



Programa de Doctorado en Bioingeniería  
Universidad Miguel Hernández de Elche

# **Análisis de las funciones postembrionarias del gen *KEULE* de Arabidopsis**

Alejandro Ruiz Bayón

Director de Tesis  
José Luis Micol Molina

Codirectora de Tesis  
Raquel Sarmiento Mañús

Elche, 2024

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche y director de esta Tesis Doctoral, y

RAQUEL SARMIENTO MAÑÚS, Doctora por la Universidad Miguel Hernández de Elche y codirectora de esta Tesis Doctoral,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor desarrollada por el Graduado Alejandro Ruiz Bayón 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.

Director de la Tesis Doctoral  
José Luis Micol Molina

Codirectora de la Tesis Doctoral  
Raquel Sarmiento Mañús

Elche, 19 de junio de 2024

## II.- RESUMEN

Durante la citocinesis de una célula de la línea somática de las plantas se forma una pared ecuatorial que la divide y separa a sus células hijas. Los componentes de dicha pared son aportados por vesículas citocinéticas que se originan en el aparato de Golgi y son transportadas hasta el plano de división celular, en donde se fusionan formando la placa celular. Esta última es inicialmente una red túbulo-vesicular que se expande radialmente a la vez que se transforma progresivamente en una lámina fenestrada plana, cuyos orificios darán lugar a los plasmodesmos. Durante la maduración de la placa celular se depositan en su interior polisacáridos sintetizados en el aparato de Golgi o en la propia placa, que constituirán la nueva pared.

En la primera fase de su proceso de fusión en la placa celular, la agregación de las vesículas citocinéticas está mediada por los denominados complejos de anclaje. En la segunda fase, la de acoplamiento, las proteínas Soluble NSF Attachment Protein Receptor (SNARE) de vesículas adyacentes forman complejos *trans*-SNARE, que propician un contacto estrecho entre sus membranas; el ensamblaje de estos complejos depende de la interacción entre sus subunidades (las proteínas SNARE, entre ellas las denominadas sintaxinas) y las proteínas Sec1/Munc18 (SM). KEULE (KEU) es una proteína SM que juega un importante papel en la coordinación de la fusión de las vesículas citocinéticas en el plano de división celular.

En el laboratorio de José Luis Micol se realizó en la década de los noventa una búsqueda de mutantes foliares de *Arabidopsis* tras una mutagénesis con metanosulfonato de etilo. Dos de dichos mutantes resultaron ser alélicos y las hojas de su roseta eran serradas, razón por la que fueron denominados *serrata4-1* (*sea4-1*) y *sea4-2*. Usando cartografía mediante secuenciación masiva, hemos establecido en esta Tesis que *sea4-1* y *sea4-2* son alelos recesivos, hipomorfos y viables del gen *KEU*; todos los alelos recesivos de este gen anteriormente descritos causan letalidad en el estado de plántula, como consecuencia de la perturbación de su desarrollo embrionario, que a su vez se debe a las alteraciones de la citocinesis que manifiestan los mutantes nulos *keu*.

El mutante *sea4-1* es portador de una transición G→A en el donante del *splicing* del noveno exón de *KEU*, que causa la retención del noveno intrón de este gen en la mayoría de los correspondientes ARN mensajeros, que en consecuencia codifican una proteína truncada. Por su parte, *sea4-2* presenta una transición G→A que presuntamente causa una sustitución S57L en uno de los cuarenta residuos que interaccionan con las sintaxinas. Hemos demostrado que *sea4-1* y *sea4-2* no complementan con los alelos nulos *keu-21*, *keu-*

22, *keu-23* y *keu*<sup>MM125</sup> de *KEU*, confirmando así su alelismo. Hemos combinado *sea4-1* y *sea4-2* con alelos de otros genes relacionados con la fusión de membranas, como los que codifican las proteínas SEC1B y SEC6, y las sintaxinas SYNTAXIN OF PLANTS21 (SYP21), SYP132 y KNOLLE (KN): hemos obtenido dobles mutantes y sesquimutantes de *sea4-1* y *sea4-2* con *sec1b-1*, *sec1b-2*, *sec6-2*, *sec6-3*, *syp21*, *syp132<sup>T</sup>* y *kn*<sup>X37-2</sup>, casi todos los cuales presentaron un fenotipo sinérgico similar; resultaron ser plántulas letales, sin desarrollo foliar o con hojas muy pequeñas y serradas.

Hemos caracterizado algunos rasgos del fenotipo morfológico de los mutantes *sea4-1* y *sea4-2*. Sus tallos y raíces principales son más cortos que los del tipo silvestre *Ler*. Su patrón de venación foliar es más complejo que el silvestre, con mayor número de bifurcaciones y venas terminales por unidad de superficie. Hemos obtenido cortes histológicos de hojas del tercer nudo de la roseta de estos mutantes, y hemos cuantificado mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial la variabilidad del tamaño de las células de la epidermis y el mesófilo en empalizada de las hojas del primer y tercer nudo de su roseta. Muchas células del mesófilo en empalizada de los mutantes *sea4* son más pequeñas que las silvestres, pero algunas son mucho más grandes y causan protuberancias en la epidermis foliar; además, la forma de las células pavimentosas de la epidermis es más simple que en *Ler*. La senescencia foliar de los mutantes *sea4* es más temprana y afecta a más hojas que en el tipo silvestre, y *sea4-2* presenta floración temprana. Hemos establecido que la variabilidad fenotípica observada en el grado de expansión de los cotiledones y las hojas y en la aparición de senescencia prematura en los mutantes *sea4* es independiente del fenotipo de los parentales y se trata, en consecuencia, de una propiedad intrínseca de su genotipo.

Hemos determinado los niveles de ploidía de los mutantes *sea4*, constatando un incremento en la endorreducción de las células foliares. También hemos realizado un análisis transcriptómico de los mutantes *sea4-1* y *sea4-2*, en el que hemos encontrado más de 7000 genes desregulados. Los genes sobreexpresados pertenecen a las categorías del plegamiento de proteínas y degradación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, la inmunidad, el ciclo de Krebs y la biosíntesis de las auxinas, el jasmonato y los monolignoles. Los genes reprimidos están relacionados con la fotosíntesis, la biosíntesis de las clorofilas y los carotenos, el ciclo de Calvin, la ruta de la acetil coenzima A, la biosíntesis de los flavín adenín dinucleótidos y flavín mononucleótidos, y el metabolismo de los aminoácidos y los ácidos grasos. Este perfil transcriptómico recuerda los de mutantes previamente descritos que manifiestan la así denominada reducción de la integridad de la pared celular y la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas. Estas características

comunes podrían estar desencadenadas por la acumulación, en el plano de división celular, de vesículas citocinéticas que no se han fusionado.

Dado que nuestro análisis transcriptómico también reveló la sobreexpresión de genes de la ruta de síntesis de la auxina, y que esta hormona regula la morfogénesis de la hoja en su conjunto y en particular la del margen foliar, hemos analizado la distribución del transportador del eflujo de la auxina PIN-FORMED 1 (PIN1) y de la propia hormona en los mutantes *sea4-1* y *sea4-2*. Hemos constatado que la distribución subcelular de PIN1 en los primordios foliares y las raíces no está alterada, aunque su concentración es inferior a la silvestre. Por su parte, la auxina se acumula más en la zona apical y la epidermis de los primordios foliares de estos mutantes que en el tipo silvestre, lo que podría justificar el margen serrado de sus hojas expandidas, ya que autores anteriores han demostrado que la morfogénesis del margen foliar en *Arabidopsis* depende de la correcta ubicación de máximos alternos de concentración de la auxina y del factor de transcripción CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (CUC2).

De nuestro estudio de los alelos *sea4-1* y *sea4-2* del gen *KEU* concluimos, como cabía esperar, que la proteína KEU actúa a nivel subcelular de igual modo durante el desarrollo embrionario, el vegetativo y el reproductivo. La actuación de KEU parece necesaria para que alcancen su tamaño normal la raíz y el tallo principales, así como las hojas de la roseta. Los tejidos internos de las hojas de estos mutantes revelan que la actuación de KEU es necesaria para la correcta definición de las líneas de demarcación entre tejidos adyacentes, como la epidermis, el mesófilo en empalizada y el lagunar. La inexistencia previa de alelos mutantes viables del gen *KEU* confiere un particular valor a *sea4-1* y *sea4-2*, por su potencial utilidad para quienes estén interesados en el estudio de la relación entre la citocinesis y la organogénesis postembrionaria en las plantas.