



Programa de Doctorado en Bioingeniería  
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Funciones de VCC y las citoquininas  
en la morfogénesis del margen y la simetría  
bilateral de las hojas de Arabidopsis**

Sergio Navarro Cartagena

Director de la tesis:  
José Luis Micol Molina

Elche, 2022

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

HAGO CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor desarrollada por el Graduado Sergio Navarro Cartagena 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 UMH, según los términos y condiciones definidos en el Plan de Investigación del doctorando, y cumpliendo los objetivos inicialmente previstos de forma satisfactoria y lo establecido en el Código de Buenas Prácticas de la UMH.

José Luis Micol Molina

Elche, 7 de diciembre de 2022

## II.- RESUMEN

La simetría es un aspecto central de los planes corporales de muchos seres vivos pluricelulares, que influye en gran medida en su aptitud biológica. Aunque la mayoría de los cuerpos de los animales presentan simetría bilateral, la de muchos órganos de las plantas es radial, con algunas excepciones como las flores bilaterales de ciertos clados del reino vegetal y la mayoría de las hojas. Se ha recopilado una gran cantidad de información durante los últimos dos siglos sobre los tipos de simetría de las arquitecturas corporales de las plantas y los animales, tanto a nivel del organismo en su conjunto como de sus órganos e histotipos especializados. Sin embargo, se ha obtenido muy poca información de la perturbación experimental de la simetría bilateral y es bien poco lo que se sabe sobre su genética; constituyen excepciones los genes animales y vegetales causantes de la asimetría bilateral (generalmente denominada ruptura de la simetría bilateral) y los responsables de las transiciones entre los patrones de simetría radial y bilateral de las flores, que han ocurrido varias veces a lo largo de la evolución de las plantas.

La abundante información disponible sobre los genes determinantes de la polaridad anteroposterior en los animales, la próximo-distal en las plantas y la dorsoventral en ambos reinos contrasta con la prácticamente inexistente genética de la simetría bilateral. No pocos autores asumen que la simetría bilateral en las plantas y los animales es una consecuencia inexorable de la aparición de la dorsoventralidad en un espacio tridimensional. En esta Tesis se ofrece una visión panorámica de los conocimientos y las incógnitas sobre la simetría en el mundo biológico, con énfasis en la bilateralidad.

La disección genética de un proceso biológico suele tener como punto de partida el aislamiento de mutantes que manifiesten alteraciones en alguna de sus facetas; estos mutantes sirven para identificar y caracterizar los correspondientes genes causales de su fenotipo. Son pocos los mutantes de la brassicácea *Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*) que muestran un cierto grado de asimetría bilateral en sus hojas. De hecho, en el laboratorio de José Luis Micol se analizó el fenotipo morfológico de la roseta de 20.000 líneas de la colección SALK y se encontraron 706 mutantes foliares viables y fértiles, pero solo uno mostró asimetría bilateral en sentido estricto, sin ninguna perturbación obvia de la dorsoventralidad. Se denominó *desigual1-1* (*deal1-1*) a este mutante, cuya anotación indicaba que era portador de una inserción de ADN-T en el gen At2g32280. Durante el desarrollo de dicho trabajo, otros autores denominaron *VASCULATURE COMPLEXITY AND CONNECTIVITY* (VCC) al gen At2g32280, nomenclatura que se sigue en esta Tesis. VCC pertenece a la subfamilia DESIGUAL (DEAL) de la familia de proteínas que contienen el

Domain of Unknown Function 1218 (DUF1218), que es específico de las plantas. Los alelos de insuficiencia de función de *VCC* causan, con penetrancia incompleta y expresividad variable, asimetría bilateral en las hojas de la roseta, debida a la posición, tamaño y número aleatorios de las protrusiones y senos del margen foliar.

La intercomunicación entre la auxina y las citoquininas modula muchos aspectos del desarrollo de las plantas, como la formación de los óvulos y las raíces laterales, entre otros. Se ha demostrado que las citoquininas favorecen la complejidad foliar durante el desarrollo de las hojas compuestas de la solanácea *Solanum lycopersicum* y la brasicácea *Cardamine hirsuta*. Sin embargo, no se ha propuesto papel alguno para estas hormonas en la morfogénesis del margen de las hojas simples. De hecho, se asume que la localización de la auxina basta para explicar las indentaciones de las hojas simples de *Arabidopsis*. Por otra parte, autores anteriores obtuvieron líneas mutantes y/o transgénicas cuyos fenotipos foliares no estudiaron en detalle, al no ser objeto de su interés; dichos fenotipos sugieren la implicación de las citoquininas en la morfogénesis del margen foliar de las hojas simples. En efecto, la reducción de la biosíntesis o la señalización de las citoquininas, o el incremento de su degradación, reducen la complejidad del margen foliar, haciéndolo más liso que el silvestre. Un ejemplo de ello es el triple mutante *ipt3 ipt5 ipt7* de *Arabidopsis*, portador de alelos nulos de tres de los genes que codifican isopentenil transferasas (IPT), las enzimas que catalizan la primera etapa de la ruta de biosíntesis de las citoquininas. En consecuencia, consideramos verosímil que las citoquininas jueguen un papel en la morfogénesis del margen en interacción con la auxina, tal como ocurre en otras facetas del desarrollo de las plantas. En esta Tesis comentamos dichos fenotipos aparentemente desapercibidos y discutimos las evidencias que respaldan nuestra hipótesis.

En los márgenes de los primordios foliares de la roseta de *Arabidopsis*, la localización de la auxina depende del transportador de su eflujo PIN-FORMED1 (PIN1), del factor de transcripción CUP-SHAPED COTYLEDON2 (*CUC2*), y de la propia hormona. Estos tres factores generan bucles de retroalimentación que crean dominios periódicos y alternos de auxina y *CUC2*, que especifican las protrusiones y los senos del margen de la hoja expandida, respectivamente. La formación de los máximos de auxina y las protrusiones depende de la dosis de *CUC2*. En efecto, el alelo hipomorfo *cuc2-3* del gen *CUC2* causa la ausencia de máximos de auxina en el margen del primordio foliar y márgenes lisos en las hojas expandidas. El alelo hiperomorfo *cuc2-1D* causa los fenotipos moleculares, histológicos y morfológicos contrarios: la expansión de los dominios de expresión de *CUC2* en los primordios foliares y un incremento en el número de protrusiones y senos en la hoja expandida.

El objetivo inicial de esta Tesis fue continuar la caracterización funcional del gen *VCC*. Dado que *VCC* tiene cuatro dominios transmembrana predichos, realizamos un ensayo del doble híbrido de la levadura para proteínas de membrana por el método de la ubiquitina dividida. Se identificaron así 263 presuntos interactores, codificados por 57 genes, que incluyen a componentes del complejo de elongación de los ácidos grasos, que sintetiza los de cadena muy larga. Dado que estos ácidos grasos inhiben la biosíntesis de las citoquininas, decidimos estudiar los efectos del exceso y el defecto de estas hormonas sobre la morfogénesis del margen foliar de *Arabidopsis*, mediante abordajes farmacológicos y genéticos: visualizamos dichos efectos en mutantes simples y múltiples en estadios tempranos del desarrollo de la hoja, mediante microscopía confocal de la expresión de transgenes que codifican marcadores fluorescentes en el primordio foliar, y tardíos, mediante análisis morfométrico de sus hojas expandidas.

En esta Tesis se ha sometido a contraste la hipótesis de que las citoquininas participan en la morfogénesis del margen de las hojas simples, en interacción con la auxina, tal como ocurre en otras facetas del desarrollo vegetal. Esta hipótesis se ha confirmado, ya que hemos demostrado (1) que la disminución de los niveles de las citoquininas o de la respuesta a estas hormonas reduce el número de máximos de auxina en los primordios foliares y de las protrusiones en el margen de las hojas expandidas, (2) que los patrones de expresión del gen *CUC2* y del marcador de respuesta a las citoquininas *TCSn::GFP* coinciden en la región basal del limbo de los primordios foliares del acceso silvestre Col-0, y (3) que la respuesta a las citoquininas depende de la actividad de los genes *CUC2* y *ERECTA (ER)*.

También se demuestra en esta Tesis que (4) la asimetría bilateral de las hojas del mutante *vcc-2* se extrema mediante tratamiento con la citoquinina sintética 6-bencilaminopurina, y se suprime en el cuádruple mutante *vcc-2 ipt3 ipt5 ipt7*, y (5) que la respuesta a las citoquininas, visualizada con el marcador *TCSn::GFP*, es asimétrica entre las mitades izquierda y derecha del limbo de los primordios foliares *vcc-2*.

En conclusión, en esta Tesis se aportan evidencias de que las citoquininas participan en la morfogénesis del margen de las hojas simples de *Arabidopsis*, y de que en este proceso interaccionan con la auxina. Proponemos además que *VCC* regula la homeostasis de la auxina y las citoquininas en el primordio foliar, contribuyendo a coordinar el crecimiento de la hoja a lo largo de sus ejes mediolateral y próximo-distal, y al mantenimiento de la simetría bilateral de la hoja.