



Análisis genético y molecular del mutante
rugosa2* de *Arabidopsis thaliana

Rubén Pérez Marcos
Elche, 2005

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Universidad en el área de conocimiento de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

VICTOR MANUEL QUESADA PEREZ, Profesor Titular de Escuela Universitaria en el área de conocimiento 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 el alumno Rubén Pérez Marcos. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

José Luis Micol Molina

Víctor M. Quesada Pérez

Elche, noviembre de 2005.

V.- DISCUSION

V.1.- Aislamiento y caracterización fenotípica del mutante *rug2*

Las hojas de las plantas son órganos laterales que emergen de los flancos del meristemo apical del tallo. La división, la expansión y la diferenciación celular son procesos que contribuyen a su forma y tamaño finales (revisado en Poethig, 1997; Tisantis y Langdale, 1998; Scanlon, 2000; Byrne *et al.*, 2001; Micol y Hake, 2003; Tsukaya, 2005). Los estudios realizados en mutantes de *Arabidopsis thaliana* como *reticulata* (*re*; E.A. Kinsman, R. González-Bayón, V. Quesada, A. Vera, P. Robles, M.R. Ponce, K.A. Pyke y J.L. Micol, resultados sin publicar), *var1* y *var2* cuyas hojas presentan una morfología externa no demasiado distinta de la silvestre a pesar de que están sustancialmente alteradas en su organización interna y su epidermis foliar aparentemente es normal. Esto sugiere que la contribución de la epidermis a la forma final de la hoja es más importante que la del mesófilo.

El mutante *rug2* de *Arabidopsis thaliana* fue aislado en el laboratorio de J.L. Micol tras una mutagénesis química con EMS (Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999). Las plantas *rug2/rug2* presentan hojas vegetativas más redondeadas y pequeñas que las de la estirpe silvestre *Ler*. Aunque su forma no difiere notablemente de la silvestre, su estructura interna está notablemente alterada, al presentar el mesófilo en empalizada en algunas regiones una densidad celular muy reducida. Esta falta de células se traduce en una disminución en el grado de pigmentación verde en las hojas de los individuos *rug2/rug2*, como consecuencia de la reducción en el número de cloroplastos y por consiguiente de los niveles de clorofila. No obstante, las células de la epidermis foliar de las plantas *rug2/rug2* presentan una morfología similar a la silvestre, lo que apoyaría la hipótesis anterior de que la epidermis contribuye más a la forma final de la hoja que los tejidos internos. La alternancia de regiones verdes normales y de otras más pálidas en las hojas del mutante *rug2* es similar a la que presentan los mutantes variegados, también como resultado de una disminución en el número de células del mesófilo foliar.

Otro rasgo morfológico distintivo del mutante *rug2* es la irregularidad que presenta su superficie foliar, probablemente debido a la reducción en la densidad de células del mesófilo, lo que produciría un colapso parcial de la epidermis en dichas zonas.

Nuestros resultados sugieren que el gen *RUG2* podría estar implicado en la determinación de la morfología y de la textura foliar mediante el control de la tasa de expansión, proliferación de células del mesófilo o de ambos procesos

V.2.- Efecto de la temperatura y de la sacarosa en el mutante *rug2*

Hemos encontrado que el fenotipo mutante de las plantas *rug2/rug2* es muy sensible a la temperatura. El cultivo de los individuos *rug2/rug2* a 26°C resulta letal para éstos, ya que su crecimiento se detiene en el estadio de plántulas totalmente decoloradas y con apenas un primer par de hojas incipientes. Por el contrario, cuando son cultivados a 16°C el fenotipo *Rug2* se suprime completamente, siendo imposible distinguir los individuos mutantes *rug2* de los silvestres *Ler*, que apenas se ven afectados por la disminución en la temperatura. Estos resultados sugieren que la mutación *rug2* afecta a la funcionalidad de la proteína *RUG2*, quizá perturbando su termoestabilidad. Así, el producto proteico del alelo *rug2* poseería un nivel de funcionalidad mayor (quizás al ser más estable) a temperaturas más bajas (16°C) que a mayor temperatura. A 20°C (temperatura a la que cultivamos habitualmente *Arabidopsis thaliana* en condiciones de laboratorio) las plantas *rug2/rug2* presentan fenotipo mutante pero son viables. El cultivo de los individuos *rug2/rug2* a mayor temperatura (26°C) resulta letal debido a la aparente falta de función del gen *RUG2*. Así pues, podríamos considerar que el alelo mutante *rug2* se comporta como su alelo silvestre a 16°C, como un alelo hipomorfo a 20°C mientras que a 26°C sería prácticamente nulo. Efectos similares del incremento de la temperatura de cultivo sobre el fenotipo se han descrito para otros mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectados en la morfología foliar tales como *var1* (Sakamoto, 2003) y *varicose (vcs)* (Deyholos et al., 2003).

Hemos encontrado que las plantas *rug2/rug2* son incapaces de desarrollarse adecuadamente si no se suplementa el medio de cultivo con una fuente de carbono como la sacarosa, lo que pone de manifiesto que su crecimiento fotoautotrófico está perturbado. Esto se debe probablemente a la falta de células del mesófilo en empalizada y al efecto negativo que produce sobre la fotosíntesis. Resultados similares se han descrito en *Arabidopsis thaliana* en mutantes afectados en procesos fotosintéticos y con una alteración en la organización interna de la hoja, tales como *cue1 (CAB underexpressed1)*; Li et al., 1995) y *pac (pale cress)*; Reiter et al., 1994; Grevelding et al., 1996). Estos resultados sugieren que la perturbación funcional del gen *RUG2* afecta negativamente a la fotosíntesis, probablemente de manera indirecta

al alterar la tasa de proliferación celular del mesófilo. No obstante, no podemos descartar completamente un efecto directo sobre la maquinaria fotosintética.

V.3.- Clonación posicional del gen *RUG2*

Hemos avanzado sustancialmente en la clonación posicional del gen *RUG2*. Cuando dio comienzo este trabajo el gen *RUG2* había sido ubicado en la región telomérica superior del cromosoma 4 (Robles, 2000; Robles y Micol, 2001). Hemos desarrollado y utilizado nuevos marcadores moleculares del cromosoma 4 de *Arabidopsis thaliana* que son polimórficos entre las estirpes silvestres Col-0 y Ler, con los que hemos genotipado algunos cientos de individuos pertenecientes a nuevas poblaciones cartográficas F₂ obtenidas en el transcurso de este trabajo. Esto nos ha permitido acortar sustancialmente el tamaño de la región candidata a contener al gen *RUG2*, que ha quedado reducida a un segmento genómico de poco más de 70 kb. Gracias a la disponibilidad de la secuencia del genoma de la estirpe Col-0 de *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; <http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>) hemos identificado en la región candidata 17 presuntos genes descritos, aunque ninguno de los cuales presenta homología con otros previamente descritos y cuyas mutaciones produzcan un fenotipo variegado (Sakamoto, 2003). Aunque el estudio de dichos genes excede los objetivos de este trabajo, los resultados que hemos obtenido permitirán identificar a corto plazo el gen *RUG2* y contribuir de este modo a la comprensión de los mecanismos genéticos y moleculares responsables del control de la morfogénesis foliar.