



**Miguel Hernández**

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Caracterización genética y molecular  
de los genes *RE* e *ICU2*  
de *Arabidopsis thaliana***

Rebeca González Bayón

Elche, 2007

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 Rebeca González Bayón para optar al grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta Tesis 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, 2 de julio de 2007

## II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con el objetivo de contribuir a la disección genética de la ontogenia foliar, hemos obtenido y estudiado varias estirpes mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presentan alteraciones en la morfología de sus hojas vegetativas, a las que hemos denominado *venosa* (*ven*) e *incurvata2* (*icu2*). Las razones de nuestro interés inicial por estos mutantes fueron las siguientes: Las hojas vegetativas de los mutantes *ven* presentan una red vascular intensamente verde, que destaca sobre un limbo pálido, lo que sugiere que sufren alteraciones en la biogénesis de los cloroplastos, la diferenciación del mesófilo, o ambas; El margen de las hojas vegetativas del mutante *icu2-1* está ligeramente recurvado hacia el haz y en su epidermis se observan grupos de células de tamaño reducido, lo que podría deberse a perturbaciones en la especificación de la dorsoventralidad o en los mecanismos de coordinación del crecimiento de los tejidos dorsales y ventrales de este órgano.

En esta Tesis Doctoral hemos caracterizado seis alelos recesivos del gen *RETICULATA* (*RE*; *VEN2*) y demostrado que su fenotipo foliar reticulado se debe a una gran reducción en la densidad de las células del mesófilo intervenal. Las hojas de las plantas *re/re* presentan una ligera disminución en tamaño y una forma casi normal, a pesar de que les faltan numerosas células del mesófilo, que son sustituidas por espacios aéreos intercelulares, lo que sugiere que el correcto desarrollo de los tejidos internos incide poco en la forma final del órgano, que parece depender en mayor medida de la epidermis. También apoya esta hipótesis la observación de que las células de la epidermis foliar de los mutantes *re* son aparentemente normales en tamaño y morfología.

Hemos clonado posicionalmente el gen *RE* y caracterizado molecularmente sus alelos, varios de los cuales parecen nulos. *RE* es *LCD1*, que había sido identificado por otros autores en base a la sensibilidad al ozono y a *Pseudomonas syringae* causada por *lcd1-1*, su único alelo conocido previamente (Barth y Conklin, 2003), y codifica una proteína de función desconocida y expresión ubicua. Nuestros resultados indican que los alelos *re* hipomorfos o nulos perturban específicamente la división de las células del mesófilo en estadios tempranos de la organogénesis foliar. Hemos demostrado además que la reticulación foliar es un rasgo externo útil como criterio selectivo para el aislamiento de mutantes con anomalías en la arquitectura interna de la hoja.

Hemos estudiado las interacciones genéticas entre *RE* y su parálogo más cercano, al que hemos denominado *RE2*, cuyo alelo nulo *re2-1* no tiene manifestación fenotípica. El análisis de la progenie de varios cruzamientos *re/re* × *re2-1/re2-1* indica que

los genotipos *re/re;re2-1/re2-1* y *RE/re;re2-1/re2-1* son letales, mientras que *re/re;RE2/re2-1* causa sinergia fenotípica, lo que sugiere que *RE* y *RE2* son redundantes y necesarios no sólo para la organogénesis foliar sino también para el desarrollo reproductivo y embrionario. La obtención del doble mutante *cue1-5/cue1-5;re-3/re-3* nos ha permitido establecer que *cue1-5* es epistático sobre *re-3*, lo que indica que *RE* participa en la ruta del shikimato.

Hemos clonado posicionalmente otros dos genes cuya insuficiencia de función provoca un fenotipo reticulado, comprobando que *VEN4* codifica una fosfohidrolasa y *VEN5*, otro parólogo de *RE*, una proteína de la envuelta del cloroplasto, ambas de función desconocida. Estamos intentando determinar la naturaleza molecular de otros tres genes *VEN* (*VEN1*, *VEN3* y *VEN6*) mediante un abordaje posicional similar al que nos ha permitido identificar *RE*, *VEN4* y *VEN5*.

Además de su fenotipo foliar, el mutante *icu2-1* muestra floración temprana y transformaciones homeóticas parciales entre órganos florales, similares a las causadas por la insuficiencia de función del gen de identidad de órgano floral *AP2*, que a su vez causa la desrepresión ectópica de *AG*. Hemos comprobado mediante RT-PCR cuantitativa que en las hojas del mutante *icu2-1* se expresan ectópicamente, entre otros, los genes *AG*, *AP1*, *AP3*, *PI*, *SEP3*, *CAL*, *FUL* y *FT*, todos los cuales codifican factores de transcripción. La desrepresión de *AG* causa el fenotipo foliar del mutante *icu2-1*, y la de *FT* su floración temprana, ya que las mutaciones de insuficiencia de función *ag-1* y *ft-1*, respectivamente, suprimen dichos rasgos.

Hemos clonado posicionalmente el gen *ICU2*, que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa  $\alpha$ . El alelo *icu2-1* es hipomorfo y probablemente modifica la estructura tridimensional de la proteína *ICU2*, pero no parece reducir su actividad polimerasa. Los alelos insercionales y aparentemente nulos *icu2-2* e *icu2-3* causan letalidad gamética y embrionaria, tal como cabe esperar del papel esencial de la ADN polimerasa  $\alpha$  en la replicación.

La obtención de dobles mutantes nos ha permitido establecer que las mutaciones *clf*, *tfl2* y *emf2* interactúan sinérgicamente con *icu2-1*. Este análisis de interacciones sugiere la existencia en *Arabidopsis thaliana* de un mecanismo de silenciamiento génico mediado por la cromatina similar al que se ha descrito para algunas levaduras y animales, en el que las marcas epigenéticas y el ADN se replican simultáneamente. Proponemos que la polimerasa *ICU2* participa en la unión de *TFL2* a las histonas, contribuyendo así al marcaje epigenético de la cromatina de manera casi simultánea a la replicación.