

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

Trabajo realizado por la Licenciada Almudena Ferrández Ayela, en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar a la Suficiencia Investigadora.

Elche, 27 de junio de 2008.

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

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

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por la Licenciada Almudena Ferrández Ayela para optar a la Suficiencia Investigadora. Las investigaciones reflejadas en esta memoria 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, 27 de junio de 2008.

I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Como parte del proceso de disección genética del desarrollo de la hoja de *Arabidopsis thaliana* que se está llevando a cabo en el laboratorio de J.L. Micol, el objetivo principal de mi Tesis es el análisis genético y molecular de los genes *TCU1* (*TRANSCURVATA1*) y *TCU2*.

Para que el crecimiento foliar se lleve a cabo deben coordinarse la división y la expansión celular. La perturbación de cualquiera de estos procesos o su descoordinación produce hojas de morfología anormal. A diferencia de las hojas vegetativas del tipo silvestre Landsberg *erecta* (*Ler*), que son casi totalmente planas, en los mutantes *tcu* el limbo se recurva hacia el envés, oblicuamente a la vena primaria. Este rasgo fenotípico hace a los mutantes *tcu* candidatos a estar alterados en algún gen implicado en el desarrollo foliar.

Las rosetas, las hojas, las flores, los frutos y el porte del mutante *tcu2-1* son menores que los del tipo silvestre *Ler*. Las hojas vegetativas de *tcu2-1* tienen una superficie rugosa y presentan una venación protuberante. Un 10% de las plántulas *tcu2-1/tcu2-1* presentan fusionadas las dos primeras hojas vegetativas y son letales. El mesófilo de *tcu2-1* muestra una mayor heterogeneidad de tamaños celulares y más espacios intercelulares que el del tipo silvestre. Sus raíces primarias son más delgadas y tienen los pelos radiculares más largos que las de *Ler*. Los mutantes *tcu2-1* presentan floración temprana y sus flores se separan del racimo antes de la formación de la silicua. El análisis de ligamiento a marcadores polimórficos de *tcu2-1* nos ha permitido delimitar un intervalo candidato de 176 kb, que contiene 52 presuntos genes, flanqueado por los marcadores MCK7 y MYB119 del cromosoma 5. Esperamos determinar a corto plazo su naturaleza molecular.

El fenotipo de los mutantes *tcu1-1* se manifiesta con expresividad variable, incluso entre las hojas de una misma planta. Sus hojas vegetativas presentan un ángulo de inserción en el tallo mucho más agudo que en *Ler*. El peciolo y el hipocotilo son más largos que los de *Ler* y manifiestan floración temprana. El tamaño de la inflorescencia y la morfología floral son normales, y las hojas caulinares están recurvadas como las vegetativas. Las rosetas de *tcu1-1* presentan un área menor y una compacidad mayor que las de *Ler*. El área de la hoja del tercer nudo es menor y su venación presenta más venas de terminación libre y menos bifurcaciones que en *Ler*. Las hojas de los mutantes *tcu1-1* son más delgadas y su mesófilo lagunar presenta más espacios intercelulares que las del tipo silvestre.

La clonación posicional del gen *TCU1* permitió identificar un gen candidato, At4g37130 que codifica una presunta nucleoporina (Alonso-Peral, Ponce y Micol, sin publicar). En el mutante *tcu1-1*, At4g37130 es portador de una mutación C→T, que introduce un codón de terminación prematuro en la correspondiente proteína.

Hemos construido un transgén que contiene el alelo silvestre de At4g37130, que hemos transferido a plantas *tcu1-1/tcu1-1*, obteniendo transformantes fenotípicamente silvestres. Este resultado confirma que At4g37130 es *TCU1*. Para determinar la localización subcelular de TCU1, hemos obtenido una construcción en la que se ha fusionado el ADNc del gen *TCU1* al de la proteína verde fluorescente (GFP). A fin de determinar el patrón de expresión espacial del gen *TCU1*, hemos fusionado su promotor al ADNc de la proteína GUS, y hemos transferido la construcción así obtenida a plantas *Ler*.

Estamos obteniendo dobles mutantes a fin de definir las eventuales interacciones genéticas de *TCU1* con otros genes. Para ello, hemos cruzado *tcu1-1* por los mutantes *phyb-5*, *icu3-2* y *phya-201*, así como por plantas portadoras de inserciones de ADN-T en genes que codifican presuntas nucleoporinas o importinas. También hemos solicitado al NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre, Nottingham, Reino Unido) semillas de líneas homocigóticas para inserciones de ADN-T en genes de algunas de las nucleoporinas descubiertas recientemente que estudiaremos más adelante.