

**Análisis genético y molecular de los genes
VEN4, VEN6 y RUG2
de *Arabidopsis thaliana***

Trabajo realizado por la Licenciada Raquel Sarmiento Mañús, 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, 30 de junio de 2008.

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

VÍCTOR QUESADA PÉREZ, Profesor Titular de Escuela Universitaria 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 Raquel Sarmiento Mañús 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

Víctor Quesada Pérez

Elche, 30 de junio de 2008.

I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

El objetivo principal de mi tesis es el análisis genético y molecular de los genes *VEN4*, *VEN6* y *RUG2* de *Arabidopsis thaliana*. Este trabajo es parte de la disección genética y molecular del desarrollo foliar que se está llevando a cabo en el laboratorio de J.L. Micol.

Los mutantes *venosa* (*ven*) fueron aislados en el laboratorio de J.L. Micol. Su rasgo fenotípico más conspicuo es la reticulación foliar, ya que sus venas están intensamente pigmentadas de verde y destacan sobre el resto del limbo, que es pálido. Nuestro interés por los mutantes *ven* se debe a que la reticulación puede servir como indicador morfológico externo de la existencia de alteraciones estructurales en los tejidos internos de la hoja. Los mutantes *ven* son, en consecuencia, candidatos a estar perturbados en el desarrollo del mesófilo.

Hemos caracterizado a nivel genético y molecular tres alelos insercionales del gen *VEN4* (*ven4-2*, *ven4-3* y *ven4-4*) y uno inducido mediante EMS, *ven4-1*. El fenotipo de los mutantes *ven4-1* y *ven4-2* es más extremo que el de los restantes mutantes *ven4* y su despigmentación foliar se debe a una disminución en su contenido en clorofilas. Los mutantes *ven4-1* y *ven4-2* presentan una reducción en el área de la roseta y el limbo foliar, y en su peso fresco y seco, así como una disminución en el área, aunque no en el número de las células del mesófilo en empalizada y la epidermis adaxial. Estos rasgos fenotípicos son menos acusados en *ven4-1* que en *ven4-2*. El fenotipo reticulado de este último no se suprimió al ser cultivado a 26°C. Estos resultados, junto con los bajos niveles de expresión del gen *VEN4* en el mutante *ven4-2*, sugieren que se trata de un alelo nulo. La clonación del gen *VEN4* (At5g40270) se llevó a cabo en el laboratorio de J.L. Micol con anterioridad al comienzo de esta tesis, comprobándose que su producto proteico es una presunta fosfohidrolasa dependiente de cationes bivalentes, de función desconocida. Estamos determinando el patrón de expresión espacial del gen *VEN4* y la localización subcelular de la proteína *VEN4*.

El mutante *ven6* muestra una reducción en su peso fresco y seco, así como en la longitud de la raíz principal, y un aumento en el tamaño de los espacios intercelulares del mesófilo en empalizada. Hemos clonado posicionalmente *VEN6* y establecido que es el gen At3g27740, cuyo producto es la subunidad pequeña de la carbamoil fosfato sintetasa (CPS). Esta enzima sintetiza carbamoil fosfato, sustrato de la primera reacción de la ruta biosintética de la arginina y de la síntesis *de novo* de las pirimidinas. El mutante *ven6* acumula ornitina, un intermediario en la ruta de biosíntesis de la arginina. La ornitina es

más tóxica para *ven6* que para su ancestro silvestre. La adición al medio de cultivo de citrulina, otro intermediario de la ruta de la arginina, suprime el fenotipo mutante de *ven6*. Estos resultados indican que el fenotipo de *ven6* se debe a la perturbación de esta ruta metabólica.

Los mutantes *rugosa* (*rug*) también fueron aislados en el laboratorio de J.L. Micol. La característica más apreciable de su fenotipo es la irregularidad de la superficie del limbo foliar, lo que sugiere que están afectados en genes implicados en el desarrollo de la epidermis. En el limbo de los mutantes *rug2* se alternan los sectores pigmentados y despigmentados. Esta variegación también sugiere la existencia de una alteración de los tejidos internos.

Hemos analizado la ultraestructura foliar de los mutantes *rug2* y realizado el análisis morfométrico de las células del mesófilo en empalizada y la epidermis adaxial. Hemos encontrado en los sectores pigmentados de verde de los mutantes *rug2* un aumento en el número de células del mesófilo en empalizada y una reducción en su tamaño. La epidermis adaxial del mutante *rug2-2* presenta un mayor número de células pavimentosas que su tipo silvestre, aunque éstas son de menor tamaño. El gen *RUG2* (At4g02990) fue clonado en el laboratorio de J.L. Micol antes del comienzo de esta tesis y su producto proteico presenta similitud con los factores de terminación de la transcripción mitocondrial de los metazoos. Nuestros resultados indican que la perturbación de la función mitocondrial dificulta el desarrollo de los cloroplastos y altera la morfogénesis foliar. Dado que *RUG2* parece ser necesaria para la transcripción de los genes mitocondriales y del cloroplasto, estamos determinando su localización subcelular. Hemos obtenido individuos dobles mutantes, portadores en homocigosis de inserciones de ADN-T en el gen *RUG2* y en su parálogo *RUG3*. Estos dos genes parecen funcionalmente redundantes, ya que el fenotipo del doble mutante *rug2-2 rug3* es sinérgico.