



***Miguel Hernández***

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Caracterización de genes  
implicados en la organogénesis foliar  
en *Arabidopsis thaliana***

Sara Jover Gil  
Elche, 2005

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

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Profesora 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 la Licenciada Sara Jover Gil para optar al Grado de Doctor. 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, 25 de abril de 2005.

## II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con el propósito de hacer contribuciones al análisis causal del desarrollo de las hojas de las plantas, hemos obtenido y estudiado varias estirpes mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presentan alteraciones de la morfología foliar, a las que hemos denominado *incurvata* (*icu*) y *rotunda* (*ron*). El limbo de las hojas vegetativas de los mutantes *icu* se recurva hacia el haz, en lugar de ser casi plano como el de las estirpes silvestres, lo que sugiere que algún proceso relacionado con la especificación o el mantenimiento de la dorsoventralidad foliar está alterado. Las hojas de los mutantes *ron* son más anchas y redondeadas que las silvestres, lo que constituye un indicio de la perturbación de la división o la expansión de las células que contribuyen a la organogénesis foliar.

Hemos caracterizado genética y molecularmente 9 mutaciones recesivas que pertenecen a los grupos de complementación *ICU8*, *ICU9* e *ICU15*, estableciendo mediante clonación posicional que son nuevos alelos hipomorfos o nulos de los genes *HYPONASTIC LEAVES1* (*HYL1*), *ARGONAUTE1* (*AGO1*) y *HUA ENHANCER1* (*HEN1*), que participan en la ruta de regulación génica postranscripcional mediada por microARN. Nuestros alelos *hen1* y *hyl1* son presuntamente nulos y causan fenotipos similares a los previamente descritos. Los alelos *ago1-51* y *ago1-52* son hipomorfos y causan la radialización y la adaxialización parcial o total de algunas hojas vegetativas. Las hojas no radializadas de estos mutantes *ago1* muestran una transición entre el peciolo y el limbo mucho más gradual que la que se aprecia en el tipo silvestre. Además, las células epidérmicas de los peciolos de los mutantes *ago1-51* y *ago1-52* muestran rasgos morfológicos característicos de las del limbo. Estos resultados indican la participación del gen *AGO1* en la especificación y/o el mantenimiento de la dorsoventralidad y la proximodistalidad de la hoja.

Hemos caracterizado genética y molecularmente dos alelos insercionales, recesivos y probablemente nulos (*icu4-3* e *icu4-4*), y dos puntuales, semidominantes y de ganancia de función (*icu4-1* e *icu4-2*) del gen *ICU4*, cuyo análisis posicional ha indicado que codifica ATHB-15, un factor de transcripción de la familia Homeodomain/Leucine Zipper III (HD-Zip III). Los alelos *icu4-3* e *icu4-4* no causan fenotipo mutante alguno, lo que sugiere que el gen *ICU4* y algún otro miembro de su familia son funcionalmente redundantes. Los alelos *icu4-1* e *icu4-2* son portadores de una mutación en una secuencia complementaria de la de los microARN miR165 y miR166, y causan un incremento en la concentración del ARNm del gen *ICU4* que es especialmente patente en las hojas. Los mutantes *icu4-1* e *icu4-2* presentan curvatura de las hojas vegetativas,

retraso de la floración y de la transición entre las hojas juveniles y las adultas, y aberraciones en el desarrollo de la raíz y los tallos, así como una insensibilidad moderada al ABA y al NaCl durante la germinación. Estos resultados indican que *ICU4* es regulado negativamente por un microARN y que participa en el desarrollo de la raíz y de los conductos vasculares del tallo, en la función de los meristemas y en el establecimiento de la polaridad foliar.

Hemos llevado a cabo análisis globales de la expresión génica en plantas *ago1-51/ago1-51* e *icu4-1/icu4-1*, mediante hibridación en micromatrices validadas por RT-PCR cuantitativa, que nos han permitido identificar genes directa o indirectamente regulados por *AGO1* e *ICU4*. Cabe destacar que entre los genes desregulados en el mutante *icu4-1* se cuentan algunos implicados en las respuestas al estrés y en el metabolismo y la señalización de algunas hormonas, entre ellas el ABA.

Hemos obtenido dobles mutantes sinérgicos entre varios alelos de los genes *AGO1*, *HEN1*, *HYL1*, *HASTY (HST)*, e *ICU4* que confirman genéticamente la relación funcional que se asume que existe entre los cuatro primeros, que son componentes demostrados o probables de la maquinaria de la ruta de los microARN, así como con *ICU4*, que es una diana de un microARN.

Hemos caracterizado genética y molecularmente dos mutantes *ron2*, que han resultado ser portadores de nuevos alelos recesivos e hipomorfos del gen *LEUNIG (LUG)*, que codifica un correpresor transcripcional que fue descrito por primera vez por su implicación en el desarrollo de la flor. Nuestros resultados demuestran que *RON2 (LUG)* está implicado en el control del tamaño y la forma de las hojas, dado que participa en los procesos de expansión celular no polar, posiblemente mediante la regulación transcripcional de genes relacionados con el crecimiento.