



Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Caracterización genética y molecular
del gen *RUG2* de *Arabidopsis thaliana***

Eva Graciá Martínez

Elche, 2006

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 la alumna Eva Graciá Martínez. 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 M. Quesada Pérez

Elche, 1 de septiembre de 2006.

V.- DISCUSIÓN

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

El mutante *rug2-1* de *Arabidopsis thaliana* se aisló en el laboratorio de J.L. Micol en el transcurso de una búsqueda de mutantes, efectuada con el objetivo de identificar genes implicados en el control de la morfogénesis foliar (Berná, 1997; Berná *et al.*, 1999). Recientemente, el gen nuclear *RUG2* ha sido clonado en el laboratorio de J.L. Micol (Quesada, Hricová, Pérez-Marcos y Micol, resultados sin publicar) y su producto proteico presenta homología con los factores de terminación de la transcripción de la mitocondria.

En este trabajo se ha avanzado en la caracterización del mutante *rug2-1*, cuyo rasgo fenotípico más distintivo es la alternancia de sectores verdes normales y de otros más pálidos en sus hojas vegetativas, que además son más redondeadas y pequeñas que las de la estirpe silvestre *Ler*. La estructura foliar interna está alterada, ya que el mesófilo en empalizada presenta una disminución en el número de células y en el tamaño de los cloroplastos en las regiones menos pigmentadas.

En un estudio previo realizado en el laboratorio de J.L. Micol (Pérez-Marcos, 2005) se determinó que el fenotipo de las plantas *rug2-1/rug2-1* es termosensible, de manera que su cultivo a 26°C le resultaba letal, mientras que a 16°C se suprimía completamente el fenotipo mutante. Hemos encontrado que el fenotipo de los individuos *rug2-1/rug2-1* es, además, fotosensible. El cultivo de las plantas *rug2-1/rug2-1* a 9000 lx, una intensidad lumínica superior a la utilizada habitualmente para *Arabidopsis thaliana* en condiciones de laboratorio (5000-6000 lx) hace sustancialmente más severo el fenotipo mutante, incrementándose su despigmentación corporal. Por el contrario, a 3200 lx el fenotipo *Rug2* se suprime parcialmente. En consonancia con estos resultados, hemos encontrado que las plantas *rug2-1/rug2-1* acumulan menos clorofilas y carotenoides que las silvestres cuando son cultivadas a intensidades lumínicas (5200 y 9000 lx) a las que el fenotipo *Rug2* se manifiesta con mayor severidad. Efectos similares del incremento de la intensidad lumínica de cultivo sobre el fenotipo se han descrito para mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectados en la morfología foliar tales como *im* (Aluru *et al.*, 2006), *var1* (Sakamoto, 2002), *thf1* (Wang *et al.*, 2004; Karen *et al.*, 2005), y el mutante *stm6* (*state transition mutant 6*) de *Chlamydomonas reinhardtii*, afectado en el gen *MOC1* (*mterf-like gene of Chlamydomonas 1*) cuyo producto presenta homología con los factores de terminación de la transcripción mitocondriales (Schönfeld *et al.*, 2004). Además de *rug2-1* y de *stm6*, no se han descrito en el reino vegetal otros mutantes afectados en genes que codifiquen factores de terminación de la transcripción mitocondrial.

Nuestros resultados sugieren que la temperatura y la intensidad lumínica afectan a la funcionalidad de la proteína mutante RUG2 del mutante *rug2-1*, quizá perturbando su estabilidad. De este modo, el grado de funcionalidad del alelo *rug2-1* sería mayor (quizá al ser más estable su producto proteico) cuando las plantas son cultivadas a temperaturas e intensidades lumínicas bajas, y viceversa.

V.2.- Aislamiento y caracterización de dobles mutantes

Hemos iniciado un estudio de interacciones genéticas entre *rug2-1* y otras mutaciones que producen fenotipos morfológicos similares, tales como *rug1* y *sca3-1*. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la mutación *rug2-1* en homocigosis es epistática sobre *rug1*, lo que sugiere que los productos proteicos de los genes *RUG1* y *RUG2* participan en un mismo proceso biológico, y que RUG1 actúa también en la mitocondria y/o el cloroplasto. La clonación del gen *RUG1* permitirá contrastar esta hipótesis. Hemos considerado sinérgico el fenotipo de los individuos *rug2-1/rug2-1;sca3-1/sca3-1*. Esto podría explicarse dado que SCA3 es una polimerasa de ARN del cloroplasto que transcribe parte del genoma de este orgánulo, por lo que su insuficiencia de función, unida a la de *RUG2*, que está presuntamente implicado en la terminación de la transcripción en la mitocondria, perturbaría la actividad transcripcional en ambos orgánulos, alterando sustancialmente el desarrollo de los dobles mutantes.

V.3.- Análisis de líneas portadoras de inserciones de ADN-T en genes funcionalmente relacionados con *RUG2*

Hemos estudiado líneas portadoras de inserciones de ADN-T en genes con funciones presuntamente relacionadas con la de *RUG2*. En primer lugar, hemos identificado un alelo nulo para el gen At1g68990, cuyo producto es la polimerasa de ARN mitocondrial (RpoTm), pero no hemos encontrado individuos homocigóticos para la inserción, lo que indica que la ausencia de función de este gen es letal. Aunque se ha descrito en *Arabidopsis thaliana* otra polimerasa de ARN codificada por un gen nuclear y presuntamente implicada en la transcripción mitocondrial (RpoTnp; Baba *et al.*, 2004) nuestros resultados sugieren que RpoTm desempeñaría el papel principal, al menos en las etapas más tempranas del desarrollo.

Hemos analizado 7 líneas presuntamente portadoras de inserciones de ADN-T en tres genes parálogos de *RUG2* (At2g21710, At4g38160 y At2g44020), que identificamos en una búsqueda de secuencias relacionadas con la de la proteína RUG2 en bases de

datos públicas. No encontramos ningún individuo de fenotipo mutante en las cuatro líneas estudiadas correspondientes al gen At2g21710.

En cuatro de las ocho familias T₄ analizadas de la línea N586466, portadora de una inserción en el gen At2g44020 identificamos plantas enanas, intensamente pigmentadas de verde y de roseta compacta. El estudio de las familias T₅ obtenidas a partir de estos individuos permitirá determinar la heredabilidad de su fenotipo mutante. En el caso del gen At4g38160, no encontramos ninguna planta con fenotipo mutante en la línea N598510. Por el contrario, en la restante línea estudiada (N616335) encontramos individuos con características morfológicas netamente distintas a las del tipo silvestre y similares a las de las plantas *rug2-1/rug2-1*: despigmentación acusada en los cotiledones, hojas, tallos, sépalos y silicuas, un retraso en el crecimiento y una disminución en la densidad de células del mesófilo foliar y en el tamaño y número de sus cloroplastos. Estos rasgos se transmitieron según un modo de herencia monogénico y recesivo. Hemos denominado *rug3* a esta línea. Nuestros resultados sugieren que *RUG3* desempeñaría un papel similar al de *RUG2* en la morfogénesis foliar, por lo que sus funciones se solaparían, y ponen de manifiesto la importancia de los factores que controlan la transcripción mitocondrial en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

La caracterización genética y molecular detallada del mutante *rug3* excede los objetivos de este trabajo y se está llevando a cabo en la actualidad en el laboratorio de J.L. Micol.