

Análisis genético y molecular de los genes *VENOSA* de *Arabidopsis thaliana*

Trabajo realizado por la Licenciada Rebeca González Bayón, en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar a la Suficiencia investigadora.

Elche, 24 de septiembre de 2004.

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 a la Suficiencia investigadora. 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, 24 de septiembre de 2004.

V.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se han descrito en *Arabidopsis thaliana* numerosos mutantes cuya característica común es una venación foliar muy manifiesta, ya que su red vascular es intensamente verde y destaca sobre un limbo más pálido (Berná *et al.*, 1999; Serrano-Cartagena *et al.*, 1999; Streatfield *et al.*, 1999). En el laboratorio de J.L. Micol se han aislado 14 estirpes representativas de esta clase fenotípica, a la que hemos denominado Venosa (Ven). Su análisis genético indica que pertenecen a seis grupos de complementación, que hemos denominado VENOSA 1 a 6 (VEN1 a 6). Disponemos de un alelo recesivo *ven1* y otro *ven4*, seis recesivos *ven2*, dos semidominantes y dos recesivos *ven3*, dos recesivos *ven5* y uno semidominante *ven6*. Se ha determinado la posición de mapa de estos seis genes mediante análisis del ligamiento a microsatélites polimórficos, concluyendo que VEN1 radica en el cromosoma 5 (a $7,96 \pm 4,49$ cM del marcador AthCTR1), VEN2 en el 2 (a $0,00 \pm 0,18$ cM de nga168), VEN3 en el 1 (a $3,34 \pm 3,29$ cM de AthZFPG), VEN4 en el 5 (a $2,78 \pm 2,75$ cM de AthPHYC), VEN5 en el 2 (a $0,00 \pm 0,18$ cM de nga361) y VEN6 en el 3 (a $0,00 \pm 0,16$ cM de AthGAPab).

Uno de los objetivos de mi Tesis es la clonación y caracterización estructural y funcional del gen VEN2. Hemos demostrado el alelismo de las mutaciones *ven2* y *re-1*, un marcador genético clásico (Rédei e Hirono, 1964), por lo que hemos pasado a llamar *re* a nuestros alelos *ven2*. Hemos caracterizado seis alelos recesivos del gen *RE*, a la vez que *re-1*, y demostrado que su fenotipo foliar reticulado se debe a una reducción considerable en la densidad de las células del mesófilo intervenal. Las hojas de las plantas *re/re* presentan una ligera disminución en tamaño pero 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 en la determinación del grosor de la hoja, pero muy poco en la forma de ésta, 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. La forma de las células vasculares del mesófilo en los mutantes *re* es aparentemente normal, pero la densidad de su venación foliar es inferior a la silvestre, lo que sugiere que una reducción en la proliferación celular del mesófilo durante el desarrollo temprano de la hoja dificulta la incorporación de las células al destino vascular.

Hemos clonado posicionalmente el gen *RE* y caracterizado molecularmente sus alelos, varios de los cuales son a todas luces nulos. *RE* es *LCD1*, recientemente

identificado por la sensibilidad al ozono y a *Pseudomonas syringae* causada por *lcd1-1*, su único alelo conocido hasta ahora (Barth y Conklin, 2003), y codifica una proteína de función desconocida y expresión ubicua. Nuestros resultados indican que las mutaciones hipomorfas en el gen *RE* perturban específicamente la división de las células del mesófilo en estadios tempranos de la organogénesis foliar.

Nuestra caracterización de los mutantes *reticulata* ha permitido, por primera vez en *Arabidopsis thaliana*, analizar los aspectos genéticos del desarrollo de la arquitectura interna de la hoja en mutantes que presentan cloroplastos aparentemente normales. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la epidermis participa en el control de la morfogénesis de la hoja. Hemos demostrado que el fenotipo foliar reticulado es un rasgo externo útil como criterio selectivo para el aislamiento de mutantes específicamente alterados en la arquitectura interna de la hoja.

Estamos intentando determinar la naturaleza molecular de los restantes genes *VEN* mediante un abordaje posicional similar al que nos ha permitido identificar a *RE* (*VEN2*).