



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

Análisis genético de mutantes variegados en *Arabidopsis thaliana*

Raquel Sarmiento Mañús
Elche, 2011

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

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

VÍCTOR QUESADA PÉREZ, 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 desarrollada por la Licenciada Raquel Sarmiento Mañús 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 Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

Maria Rosa Ponce Molet

Víctor Quesada Pérez

Elche, 21 de febrero de 2011.

II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Esta Tesis es parte de la disección genética y molecular del desarrollo de las hojas de las plantas que se está llevando a cabo en el laboratorio de J.L. Micol. Hemos caracterizado 11 mutantes, portadores de alelos de 6 genes nucleares de *Arabidopsis thaliana*, que manifiestan alteraciones en el mesófilo o la epidermis foliar. Al menos 4 de estos genes codifican proteínas que actúan en el cloroplasto, y todos parecen relacionados en mayor o menor medida con el intercambio de señales entre el núcleo y el cloroplasto.

Las hojas de los mutantes *venosa* (*ven*) son reticuladas: sus venas son verdes y destacan sobre un limbo pálido, un rasgo morfológico externo que suele indicar un desarrollo insuficiente de los tejidos internos. Nos interesamos inicialmente por los genes *VEN* porque les consideramos presuntamente implicados en el desarrollo del mesófilo.

Hemos estudiado 4 alelos del gen *VEN4*. El fenotipo mutante de *ven4-2* es más extremo que el de *ven4-1*, siendo *ven4-3* y *ven4-4* los alelos más débiles. Los mutantes *ven4-1* y *ven4-2* sufren una reducción en el área de la roseta y el limbo foliar, y en su peso fresco y seco, así como en el tamaño, aunque no el número, de las células del mesófilo en empalizada. Hemos clonado posicionalmente el gen *VEN4*, que codifica una presunta fosfohidrolasa de función desconocida y se expresa en las hojas y las flores incipientes, la raíz y el tallo. La proteína *VEN4* es nuclear.

La mutación *dov1* (*differential development of vascular associated cells1*) causa reticulación foliar. Hemos clonado posicionalmente el gen *DOV1*, que codifica la glutamina fosforribosil pirofosfato amidotransferasa 2, que cataliza la primera reacción de la síntesis *de novo* de las purinas. Hemos obtenido dobles mutantes cuyos fenotipos indican la epistasia de *SCABRA3* (*SCA3*; codifica una polimerasa de ARN que transcribe los genes del cloroplasto) sobre *VEN4* y la sinergia entre este último y *DOV1*. El estudio de la relación funcional entre *DOV1* y *SCA3*, que actúan en el cloroplasto, y *VEN4*, que lo hace en el núcleo, podría aportar información acerca de la señalización intracelular.

La mutación puntual *ven6-1* causa una reducción en el peso fresco y seco de la planta, y un aumento en el tamaño de los espacios intercelulares del mesófilo en empalizada. Hemos identificado un alelo insercional y presuntamente nulo de *VEN6* (*ven6-2*). La clonación posicional de *VEN6* ha revelado que codifica la subunidad pequeña de la carbamoil fosfato sintetasa (CPS), que cataliza en otras especies la conversión de glutamina en glutamato y carbamoil fosfato (CP). El CP se condensa con la ornitina para rendir citrulina en la primera etapa de la ruta de biosíntesis de la arginina.

Hemos llevado a cabo un análisis metabólico que ha demostrado que *ven6-1* acumula ornitina. La adición de citrulina al medio de cultivo suprime el fenotipo mutante de *ven6-1*, y la de ornitina le resulta más tóxica que a su ancestro silvestre. Nuestros resultados indican que la actividad CPS y la arginina son necesarias para el desarrollo del mesófilo intervenal —pero no para las venas y las células perivasculares— en las hojas de *Arabidopsis*. La expresión heteróloga del gen *VEN6* en mutantes de *Escherichia coli* deficientes en la actividad CPS nos ha permitido demostrar su actividad enzimática, así como que su función está conservada entre estas dos especies tan distantes.

La superficie del limbo de los mutantes *rugosa* (*rug*) es irregular, lo que a primera vista sugiere que están afectados en genes implicados en el desarrollo de la epidermis foliar. Además, en el limbo de los mutantes *rug2* se alternan los sectores pigmentados y despigmentados, mientras que los *rug1* presentan zonas necróticas, observaciones que sugieren la alteración de los tejidos internos.

Hemos encontrado en los sectores verdes de las hojas de los mutantes *rug2* un aumento en el número de células del mesófilo en empalizada y una reducción en su tamaño. Las células pavimentosas de la epidermis adaxial son más numerosas y pequeñas en *rug2-2* que en el tipo silvestre. La proteína RUG2 es homóloga de los factores de terminación de la transcripción mitocondrial de los metazoos, y se localiza tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos. La transcripción de los genes mitocondriales disminuye y la de los cloroplásticos aumenta en el mutante *rug2-1*. Nuestros resultados indican que RUG2 es un componente de la regulación anterógrada de la mitocondria y el cloroplasto por el núcleo, y que participa en el control de la transcripción del genoma de al menos uno de estos orgánulos. Hemos obtenido dobles homocigotos para alelos de insuficiencia de función de *RUG2* y su parálogo más cercano, al que hemos llamado *RUG3*, cuyo fenotipo ha resultado ser sinérgico y letal, lo que sugiere que estos dos genes son funcionalmente redundantes.

Las hojas del mutante *rug1* presentan sectores necróticos en los que hemos detectado H_2O_2 , rasgos fenotípicos que se extreman cuando es cultivado en condiciones de día largo. *RUG1* codifica una presunta porfobilinógeno desaminasa (cataliza la quinta etapa de la ruta de biosíntesis de los tetrapirroles) y su epistasia sobre *LIN2* (*LESION INITIATION2*; codifica la coproporfirinógeno III oxidasa, que cataliza la octava etapa de la ruta). *rug1* podría ser útil para el estudio de la señalización retrógrada, en la que se ha propuesto que participan los tetrapirroles. El análisis de este mutante también resultará de utilidad para la comprensión de los mecanismos de defensa de las plantas contra el estrés fotooxidativo.