algunos residuos de lisina y arginina de la región aminoterminal de las histonas H3 y H4. En consecuencia, consideramos verosímil que *ICU11* participe directa o indirectamente en la desmetilación de histonas.

En las hojas de los mutantes reticulados la venación se distingue claramente por su coloración verde, que destaca sobre un limbo pálido. Este rasgo fenotípico ha sido utilizado anteriormente en el laboratorio de J.L. Micol como indicador externo de la existencia de alteraciones en la proliferación de los tejidos intervenales internos. Hemos estudiado en esta Tesis varios alelos del gen *RE* y otros miembros de su familia, a la que hemos denominado RETICULATA-RELATED (RER). Hemos establecido que la familia se subdivide en varios clados, cuyos miembros son funcionalmente redundantes. Por otra parte, los fenotipos de las combinaciones dobles mutantes de alelos de genes de la familia RER sugieren la existencia de funciones específicas de cada clado.

En esta Tesis se ha contribuido también a otra línea de investigación del laboratorio de J.L. Micol, cuyo objetivo es identificar los genes responsables de la variabilidad natural en el tamaño de la hoja de *Arabidopsis*. Hemos identificado un QTL que modula el tamaño de la planta en su conjunto y de la hoja en particular, y estamos obteniendo líneas casi isogénicas con el propósito de mendelizarlo.