

**Análisis genético de la formación
del patrón de venación de la hoja
en *Arabidopsis thaliana***

Trabajo realizado por el Licenciado Héctor Candela Antón, en la División de Genética, Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al Grado de Doctor.

Elche, 13 de diciembre de 2001.

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

ANTONIO MARTÍNEZ LABORDA, 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 realizada por el Licenciado Héctor Candela Antón para optar al Grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la División de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Elche, 13 de diciembre de 2001.

VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Es bien poco lo que se sabe acerca de la biogénesis de las estructuras reticulares ramificadas, como las del sistema nervioso, el circulatorio y el respiratorio de los animales. En esta Tesis se ha iniciado la disección genética de la formación de una de tales estructuras, el patrón de venación de las hojas de las plantas, dentro de un proyecto de investigación del laboratorio de J.L. Micol en el que se pretende desentrañar los mecanismos genéticos responsables de la morfogénesis foliar en *Arabidopsis thaliana*.

Hemos desarrollado en primer lugar un método rápido y simple de visualización de los conductos vasculares, basado en la despigmentación de las hojas mediante tratamiento con hidrato de cloral, para emplearlo en la caracterización de la venación foliar de un ecotipo de referencia de *Arabidopsis thaliana*, Landsberg *erecta* (Ler), y en la búsqueda de mutantes y variantes naturales.

A continuación, hemos estudiado la formación del patrón de venación de Ler durante el desarrollo de tres de sus hojas vegetativas, la primera, la tercera y la octava. Como descriptores de su complejidad, hemos definido tres parámetros que han sido cuantificados a lo largo de la expansión foliar: los cocientes entre (a) la longitud o (b) el número de bifurcaciones de la red vascular y el área del limbo, que disminuyen en paralelo a medida que la hoja crece, y (c) el número de hidatodos, que se incrementa progresivamente en las sucesivas hojas de la roseta, así como a lo largo de la expansión de cada una de ellas. Hemos constatado diferencias netas al respecto de estos parámetros entre los tres tipos de hojas estudiadas. También hemos comprobado que existe una gran correlación entre la variación con el tiempo de la densidad vascular y la del número de bifurcaciones por unidad de superficie, dos parámetros que son independientes del área total del limbo. Sus valores varían a lo largo de la expansión foliar de un modo muy similar en los tres tipos de hojas estudiados, lo que sugiere que un único mecanismo de formación del patrón de venación opera en todas ellas.

Con la finalidad de identificar genes implicados específicamente en la formación del patrón de venación de la hoja vegetativa de *Arabidopsis thaliana*, hemos llevado a cabo una búsqueda de mutantes con patrones de venación diferentes del silvestre en hojas por lo demás normales. Con una sola excepción, no hemos encontrado ningún mutante que cumpla estrictamente este requisito tras haber estudiado el patrón de venación de las hojas del primer nudo de 3.110 plantas M₂ y 9.875 T₄, derivadas de una mutagénesis química mediante EMS y otra insercional con el ADN-T de *Agrobacterium*

tumefaciens, respectivamente, ello a pesar de que en la primera de estas búsquedas se identificaron y descartaron 1.492 presuntos mutantes morfológicos.

Hemos aislado un mutante inducido mediante ADN-T, al que hemos denominado *extrahydathodes (ehy)*, cuyas hojas del primer nudo de la roseta basal presentan más hidatodos que las silvestres. Este fenotipo podría deberse a una aceleración en la secuencia silvestre de generación de hidatodos o a la desaparición de la fase juvenil del desarrollo vegetativo, que tendrían como consecuencia que la primera hoja del mutante muestre rasgos que en la estirpe silvestre se manifiestan en hojas ulteriores. La no señalización de la mutación *ehy* nos ha llevado a posponer su análisis molecular, que deberá llevarse a cabo mediante una estrategia posicional.

La práctica inexistencia de mutantes afectados específicamente en el patrón de venación podría deberse a que los genes implicados en su formación son pocos, o a que sus funciones son redundantes, o a la letalidad de la mayoría, si no la totalidad, de sus alelos mutantes. Alternativamente, algunos de los controles genéticos de la morfogénesis foliar podrían ser responsables de la formación del patrón de venación, lo que explicaría la inexistencia de mutantes con hojas morfológicamente normales y patrones de venación aberrantes. Según este último punto de vista, la formación del patrón de venación sería una mera consecuencia del proceso de desarrollo global de la hoja. En esta línea de pensamiento, el estudio del patrón de venación en mutantes cuyas hojas presenten formas y/o tamaños anormales debería contribuir a esclarecer la relación entre la formación del patrón vascular y la morfogénesis foliar, por lo que hemos estudiado 98 estirpes de la colección de mutantes obtenidos en el laboratorio de J.L. Micol, cuya morfología foliar está alterada. Hemos comprobado que dos de estos mutantes, *rotunda1 (ron1)* y *apiculata7-1 (api7-1)*, presentan patrones de venación aberrantes.

Hemos intentado establecer la eventual utilidad del análisis de la variabilidad natural para la identificación de genes implicados en la formación del patrón de venación. Hemos estudiado 266 estirpes silvestres, encontrando dos cuyos patrones de venación son mucho más simples que el predominante entre las restantes. El estudio de una de ellas, Ba-1, no pudo continuarse dada su aparente heterogeneidad genética y floración extremadamente tardía. El patrón de venación del segundo ecotipo, Ei-5, resultó ser un rasgo monogénico y recesivo, al que hemos denominado Hemivenata (Hve).

El fenotipo Hve es pleiotrópico, estando entre sus rasgos distintivos su fertilidad reducida, su inflorescencia arbustiva y la ausencia de ondulaciones en el crecimiento de la raíz. Sin embargo, no difiere sustancialmente del ecotipo de referencia Ws-2 en lo relativo a la sensibilidad a las auxinas y los inhibidores de su transporte, así como a la

percepción de la luz o la gravedad. Estas características indican que la mutación *hve* no perturba la síntesis ni la percepción de una señal hormonal y sugieren la implicación del gen *HVE* en la homeostasis de las auxinas.

El análisis del ligamiento a marcadores moleculares, llevado a cabo en una población cartográfica de 1051 individuos de la F_2 de un cruzamiento Ei-5 x Ws-2, nos ha permitido establecer que el gen *HVE* radica en un segmento de 203 kb del cromosoma 2 de *Arabidopsis thaliana*. Hemos secuenciado dos genes de dicha región, a los que hemos considerado candidatos por su posible relación con el metabolismo de las auxinas y/o la transducción de su señal, cuyos productos son el citocromo P450 CYP71B9 y la enzima conjugadora de ubiquitina UBC2. Aunque en ambos casos hemos encontrado polimorfismos entre el alelo de Ei-5 y el de Col-0, ninguno de ellos constituye una prueba irrefutable de la identidad del gen *HVE*. Los alelos de Col-0 de estos y otros genes candidatos serán transferidos a plantas Hve, fuera del marco de esta Tesis, a fin de determinar cuál restaura el fenotipo silvestre en los transformantes que se obtengan.

Para conseguir una visualización precoz del patrón de venación foliar, hemos empleado la construcción *ATHB-8-GUS*, en la que la unidad de transcripción del gen *GUS* (de la β -glucuronidasa) se encuentra bajo el control del dominio regulador de *ATHB-8*. Este último es un gen que se expresa específicamente en las células del procámium vascular. Hemos realizado cruzamientos entre plantas transgénicas *ATHB-8-GUS* y las estirpes mutantes *axr1-12* (*auxin resistant1-12*), *hve*, *mp*^{T370} (*monopteros*^{T370}) y *ron1*, que presentan alteraciones del desarrollo vascular, a fin de estudiar en su progenie F_2 la expresión del transgén testigo. Los resultados obtenidos indican que todas las mutaciones estudiadas perturban la formación del patrón de venación desde sus etapas más tempranas.

Con el fin de establecer las eventuales interacciones entre *HVE* y otros genes cuyas mutaciones perturban el desarrollo vascular, como *RON1*, *LOP1* (*LOPPED1*), *MP*, *PIN1* (*PIN-FORMED1*), *AXR1* y *CVP2* (*COTYLEDON VASCULAR PATTERN2*), hemos obtenido y caracterizado varios dobles mutantes. La aditividad fenotípica de *hve* y las mutaciones *pin1-1*, *lop1-65* y *cvp2-1* sugiere que son varias las operaciones genéticas independientes implicadas en la formación del patrón de venación. Por el contrario, los genes *AXR1* y *HVE* parecen participar en diferentes etapas de una ruta de desarrollo relacionada con las auxinas, tal como sugiere la semejanza entre los patrones de venación de los mutantes *axr1-12* y *hve* y el doble mutante *axr1-12 hve*.

Los resultados obtenidos en esta Tesis son compatibles con el modelo de formación del patrón de venación propuesto en la hipótesis de la canalización de Sachs.