

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



INSITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Caracterización de la mutante albina *clb5-1* de
Arabidopsis thaliana que presenta alteraciones
en la biogénesis del cloroplasto**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:**

Biól. Aida Odette Avendaño Vázquez

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Patricia León Mejía

2005

0349937



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCION	2
2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> , planta modelo en biología vegetal	2
2.2	Generalidades del desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
2.3	Los plástidos	6
2.4	La biogénesis del cloroplasto	8
2.5	Mutantes de <i>Arabidopsis</i> con alteraciones en la biogénesis del cloroplasto	10
III	ANTECEDENTES	12
IV	HIPOTESIS	15
V	OBJETIVOS	15
5.1	General	15
5.2	Particulares	15
VI	MATERIAL Y METODOS	16
6.1	Material vegetal	16
6.2	Germinación y crecimiento de las plantas	16
6.3	Selección de mutantes albinas	17
6.4	Selección de plantas heterócigas	17
6.5	Cruzas dirigidas y selección de progenie recombinante	18
6.7	Ensayo histoquímico de GUS	18
6.8	Cuantificación de pigmentos fotosintéticos	19
6.9	Cinética del crecimiento de raíz	19
6.10	Aclaración de las raíces	20
6.11	Detección de almidón	21
6.12	Aislamiento de DNA total de tejidos vegetales	21
6.13	Análisis por PCR	21
6.14	Manejo de imágenes	22
VII	RESULTADOS	23
7.1	Análisis del desarrollo de la parte aérea de la mutante <i>clb5-1</i>	23
7.1.1	Desarrollo de la mutante <i>clb5-1</i> en diferentes condiciones de luz	23

7.1.2	Análisis de pigmentos	25
7.1.3	Desarrollo de la <i>clb5-1</i> en condiciones de baja luz	27
7.1.4	Desarrollo de la hoja en la mutante <i>clb5-1</i>	30
7.1.5	Tinción de almidón en la hoja de la mutante <i>clb5-1</i>	31
7.2	Análisis del sistema radical de la mutante <i>clb5-1</i>	32
7.2.1	La raíz primaria de la mutante <i>clb5-1</i>	32
7.2.2	Tinción de almidón de la raíz de la mutante <i>clb5-1</i>	36
7.3	Identificación y aislamiento del gen <i>CLB5</i>	37
7.3.1	Búsqueda del gen por delección.....	37
7.3.2	Búsqueda de mutantes albinas entre los genes.....	39
VIII	DISCUSION	40
8.1	Análisis del desarrollo de la parte aérea.....	40
8.2	El sistema radical de la mutante <i>clb5-1</i>	45
8.3	Los plástidos de la mutante <i>clb5-1</i>	47
8.4	Identificación del gen <i>CLB5</i>	48
IX	CONCLUSIONES	51
X	PERSPECTIVAS	52
XI	REFERENCIAS	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. A, Planta *Arabidopsis* de tipo silvestre: hojas verdaderas que muestran tricomas, su patrón próximo distal (\leftrightarrow) y su patrón centro-lateral (\Leftrightarrow) (modificado de Guriérrez-Nava, 2201). B, corte transversal de hoja: epidermis adaxial (ea), mesófilo de empalizada (mem), mesófilo esponjoso (mes), tejido vascular (tv) y epidermis abaxial (eb) (Modificado de Pyke y López-Juez, 1999) pág. 3

Figura 2. A) *Arabidopsis thaliana* en etapa reproductiva: hoja de roseta (hr), escapo (es), hojas caulina(hc) , inflorescencia (if) y silicua (si) (modificado de K. Sutliff en Meinke, 1998). B) *Arabidopsis thaliana* a los 10 días de haber germinado: brote (BR), raíz primaria (R) y raíz lateral (RL). C) Flor de *Arabidopsis* que muestra las estructuras florales de sépalos (s), pétalos (p), estambres (e) y carpelo (c) (modificada de Bowman, 2001). D) Mesitemo apical de la raíz de *Arabidopsis* : columela lateral (cl), epidérmis (ep), córtex (c), endodérmis (en), cilindro vascular o estele (es), centro quiascente (QC) y columela (co) en donde se pueden los gránulos de almidón (modificado de en Scheres, *et al.*, 2002). E) corte transversal de raíz primaria: protoxilema (px), protofloema (pp), periciclo (p), endodérmis (e), epidermis , córtex (c) y epidermis (ep) (modificado de Scheres, *et al.*, 1995? en Scheres, *et al.*, 2002). F) una sección de la raíz primaria de *Arabidopsis*: raíz lateral (RL), periciclo (P), endodérmis (E), córtex (C) y epidermis (EP), el asterisco indica el polo protoxilemático (modificado de Casimiro, 2001) pág. 5

Figura 3. Esquema que muestra los diferentes tipos de plástidos que se pueden encontrar en células vegetales y las rutas de interconversión posibles. El asterisco indica formas intermediarias de plástidos (imagen modifica de Buchanan *et al.*, 2000) pág. 7

Figura 4. Biogénesis del cloroplasto, donde se puede observar la maduración del complejo membranal interno o tilacoide. El asterisco indica estadios intermedios del desarrollo del cloroplasto. En la foto de microscopia electrónica y en el dibujo se pueden apreciar la membrana externa (me), la membrana interna (mi), la membrana tilacoidea granal (tg), la membrana tilacoidea estromal (te) y el estroma (es) del cloroplasto (Modificado de Vothknecht y Westhoff. 2001) pág. 9

Figura 5. Representación esquemática de la interacción núcleo-cloroplasto. La síntesis de proteínas codificadas por el genoma plastídico o plastoma (p-DNA) está regulada por factores codificados por el núcleo, señalización anterógrada. Al mismo tiempo el cloroplasto envía señales al núcleo respecto a su estado metabólico y de desarrollo, señalización retrógrada, que influyen sobre la expresión de genes nucleares. Esta figura se basa en el esquema de Rochaix, 1996 en Vothknecht y Westhoff. 2001 pág. 10

Figura 6. Morfología de las mutantes *clb*'s homocigas (A-F) y de la planta de tipo silvestre (G) a los 21 días de haber germinad. Escala= 5 mm. Imagen modificada de Gutiérrez-Nava, 2001 pág. 12

Figura 7. Examinación por microscopía electrónica de plástidos hojas verdaderas de plantas de 21 días de edad de tipo silvestre (A) y de mutantes homócigas *clb*'s (B-D). Escala=1 μ m. Imagen tomada de Gutiérrez-Nava , *et al.*, 2004 pág. 13

Figura 8. Plantas tipo Silvestre del ecotipo *Ler* y de la línea mutante *clb5-1* crecidas en tres diferentes concentraciones de luz. Las flechas indican la presencia de tricomas en las plantas albinas. Escala: *Ler* 1.5X, *clb5-1* 2X pág. 24

Figura 9. Análisis de pigmentos fotosintéticos en plantas de 15 días de edad de los ecotipos *Ler* y *WS*, y de las líneas mutantes *clal-1*, *clb6-1* y *clb5-1*. L=230 μ mol.m⁻².s⁻¹; ML=16 μ mol.m⁻².s⁻¹ y BL=230 μ mol.m⁻².s⁻¹. Se muestran los resultados de tres repeticiones \pm ES (n=10) pág. 26

Figura 10. Plantas de la línea de tipo silvestre (*Ler*) y plantas albinas de la mutante (*clb5-1*) a los 3 días de haber germinado bajo condiciones de alta luz (230 μ mol.m⁻².s⁻¹) y de baja luz (1 μ mol.m⁻².s⁻¹). Escala: *Ler* 1.5X, *clb5-1* 2X pág. 28

Figura 11. Plantas de tipo silvestre (*Ler*) y mutantes (*clb5-1*) crecidas en condiciones de alta luz (230 μ mol.m⁻².s⁻¹) y baja luz (1 μ mol.m⁻².s⁻¹). En alta luz se muestra a la planta de tipo silvestre a los 12 días de haber germinado y a la planta mutante a las 8 semanas de haber germinado. En baja luz se muestra tanto a la planta de tipo silvestre como a la mutante a los 18 días de haber germinado. Escala=1mm pág. 29

Figura 12. Plantas de la línea mutante *clb5-1* crecidas en condiciones de baja luz. **A)** Planta en la que se puede apreciar el desarrollo de sistema radical (R) y del brote (B), en el cual se puede ver la roseta (r), el escape (e) y la inflorescencia (f); **B)** Hojas caulinas que muestran un claro patrón adaxial-abaxial (planta crecida en caja Petri 150x15). **C)** Inflorescencia de una planta crecida en caja Petri 150x15 pág. 30

Figura 13. Tinción de almidón con KI-I₂ en hojas de plantas de la línea de tipo silvestre *Ler* y de la línea mutante *clb5-1*, crecidas en condiciones de alta luz (230 μ mol.m⁻².s⁻¹) y de baja luz (1 μ mol.m⁻².s⁻¹). Las flechas indican la presencia de almidón en células guarda. Los cuadros indican almidón de plástidos de algunos tipos celulares localizados cercanos al tejido vascular. Escala=10 μ m pág. 31

Figura 14. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de plantas de tipo silvestre (*Ler*) y de la línea mutante *clb5-1* crecidas bajo condiciones de alta luz (230 μ mol.m⁻².s⁻¹) y baja luz (1.5 μ mol.m⁻².s⁻¹) en tres diferentes medios de cultivo definidos por su concentración de sacarosa (0%, 1% y 2%). Se muestran los datos obtenidos de tres repeticiones \pm ES (n=15) pág. 33

Figura 15. Plantas de la línea de tipo silvestre (*Ler*) y de la línea mutante (*clb5-1*) crecidas en medio de cultivo MS adicionado con 1% de sacarosa en condiciones de alta luz (A) y baja luz (B). Las flechas indican la zona de transición entre el hipocotilo y la raíz. Los asteriscos indican la planta con la raíz más larga de cada grupo pág. 34

Figura 16. A) Densidad de primordios de raíces laterales (PRL) y **B)** densidad de raíces laterales (RL) que presentan plantas de tipo silvestre (*Ler*) y plantas de la línea mutante (*clb5-1*) de 8 días de edad crecidas bajo condiciones de alta luz (L) y de baja luz (BL). Se muestran los resultados de tres repeticiones \pm ES (n=10) pág. 35

Figura 17. Análisis cualitativo para la identificación por deleción del gen *CLB5*. Productos de PCR amplificados a partir de DNA total de plantas de tipo silvestre, del ecotipo *Ler*, y de la línea mutante *clb5-2* pág. 38

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Algunas mutantes albinas en las cuales se ha identificado el gen mutado y su función ...
..... pág. 11
- Tabla 2 .** Oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR pág. 21
- Tabla 3.** Condiciones de alineamiento y de extensión para la amplificación de los genes candidatos pág. 22
- Tabla 4.** Relación porcentual entre el contenido de pigmentos que las plantas albinas presentan respecto al contenido que presentan las plantas de tipo silvestre. Las mutantes *clb5-1* y *clb6-1* fueron comparadas con el ecotipo *Ler* y la mutante *clal-1* con el ecotipo *WS* pág. 27
- Tabla 5.** Presencia de raíces adventicias en plantas silvestres y mutantes a los ocho días de haber germinado en medio con 1% de sacarosa en condiciones de alta luz (L) y baja luz (BL). Se muestran los resultados de tres repeticiones \pm ES (n=10) pág. 36
- Tabla 6.** Genes contenidos en la región de 30Kpb acotada para el gen CLB5 pág. 39
- Tabla 7.** Mutantes por inserción de T-DNA de las colecciones SALK (Salk institute Genomic Análisis Laboratory) y SAIL (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library) pág. 39

I. RESUMEN

clb5-1 es una mutante albina de *Arabidopsis thaliana* que presenta alteraciones importantes en el desarrollo y la estructura de sus cloroplastos. El análisis estructural y molecular de la mutante ha demostrado que sus cloroplastos se encuentran arrestados en un estadio temprano de desarrollo y que el gen afectado actúa de manera autónoma celular (Gutirérrez-Nava, *et al.*, 2004). En el presente trabajo se abordó la caracterización de la mutante *clb5-1*, demostrado que esta mutante presenta un mejor desarrollo de hojas cuando es crecida en condiciones de luz que no causan daño fotooxidativo ($1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Por su parte, tanto en condiciones de alta iluminación ($230 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), que afectan el desarrollo de hojas, como en baja intensidad luminosa, la raíz primaria de la mutante no presenta alteraciones en su estructura y crecimiento, sin embargo, en condiciones de baja iluminación, la producción de raíces laterales es notablemente mayor al de la planta de tipo silvestre.

El mapeo genético del gen *CLB5* ha permitido ubicarlo en una región de 30 Kb del cromosoma 3 de *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo, se presentan los resultados de análisis moleculares y genéticos, de algunos de los genes contenidos en dicha región genómica, que se han seguido con la intención de identificar el gen afectado en la mutante.

II. INTRODUCCION

2.1 *Arabidopsis thaliana*, planta modelo en biología vegetal

La mutante *clb5-1*, objeto de estudio del presente trabajo, es una mutante albina de *Arabidopsis thaliana* que presenta alteraciones importantes en el desarrollo y la estructura de sus cloroplastos (Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004). Por lo tanto, que resulta conveniente comprender primero quien es *Arabidopsis thaliana* y cuál es su importancia en el área de la ciencia de la biología vegetal.

Arabidopsis thaliana es una planta dicotiledónea de la familia Brassicácea, ampliamente usada como organismo modelo en biología, que ha sido adoptada como modelo para el estudio de la biología vegetal debido a las ventajas que presenta para la investigación, entre ellas se incluyen las siguientes características:

- Ser una planta de tamaño pequeño, que puede ser crecida en invernadero o en cámaras de crecimiento, que se autofecunda y posee un ciclo de vida corto.
- *Arabidopsis* posee uno de los genomas más pequeños entre las plantas superiores, el cual está distribuido en 5 cromosomas y mide al rededor de 125 Mb. Se estima que contiene al rededor de 30 000 genes y que se puede encontrar un gen por cada 2Kb.
- *Arabidopsis* puede ser transformada (genética y transitoriamente) y puede ser mutagenizada por diferentes métodos, como químicos (usando etil metano sulfonato o EMS), por radiación (como "Fast Neutron"), por el uso de elementos transponibles (*Ds*) y en especial por inserción utilizando el T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*.
- Para ésta planta se cuenta con varios recursos genómicos, entre ellos la secuencia completa de su genoma, la cual se tiene desde el año 2000. Existen colecciones de mutantes por inserción (T-DNA) cercanas a la saturación. Se han elaborado arreglos genómico que contienen todo el transcriptoma y se encuentran disponibles más de 50 000 marcadores moleculares. Existen también bases de datos de secuencias de expresión (EST's), bibliotecas de DNA complementario (cDNA), y otros bancos de mutantes en diferentes Instituciones tanto públicas como privadas.
- La disponibilidad de información almacenada en diferentes bases de datos como TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, www.Arabidopsis.org), SALK (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu/>) y LEHLE SEEDS (Source for everythin *Arabidopsis*, www.arabidopsis.com)

Por todo lo anterior es notable el papel que ésta especie ha jugado en estudios de biología vegetal, siendo también un buen sistema para abordar problemas fundamentales de estructura y función común a otros los eucariontes (Meinke, *et al.*, 1998; Koornneef y Scheres, 2001; Alonso *et al.*, 2003; Zhang, *et al.*, 2004).

2.2 Generalidades del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta perteneciente a la familia *Brassicaceae* o *Cruciferaeae*, que presenta una amplia distribución en Europa, Asia y América del Norte. Esta angiosperma es una planta pequeña cuyo ciclo de vida toma de 6 a 8 semanas dependiendo del ecotipo y de las condiciones de crecimiento. Sus semillas, que miden alrededor de 0.5 mm, germinan fácilmente después de pasar por un tratamiento de frío (4°C), el cual rompe la dormancia (Meinke, *et al.*, 1998; Koornneef y Scheres, 2001). Tanto el brote primario como la raíz primaria se producen a partir de los meristemos apicales del brote y de la raíz, SAM y RAM respectivamente (por su siglas en inglés), los cuales se establecen durante la embriogénesis (Van den Berg, *et al.*, 1998; Nelissen, 2003).

Las plántulas presentan un par de cotiledones en posición opuesta, que al formarse durante la embriogénesis no derivan del SAM, sin embargo presentan tanto una estructura como diferenciación celular similar a la de hojas verdaderas, excepto por que no presentan tricomas. El primer par de hojas verdaderas tienen tricomas en la parte adaxial junto con las hojas subsecuentes que forman roseta, la cual llega a medir de 2 a 10 cm de ancho, tienen tricomas en ambos lados (Van den Berg, *et al.*, 1998; Nelissen, 2003). La hoja de *Arabidopsis* presenta la simetría típica de las angiospermas, con tres ejes: el próximo-distal, el centro-lateral y el adaxial-abaxial (Leyser y Day, 2003) (Fig.1A y B). La estructura de la hoja comprende cinco capas celulares: la epidermis adaxial, el mesófilo de empalizada (células columnares características), el tejido vascular, el mesófilo esponjoso (células isodiamétricas) y la epidermis abaxial (Fig.1B). Se estima que la hoja consiste de 10 diferentes tipos celulares cuya coordinación en división y desarrollo llevan a la formación “correcta” del órgano. (Pyke y López-Juez, 1999).

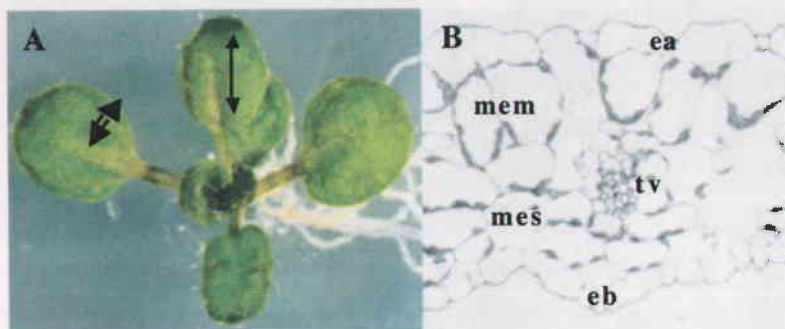


Figura 1. A) Planta *Arabidopsis* de tipo silvestre: hojas verdaderas que muestran tricomas, su patrón próximo distal (\leftrightarrow) y su patrón centro-lateral (\leftrightarrow) (modificado de Guriérrez-Nava, 2201). B) corte transversal de hoja: epidermis adaxial (ea), mesófilo de empalizada (mem), mesófilo esponjoso (mes), tejido vascular (tv) y epidermis abaxial (eb) (Modificado de Pyke y López-Juez, 1999)

Con el estudio genético, estructural y fisiológico en plantas de tipo silvestre, mutantes y líneas transgénicas, se han identificado genes como *ASIMETRIC LEAVES 1 (ASI)*, *PHABULOSA (PHAB)*, *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* y *YABBY (YAB)*, entre otros, involucrados en el desarrollo de la hoja, particularmente en su iniciación, simetría y crecimiento (Pyke y López-Juez, 1999; Leyser y Day, 2003; Nelissen, 2003); también se han realizado varios estudios donde se demuestra que el desarrollo de la hoja está regulado por factores como luz, hormonas, azúcares y el desarrollo de los cloroplastos (Pyke y López-Juez, 1999; Weston, et al., 2000; Leyser y Day, 2003)

En *Arabidopsis*, el tallo elongado, que se conoce como escapo floral, produce una inflorescencia apical indeterminada. A partir de los yemas que se presentan en las hojas caulinas del escapo se generan otras inflorescencias. *Arabidopsis* tiene una flor típica de crucíferas, la cual mide alrededor de 2 mm y presenta cuatro verticilios de órganos florales: sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Los primordios florales aparecen a las 2 semanas después de haber germinado y la fertilización tiene lugar a las 3 semanas, y una vez que se producen las silicuas (frutos en forma de vaina) el desarrollo de la semilla se toma de 2 a 3 semanas (Koornneef y Scheres, 2001) (Fig.2A y C).

El sistema radical de *Arabidopsis* se compone de la raíz primaria, la cual tiene un origen embrionario y de raíces laterales, que se originan de manera potsembrionaria (Fig. 2B). La raíz primaria de *Arabidopsis* presenta una estructura simple, formada por varios tejidos dispuestos de manera radial, siendo la capa de células epidérmicas la más externa, seguida de los tejidos corticales y endodermiales que rodean al tejido vascular el cual se sitúa en el centro de la raíz (Fig. 2D). Los tipos celulares antes mencionados se forman a partir de sus respectivas células iniciales que se encuentran en el meristemo apical de la raíz (RAM) (Fig. 2E) (Casimiro, et al., 2003; Malamy y Benfey, 1997a y b; Van den Berg, et al., 1998). Las raíces laterales son estructuralmente parecidas a la raíz primaria, presentando las mismas capas celulares en la misma disposición e incluyendo un meristemo apical; las raíces laterales son por sí mismas capaces de producir nuevas raíces laterales, lo que permite la ramificación de la raíz y el eventual desarrollo de un sistema radical complejo (Casimiro, et al., 2003; Reed, et al., 1998; Van den Berg, et al., 1998; Malamy y Benfey, 1997a y b; Celeza, et al., 1995)

Las raíces laterales se generan a partir de células del periciclo (células fundadoras) adyacentes a los polos protoxilemáticos. Cabe mencionar que aún cuando la mayoría de las células del periciclo continúan su proliferación, no todas llegan a ser células fundadoras, permaneciendo quiescentes y manteniendo la integridad de la raíz parental (Dubrovsky, et al., 2000; Dubrovsky, 2002). De ésta manera una célula fundadora, que no requiere desdiferenciarse, da lugar a un primordio de raíz lateral (PRL) mediante una serie de divisiones celulares, anticlinales y periclinales, y de la expansión

celular, que llevan a la formación de una estructura ordenada compuesta de diferentes capas celulares, las cuales son análogas a las presentes en la raíz primaria. Las células en el primordio se diferencian y se elongan, causando que la estructura emerja a través de la epidermis de la raíz primaria, momento en que se le denomina raíz lateral (RL); poco después de haber emergido en la raíz lateral se puede ver mas claramente en su extremo apical el establecimiento de una estructura cuya organización se relaciona con la estructura del RAM (Malamy y Benfey, 1997a y b) (Fig.2F).

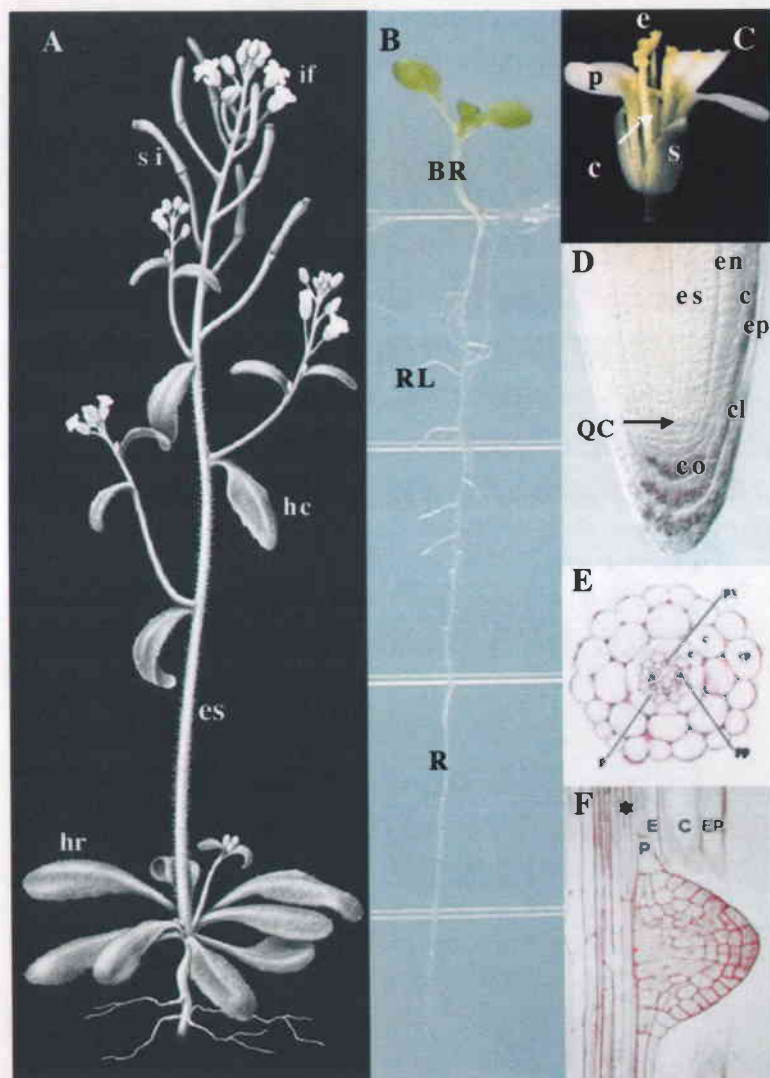


Figura 2. **A)** *Arabidopsis thaliana* en etapa reproductiva: hoja de roseta (hr),escapo (es), hojas caulina(hc) , inflorescencia (if) y silicua (si) (modificado de K. Sutliff en Meinke, 1998). **B)** *Arabidopsis thaliana* a los 10 días de haber germinado: brote (BR), raíz primaria (R) y raíz lateral (RL). **C)** Flor de *Arabidopsis* que muestra las estructuras florales de sépalos (s), pétalos (p), estambres (e) y carpelo (c) (modificada de Bowman, 2001). **D)** Mesitemo apical de la raíz de *Arabidopsis* : columela lateral (cl), epidermis (ep), córtex (c), endodermis (en), cilindro vascular o estele (es), centro quiascente (QC) y columela (co) en dónde se pueden los gránulos de almidón (modificado de en Scheres, *et al.*, 2002). **E)** corte transversal de raíz primaria: protoxilema (px), protofloema (pp), periciclo (p), endodermis (e), epidermis , córtex (c) y epidermis (ep) (modificado de Scheres, *et al.*, 1995? en Scheres, *et al.*, 2002). **F)** una sección de la raíz primaria de *Arabidopsis*: raíz lateral (RL), periciclo (P), endodermis (E), córtex (C) y epidermis (EP), el asterisco indica el polo protoxilemático (modificado de Casimiro, 2001)

El mecanismo por el cual se inicia la formación de una RL aún se desconoce (Dubrovsky, 2002), sin embargo gracias al estudio genético, estructural y fisiológico de plantas de tipo silvestre, como *Columbia (Col)* y *Landsberg erecta (Ler)*, mutantes como (*alf4*, *alf3*, *tir*, *hbt* y *shr* entre otras) y líneas transgénicas (como *uidA* y *Ccyclin B1;1-Gus*), se ha demostrado que en la producción de raíces laterales tienen un papel importante la presencia de auxinas, el transporte de éstas, el estado

nutricional de la planta y la concentración de sacarosa en el medio de cultivo; también se propone que el patrón de formación tanto de la raíz primaria como de las raíces laterales puede estar regulado por un conjunto similar de genes (Celeza, *et al.*, 1995; Malamy, y Benfey, 1997b; Van den Berg, *et al.*, 1998; Dubrovsky, *et al.*, 2000; Casimiro, *et al.*, 2001; Malamy y Ryan, 2001; Dubrovsky, 2002; Casimiro, *et al.*, 2003).

Factores tales como luz y azúcares, entre otros, pueden promover el desarrollo de raíces adventicias en el brote primario. Se ha encontrado que en *Arabidopsis* estos órganos, cuya estructura es idéntica a la de la raíz primaria, inician su desarrollo en el hipocótilo a partir de células del periciclo de manera similar a como lo hacen las raíces laterales (Takahashi, *et al.*, 2003).

2.3 Los plástidos

Como se ha mencionado en párrafos anteriores la mutante *clb5-1* presenta alteraciones importantes en el desarrollo y la estructura de sus cloroplastos. Los cloroplastos son un tipo particular de plástidos.

Los plástidos son un grupo esencial de organelos semiautónomos (que tienen genoma propio) que se encuentran presentes en las células vegetales (Fig. 3). Todos los plástidos se derivan de plástidos pequeños e indiferenciados denominados proplástidos (con 0.2 a 1 μm de diámetro) que se encuentran en las células meristemáticas (de 10 a 20 por célula) los cuales, durante la diferenciación celular, se desarrollan y diferencian en distintos tipos funcionales, mediante programas de expresión génica específicos (Bauer, *et al.* 2001; Buchanan *et al.*, 2000; Pyke, 1999; Mullet, 1988). Las diferentes formas de plástidos se caracterizan por su función órgano-específica o tejido-específica, y se clasifican según su función o con base en características particulares. Así podemos tener dos grandes grupos, los cromoplastos y los leucoplastos. Dentro del grupo de los cromoplastos se encuentran los plástidos que acumulan pigmentos, que generalmente se encuentran en células de órganos florales o de frutos; en particular a los cromoplastos que acumulan clorofila y en los que se lleva a cabo la fotosíntesis se les llama cloroplastos. Como leucoplastos se denominan a los plástidos que no acumulan pigmentos, y se les nombra según las moléculas que almacenan, como el almidón (amiloplastos), lípidos (elaioplastos) y proteínas (proteinoplastos). También podemos mencionar a los gerontoplastos, que son cloroplastos senescentes, y a los etioplastos, que son plástidos que se encuentran en tejidos no expuestos a la luz o que se forma a partir de la dediferenciación de un cloroplasto por la ausencia de luz (Bauer, *et al.*, 2001; Yu y Li, 2001; Buchanan *et al.*, 2000; Cronquist, 1997) (Fig. 3).

Los estudios sobre el control molecular de la diferenciación plastídica en la planta *Arabidopsis* se han enfocado principalmente en la transición plástido-cloroplasto en el desarrollo de hoja. Sin embargo, los plástidos sufren otros procesos de diferenciación dependiente del tipo celular en que el plástido reside. También hay cabida para íter conversión entre los diferentes tipos de plástidos, un ejemplo claro es el paso de cloroplasto (que es un cromoplasto) a un leucoplasto en el desarrollo del pétalo (Pyke y Page, 1998) (Fig.3).

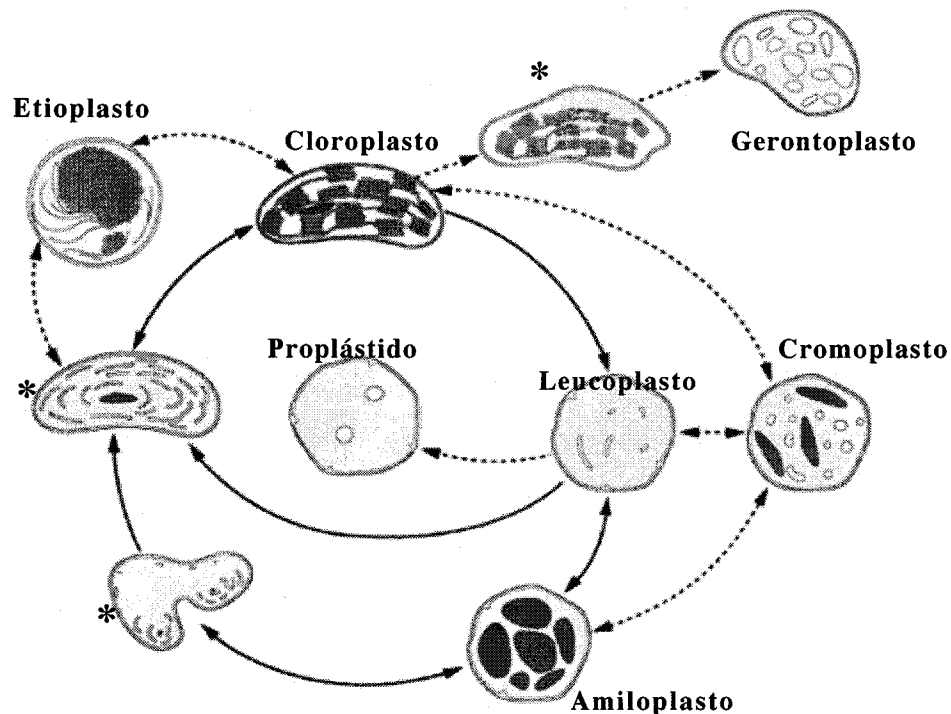


Figura 3. Esquema que muestra los diferentes tipos de plástidos que se pueden encontrar en células vegetales y las rutas de interconversión posibles. El asterisco indica formas intermedias de plástidos (imagen modifica de Buchanan *et al.*, 2000).

Los plástidos más complejos y mejor estudiados son los cloroplastos, debido en gran parte a su importancia funcional, ya que en ellos se lleva a cabo el proceso de fotosíntesis, así como varias vías metabólicas esenciales para la planta, que incluyen la biosíntesis de carbohidratos, lípidos y ácidos grasos, y el metabolismo de aminoácidos (Pyke, 1999; Buchanan *et al.*, 2000). La estructura compleja del cloroplasto refleja sus diversas funciones. En plantas superiores los cloroplastos son estructuras altamente organizadas, de forma elipsoidal o lenticular (4 a 6 μm de diámetro) cuyo número varía dependiendo del tipo celular y estado de desarrollo del órgano. *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, presenta más de 100 plástidos en cada una de las células de mesófilo. Los cloroplastos se encuentran delimitados por un sistema de doble membrana (membrana interna y membrana externa); el sistema membranal interno, conocido como membrana tilacoidea, la cual presenta regiones organizadas en conjuntos de "sacos" apilados, denominado tilacoide grana, y regiones sin

apilar expuestas al medio fluido (estroma) que se denomina tilacoide estromal. Las membranas del tilacoide están todas interconectadas delimitando un espacio interno conocido como lumen (Buchanan *et al.*,2000; Bauer *et al.*, 2001) (Fig.4).

2.4 La biogénesis del cloroplasto

Al proceso por el cual se desarrolla el cloroplasto a partir del proplástido se le denomina “biogénesis del cloroplasto”. Este proceso involucra un programa específico de expresión génica, considerado como el mayor evento subcelular que se presenta durante la fotomorfogénesis. Los eventos regulatorios que dan lugar a cambios estructurales (aumento de volumen y de expansión de la membrana) y funcionales (fotosíntesis) del organelo, involucran tanto la expresión de genes controlada por luz como el transporte y ensamblaje de una gran cantidad de proteínas, que en su mayoría están codificadas en el genoma nuclear (entre 2500 a 3000 proteínas), sintetizadas como precursores en el citosol y transportadas al cloroplasto gracias a la presencia de un péptido de tránsito en su extremo amino terminal. Este péptido de tránsito es reconocido y modificado por los complejos de traslocación proteica de la membrana externa ó Toc (translocon at the outer envelope membrane of chloroplast) y de la membrana interna ó Tic (translocon at the inner envelope membrane of chloroplast) del organelo (Bisanz, *et al.*, 2003; Bauer, *et al.*, 2001; Reiter, *et al.*,1994).

Los cloroplastos (al igual que todos los plástidos) presentan un genoma autónomo, que codifica alrededor de 100 proteínas, mientras que en el genoma nuclear residen la mayoría de los genes que se requieren para la función y mantenimiento de este organelo. Dada la separación física de la información genética requerida para el desarrollo y función de los plástidos se ha demostrado que se requiere de una expresión coordinada de ambos genomas (Bisanz, *et al.*, 2003; Mayfield y Taylor, 1987). Esta coordinación se encuentra influenciada por diferentes tipos de señales externas, principalmente la luz, y de señales del estado metabólico y del desarrollo del plástido. Estas señales a su vez son necesarias para el metabolismo, el desarrollo y la diferenciación celular y, consecuentemente, para la morfogénesis de la hoja y posiblemente de otros órganos (Mullet 1988; León *et al.*,1998; Aluru *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2001; Motohashi, *et al.*,2001; Surpin *et al.*, 2002; Larkin *et al.*, 2003; Babychuk, *et al.*,2003).

Hasta el momento se sabe poco sobre los mecanismos que controlan la biogénesis de cloroplasto. Se ha encontrado que en la regulación de la transcripción del genoma cloroplástico se encuentran involucradas dos diferentes RNA polimerasas: una codificada en el núcleo (Nuclear Encoded Polimerase, NEP), la cual transcribe los genes que codifican para proteínas plastídicas y otra codificada en el cloroplasto (Plastid Encoded Polimerase, PEP), que se encarga de transcribir los

genes fotosintéticos y no fotosintéticos. La actividad de ambas enzimas varía de acuerdo al estado de desarrollo del cloroplasto y en respuesta a diferentes señales (Krupinska y Falk, 1994; Gutiérrez-Nava, 2001).

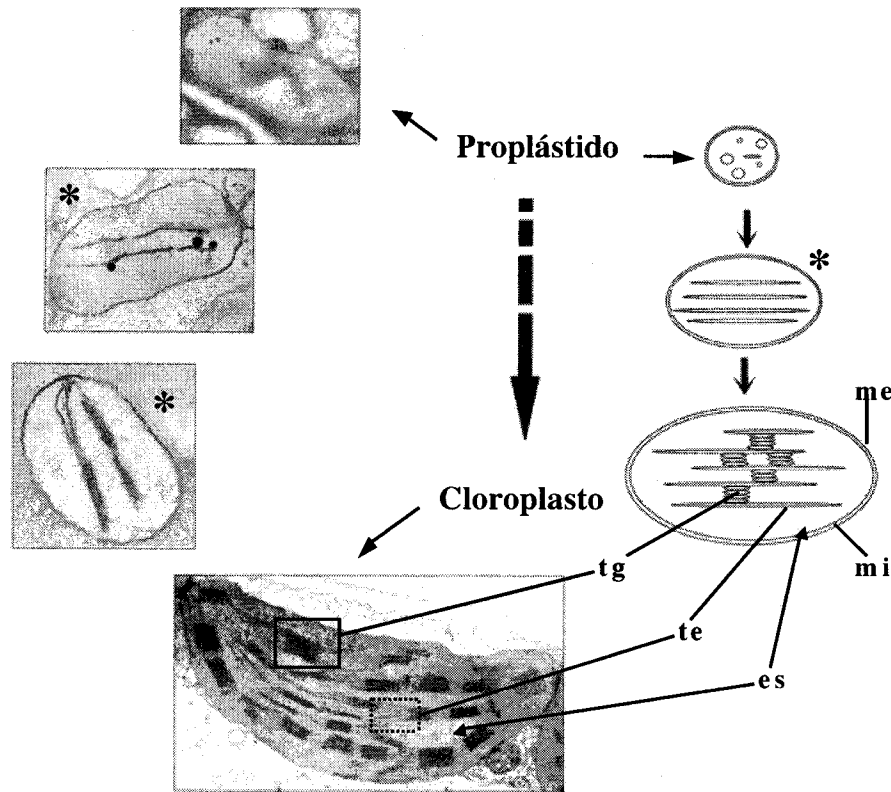


Figura 4. Biogénesis del cloroplasto, dónde se puede observar la maduración del complejo membranar interno o tilacoide. El asterisco indica estadios intermedios del desarrollo del cloroplasto. En la foto de microscopía electrónica y en el dibujo se pueden apreciar la membrana externa (me), la membrana interna (mi), la membrana tilacoidea granal (tg), la membrana tilacoidea estromal (te) y el estroma (es) del cloroplasto (Modificado de Voithknecht y Westhoff. 2001).

Por otro lado, distintas vías de señalización de plástido-núcleo se han propuesto con base en estudios fisiológicos, genéticos y moleculares (Larkin, et al., 2003). Una de ellas es la conocida como “señalización anterógrada”, en la que se postula que existen genes nucleares que regulan la expresión de genes cloroplásticos y por lo tanto controlan el desarrollo de este organelo; entre los genes involucrados en esta señalización se encuentran los que codifican para proteínas que regulan la transcripción y regulación de genes plastídicos, como es el caso del gen de Ribulosa bifosfato carboxilasa (Rubisco) (Aluru y Rodermel, 2004) (Fig.5).

Gracias al estudio de plantas que presentan afectación en el desarrollo del cloroplasto, ya sean plantas de tipo silvestre tratadas con norflurazón (un herbicida que causa la acumulación de fitoeno y la fotooxidación del aparato fotosintético) o mutantes con alteraciones de pigmentación, se

ha evidenciado que que existe una conexión entre la integridad del cloroplasto y la regulación de genes nucleares (Bisanz, *et al.*, 2003; Bauer, *et al.*, 2001). Así se ha postulado la vía de “señalización retrógrada”, donde estarían implicadas señales químicas procedentes del cloroplasto (a lo que se le ha llamado “el factor plastídico”) por medio de dos vías de señalización, una mediada por tetrapirroles y otra mediada a través de señalización por óxido-reducción (Surpin *et al.*, 2002) (Fig.5).

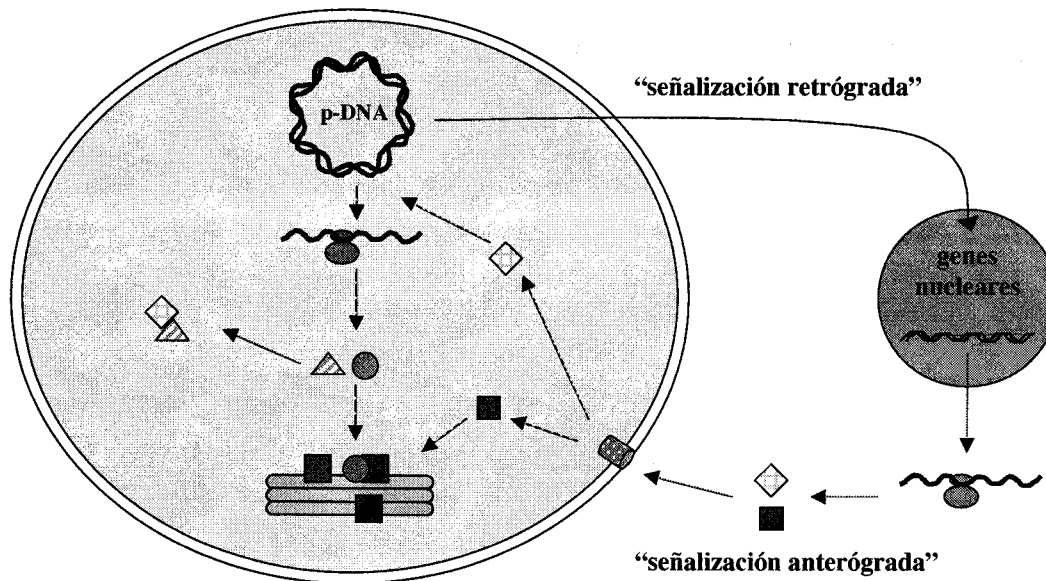


Figura 5. Representación esquemática de la interacción núcleo-cloroplasto. La síntesis de proteínas codificadas por el genoma plastídico o plastoma (p-DNA) está regulada por factores codificados por el núcleo, señalización anterógrada. Al mismo tiempo el cloroplasto envía señales al núcleo respecto a su estado metabólico y de desarrollo, señalización retrógrada, que influyen sobre la expresión de genes nucleares. Esta figura se basa en el esquema de Rochaix, 1996 en Vothknecht y Westhoff. 2001.

2.5 Mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la biogénesis del cloroplasto

Una de las estrategias más exitosas seguidas para abordar el estudio del desarrollo del cloroplasto es el aislamiento y caracterización de mutantes con alteraciones en pigmentación, que es una manera sensitiva de monitorear la función plastídica por que el fenotipo es de fácil registro (Bisanz, *et al.*, 2003). Entre ellas destacan las reticuladas como *chlorophyll a/b-binding* [CAB] *protein underexpressed 1* (*cue1*) (Streatfield, *et al.*, 1999), las variegadas como *immutans* (*im*) (Aluru, *et al.*, 2001), las verde pálido como *pale cress* (*pac*) (Reiter, *et al.*, 1994) y *albino or pale green mutant 1* (*apg1*) (Motohashi, *et al.*, 2003), las amarillas como *differentiation and greening* [DAG]-like [DAL] *1 mutant* (*dal1-2*) (Bisanz, *et al.*, 2003) y *jovtenky* (*jov*) (Babiychuk, *et al.*, 2003) y varias mutantes con fenotipo albino (que es producto de una pérdida severa de pigmentos fotosintéticos), de las que algunas se ha identificado el gen mutado y se ha podido descifrar su función (Tabla 1), gracias a la

caracterización de las mutantes y la clonación del respectivo gen (“forward genetics”) y del establecimiento de la función (alterada en la mutante) de la proteína codificada por el gen en cuestión.

Tabla 1. Algunas mutantes albinas en las cuales se ha identificado el gen mutado y su función.

Proceso	Mutante	Gen	Función	Referencia
Señalización	<i>gun-4</i> (<i>genomes uncupled</i>)	<i>GUN4</i>	GUN4 es una proteína plastídica que participa en la señalización plástido-núcleo	Larkin, <i>et al.</i> , 2003
Transporte	<i>alb3</i> (<i>albino 3</i>)	<i>ALB3</i>	Proteína de membrana cloroplástica, vía SRP ¹	Sundberg, <i>et al.</i> , 1997 Moore, <i>et al.</i> , 2000
	<i>apg2</i> (<i>albino and pale green</i>)	<i>APG2</i>	Componente del sistema de transporte de proteínas a cloroplasto dependiente de ΔpH	Motohashi, <i>et al.</i> , 2001
	<i>ppi2</i> (<i>plastid protein import</i>)	<i>TOC159</i>	GTPasa componente del TOC ²	Bauer, <i>et al.</i> , 2000
Metabolismo	<i>clal-1</i> (<i>cloroplastos alterados</i>)	<i>CLAI</i>	Enzima DXS ³ de la vía MEP ⁴	Mandel, <i>et al.</i> , 1996 Estévez, <i>et al.</i> , 2000
	<i>clb4</i> (<i>chloroplast biogenesis</i>)	<i>ISPG</i>	Enzima HDS ⁵ de la vía MEP ⁴	Gutiérrez-Nava, <i>et al.</i> , 2004
	<i>clb6</i> (<i>chloroplast biogenesis</i>)	<i>ISPH</i>	Enzima HDR ⁶ de la vía MEP ⁴	Guevara-García, <i>et al.</i> , 2005

1. Vía partícula reconocedora de la señal [signal recognition particle] (SRP)
1. Complejo de traslocación protéica de la membrana externa del cloroplasto (translocon at the outer envelope membrane of chloroplast)
1. 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato sintasa
1. Vía del Metil Eritritol Fosfato (MEP) para la síntesis de isoprenoides
1. 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato reductasa
1. 1-hidroxi-2-metil-butenil 4-fosfato reductasa

III. ANTECEDENTES

Con el objetivo de identificar nuevos genes nucleares involucrados en el desarrollo de cloroplasto Gutiérrez-Nava, *et al.* (2004) realizó un escrutinio de mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presentaban alteraciones en el contenido de pigmentos fotosintéticos, del cual se aislaron 9 mutantes con fenotipo albino a las que se les llamó *chloroplast biogenesis (clb)*, éstas mutantes son letales en estado homocigoto y genéticamente se comportan como recesivas. De dichas mutantes, una resultó ser alélica a la mutante *cla1-1* previamente caracterizada (Mandel *et al.*, 1996; Estévez *et al.*, 2000), las mutantes *clb4-1* y *clb6-1* están mutadas en los genes *ISPG* y *ISPH*, respectivamente, que codifican para las enzimas HDS y HDR de la vía MEP (Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004 y Guevara-García, *et al.*, 2005). Las demás mutantes *clb* corresponden a genes no caracterizados, de las cuales tres mostraron ser alelos de un mismo gen (*clb5-1*, *clb5-2* y *clb5-3*). Las mutantes *clb* son letales en estado homocigoto y genéticamente se comportan como recesivas (Fig.6).

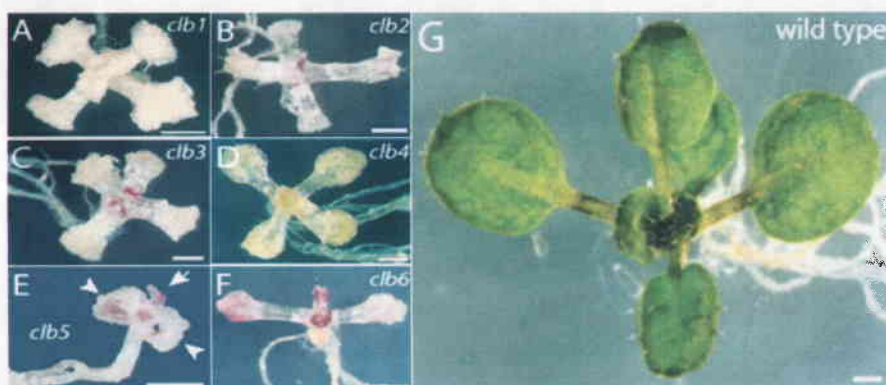


Figura 6. Morfología de las mutantes *clb*'s homocigotas (A-F) y de la planta de tipo silvestre (G) a los 21 días de haber germinado. Escala= 5 mm. Imagen modificada de Gutiérrez-Nava, 2001.

El análisis del desarrollo de las mutantes *clb* en condiciones de fotoperiodo con $120\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz, mostró que todas las mutantes *clb* presentan menos del 2% del contenido de clorofila que presentan la planta de tipo silvestre y que las mutantes muestran alteraciones en su desarrollo en comparación al de las plantas de tipo silvestre. En general las mutantes *clb* presentan fenotipos anormales en la morfología de la hoja, siendo la mutante *clb5-1* (objeto de estudio del presente trabajo) la que mostró el efecto más severo, desarrollando cotiledones pequeños, con protuberancias y encorvamiento tal que la parte adaxial del cotiledón toca el hipocótilo (Fig.6E). En *clb5-1*, las primeras hojas verdaderas no presentan diferenciación entre el peciolo y la lámina foliar, y muestran una morfología radializada con proyecciones dactiliformes, que parecen perder el patrón dorsoventral, y en las que aparentemente se pierde el tejido del mesófilo siendo reemplazado por un espacio vacío entre la epidermis y el tejido vascular. Una de las mutantes, la *clb1-1*, mostró un desarrollo menos afectado sin embargo no llegó a producir semillas. (Gutiérrez-Nava, 2001; Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004).

El análisis estructural por microscopía electrónica de los cloroplastos de las mutantes *clb* mostró que, en comparación con los cloroplastos de la planta de tipo silvestre, estos organelos se encuentran arrestados en estadios tempranos de diferenciación (Fig.7). Los plástidos de la mutante *clb5-1* son los más afectados presentando estructuras vesiculares similares a las encontradas en proplástidos (Fig.7F). Este estudio sugiere una correlación entre la afectación del desarrollo del cloroplasto y la alteración en el desarrollo de la hoja en la mutante *clb5-1*, que no es fácil de establecer para las otras mutantes *clb*. Dicha observación proponía que éstas mutantes pudieran estar afectadas en diferentes vías requeridas para el desarrollo del cloroplasto y que tales vías pueden no tener igual importancia en el desarrollo de la hoja (Gutiérrez-Nava, 2001; Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004).

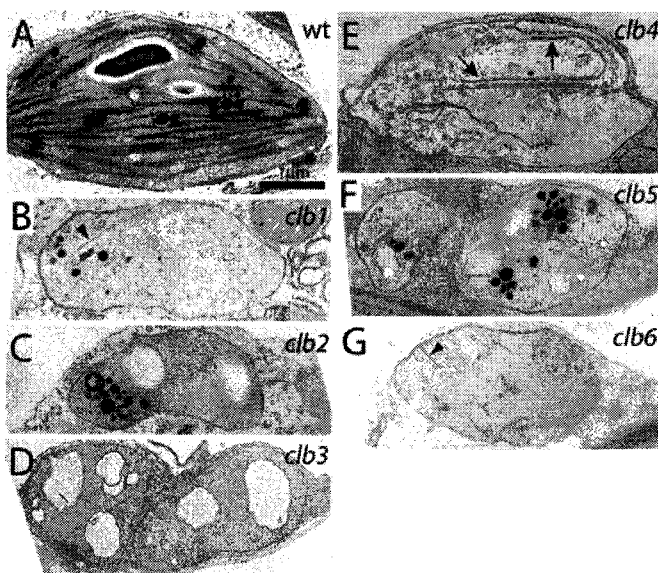


Figura 7. Examinación por microscopía electrónica de plástidos hojas verdaderas de plantas de 21 días de edad de tipo silvestre (A) y de mutantes homocigotas *clb*'s (B-D). Escala=1µm. Imagen tomada de Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004.

Los embriones albinos de las mutantes *clb* presentan una morfología normal. El estudio detallado a través de microscopía de fluorescencia de los embriones de éstas mutantes reveló que en las mutantes *clb4* y *clb6* existe una acumulación pequeña de clorofila en la raíz embrionaria. Siendo más abundante cerca tejido micropilar, que es la unión entre el tejido materno y el embrión. Esta restauración parcial en la producción de clorofila en el embrión ha llevado a sugerir que la planta madre es capaz de complementar parcialmente la mutación durante ésta etapa de desarrollo. Este fenotipo que también se observa en la mutante *clal-1*, se ha denominado no autónomo celular. En las otras mutantes *clb*, como es el caso de *clb5-1*, no se encontró acumulación de clorofila en ninguna parte del embrión por lo tanto se ha propuesto que *clb5-1* se comporta como una mutación autónoma celular (Gutiérrez-Nava, 2001; Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004).

Con el propósito de descartar la posibilidad de que el fenotipo albino de las mutantes *clb* fuera consecuencia de un daño fotooxidativo de los cloroplastos, debido a que, tanto el aislamiento como

el análisis morfológico fue realizado bajo condiciones de alta luz ($120\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), las mutantes se crecieron en condiciones de baja luz ($5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), encontrando que la baja iluminación no revierte el fenotipo albino y que su desarrollo semeja al de las plantas de tipo silvestre crecidas bajo las mismas condiciones (Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004).

Con el objetivo final de identificar los genes *CLB* se realizó el mapeo genético de las mutaciones mediante la secuencias simples polimórficas (SSLPs) (Lukowitz, *et al.*, 2000). De ésta manera se logró obtener un mapa genético aproximado para cada una de las mutaciones *clb*. En particular el gen *CLB5*, objeto de interés del presente trabajo, se ubicó en el cromosoma III ligado al marcador *nga 172* (Gutierrez-Nava, *et al.*, 2004).

Finalmente a través del estudio de la expresión de varios genes nucleares como el rRNA 16S (*mrl65*), el gen *rpl21*, que codifica para una proteína ribosomal plastídica, y la subunidad pequeña de la Rubisco (*RBCS*), y de la expresión de genes cloroplásticos como una subunidad de la acetil-CoA carboxilasa (*accD*) y el gen *psbA* que codifica para la proteína D1 del fotosistema II, considerados como marcadores moleculares del estado de desarrollo y función del cloroplasto, se encontró que la mutante *clb5-1* contiene niveles reducido de los transcritos de éstos genes, apoyando la idea de que los plástidos en ésta mutante están severamente afectados y arrestados en una etapa desarrollo temprano (Gutiérrez-Nava, 2001).

Con los resultados del estudio preliminar de las mutantes *clb*, se ha propuesto que cada mutación afecta genes que participan en diferentes etapas del proceso de desarrollo de cloroplasto, situando a la mutante *clb5-1* al inicio de dicho proceso (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004). Por lo tanto, la caracterización más detalla de la mutante *clb5-1* puede proporcionar información valiosa sobre los factores que están involucrados en los estadios tempranos del desarrollo de el cloroplasto, lo que además puedan servir como base para el entendimiento de las vías que son requeridas para la diferenciación y el desarrollo éste organelo.

IV. HIPOTESIS

El gen *CLB5* participa en etapas tempranas de la biogénesis de cloroplasto y podría afectar la diferenciación de otros tipos de plástidos.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Estudiar la participación del gen *CLB5* durante la biogénesis de diferentes plástidos.

5.2 Particulares

1. Análisis morfológico de la mutante *clb5-1* en diferentes etapas de desarrollo y en diferentes tejidos (hoja y raíz).
2. Identificación y aislamiento del gen *CLB5*

IV. HIPOTESIS

El gen *CLB5* participa en etapas tempranas de la biogénesis de cloroplasto y podría afectar la diferenciación de otros tipos de plástidos.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Estudiar la participación del gen *CLB5* durante la biogénesis de diferentes plástidos.

5.2 Particulares

1. Análisis morfológico de la mutante *clb5-1* en diferentes etapas de desarrollo y en diferentes tejidos (hoja y raíz).
2. Identificación y aislamiento del gen *CLB5*

VI. MATERIAL Y METODOS

6.1 Material vegetal

En los diferentes experimentos de este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas silvestres: *Landsberg erecta* (*Ler*), *C24* y *Wassilewskija* (*WS*); y de las líneas mutantes: *cloroplastos alterados1-1* (*cla1-1*), cuyo fondo genético es *WS*, *chloroplast biogenesis6-1* (*clb6-1*), *chloroplast biogenesis5-1* (*clb5-1*), *chloroplast biogenesis5-2* (*clb5-2*), de fondo genético *Ler*, *SALK_139854*, *SALK_096658*, *SAIL_215_C03*, *SAIL_652_H07*, *SALK_041064*, *SAIL_294_C04*, *SALK_073252*, *SALK_129163*, *SALK_104138*, *SALK_110145*, *SALK_004031* y *SALK_116548*, con fondo genético de *0* (*Col-0*). También se emplearon las líneas transgénicas: *pFIL-GUS* y *pREV-GUS* donadas amablemente por el Dr. John L. Bowman de la Universidad de California, Davis, California, EUA.

6.2 Germinación y crecimiento de las plantas

Para ser germinadas en medio de cultivo las semillas fueron esterilizadas en alcohol etílico al 100% por 1 min, hipoclorito de sodio al 1.8 % (v/v) por 7 min, y posteriormente enjuagadas con agua estéril por 1 min (5 veces). Una vez sembradas en el medio de cultivo las semillas fueron conservadas a 4°C durante 4 días (para romper la dormancia) y posteriormente fueron colocadas en condiciones de fotoperiodo 16 hrs luz: 8 hrs oscuridad (16:8) a una temperatura de 24°C. Las condiciones de luz que se utilizaron en éste trabajo fueron de 230 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (alta iluminación, alta luz o L), 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (iluminación media, media luz o ML) y 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (baja iluminación, baja luz o BL).

En la distribución de las semillas en medio de cultivo se probaron tres diferentes “vehículos” para la distribución de la semilla: agua estéril, solución de agarosa 0.1% (w/v); medio GM adicionado con sacarosa al 1% (w/v) y 0.1% de agar (w/v) (pH de 5.7).

Para el estudio de la parte aérea (hoja) se utilizó el medio de cultivo GM: sales de medio Murashige y Skoog 1X (SIGMA® y CAISSON, Laboratories, Inc.), vitaminas de medio Gamborg 1X, sacarosa al 1% (w/v) y 0.8% de agar (w/v) a un pH de 5.7. El medio fue puesto en cajas Petri de 100x25mm y de 150x25mm, y cajas MAGENTA (SIGMA-Aldrich, 2000). Para el

estudio de la raíz se utilizó el medio MS: sales y vitaminas de medio Murashige y Skoog 0.2X de su concentración (w/v), a un pH de 5.8, adicionado con agar al 0.8 % (w/v) y sacarosa al 0%, 1% y 2% (w/v), vertido en cajas Petri de 150x25mm y 100x15mm (cuadradas).

Para el crecimiento en sustrato se emplearon semillas conservadas a 4°C por al menos una semana. Las semillas fueron embebidas en agua de 5 a 30 min., posteriormente fueron sembradas en Metro-Mix 2000 (Scotts, MR) previamente esterilizado. Las macetas fueron puestas bajo condiciones de fotoperiodo 16:8 a una temperatura de 24 °C y regadas cada 3-4 días. Las macetas fueron protegidas contra la desecación por un periodo de 2 a 3 semanas con el objetivo de proteger a las plántulas. En los casos en que se transplantaron plántulas de medio de cultivo a sustrato, las plántulas (de 8 a 12 días) también fueron protegidas contra desecación por al menos una semana.

6.3 Selección de mutantes albinas

Para seleccionar plantas albinas de las líneas mutantes bajo estudio, se sembró la semilla en medio de cultivo (GM o MS dependiendo de análisis) y después de 6 días de haber germinado fue posible detectar aquellas plantas con fenotipo albino. Dependiendo del experimento a realizar las plantas albinas se cambiaron a cajas nuevas o las plantas con fenotipo silvestre (verdes) fueron extraídas del medio de cultivo.

6.4 Selección de plantas heterocigas

Para la selección de plantas heterocigas se utilizaron dos poblaciones, una de plantas germinadas directamente en sustrato y otra de plántulas verdes transplantadas de medio de cultivo a sustrato. Todas las plantas fueron mantenidas en las condiciones de crecimiento antes mencionadas. Las plantas heterocigas se seleccionaron por inspección visual de silicuas inmaduras, en busca de aquellas silicuas que segregaban embriones albinos. Las silicuas fueron montadas en porta objetos por medio de una cinta de doble pegamento y disectadas con la ayuda de dos agujas, abriendo la silicua longitudinalmente para exponer los embriones e identificar las plantas que presentaban embriones albinos (plantas heterocigas), las cuales se utilizaron para obtener semilla o para realizar cruza genéticas.

6.5 Cruzas dirigidas y selección de progenie recombinante

Para realizar las cruzas genéticas se utilizaron plantas adultas en etapa de floración crecidas bajo las condiciones antes mencionadas. Las plantas heterocigas de la mutante *clb5-1* fueron utilizadas como la línea materna, mientras que las líneas *pFIL-GUS* y *pREV-GUS* fueron utilizadas como donadoras de polen. Después de realizada la polinización manual, los carpelos fueron protegidos de la desecación de 3-6 días; las semillas fueron colectadas al madurar la silicua (de 2 a 3 semanas después de realizar la cruce).

Tanto para la selección de las líneas transgénicas *pFIL-GUS* y *pREV-GUS*, como de la progenie resultante de la cruce entre éstas líneas y mutante *clb5-1* (ver más adelante), se utilizaron plantas que presentaban escape. Las plantas fueron puestas en contenedores herméticos de plástico transparente y mantenidas en las condiciones de fotoperíodo, temperatura y riego, antes mencionadas, por un período de 3 a 4 semanas para su selección con el herbicida BASTA. El herbicida se utilizó en una dilución acuosa (1:1000), realizándose de 2 a 3 asperciones a intervalos de al menos una semana. Las plantas resistentes al herbicida fueron sometidas a la selección por embriones albinos y prueba histoquímica de GUS (ver más adelante).

6.6 Ensayo histoquímico de GUS

Para la detección de la expresión del gen reportero GUS (el cual codifica para la enzima β -glucoronidasa) se realizó el ensayo histoquímico reportado por Jefferson, *et al.* (1987). El tejido fue sumergido en una solución de tinción que contenía al substrato de la enzima β -glucoronidasa, el 5-bromo-4-cloro-3 indolil-glucoronido (X-Glu), a una concentración de 1mg/ml, aplicando vacío para facilitar su penetración al tejido. Las muestras se incubaron a 37°C de 12 a 16 hrs. La solución de X-Glu fue substituida por una mezcla de acetona:metanol (1:3), realizando de 2 a 3 cambios hasta eliminar los pigmentos del tejido y evidenciar la precipitación del índigo y por lo tanto de expresión de GUS. El tejido se enjuagó con agua y se preservó a 4 °C en glicerol al 50%. El análisis de actividad de GUS se realizó sobre hojas de plantas adultas de las líneas *pFIL-GUS* y *pREV-GUS*, *clb5-1* (heterociga), plantas de la generación F1 de la cruce entre éstas líneas y plantas albinas de la F2.

6.7 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Para la cuantificación de clorofilas a y b y carotenos se realizó la extracción de estos pigmentos con el método de Vázquez-Duhalt y Greppin (1987), utilizando plántulas de 15 días de edad de los ecotipos *Ler* y *Ws* y de las líneas mutantes *cla1-1*, *clb6-1* y *clb5-1* (plántulas albinas). El material vegetal fue sumergido en una solución de diclorometano-metanol (1:2) durante 4 hrs en obscuridad a una agitación constante. Posteriormente la absorbancia (A) de los extractos fue medida en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 450 nm, 645nm y 663nm. Para medir al espectro los extractos de plantas silvestres se usó una dilución extracto:solución de extracción 1:10.

Para calcular la cantidad de pigmentos expresada en μg de pigmento por mg de tejido fresco se utilizaron las siguientes fórmulas (Vázquez-Duhalt, *com. per.*):

Clorofila a $[(12.7)(A_{663\text{nm}})] - [(2.69)(A_{645\text{nm}})]$

Clorofila b $[(22.9)(A_{645\text{nm}})] - [(4.64)(A_{663\text{nm}})]$

Carotenos $[(4)(A_{450\text{nm}})]$

Para obtener la concentración específica de pigmentos el resultado de cada fórmula se multiplicó por el factor de dilución, obteniendo los μg de pigmento por ml de extracto; este resultado se multiplicó por los ml totales de extracción y se dividió entre los mg de tejido fresco para obtener la cantidad de pigmento expresado en μg de pigmento por mg de tejido fresco.

6.8 Cinética del crecimiento de raíz

Para el análisis del crecimiento de la raíz primaria se utilizaron plantas del ecotipo *Ler* y de la línea mutante *clb5-1* que fueron germinadas en cajas Petri 100X25 medio MS 0.2X adicionado con diferentes concentraciones de sacarosa (0%, 1% y 2%) y en condiciones de fotoperíodo 16:8 con alta luz ($230 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y baja luz ($1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). A los 3-4 días posteriores a la germinación todas las plántulas de *Ler* y las plántulas albinas de la línea *clb5-1* se transfirieron a cajas Petri de 150x25 con el medio de cultivo antes mencionado, que fueron orientadas y mantenidas en posición vertical. El seguimiento del crecimiento de la raíz se inició un día

después de transferir las plántulas, midiendo el incremento de la longitud de la raíz diariamente por un periodo de 16 días.

6.9 Aclaración de las raíces

Para el análisis microscópico de la raíz primaria se realizó la aclaración de las raíces con el método de Malamy y Benfey (1997a) modificado por Dubrovsky y colaboradores (*com. per.*). Se utilizaron plántulas de 8 días de edad tanto del ecotipo *Ler* como de la línea mutante *clb5-1* crecidas en medio MS 0.2X adicionado con 1% de sacarosa, en cajas Petri 100x25 cuadradas, mantenidas en posición vertical en condiciones de alta luz ($230 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y de baja luz ($1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las plantas fueron puestas en una solución de formaldehído al 0.3% durante 20 min, posteriormente fueron pasadas a una solución de HCl-metanol (0.24N-20%) e incubadas a 65°C durante 40 min, ésta solución fue reemplazada por una solución de NaOH-etanol (0.7%-60%) por 20 min. El tejido fue rehidratado empleando diferentes disoluciones de etanol, 40% (por 4 días), 20% (por 1 día) y 10% (por 1 día). El tejido en etanol al 10% se cambió a una solución etanol-glicerol (10%-50%). Las muestras fueron montadas con glicerol al 50% y examinadas al microscopio con óptica de Nomarski (microscopio óptico ECLIPSE E600, NIKON) para determinar la densidad de primordios de raíces laterales (PRL) y de raíces laterales (RL) en la raíz primaria tanto en la planta de tipo silvestre como en la mutante *clb5-1*.

La densidad de primordios (PRL) fue obtenida de la siguiente manera: empezando el análisis por la parte apical de la raíz primaria, se contó el número de primordios a partir desde el primer primordio encontrado hasta el primordio anterior a la primera raíz lateral. El número de primordios fue dividido entre la longitud de la zona examinada (zona de PRL ó zPRL).

La densidad de raíces laterales (RL) se calculó de manera similar a la de PRL: comenzando la observación por la parte apical de la raíz se obtuvo el número de raíces, el cuál se dividió entre la zona de raíces, que abarcó desde la primera raíz encontrada hasta la última raíz lateral encontrada en la parte basal de la raíz primaria. A esta zona se le llamó zona de RL ó zRL.

6.10 Detección de almidón

La detección de almidón se realizó con el método de Yu y Li (2001). El material vegetal consistió en plantas de 10 días de edad del ecotipo *Ler* y de la línea mutante *clb5-1* (plántas albinas) crecidas en cajas cuadradas 100X15, con medio MS 0.2X adicionado con 1% de sacarosa, orientadas verticalmente, bajo condiciones de alta luz ($230 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y de baja luz ($1-1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las plantas fueron puestas en una solución de etanol al 95%, realizando de 1 a 2 cambios de la solución hasta obtener plantas aclaradas. La solución de etanol fue substituida por una mezcla de Ioduro de Potasio (KI-I_2). Después de 30 min las plantas fueron enjuagadas en agua destilada y montadas con glicerol al 50% para ser observadas al microscopio óptico (NIKON) y al microscopio estereoscópico (ECLIPSE E600, NIKON).

6.11 Aislamiento de DNA total de tejidos vegetales

El DNA total se aisló de plantas con 15 días de edad de los ecotipos *Ler* y *C24*, y de las líneas mutantes *clb5-1* y *clb5-2* (albinas). El método que se utilizó fue el descrito por Lukowitz, *et al.* (2000): El tejido macerado es puesto en un buffer de extracción CTAB-NaCl-Tris HCl-EDTA-CTAB y cloroformo, y las precipitaciones se hacen con 2-propanol y etanol.

6.12 Análisis por PCR

Tabla 2 . Oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR.

Gen	Oligonucleótido F 5'-3'	Oligonucleótido R 5'-3'
<i>APT1</i>	TCCCAGAATCGC TAAGATTGCC	CCTTCCCTTAAGCTCTG
<i>AtDHR1</i>	AAGAAGAGCAGATATCGTGTTG	TTGTCTCCATGTATAGCAGCAGC
At3g04490	CCTGTA CTCCGTCTTCTCGAG	CAGAAACCCACGAACTTCGAC
At3g04500	GTCAATCCCACCATCTTCAG	TGCTTCTTATTGCTGTGATG
At3g04510	GCCCTAAATCACTCAACTCG	CGACATTATTGAGTTGCACC
At3g04520	CCAACGCAGTGAGCCAAATC	CGCCTTCTCTTCTCTTCACG
At3g04540	CGAGCAAGAGAAAATGGCC	GCTATCACTAGGTGCAAC
At3g04550	CACCATGTTCTCTCTCAAACCTC	CATGACCATGATGACTCCG
At3g04560	GACGAACTGGAGAGAGATGG	CAAATCCTACCAATCAGACC

Las condiciones del PCR fueron las siguientes: Para 25µl de reacción se utilizaron 2.5µl de buffer 10X para PCR, 2.5 µl de MgCl₂ 25mM, 1µl de una mezcla de dNTP's 10mM, 2.5µl de una solución a 60ng/µl de cada oligonucleótido.

El programa general para la reacción de fue el siguiente: 1ciclo de 4min a 94°C. De 30 a 35 ciclos de 54 a 60°C, de 1-3 min a 50-68°C, de 1-3min a 72°C. Un ciclo final de 5 min a 72°C. La temperatura y tiempos de alineamiento y tiempos de extensión varió según el gen a amplificar .

Tabla 3. Condiciones de alineamiento y de extensión para la amplificación de los genes candidatos.

Gen	Temperatura de alineamiento (°C)	Tiempo de alineamiento (min)	Tiempo de extensión (min)
<i>AtDHRI</i>	54	1	2.30
At3g04490	54	2	2
At3g04500	53	2	2
At3g04510	59.5	1	1
At3g04520	59.5	1	3
At3g04540	56.8	0.5	1
At3g04550	60	1	2
At3g04560	56.8	1	2

6.13 Manejo de imágenes

Las fotografías de plántulas para el análisis de desarrollo de la parte aérea, de la raíces y detección de almidón fueron tomadas usando una cámara digital NIKON E995 acomodada al microscopio óptico (NIKON) y al microscopio estereoscópico (ECLIPSE E600, NIKON). Las fotografías de plantas en cajas Petri y Magenta fueron tomadas usando la cámara NIKON COOLPIX800. Las fotos de geles y placas fueron digitalizadas con un equipo ARCUS, AGFA. Todas las figuras fueron editadas con el programa Adobe Photoshop 7.

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis del desarrollo de la parte aérea de la mutante *clb5-1*

7.1.1 Desarrollo de la mutante *clb5-1* en diferentes condiciones de luz

En el trabajo de Gutiérrez-Nava, *et al.*, (2004), se realizó un análisis preliminar de la mutante *clb5-1*, analizando plantas de 10 días de edad crecidas en condiciones de $120\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz (alta luz) y de $5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz (baja luz). En dicho trabajo se encontró que en condiciones de baja luz la mutante no revierte al fenotipo silvestre y que en tales condiciones de crecimiento el desarrollo de la planta albina es igual al de la planta de tipo silvestre.

Con el objetivo de ampliar la caracterización de la mutante *clb5-1* se decidió estudiar el desarrollo de ésta mutante en diferentes concentraciones de luz: $230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, concentración normal del cuarto de crecimiento *in vitro*, como la concentración de alta luz (L); $1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, concentración reportada para evitar el daño fotooxidativo (Oelmüller, 1989.), como baja luz (BL) y $16\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, concentración escogida de manera arbitraria, como una medida intermedia de concentración de luz (ML). Y observar su fenotipo en detalles. La razón por la cual se decidió utilizar concentraciones de luz por debajo de la que se utiliza comúnmente para cultivar plantas de *Arabidopsis* se debe a que diferentes trabajos han demostrado que bajos niveles de carotenoides y altas concentraciones de luz provocan la fotooxidación de la clorofila, la cual puede llegar a dañar estructuralmente a los cloroplastos y que tal daño puede ser minimizado usando bajas cantidades de luz (Oelmüller, 1989; Weston, et al., 2000). También se sabe que durante el desarrollo del cloroplasto la formación de la membrana tilacoidea y la maduración de la maquinaria fotosintética se presentan de manera coordinada; y que, cuando se afecta la formación de esta membrana se da también una baja en la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos (Weston, et al., 2000; Vothknecht y Westhoff, 2001).

Con este análisis se corroboró que el fenotipo albino de la mutantes *clb5-1* no se revierte al crecer las plantas en bajas condiciones de luz de 16 y $1.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; sin embargo, en cuanto al desarrollo de la planta se pudo observar que la morfología de la hoja si presenta diferencias.

Comparando la morfología de hojas cotiledonarias de plantas crecidas en condiciones de alta luz ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y de media luz ($16\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se observó que en media luz los cotiledones muestran una morfología menos radializada, presentan menos protuberancias y se puede llegar a diferenciar entre un peciolo y una lámina de la hoja; en contraste las hojas verdaderas no parecen presentar una menor afectación en su morfología. Al comparar la morfología de la mutante crecida en condiciones de baja luz ($1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) con la morfología que presentan en alta y media luz se pudo observar que la mutante presenta un desarrollo evidentemente menos afectado, tanto de hojas cotiledonarias como de hojas verdaderas, las cuales presentan una clara diferencia entre el peciolo y la lámina de la hoja, no muestran protuberancias y parecen presentar un patrón abaxial-adaxial (Fig.8).

También se pudo observar que la mutante *clb5-1* es capaz de producir tricomas aún en la concentración de alta luz, a diferencia de lo observado por Gutiérrez-Nava, *et al.*, (2004) (Fig.8) y que en bajas concentraciones de luz (1.5 y $16\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) la mutante parece acumular menor contenido de antocianinas.

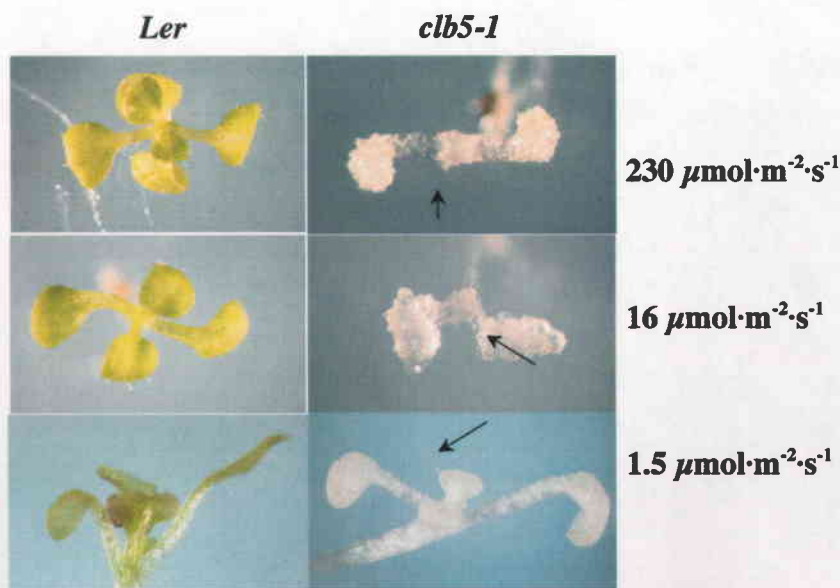


Figura 8. Plantas tipo Silvestre del ecotipo *Ler* y de la línea mutante *clb5-1* crecidas en tres diferentes concentraciones de luz. Las flechas indican la presencia de tricomas en las plantas albinas. Escala: *Ler* 1.5X, *clb5-1* 2X

7.1.2 Análisis de pigmentos

Gutiérrez-Nava, *et al.*, (2004), cuantificó los niveles de clorofila total en las mutantes *clb* crecidas en condiciones de $120\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz (como alta luz), encontrando que contenían menos del 2% de la cantidad de pigmentos totales que presentan las plantas de tipo silvestre. Con el objetivo de identificar si existe una alteración en la acumulación de pigmentos fotosintéticos, clorofilas *a* y *b*, y de carotenos en la mutante *clb5-1* cuando es crecida en concentraciones de baja y media luz, se realizó la cuantificación de estos pigmentos en plantas de 15 días de edad crecidas en condiciones de alta luz ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), media luz ($16\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y baja luz ($1.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) con el método descrito por Vázquez-Duhalt y Greppin (1987). Para este análisis se utilizaron plantas albinas de las líneas mutantes *clb5-1*, *clb6-1* y *clb1-1*, así como plantas de tipo silvestre de los ecotipos *Ler* (fondo genético de *clb5-1* y *clb6-1*) y *WS* (fondo genético de *clb1-1*).

Los resultados obtenidos de éste análisis mostraron que la cantidad de pigmentos (clorofilas *a* y *b*, y carotenos) en las plantas albinas (*clb5-1*, *clb6-1* y *clb1-1*) crecidas en condiciones de alta, media y baja luz fue significativamente menor a la cantidad de éstos pigmentos presentes en las plantas de tipo silvestre (*Ler* y *WS*) crecidas en las mismas condiciones de luz (Fig. 9). Los porcentajes de los pigmentos que cada línea mutante presenta respecto a la línea silvestre se encuentran resumidos en la Tabla 4.

También se observó que las plantas de las líneas silvestres (*Ler* y *WS*) crecidas en condiciones de media luz no presentaron una cantidad significativamente menor de pigmentos en comparación con las plantas crecidas en condiciones de alta luz. Mientras que las plantas crecidas en condiciones de baja luz contenían entre el 12 y el 30% de la cantidad de pigmentos que presentaron las plantas crecidas en alta luz. A diferencia de las plantas silvestres, las plantas albinas de las mutantes *clb5-1*, *clb6-1* y *clb1-1*, crecidas en condiciones de baja luz, no presentaron una diferencia significativa en el contenido de pigmentos con respecto al que mostraron en media y alta luz (Fig. 9). Cabe mencionar que, en el caso de las clorofilas *a* y *b*, la mutante *clb5-1* muestra una tendencia en la acumulación de pigmentos, en respuesta a las diferentes condiciones de luz, semejante a la que muestra la línea silvestre, tendencia que no se observa en las mutantes *clb1-1* y *clb6-1* (Fig.9)

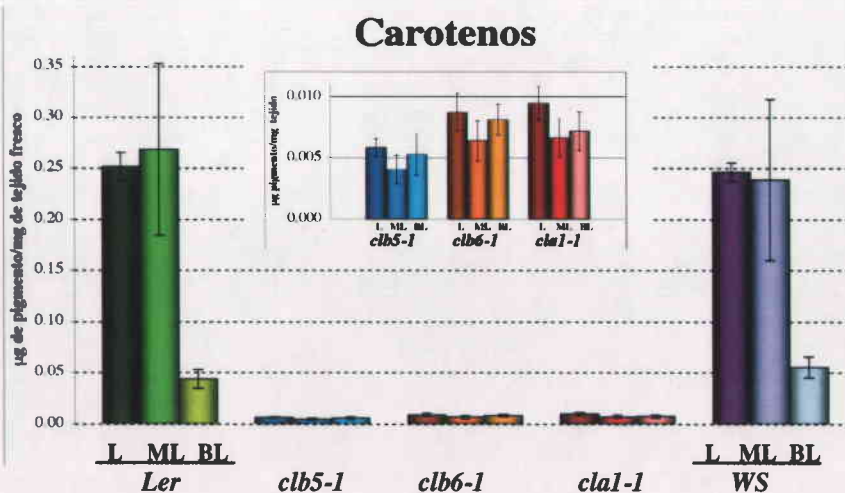
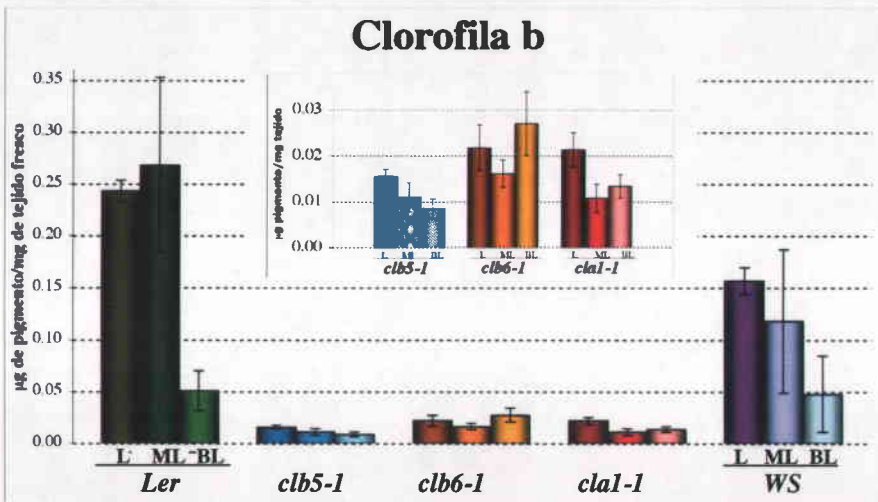
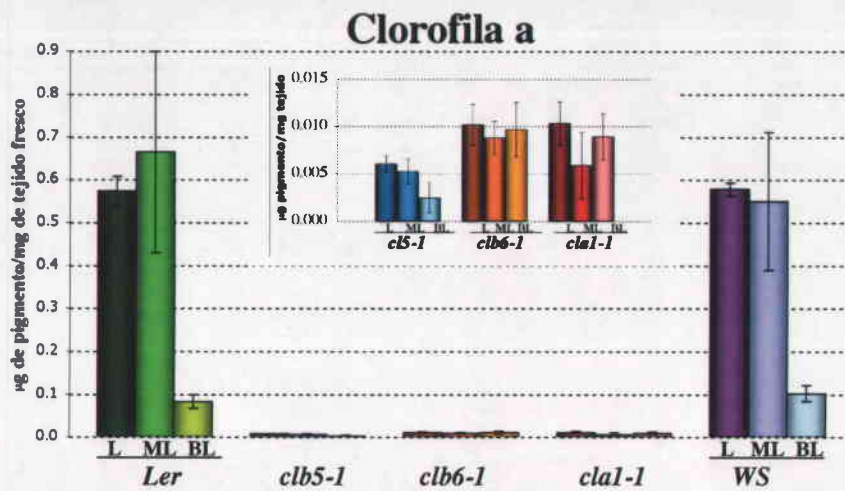


Figura 9. Análisis de pigmentos fotosintéticos en plantas de 15 días de edad de los ecotipos *Ler* y *WS*, y de las líneas mutantes *cla1-1*, *clb6-1* y *clb5-1*. L=230 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; ML=16 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y BL=230 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se muestran los resultados de tres repeticiones \pm ES (n=10).

Estos resultados demuestran que la mutante *clb5-1* no presenta diferencias en el contenido de pigmentos cuando esta es crecida en baja luz y corroboran que la afectación en el contenido de pigmentos fotosintéticos es consecuencia de la afectación en el desarrollo de los cloroplastos, la cual se debe a la mutación que éstas líneas presentan, y no se debe a un efecto fotooxidativo.

Tabla 4. Relación porcentual entre el contenido de pigmentos que las plantas albinas presentan respecto al contenido que presentan las plantas de tipo silvestre. Las mutantes *clb5-1* y *clb6-1* fueron comparadas con el ecotipo *Ler* y la mutante *clal-1* con el ecotipo *WS*.

Luz	Mutante	% de pigmentos ^a		
		Chl a	Chl b	Carotenos
230 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	<i>clb5-1</i>	1	6	2
	<i>clb6-1</i>	2	10	4
	<i>clal-1</i>	2	13	4
16 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	<i>clb5-1</i>	1	4	2
	<i>clb6-1</i>	1	6	2
	<i>clal-1</i>	1	9	3
1 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	<i>clb5-1</i>	3	16	14
	<i>clb6-1</i>	11	50	20
	<i>clal-1</i>	10	25	11

a. El porcentaje de pigmentos para cada mutante se calculo con respecto a la cantidad de pigmentos que presentaron las plantas de tipo silvestre (100%). Chl a= clorofila a; Chl b= clorofila b.

7.1.3 Desarrollo de la *clb5-1* en condiciones de baja luz

Con base en los resultados obtenidos usando las concentraciones de luz de media luz ($16\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y de baja luz ($1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se decidió utilizar las condiciones de alta luz ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y las de baja luz para continuar el estudio del desarrollo de la mutante *clb5-1*.

Para la germinación de la mutante *clb5-1* se probaron tres diferentes soluciones para distribuir la semilla sobre el medio de cultivo: agua estéril, medio GM con agar al 0.1% (w/v) y agua con agarosa al 0.1% (w/v). Se observó que utilizando agua, la mayoría de las plantas crecidas en baja luz presentaban hipocotilos largos y hojas cotiledonarias pequeñas, que es un desarrollo muy

parecido al que presentan las plantas de tipo silvestre (*Ler*) germinadas en las mismas condiciones. En contraste, usando la solución de medio GM y la de agarosa, la mayoría de las plantas albinas y plantas de tipo silvestre germinan y se mantienen en contacto con el medio de cultivo presentando un mayor desarrollo, produciendo hojas verdaderas. Dado que no se observó diferencia al utilizar GM con agar al 0.1% (w/v) o agarosa al 0.1% (w/v), tanto en la mutante como en la planta de tipo silvestre, se decidió utilizar la solución de agarosa como el medio para distribuir la semillas en el medio de cultivo para la germinación.

Una vez establecidas las condiciones de creceimeinto y con el objetivo de estudiar el desarrollo de la mutante *clb5-1* en condiciones de baja luz, se inició el seguimiento del desarrollo de la parte aérea. Se observó que tanto en condiciones de alta como de baja luz, las plántulas de la línea de tipo silvestre y la mutante *clb5-1* presentan a los 3 días de haber germinado el un estadio de desarrollo similar, aunque las plantas de la mutante muestran un tamaño menor que las plantas de tipo silvestre (Fig. 10).



Figura 10. Plantas de la línea de tipo silvestre (*Ler*) y plantas albinas de la mutante (*clb5-1*) a los 3 días de haber germinado bajo condiciones de alta luz ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y de baja luz ($1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Escala: *Ler* 1.5X, *clb5-1* 2X

Durante el crecimiento en condiciones de alta luz la diferencia entre el desarrollo de la planta de tipo silvestre y el de la mutante se volvió más evidente, donde la planta de tipo silvestre se desarrollaba más rápido que la mutante, presentando su cuarta de hoja verdadera alrededor de los 10 días de haber germinado, en contraste la mutante produce su cuarta hoja verdadera alrededor

de los 20 días. Además las plantas de la mutante *clb5-1* presentan un tamaño más pequeño que el de las plantas de tipo silvestre. Sin embargo, en condiciones de baja luz no parece haber esta diferencia temporal en el desarrollo, produciendo ambas líneas su cuarta hoja verdadera alrededor de los 15 días (Fig.11).

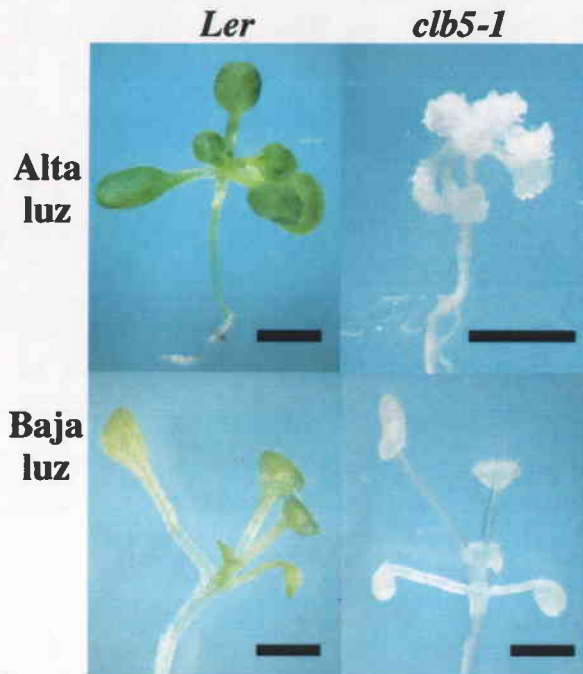


Figura 11. Plantas de tipo silvestre (*Ler*) y mutantes (*clb5-1*) crecidas en condiciones de alta luz ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y baja luz ($1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). En alta luz se muestra a la planta de tipo silvestre a los 12 días de haber germinado y a la planta mutante a las 8 semanas de haber germinado. En baja luz se muestra tanto a la planta de tipo silvestre como a la mutante a los 18 días de haber germinado. Escala=1mm.

Al igual que otras mutantes albinas (Mandel, *et al.*, 1996; Sundberg, *et al.*, 1997; Bauer, *et al.*, 2000; Motohashi, *et al.*, 2001; Larkin, *et al.*, 2003), las plántulas de la mutante *clb5-1* germinadas en sustrato no sobreviven, por lo tanto el grueso del análisis de la mutante *clb5-1* se realizó en condiciones *in vitro*. Con base en lo anterior y considerando las limitaciones de espacio que las cajas Petri de 100x25 representaban para el crecimiento de la mutante, se decidió probar el crecer a las plantas albinas en cajas Magenta con medio de cultivo (dispuesto de manera diagonal) (Fig.12A) y en cajas Petri de 150x15, orientadas y mantenidas de manera vertical. De ésta manera se encontró que la mutante crecida en condiciones de baja luz fue capaz de continuar su crecimiento, produciendo roseta e incluso realizando la transición a la fase reproductiva, produciendo escapo y primordios florales que, sin embargo, no se desarrollan (Fig.12 ByC). Este fenotipo sin embargo no parece ser exclusivo de la mutante ya que también se observa en las plantas de tipo silvestre crecidas bajo estas mismas condiciones.

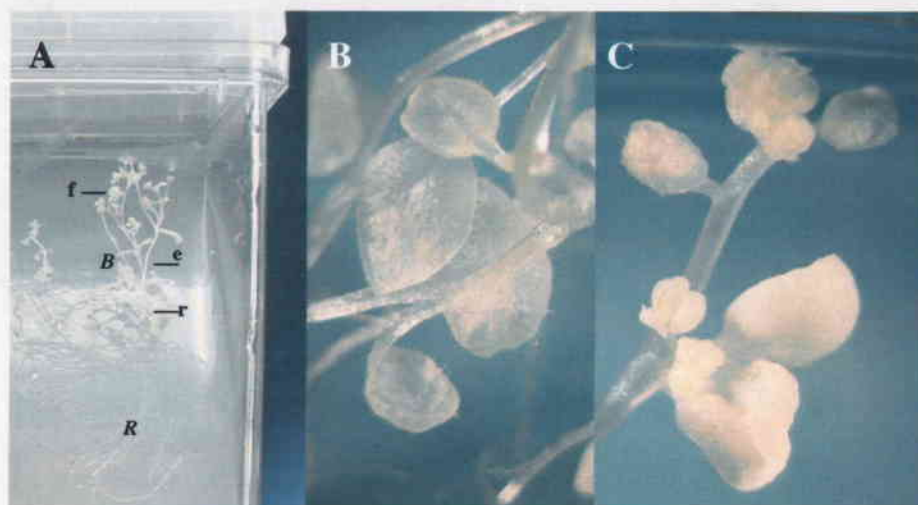


Figura 12. Plantas de la línea mutante *clb5-1* crecidas en condiciones de baja luz. **A)** Planta en la que se puede apreciar el desarrollo de sistema radical (*R*) y del brote (*B*), en el cual se puede ver la roseta (*r*), el escapo (*e*) y la inflorescencia (*f*); **B)** Hojas caulinas que muestran un claro patrón adaxial-abaxial (planta crecida en caja Petri 150x15). **C)** Inflorescencia de una planta crecida en caja Petri 150x15.

7.1.4 Desarrollo de la hoja en la mutante *clb5-1*

Dado el patrón de desarrollo que la hoja de la mutante *clb5-1* mostró cuando la planta fue cultivada en condiciones de baja luz (Fig.12B), y con el objetivo de analizar más finamente la estructura foliar de la mutante *clb5-1* bajo condiciones en las que el efecto fotooxidativo no existiera, se decidió analizar el patrón de expresión de genes marcadores del desarrollo de la hoja. Con éste fin se usaron las líneas transgénicas *pFIL-GUS* y *pREV-GUS* (Nelisse *et al.*, 2003), las cuales expresan el gen reportero de la β -glucoronidasa (GUS) bajo la regulación de los promotores de los genes *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* (reportero de la identidad abaxial de la hoja) y *REVOLUTA (REV)* (reportero de la identidad adaxial de la hoja). Con éste fin se realizaron cruces entre plantas heterocigas de la mutante *clb5-1* como línea materna y plantas de las líneas transgénicas *pFIL-GUS* y *pREV-GUS* (homocigas para el transgen) como plantas donadoras de polen (línea paterna). Las líneas *clb5-1::pFIL-GUS* y *clb5-1::pREV-GUS* productos de la cruce fueron seleccionadas por su resistencia al herbicida BASTA, por la presencia de GUS a través de un ensayo histoquímico y por la presencia de embriones albinos.

Gracias a este trabajo se lograron obtener tres líneas independientes *clb5-1/pFIL-GUS* y cuatro líneas independientes *clb5-1/pREV-GUS*, las cuales serán utilizadas en el análisis histológico de estructura de la hoja de la mutante *clb5-1*, análisis que se realizará posterior al presente trabajo.

7.1.5 Tinción de almidón en la hoja de la mutante *clb5-1*

Uno de los parámetros que se ha elegido para analizar el estado tanto funcional como de desarrollo de algunos plástidos, amiloplastos y cloroplastos, en plantas mutantes y de tipo silvestre ha sido la cuantificación de almidón o la detección de éste por tinción (Yu, T. y H. Li. 2001). Por tal motivo, se hizo un análisis de la presencia de almidón en los plástidos de la mutante *clb5-1*. Para ello se utilizaron plantas de tipo silvestre de 10 días de edad del ecotipo *Ler* y de la línea mutante *clb5-1*, crecidas en alta y baja luz. Las plantas fueron puestas en una solución de Iodina ($KI-I_2$) para evidenciar la presencia de almidón. El análisis demostró que los plástidos de las células guarda tanto en la mutante *clb5-1*, como en la planta silvestre acumulan almidón (Fig.13).

En las hojas de plantas de tipo silvestre crecidas en alta luz se puede observar una mayor acumulación de almidón en cloroplastos de varios tipos celulares (que no se pudieron identificar) además de en las células guarda lo cual es congruente con lo reportado por Yu y Li (2001). Sin embargo, en la mutante *clb5-1*, crecida tanto en alta, como en baja luz, la acumulación de almidón se restringió a plástidos de algunos tipos celulares localizados cercanos al tejido vascular (Fig.13). Lo anterior sugiere que en esta mutante los cloroplastos de diferentes tipos celulares pueden presentar variaciones en el grado de afectación en su función y/o desarrollo (Yu, T. y H. Li. 2001).

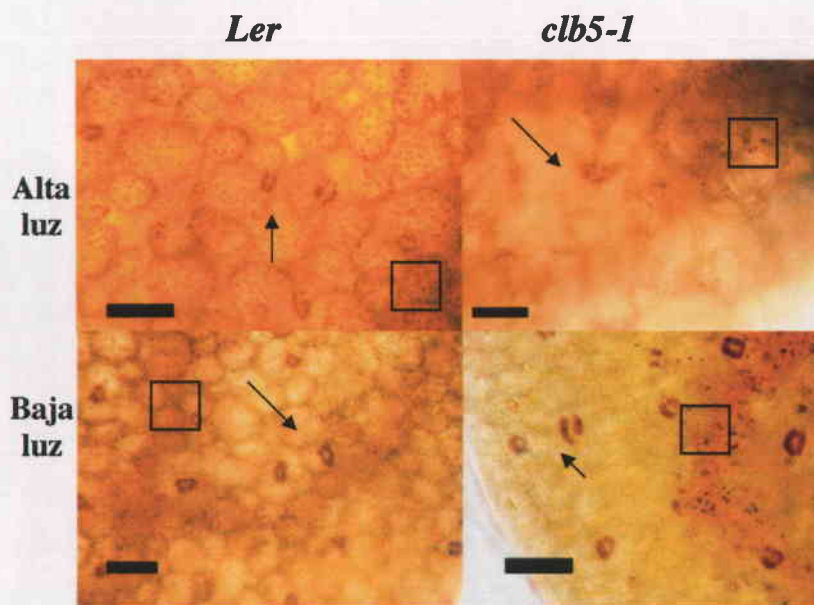


Figura 13. Tinción de almidón con $KI-I_2$ en hojas de plantas de la línea de tipo silvestre *Ler* y de la línea mutante *clb5-1*, crecidas en condiciones de alta luz ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y de baja luz ($1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las flechas indican la presencia de almidón en células guarda. Los cuadros indican almidón de plástidos de algunos tipos celulares localizados cercanos al tejido vascular. Escala= $10\mu\text{m}$.

7.2 Análisis del sistema radical de la mutante *clb5-1*

Hasta el momento no se ha reportado un estudio sobre el sistema radical de una mutante albina, de hecho sólo en pocos trabajos sobre éste tipo de mutantes se menciona el crecimiento de la raíz de la mutante en cuestión (Yu, T. y H. Li. 2001; Mandel, *et al.*, 1996), pero ninguno de ellos abarca un análisis cuantitativo sobre el crecimiento y desarrollo de éste órgano tan importante para la planta. Por tal motivo para ampliar la caracterización de la mutante *clb5-1* se decidió examinar el efecto que la mutación tiene en el desarrollo de la raíz.

7.2.1 La raíz primaria de la mutante *clb5-1*

En el análisis del sistema radical de la mutante *clb5-1*, lo primero que se abordó fue comparar el crecimiento (elongación) de la raíz primaria de la mutante con el de la raíz primaria de la planta de tipo silvestre (*Ler*), con el propósito de establecer el medio de cultivo óptimo para el análisis de raíces laterales. Para ello se crecieron, por 15 días, plantas tanto de tipo silvestre como mutantes en tres diferentes medios de cultivo MS (ver metodología) definidos por su contenido de sacarosa (0%, 1% y 2% w/v), bajo condiciones de alta luz ($230 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y baja luz ($1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), registrando diariamente el crecimiento su la raíz primaria (Fig.14).

Con éste estudio se encontró que tanto en condiciones de alta como baja luz la raíz primaria de la mutante *clb5-1* no se desarrollaba si en el medio no existe una fuente de carbono (MS con 0% de sacarosa) (Fig.14), al igual que la raíz de la planta de tipo silvestre crecida en condiciones de baja luz (Fig.14B). Con éste medio de cultivo también se pudo observar que si bien la raíz de la planta de tipo silvestre fue capaz de crecer en medio sin sacarosa bajo condiciones de alta luz, su crecimiento es menor al ser comparado con el que presenta en medios con sacarosa, donde en comparación con el medio de 1% de sacarosa, en 2% de sacarosa el crecimiento de la raíz de la planta de tipo silvestre es menor (Fig.14A). Estos datos también muestran el carácter heterotrófico que las plantas adquieren al ser puestas en condiciones *in vitro*, y que altas concentraciones de sacarosa afectan de manera negativa el desarrollo de la raíz. Al igual que la raíz de las plantas de tipo silvestre, en condiciones de alta luz, la raíz de la mutante *clb5-1* presenta un mayor crecimiento en medios con sacarosa, sin embargo no existe una diferencia

significativa entre el crecimiento que la raíz de la mutante alcanza en estos dos medios (Fig. 14A).

En condiciones de baja luz se encontró que la raíz tanto de la planta de tipo silvestre, como la raíz de la mutante siguen una tendencia de crecimiento directamente proporcional a la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo (Fig. 14B). Así, en medio sin sacarosa la raíz de ambas detiene su elongación, mientras que en medio de cultivo con 2% de sacarosa, tanto la raíz de la mutante como la raíz de la planta de tipo silvestre, crecen más que en medio con 1% de sacarosa, medio en que además la raíz de la mutante presenta un crecimiento semejante al de la raíz de la planta de tipo silvestre (Fig. 14B).

Cabe mencionar que la mutante *clb5-1* presenta una cinética de crecimiento similar cultivada en medio con 1% de sacarosa tanto en condiciones de alta como baja luz.

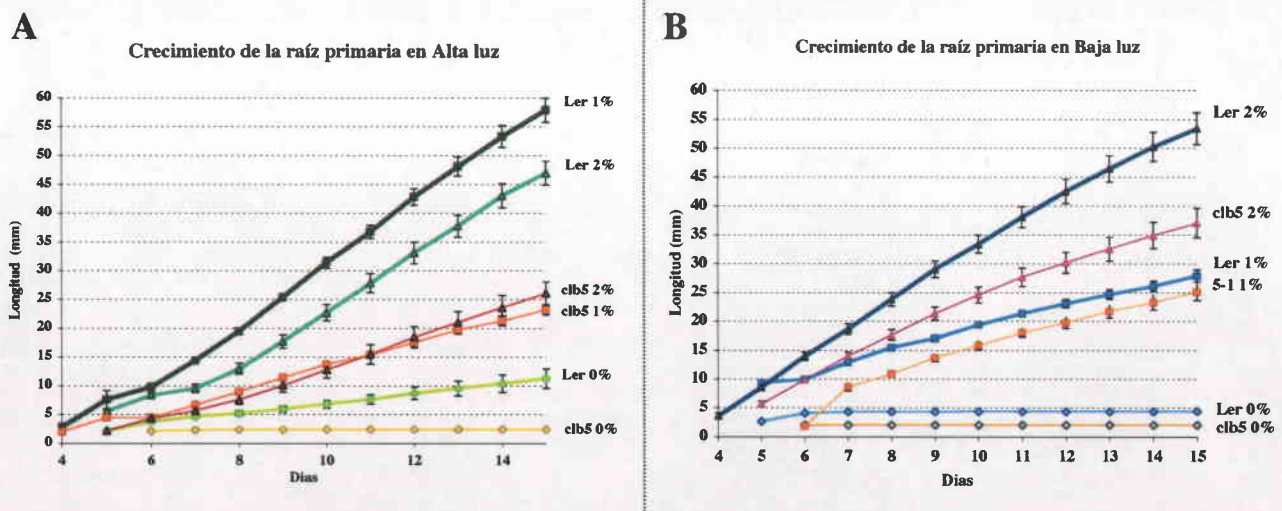


Figura 14. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de plantas de tipo silvestre (*Ler*) y de la línea mutante *clb5-1* crecidas bajo condiciones de alta luz ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y baja luz ($1.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en tres diferentes medios de cultivo definidos por su concentración de sacarosa (0%, 1% y 2%). Se muestran los datos obtenidos de tres repeticiones \pm ES (n=15).

Como se mencionó en la introducción de éste trabajo, el sistema radical de *Arabidopsis* se compone de la raíz primaria y de las raíces laterales. Las raíces laterales son importantes para el desarrollo de la planta ya que su producción da lugar a un sistema radical complejo, así mismo, las raíces laterales están involucradas en muchos aspectos desarrollo de la planta.

Dada la paridad de crecimiento que la raíz primaria de la mutante *clb5-1* presenta respecto a la raíz de la planta de tipo silvestre cuando son crecidas en medio de cultivo con 1% de sacarosa bajo condiciones de baja luz, que es acorde con el desarrollo de la parte aérea en baja luz, se decidió utilizar esta concentración de sacarosa para realizar el estudio de la producción de primordios de raíces laterales (PRL) y de raíces laterales (RL) (Fig.15) tanto en alta ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) como baja luz ($1.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

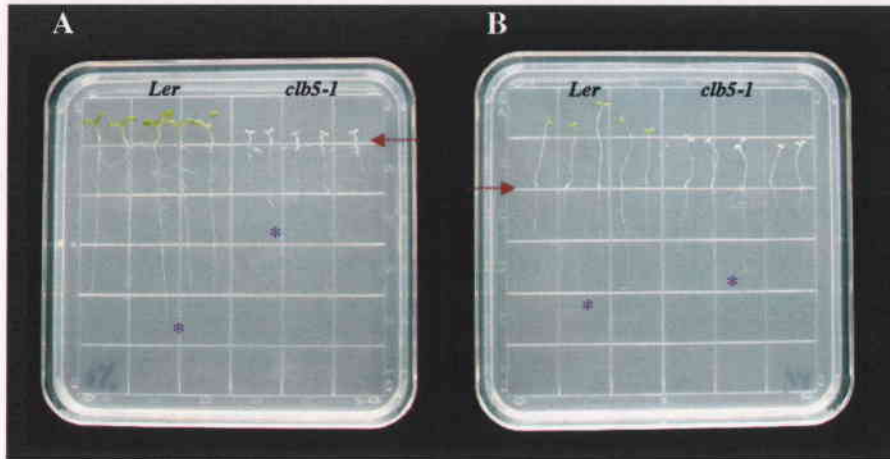


Figura 15. Plantas de la línea de tipo silvestre (*Ler*) y de la línea mutante (*clb5-1*) crecidas en medio de cultivo MS adicionado con 1% de sacarosa en condiciones de alta luz (A) y baja luz (B). Las flechas indican la zona de transición entre el hipocotilo y la raíz. Los asteriscos indican la planta con la raíz más larga de cada grupo.

En cuanto a la producción de primordios de raíces laterales, se observó que la planta de tipo silvestre (*Ler*) cultivada en condiciones de baja luz ($1.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) presentó la tendencia a producir una cantidad menor de primordios con respecto a la cantidad que produjo bajo condiciones de alta luz ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), sin embargo la diferencia no es significativa. En este mismo estudio también se observó que en la mutante *clb5-1* la diferencia en la condición de luz no afectaba de manera significativa en la producción de los primordios, ya que en ambas condiciones la mutante produjo un número similar de primordios. Un dato interesante que también surgió al realizar éste análisis fue el que la mutante *clb5-1*, crecida tanto en alta como baja luz, presentó una cantidad de primordios comparable a la que produce la planta de tipo silvestre crecida bajo las mismas condiciones de luz (Fig.16A).

Con respecto a la producción de raíces laterales se encontró que la planta de tipo silvestre (*Ler*) crecida en condiciones de baja luz presentó un número significativamente menor de raíces laterales que la cantidad de raíces laterales que produce cuando es crecida en condiciones de alta

luz. Mientras que la mutante *clb5-1* no presenta una diferencia significativa en la cantidad de raíces laterales que produce cuando es cultivada en condiciones tanto de alta como de baja luz. Al comparar a la mutante con la planta de tipo silvestre, se encontró que en condiciones de alta luz ambas líneas produjeron un número similar de raíces laterales, y que, en contraste, en condiciones de baja luz la mutante desarrolla un número significativamente mayor de raíces laterales al número que produce la planta de tipo silvestre (Fig.16B). También se observó que en la mutante *clb5-1* tanto los primordios de raíces laterales como las raíces laterales no parecen presentar una alteración en estructura.

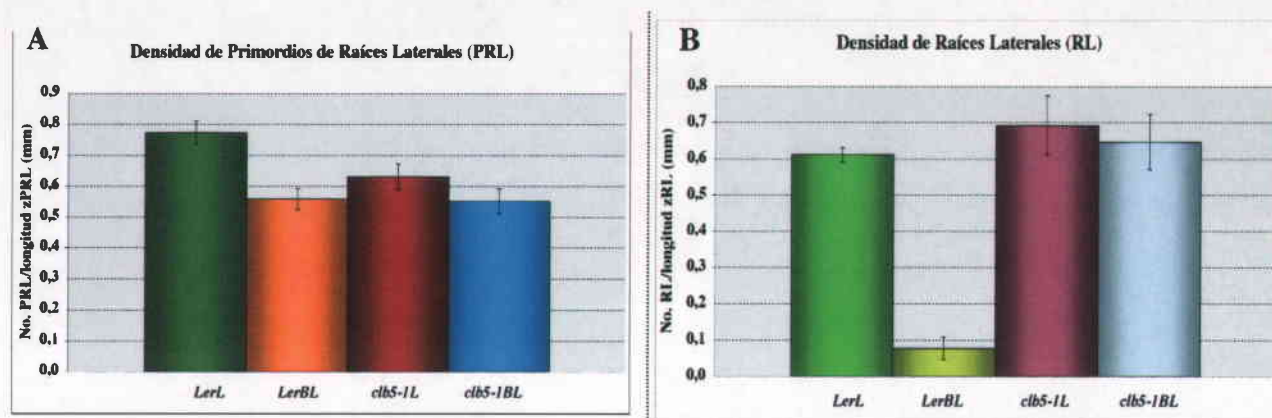


Figura 16. A) Densidad de primordios de raíces laterales (PRL) y B) densidad de raíces laterales (RL) que presentan plantas de tipo silvestre (*Ler*) y plantas de la línea mutante (*clb5-1*) de 8 días de edad crecidas bajo condiciones de alta luz (L) y de baja luz (BL). Se muestran los resultados de tres repeticiones \pm ES (n=10).

Otros órganos laterales que presentan una estructura celular semejante a la de la raíz primaria son las raíces adventicias, que son raíces cuyo desarrollo es post-embrionario y cuyo origen celular es a partir de tejidos del brote primario. Takahashi, *et al.*, (2003) demostraron la producción de raíces adventicias y primordios en plántulas de *Arabidopsis* crecidas en obscuridad y en contacto con el medio, proponiendo que la combinación de sacarosa y obscuridad son las condiciones idóneas para la formación de raíces adventicias. En el presente estudio se encontró que en condiciones de baja luz tanto las plantas de tipo silvestre como las plantas de la mutante *clb5-1* producen raíces adventicias, (Tabla 5).

7.2.2 Tinción de almidón de la raíz de la mutante *clb5-1*

Como parte del estudio del sistema radical de la mutante *clb5-1* se realizó la tinción de almidón en las raíces tanto de la mutante *clb5-1* como de la planta de tipo silvestre. Este análisis nos permitió observar la presencia de amiloplastos en el meristemo de la raíz de la mutante, crecida tanto en condiciones tanto de alta como de baja luz. Este almidón se acumula en los estatolitos de forma semejante a como ocurre en las plantas de tipo silvestre (Fig. 17). Este análisis también nos permitió observar que tanto el tamaño del meristemo, como el número de células con amiloplastos, parece estar reducido en la mutante, siendo tal diferencia más evidente cuando la mutante es crecida en condiciones de alta luz, lo cual podría deberse a variaciones en el número o tamaño de las células meristemáticas, sin embargo, para poder llegar a una conclusión se necesitaría de un estudio más profundo de la estructura del meristemo.

Tabla 5. Presencia de raíces adventicias en plantas silvestres y mutantes a los ocho días de haber germinado en medio con 1% de sacarosa en condiciones de alta luz (L) y baja luz (BL). Se muestran los resultados de tres repeticiones \pm ES (n=10).

Condición de luz	Línea	Plantas totales	Plantas con raíces adventicias
L	<i>Ler</i>	30	0
L	<i>clb5-1</i>	31	0
BL	<i>Ler</i>	35	7 (20%)
BL	<i>clb5-1</i>	31	12 (39%)

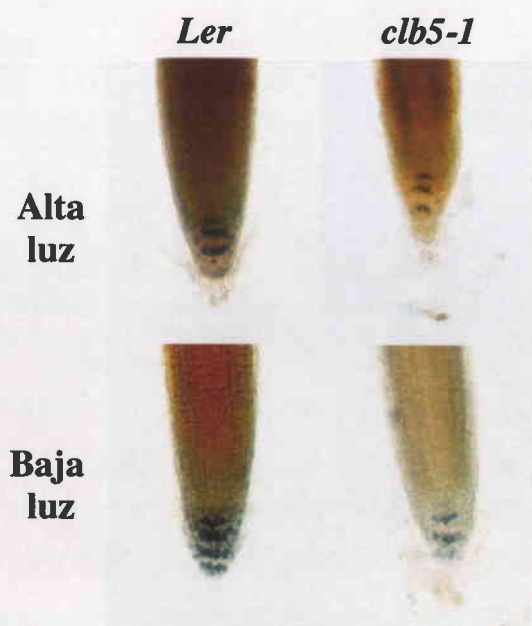


Figura 17. Tinción con KI-I₂ de raíces de la línea de tipo silvestre (*Ler*) y de la línea mutante (*clb5-1*). Plantas de 10 días de haber germinado crecidas medio MS con 1% de sacarosa en condiciones de alta luz ($230 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y baja luz ($1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Campo=20X

7.3 Identificación y aislamiento del gen *CLB5*

Con el objetivo de identificar la identidad del gen *CLB5* se generó un mapeo utilizando los marcadores SSLP (simple sequence length polymorphisms) siguiendo la técnica reportada por Lukowitz, et al., (2000). Este análisis permitió situar al gen *CLB5* en una zona de 30 Kpb acotada por los marcadores T27C4(C) y T27C4(D) dentro del BAC T27C4 en el cromosoma 3 del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Gutiérrez-Nava, et al., 2004). Esta zona comprende 10 genes que se muestran en la Tabla 6, en la cual además se muestra información acerca de la posible función de cada gen y de cuáles de ellos se pudo obtener una amplificación por PRC.

Tabla 6. Genes contenidos en la región de 30Kpb acotada para el gen *CLB5*

Genes	Características	PCR
At3g04480	Endoribonucleasa	-
At3g04490	Exportina	✓
At3g04500	Proteína de unión RNA a ^a	✓
At3g04510	Proteína hipotética ^a	✓
At3g04520	Treonin-aldolasa (<i>THA2</i>)	✓
At3g04525	TRNA-Arg	-
At3g04530	Cinasa de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa 2 (<i>PPCK2</i>)	-
At3g04540	Proteína hipotética ^a	✓
At3g04550	Proteína expresada ^a	✓
At3g04460	Proteína expresada ^a	✓

a. Localización predicha en cloroplasto

7.3.1 Búsqueda del gen por delección

Durante el aislamiento de las mutantes *clb*, 3 de ellas resultaron alélicas: *clb5-1*, *clb5-2* y *clb5-3* (Gutiérrez-Nava, et al., 2004). La mutante *clb5-2* fue obtenida mediante la técnica de mutagénesis llamada “fast neutron”, la cual generalmente produce delecciones, que son remociones de fragmentos de cromatina que pueden abarcar unas cuantas pares de bases (pb) o

varias kilobases (Kpb) tamaño relativamente grandes, esto nos permitió hacer uso de dicho alelo. Por lo tanto se decidió buscar la identidad del gen *CLB5* mediante el análisis de los productos de PCR obtenidos para los genes candidatos, de la región codificante, de la ausencia o el cambio en el tamaño del producto amplificado. Con base en la información que se obtuvo en las bases de datos TAIR (The Arabidopsis information resource, www.arabidopsis.org), MIPS (Minich information center for protein sequences, <http://mips.gsf.de>), NCBI (National center for biotechnology information, www.ncbi.nlm.nih.gov), TIGR (The institute for genomic research, www.tigr.org) y SALK (Salk institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu/>) sobre los 10 genes, se escogieron 7 candidatos, para los cuales se diseñaron oligonucleótidos específicos para su amplificación por PCR.

Los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa al 1%, y para ninguno de los genes se encontró una diferencia en el tamaño del producto amplificado (Fig. 11). Tal resultado puede deberse a varias razones entre otras a que la deleción en la mutante *clb5-2* sea tan pequeña que no sea distinguible en geles de esta concentración de agarosa. Otra razón puede ser que la deleción no se dentro de la secuencia del gen que se escogió para el diseño de oligonucleótidos.

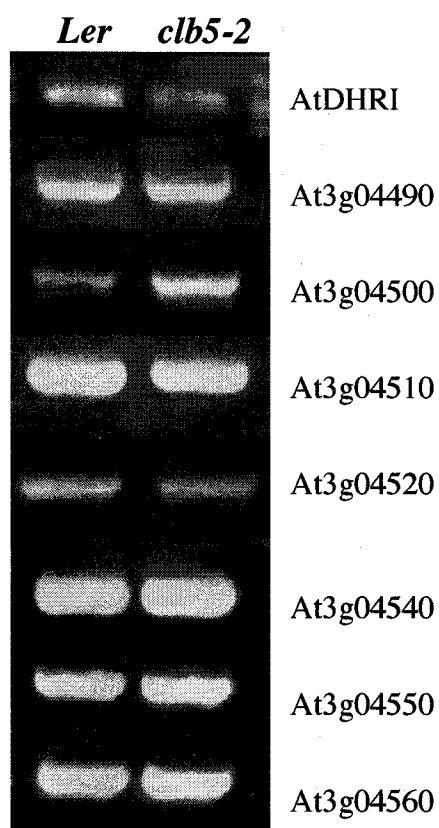


Figura 17. Análisis cualitativo para la identificación por deleción del gen *CLB5*. Productos de PCR amplificados a partir de DNA total de plantas de tipo silvestre, del ecotipo *Ler*, y de la línea mutante *clb5-2*.

7.3.2 Búsqueda de mutantes albinas entre los genes candidatos

Con base en la información existente en las bases de datos de *Arabidopsis*, TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>) y Signal-SALK (Salk institute Genomic Análisis Laboratory, <http://signal.salk.edu/>) sobre los 10 genes contenidos en la región acotada por mapeo, se adquirieron mutantes por inserción de T-DNA de diferentes colecciones, que afectaran a los genes acotados por el mapeo. Las mutantes encontradas y analizadas se muestran en la Tabla 7. El objetivo del análisis fue el de detectar al menos una línea que segregara el fenotipo albino, fenotipo de la mutante *clb5-1*. Los resultados mostraron que la mutante SALK_129163 anotada para el gen At3g04520 segregaba plántulas albinas.

Cabe mencionar que el gen At3g04520 ha sido nombrado como THA2 por presentar un 70% de indentidad con el gen THA1 de *Arabidopsis thaliana*, el cual codifica para una Treonin-aldolasa implicada en el metabolismo de aminoácidos (Jander, *et al.*, 2004).

Tabla 7. Mutantes por inserción de T-DNA de las colecciones SALK (Salk institute Genomic Análisis Laboratory) y SAIL (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library)

Genes	Mutantes	Plantas albina
At3g04480	SALK_139854	X
At3g04490	SALK_096658	X
	SAIL_215_C03	X
At3g04500	SAIL_652_H07	X
	SALK_041064	X
At3g04510	SAIL_294_C04	X
	-	-
At3g04520	SALK_073252	X
	SALK_129163	✓
At3g04525	-	-
At3g04530	-	-
At3g04540	SALK_104138	X
At3g04550	-	-
At3g04460	SALK_110145	X
	SALK_004031	X
	SALK_116548	X

VIII. DISCUSION

8.1 Análisis del desarrollo de la parte aérea

En condiciones naturales las plantas, al igual que todos organismos fotosintéticos, están expuestas a un amplio rango de intensidades fluctuantes de luz. Se sabe que la exposición a una concentración de luz por arriba de la que se necesita para una óptima fotosíntesis, resulta en uno de los estreses más importantes a los que se enfrentan naturalmente las plantas. En especial las condiciones de luz extrema, es decir por arriba de la condición óptima para que se lleve a cabo la fotosíntesis, pueden llevar a que el aparato fotosintético sea dañado irreversiblemente.

Se ha encontrado que si se parte de condiciones de baja intensidad lumínica, un incremento en la densidad del flujo de fotones (al aumentar la intensidad de luz), correlaciona positivamente con el incremento en la fijación fotosintética de carbono. Sin embargo por arriba de un límite la capacidad de captar la energía lumínica se satura y la planta es incapaz de usar toda la energía absorbida por los complejos colectores de luz. Bajo tales condiciones de exceso de luz, el lumen del cloroplasto se vuelve altamente ácido, la cadena de transporte de electrones se reduce y la energía de excitación se acumula dentro de complejo colector de luz del fotosistema II (LHCII por sus siglas en inglés). Este exceso de excitación en el complejo puede resultar en la producción de tripletes de clorofila a y en la producción de oxígeno libre (Elrad, *et al.*, 2002). El oxígeno libre causa la modificación de proteínas y la peroxidación de lípidos; esta última se vuelve autocatalítica resultando en una destrucción masiva de membrana (Niyogi, 1999 en Elrad, *et al.*, 2002). El exceso de luz también tiene como consecuencia el agotar la reserva de NADP+, causando un incremento en la tasa de flujo electrónico del fotosistema I al oxígeno, generando superóxido y peróxido de hidrógeno (Asada, 1999 en Elrad, *et al.*, 2002). Este daño fotooxidativo también puede afectar a los peroxisomas (Mayfield y Taylor, 1987).

Las plantas responden a la luz excesiva con un conjunto de mecanismos a los que se les denomina fotoprotectores, cuya función es minimizar los efectos dañinos del exceso de luz. Entre estos mecanismos se encuentran:

- La disipación térmica del exceso de energía de excitación en el LHCII, lo que reduce la formación de tripletes de clorofila a y la producción de especies reactivas de oxígeno (Elrad, *et al.*, 2002).
- La destoxicación de superperóxidos por una serie de enzimas estromales o asociadas a la membrana tilacoidea, que incluyen a la superóxido dismutasa y a la ascorbato peróxidasa (Asada, 1999 en Elrad, *et al.*, 2002).
- Prevención de la peroxidación autocatalítica de lípidos de membrana por compuestos antioxidantes como el tocoferol y la zeaxantina (Niyogi, 1999 en Elrad, *et al.*, 2002).
- Eliminación de los tripletes de clorofila que se generan en el LHCII por el complejo molecular xantofila-luteína del complejo colector de luz (Peterman *et al.*, 1997 en Elrad, *et al.*, 2002).
- Destoxicación del oxígeno libre por compuestos como la luteína y neoxantina (en el LHCII), por la zeaxantina y el tocoferol en las membranas tilacoideas (Croce *et al.*, 1999b; Havaux *et al.*, 2000 Elrad, *et al.*, 2002) o por los carotenoides que además limitan de la formación de oxígeno libre.

Se sabe que la alteración en la cantidad de pigmentos en una planta, debido a tratamientos con herbicidas (Mayfield y Taylor, 1987), altas concentraciones de azúcares (To, *et al.*, 2003) y mutaciones afecta la estructura del cloroplasto (León, *et al.*, 1998; Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004). En particular, aquellas mutaciones o herbicidas (como el norfluorazon) que inhiben la acumulación de pigmentos fotoprotectores como los carotenoides llevan al arresto del desarrollo del cloroplasto en estadios tempranos, como consecuencia del daño fotooxidativo (Mayfield y Taylor, 1987). Dado que el grado de fotooxidación es dependiente de la intensidad lumínica, se ha encontrado que se puede presentar un desarrollo normal del cloroplasto, y de la planta en general, si las plantas deficientes en carotenoides son crecidas en condiciones de baja intensidad de luz. De hecho, la deficiencia de carotenoides causa un amplio rango de efectos pleiotrópicos, pero la mayoría de los cuales parecen estar condicionados la cualidad e intensidad de luz. (Mayfield y Taylor, 1987; Aluru y Rodermel, 2004; Motohashi, *et al.*, 2003).

Existen pocos trabajos con mutantes de *Arabidopsis* afectadas en el desarrollo del cloroplasto en donde se hayan utilizado condiciones de baja luz, de hecho, parece ser que dependiendo del tipo

de mutante es su respuesta a la concentración de luz. Por ejemplo, la mutante *im*, que es variegada, en baja luz ($15\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz) presenta un aumento en la cantidad de sectores verdes (casi toda la planta es verde), mientras que crecida en alta luz ($100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) aumentan la formación de sectores blancos (Aluru y Rodermel 2004). Por otro lado, la mutante amarilla *apg1*, que tiene una tasa de crecimiento que es menor respecto a la de la planta de tipo silvestre en condiciones de baja luz ($7\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), el crecimiento de esta mutante es comparable al de la planta de tipo silvestre en media luz ($75\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), mientras que la mutante se queda pequeña, blanca y amarilla en alta luz ($230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Motohashi 2003). En el caso de la mutante *clb5-1* se pudo observar que existe una relación entre la afectación en su desarrollo y la cantidad de luz. Tomando en cuenta los resultados obtenidos al crecer a esta mutante en luz de $120\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004), $230\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $16\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (en el presente trabajo), es evidente que a medida que la concentración de luz disminuye la morfología de la mutante se ve menos afectada, sin embargo, no se revierte el fenotipo albino de la mutante.

Existen trabajos en los que al crecer plantas deficientes en carotenoides en condiciones de luz que evitan la fotooxidación (de 0.01 a $1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), las plantas pueden acumular bajas cantidades de clorofila aún en ausencia de carotenoides (Oelmüller, 1989). Al cuantificar la cantidad de clorofilas a y b y de carotenos presentes en las mutante *clb5-1* crecida en baja luz, se observó que no se presenta un cambio significativo en los niveles de estos pigmentos, de hecho cabe mencionar que para el caso de las clorofilas a y b la mutante *clb5-1* muestra una tendencia en la acumulación de pigmentos semejante a la que muestra la línea silvestre (*Ler*), tendencia que no se observa en las otras mutantes albinas *cla1-1* y *clb6-1*. En las mutantes *cla1-1* y *clb6-1* se encuentran afectados los genes que codifican para la primera y la última enzima de la vía MEP, respectivamente, vía en la cual se producen el isopentil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP) requeridos para la síntesis de isoprenoides tales como el isopreno, los carotenoides, las plastoquinonas, los conjugados de fitol (como tocoferoles y clorofilas) y reguladores de crecimiento vegetal como el ácido absísico (Guevara-García, *et al.*, 2005.; Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004; Estévez, *et al.*, 2000; Mandel, *et al.*, 1996). La vía MEP se lleva a cabo en los plástidos, de manera que el bajo contenido de pigmentos y el efecto en el desarrollo de los cloroplastos en las mutantes *cla1-1* y *clb6-1*, puede considerarse que es una consecuencia directa de la mutación. Por

su parte la acumulación de pigmentos en la mutante *clb5-1* es interesante desde el punto de vista de la regulación dependiente de luz que existe sobre la acumulación de estos pigmentos, ya que donde hay la posibilidad de que los factores que estén involucrados en tal regulación estén actuando de la misma manera en la mutantes *clb5-1* y en la línea silvestre, mientras que las mutantes *cla1-1* y *clb6-1* parecen tener una alteración en dicho mecanismo de regulación. Esto podría ser un indicio de que el gen *CLB5* no se encuentra involucrado en una vía tan directamente relacionada con la producción de pigmentos como lo es la vía MEP.

Como se ha mencionado, la mayoría de los trabajos que abordan el estudio de mutantes afectadas en el desarrollo del cloroplasto u otros plástidos, y que presentan alteración en el contenido de pigmentos, utilizan condiciones de crecimiento de alta iluminación, lo que implica la desventaja de no poder estudiar el desarrollo de las plantas en un contexto de bajo estrés fotooxidativo. Por otro lado, dado que las plantas no sólo utilizan la luz como fuente de energía, sino también como señal de información, los estudios en los que se utilizan condiciones de obscuridad dejan a un lado el efecto fotomorfogénico que tiene la luz (To, et al., 2003. Araki y Komeda, 1993). Así, es evidente que uno de los problemas que se mantienen sin resolver en los estudios de mutantes que afectadas en el desarrollo de los cloroplastos es si el fenotipo se debe a un factor pleiotrópico o si es un producto directo de la mutación.

En el presente trabajo se analizó el desarrollo de la mutante *clb5-1* en condiciones en las que esta planta no estuviera expuesta a un estrés fotooxidativo. Estas condiciones permiten eliminar el efecto pleiotrópico que afecta a la mutante debido a la alta iluminación. De esta manera, se pudo observar que el estado de desarrollo que la mutante puede alcanzar en condiciones de baja luz es mayor que el que alcanza bajo condiciones de alta iluminación, produciendo una roseta, escape e influorescencias. Además su desarrollo en ésta condición de luz es semejante al que presenta la planta de tipo silvestre crecida en las mismas condiciones. Si bien *clb5-1* no es la primera mutante albina de *Arabidopsis* que logra tal grado de desarrollo, es importante destacar que a diferencia de la mutante *cla1-1*, que puede desarrollarse en condiciones de alta luz, *clb5-1* lo hace en condiciones de baja luz, como lo hace la mutante *gun4-2* (Larkin, et al., 2003). La razón por la que la luz puede afectar de manera diferente el desarrollo de mutantes que presentan una condición común, como es el albinismo, sigue siendo una incógnita. El hecho de que la mutante

clb5-1 se desarrolle de manera similar idéntica a la planta de tipo silvestre en condiciones de baja luz pudiera indicar que la mutante es capaz de monitorear el ambiente lumínico de manera semejante a la de la planta de tipo silvestre y de modular su crecimiento y desarrollo por el mismo mecanismo (Larkin, et al., 2003; Mandel, et al., 1996).

Existen varios estudios en *Arabidopsis* que demuestran que el crecimiento vertical y la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo influyen de manera importante para revertir el fenotipo etiolado en plantas crecidas en obscuridad, resultando en lo un mayor desarrollo de la parte aérea (Roldán, et al., 1999; Takahashi, et al., 2003; Baier, et al., 2004). En el caso de la mutante *clb5-1*, fue evidente que el hecho de que las plantas crecieran en contacto directo con el medio de cultivo es un factor que influye de manera importante en su desarrollo. Se sabe que los azúcares además de ser fuente de energía también son moléculas estructurales y señalizadoras. En particular, se ha propuesto que la sacarosa afecta la elongación del hipocotilo y de la raíz, incluso se plantea que cuando es crecida en condiciones de obscuridad la planta que permanece en contacto con el medio obtiene el azúcar a través de la superficie del hipocótilo (Takahashi, et al., 2003; Baier, et al., 2004). Así, cabe la posibilidad de que en tales condiciones la mutante *clb5-1* pueda obtener el azúcar del medio de cultivo, movilizarla y metabolizarla para presentar cambios morfológicos similares a lo que presenta la planta línea silvestre como parte de su aclimatación fotosintética (Pyke y López-Juárez, 1999; Weston, et al., 2000), revertiendo en cierto grado la afectación morfológica que presenta en condiciones de alta luz.

Un aspecto importante del desarrollo que presentó la mutante *clb5-1* en condiciones de baja luz, fue la producción de estructuras parecidas a primordios florales, semejantes a las que se han reportado para la planta de tipo silvestre (*Ler*) y para las mutantes *cla1-1* y *gun4-2* crecidas en las mismas condiciones (Andel, et al., 1996; Larkin, et al., 2003). Dichas estructuras son semejantes a las que presentan diferentes líneas silvestres (ecotipos) crecidas en obscuridad (Araki y Komeda, 1993). La anterior observación sugiere que el motivo por el cual *clb5-1* no puede producir flores, está más relacionado con mecanismos de regulación por luz, que con el defecto en la biogénesis de sus cloroplastos. La elucidación de tales mecanismos ha sido una de las preguntas más importantes para aquellos interesados en la fisiología de la floración (Araki y Komeda, 1993).

En cuanto al desarrollo de la hoja, la mutante *clb5-1* crecida en condiciones de alta luz muestra una correlación positiva entre la afectación del desarrollo del cloroplasto y la alteración en el desarrollo de la hoja (Gutiérrez-Nava, 2001; Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004). En reportes previos se ha demostrado que otras mutantes afectadas en el desarrollo del cloroplasto también presentan alteraciones en la morfología de la hoja, demostrando la existencia de un mecanismo coordinado entre el desarrollo de órganos y organelos, de tal manera, el desarrollo y estado metabólico de los plástidos afectan vías de señalización plástido-núcleo que también son importantes para el desarrollo normal de la hoja (Reiter, *et al.*, 1994; León *et al.*, 1998; Aluru y Rodermel, 2001; Larkin *et al.*, 2003). Por su parte, el desarrollo de la hoja es un proceso que está influenciado por factores ambientales, principalmente la luz, cuya calidad y cantidad afectan tanto el tamaño como la forma y la morfología de la hojas (Reiter, *et al.*, 1994). En condiciones de baja luz la mutante *clb5-1* presenta un mejor desarrollo de la hoja, que puede deberse a un proceso conocido como “aclimatación” a las condiciones de luz. Este proceso involucra una gran variedad de respuestas por parte de la planta, incluyendo cambios en la anatomía de la hoja, principalmente del tejido del mesófilo (Aluru y Rodermel, 2001; Weston, *et al.*, 2000). Dado lo anterior, el estudio de la estructura de la hoja de las líneas *clb5-1FIL-GUS* y *clb5-1 REV-GUS*, generadas en éste trabajo, crecidas en condiciones de baja luz, podrían contribuir al entendimiento de la influencia que el estado de desarrollo del cloroplasto y las condiciones de luz ejercen sobre el desarrollo de la hoja.

8.2 El sistema radical de la mutante *clb5-1*

En cuanto a la elongación de la raíz primaria, fue evidente que en ausencia de sacarosa las plantas tanto de tipo silvestre como mutantes detienen el crecimiento en los primeros días de cultivo, éste fenómeno ya se había observado antes para *Ler* y otros ecotipos. De hecho, se proponen que éste puede indicar el momento en que la semilla pone fin a su actividad como proveedor de fuentes de carbono, lo cual también evidencia el carácter heterotrófico de la mutante (Takahashi, *et al.*, 2003; Bauer, *et al.*, 2001)

Se sabe que la sacarosa afecta la elongación de la raíz (Takahashi, *et al.*, 2003; Baier, *et al.*, 2004).; al ser crecida en condiciones de baja luz fue evidente que la mutante *clb5-1* aumenta el

crecimiento de su raíz primaria de manera proporcional al aumento de la sacarosa en el medio, llegando a tener una elongación muy parecida a la que presenta una planta de tipo silvestre, lo que demuestra que esta mutante está usando la sacarosa del medio para contrarrestar el defecto fotosintético.

Lo mencionado junto con el hecho de que la raíz de mutante *clb5-1* no presenta una diferencia evidente en su estructura respecto a la raíz de una planta de tipo silvestre, sugiere que el gen *CLB5* no parece requerirse para el desarrollo normal de la raíz primaria, por lo que la afectación en el crecimiento de la raíz en la mutante podría ser más una consecuencia indirecta del defecto metabólico derivado de no poseer cloroplastos fotosintéticamente funcionales.

Con respecto a la producción de órganos laterales (raíces laterales), es interesante que diferentes condiciones de luz (alta y baja) no tengan un efecto sobre la producción de primordios de raíces laterales tanto en la planta de tipo silvestre (*Ler*) como en la mutante *clb5-1*. También es interesante que a pesar de las diferencias que la mutante presenta en su desarrollo con respecto a una planta de tipo silvestre en condiciones de alta luz, no haya una diferencia significativa entre ambas líneas en la densidad de primordios de raíces laterales en estas condiciones.

En contraste con lo que se observó para los primordios de raíces laterales, en cuanto a la presencia de raíces laterales se encontró que en la planta de tipo silvestre las condiciones de luz sí influyen sobre el desarrollo de raíces laterales ya que en baja luz se produce un número significativamente menor de éstas.

En trabajos anteriores ya se había encontrado que en plantas silvestres la presencia de raíces laterales depende de las condiciones de luz, estableciéndose que cuando las plantas son puestas en condiciones de obscuridad, producen un número menor de raíces laterales. (Jensen, *et al.* 1998; Reed, *et al.*, 1998). Ciertamente, en condiciones de obscuridad, al no llevarse a cabo la fotosíntesis, la falta de raíces laterales podría deberse a los bajos niveles de carbono disponible. La condición de obscuridad podría tomarse como una condición realmente cercana a la de baja luz utilizada en este trabajo. Por otra parte, se ha encontrado que la adición de auxinas revierte la inhibición del desarrollo de raíces laterales por arriba de la reversión por sacarosa (Reed, *et*

al.,1998). Otro hecho que apoya el que las auxinas sean la señal principal para el desarrollo de raíces laterales radica en que la adición de auxinas a mutantes defectuosas en la maduración de raíces laterales revierte el fenotipo mutante (Celeza, *et al.*, 1995).

Por otro lado, la reducción en el número de raíces laterales no se puede atribuir a la falta de fotosintatos, ya que plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis* tratadas con norfluorazon y crecidas en luz, reducen pero no suprimen el desarrollo de la raíces laterales, por lo que se sugiere que el crecimiento en obscuridad previene el movimiento de sustancias, que median el desarrollo de raíces laterales, del brote a la raíz,(Reed, *et al.*,1998).

Si lo anterior es cierto, la mutante *clb5-1* que produce un número mayor de raíces laterales cuando es crecida en baja luz, estaría presentando una alteración de la regulación del desarrollo de raíces laterales debida principalmente a la falta de cloroplastos desarrollados. También se encontró que la mutante presenta menos raíces laterales que una planta de tipo silvestre en condiciones de alta luz, si bien produce más raíces laterales que una planta de tipo silvestre cuando es crecida en baja luz. En este contexto, cabe mencionar que también se propone la existencia de una vía independiente de auxinas, la cual media la inhibición de raíces laterales inducida por ABA (Casimiro, *et al.*, 2003). De tal manera, al tener la mutante *clb5-1* una afectación en los cloroplastos, el ABA pudiera ser una de las moléculas que presentaran alteraciones importantes en su biosíntesis y metabolismo.

8.3 Los plástidos de la mutante *clb5-1*

Mediante la tinción por almidón de la hoja de la mutante *clb5-1*, se pudieron detectar cloroplastos que presentaron acumulación de almidón, en células guarda y en células cercanas al tejido vascular. Un dato importante es que esto se observó de igual manera para la mutante crecida en alta y baja luz, lo que sugiere que la acumulación de almidón en los plástidos en estos tipos celulares es independiente de las condiciones de luz y su impacto en el desarrollo.

La presencia de plástidos capaces de acumular almidón en células guarda ya se había reportado en la mutante albina de *Arabidopsis*, la *ppi2*. En este caso un estudio ultraestructural corroboró

que los plástidos de células guarda tenían cantidades significativas de gránulos de almidón por lo que la biogénesis del cloroplasto en esta mutante está afectada sólo en células de mesófilo (Yu y Li, 2001). También es importante mencionar que de la doble mutante *sqd2 pgp1-1*, que muestra un fenotipo verde pálido, el análisis estructural de la hoja mostró que las células de mesófilo que contenían cloroplastos eran aquellas adyacentes a las estructuras vasculares (Yu y Benning, 2003).

Existen estudios sobre *Arabidopsis* en los que se ha encontrado que las células epidérmicas, entre ellas las células guarda, presentan una menor actividad de genes fotosintéticos que las células del mesófilo, proponiendo que los cloroplastos de células epidérmicas se encuentran poco diferenciados (Dupree, *et al.*, 1991; Pyke y Page, 1998)

En el presente trabajo también se demostró que mediante la tinción por almidón que, en términos de acumulación de almidón, la mutante *clb5-1* crecida tanto en alta como en baja luz, presenta plástidos funcionales en la cofia de la raíz (amiloplastos) de manera semejante a como ocurre en la planta de tipo silvestre y en la mutante *ppi2* (Yu y Li. 2001).

Con base en lo anterior, para la mutante *clb5-1* podemos decir que los plástidos de diferentes tipos celulares pueden presentar diferencias en el grado de afectación que provoca la mutación o que en no todos los tipos de plástidos se encuentran afectados de igual manera.

8.4 Identificación del gen *CLB5*

Hasta el momento no se ha podido identificar al gen *CLB5*, sin embargo, el análisis de mutantes por inserción de T-DNA, como el de la línea SALK_129163 que segrega embriones albinos, propone al gen At3g04520 como el mejor candidato, éste gen ha sido nombrado como *THA2*, por presentar un 70% de identidad con el gen *THA1*, el cual codifica para una Treonina aldolasa (Jander, *et al.*, 2004).

La función de la treonina aldolasa consiste en convertir la treonina (Thr) en glicina (Gly) y acetaldehído. En bacterias la L-Treonina aldolasa juega un papel importante en la degradación de

L-treonina (Kataoka, *et al.*, 1997). En levadura, la Treonina aldolasa está involucrada en una vía, llamada GLY, diferente a la glicolítica y la gluconeogénica para la producción de glicina que representa la mayor fuente de glicina (Monschau, *et al.*, 1997). En plantas, se especula que la función de esta enzima es la de evitar niveles tóxicos de Thr, ser parte de una vía alterna para la biosíntesis de Gly o para la producción de acetil-CoA (Jander, *et al.*, 2004).

Hasta ahora, la mayoría de los genes afectados identificados en mutantes albinas de *Arabidopsis*, codifican para proteínas cuya función se realiza en los cloroplastos, ya sea que se requieran para la estructura, el mantenimiento o la función del organelo (Guevara-García, *et al.*, 2005; Gutiérrez-Nava, *et al.*, 2004; Larkin, *et al.*, 2003; Motohashi, *et al.*, 2001; Yu y Li, 2001; Bauer, *et al.*, 2000; Estévez, *et al.*, 2000; Moore, *et al.*, 2000). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que, en general, se considera que el fenotipo albino es el resultado de un bloqueo en el proceso fotosintético, ya sea porque se afecta de manera directa al cloroplasto o de manera indirecta, como una consecuencia de defectos más generales en el desarrollo de la planta o su metabolismo (León, *et al.*, 1998). Así, en este trabajo podríamos haber identificado la primera proteína involucrada en el desarrollo del cloroplasto que presenta tanto localización como función extraplastídica.

Existen diferentes trabajos en los que se relaciona el desarrollo del cloroplasto con el metabolismo de aminoácidos. La mutante reticulada *cuel1*, afectada en un traslocador de piruvato-fosfato (PPT) que ejerce su función normal en la membrana interna del cloroplasto, compromete la síntesis de aminoácidos aromáticos y sus derivados, como consecuencia, la biogénesis del cloroplasto en células del mesófilo no puede ser completada (Bauer, *et al.*, 2001). También se ha visto que el tratamiento con herbicidas, como glifosato y clorsulfuron, que inhiben la producción de aminoácidos esenciales, causa clorosis en plantas de tipo silvestres, efecto que puede ser parcialmente bloqueado al adicionar al medio de cultivo con aminoácidos aromáticos o de cadena ramificada, lo cual sugiere que la carencia de aminoácidos puede estar provocando daño al cloroplasto y causando un estrés fotooxidativo (Zhao, *et al.*, 1998). Por otro lado, cabe mencionar que la Thr es uno de los 10 aminoácidos esenciales que no pueden sintetizar ni el humano ni los animales monogástricos, además que se encuentra considerado como uno de los aminoácidos limitantes en semillas de cereales. Dada la importancia nutricional de la Thr, la regulación de su

metabolismo ha sido estudiada ampliamente a nivel bioquímico, genético y, más recientemente, molecular (Galili,1995; Galili, *et al.*, 1994).

Se considera que las plantas sobresalen por su amplio repertorio bioquímico que les permite adaptarse y sobrevivir bajo un amplio rango de diversas condiciones ambientales, en este contexto, el análisis de mutantes con defectos bioquímicos representan una herramienta poderosa para tratar de entender la función de las vías metabólicas afectadas y de las molécula en cuestión (Yu y Benning, 2003).

De esta manera de ser el gen *THA2* el afectado en la mutante *clb5-1*, su estudio podría resultar muy importante no sólo para tratar de esclarecer su papel en el desarrollo del cloroplasto, sino también para discernir su participación en el metabolismo de aminoácidos.

IX. CONCLUSIONES

La mutante *clb5-1* crecida en condiciones de baja luz presenta un desarrollo menos afectado en comparación al que presenta bajo condiciones de alta luz.

En condiciones de baja luz la mutante *clb5-1* desarrolla hojas cuyo patrón de desarrollo es igual al de las hojas de una planta de tipo silvestre.

La mutante *clb5-1* muestra tanto el crecimiento, como la estructura de la raíz primaria semejante al de una planta de tipo silvestre (*Ler*). Sin embargo, presenta diferencias en la producción de raíces laterales.

En la mutante *clb5-1* no todos los tipos de plástidos parecen estar afectados de la misma manera.

Mediante mapeo y análisis moleculares y genéticos, el gen *CLB5* se ha podido identificar con alto grado de certidumbre como una Treonina aldolasa (*THA2*) relacionada al metabolismo de aminoácidos.

X. PERSPECTIVAS

Terminar el estudio de complementación entre la mutante *clb5-1* y la mutante SALK_129163.

Realizar un estudio de perfil aminoácidos en la mutante *clb5-1*.

Analizar de la expresión del gen At3g04520 (THA2) en la mutante *clb5-1*.

Identificar el patrón de desarrollo foliar de la mutante *clb5-1*, mediante el análisis histológico de las hojas de plantas pertenecientes a las líneas *clb5-1/pFIL-GUS* y *clb5-1/pREV-GUS*.

Efectuar el análisis estructural de los plátidos (cloroplastos y amiloplastos) de plantas de tipo silvestre y de la mutante *clb5-1* crecidas en condiciones de baja luz.

XI. REFERENCIAS

- Alonso, J.M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C.C. and Ecker, J.R. 2003. **Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana***. *Science*, **301**:653-657.
- Aluru, M. R., H. Bae, Wu, D. and Rodermel, S. R. 2001. **The *Arabidopsis inmutans* mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants**. *Plant Physiology*, **127**:67-77.
- Aluru, M.R. and Rodermel, S.R. 2004. **Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase**. *Physiologia Plantarum*, **120**:4-11.
- Araki, T. and Komeda, Y. 1993. **Flowering in darkness in *Arabidopsis thaliana***. *Plant Journal*, **4**:801-811.
- Babiychuk, E., Müller, F., Eubel, H., Braun, H. P., Frentzen, M. and Kushnir, S. 2003. ***Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function**. *Plant Journal*, **33**:899-909.
- Baier, M., Hemmann, G., Colman, R., Corke, F., Card, R., Smith, C., Rook, F. and Bevan, M. W. 2004. **Characterization of mutants in *Arabidopsis* showing increase sugar-specific gene expression, growth, and developmental responses**. *Plant Physiology*, **134**:81-91.

- Bauer, J., Chen, K., Hiltbrunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schell, D. and F. Kessler. 2000. **The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis.** *Nature*, **403**:203-207.
- Bauer, J., Hiltbrunner, A. and F. Kessler. 2001. **Molecular biology of chloroplast biogenesis. Gene expression, protein import and intraorganellar sorting.** *Cell Molecular Life Science*, **58**:420-433.
- Bisanz, C., Bégot, L., Carol, P., Pérez, P., Bligny, M., Pesey, H., Gallois, J., Lerbs-Mache, S. and Mache, R. 2003. **The *Arabidopsis* nuclear *DAL* gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation.** *Plant Molecular Biology*, **51**:651-663.
- Bollman, K. M., Aukerman, M. J., Park, M. hunter, C. Berardini, T. Z. and Poethig, R. S. 2003. **HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis.** *Development*, **130**: 1493-1504.
- Bowman, J.L. 2001. ***Arabidopsis*: flower development and patterning.** *Encyclopedia of life science.* <http://www.els.net>. *Nature Scientifican American*.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L. 2000. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA. 1367pp.**
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, A., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, g., Casero, P.J. and Bennett, M. 2001. **Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation.** *Plant Cell*, **13**:843-852.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G. and Bennett, M.J. 2003. **Dissecting *Arabidopsis* lateral root development.** *Trends in Plant Science*, **8**:165-71.

- Celeza, J.L., Grisafi, P.L. and Fink, G.R. 1995. **A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 9:2131-2142.**
- Cronquist, A. 1997. **Introducción a la Botánica**. CECSA. México. 800pp.
- Dubrovsky, J.G., Doerner, P.W., Colón-Carmona, A. and Rost, T. L. 2000. **Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124:1648-1687.**
- Dubrovsky, J.G. **The Development of Lateral Roots** (Essay 16.4). 2002b. En: *Plant Physiology on Line, A Companion to Plant Physiology Third Edition* by Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, <http://www.plantphys.net/article.php?ch=16&id=275>.
- Dupree, P., Pwee, K.H. and Gray, J. 1991. **Expression of photosynthesis gene-promotor fusions leaf epidermal cells of transgenic tobacco plants. *Plant Journal*, 1:115-120.**
- Elrad, D., Niyogib, K.K. and Grossmanc, A. R. 2002. **A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation. *Plant Cell*, 14:1801-1816.**
- Estévez, J. M., Cantero, A. Romero, C. Kawaide, H., Jiménez, L.F., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya, Y., and León, P. 2000. **Analysis of the expression of *CLAI*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway an *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124: 95-104.**
- Fitter, D.W., Martin, D.J., Copley, M.J., Scotland, R.W. and Langdale, J.A. 2002. **GLK gene pair regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant Journal*, 31:713-727.**
- Galili, G. 1995. **Regulation of lysine and threonine synthesis. *Plant Cell*, 7:899-906.**

- Galili, G., Kaechi, H., Shaul, O., Perl, A., Cahana, A., Ben-Tzvi Tzchori, I., Zhu, X.Z. and Galili, S. 1994. **Production of transgenic plants containing elevated levels of lysine and threonine.** *Biochemical Society Transaction*, 22:921-925.
- Guevara-García, A., San Román, C., Arroyo, A., Cortés, M. E. Gutiérrez-Nava, M.L. and León, P. 2005. **Characterization of the Arabidopsis *clb6* mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl- D-erytrol 4-phosphate pathway.** *Plant Cell*, 17:628-643
- Gutiérrez-Nava, Ma. de la Luz. 2001. **Establecimiento de un sistema para clonar genes de maíz involucrados en la fotosíntesis y análisis genético de la biogénesis del cloroplasto en Arabidopsis thaliana.** Tesis de doctorado. UNAM. 64 pp.
- Gutiérrez-Nava, M.L., Gillmor, S.C., Jiménez, L.F., Guevara-García, A. and León, P. 2004. **Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development.** *Plant Physiology*, 135:471-482.
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., Almeida, E., Inzé, D. and Beeckman, T. 2002. **Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation.** *Plant Cell*, 14:2339-2351.
- Jander, G. Norris, S.R., Joshi, V., Fraga, M., Rugg, A., Yu, S., Li, L. and Last, R. L. 2004. **Application of a high-throughput HPLC-MS/MS assay to Arabidopsis mutant screening; evidence that threonine aldolase plays a role in seed nutritional quality.** *Plant Journal*, 39: 465-475.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. 1987. **GUS fusions: β -glucoronidase as a sensitive and versatile gene fusion in higher plants.** *EMBO Journal*, 6:3901-3907.

- Jensen, P.J. Hangarter, R.P. and Estelle, M. 1998. **Auxin transport is required for hypocotyls elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*.** *Plant Physiology*, **116**:455-462.
- Kataoka, M., Wada, M., Nishi, K., Yamada, H. and Shimizu, S. 1997. **Purification and characterization of L-allo-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei* DK-39.** *FEMS Microbiology*, **151**:245-248.
- Krupinska, K. and Falk, J. 1994. **Changes in RNA-polymerase activity during biogenesis, maturation and senescence of Barley chloroplasts. Comparative analysis of transcripts synthesis either in run-assay or by transcriptionally active chromosomes.** *Journal of Plant Physiology*, **143**:298-305.
- Koornneef, M. and Scheres, B. 2001. ***Arabidopsis thaliana* as an experimental organism.** *Encyclopedia of life science*. <http://www.els.net>. *Nature Scientifican American*.
- Larkin, R.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Chory, J. 2003. **GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling.** *Science*, **299**:902-906.
- Leyser, O. and Day, S. 2003. **Mechanisms in plants development.** *Blackwell Publishing*. *Oxford, USA*. 241pp
- León, P, Arroyo, A. and Mackenzie, S. 1998. **Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**:453-480.
- Li, J. and Chen, X. 2003. **PAUSED, a putative Exportin-t, acts pleiotropically in *Arabidopsis* development but dispensables for viability.** *Plant Physiology*, **132**:1913-1924.

- Lukowitz, W., Gillmor, S.C. and Scheible, W-R. 2000. **Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you.** *Plant physiology*, **123**:795-805.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N. 1997a. **Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*.** *Development*, **124**:33-44.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N. 1997b. **Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots.** *Trends in Plant Science*, **2**:390-396.
- Malamy, J.E. and Ryan, K.S. 2001. **Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*.** *Plant Physiology*, **127**:899-909.
- Mandel, M.A., Feldmann, K.A. Herrera-Estrella, L. Rocha-Sosa, M. and León, P. 1996. ***CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution.** *Plant Journal*, **9**:649-658.
- Mansfield, S.G. and Briarty, L.G. 1991. **Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. The developing embryo.** *Canadian Journal of Botany*, **69**:461-476.
- Mayfield, S.P. and Taylor, W.C. 1987. **Chloroplast photooxidation inhibits the expression of a set of nuclear genes.** *Molecular and General Genetics*, **208**:309-314.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. and Koornneef, M. 1998. ***Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis.** *Science*, **282**:662-682.
- Monschau, N., Stahmann, K.P., Sahm, H., McNeil, J.B. and Bogner, A.L. 1997. **Identification of *Saccharomyces cerevisiae* GLY1 as a threonine aldolase: a key enzyme in glycine biosynthesis.** *FEMS Microbiology Letters*, **150**:55-60.

- Monte, E., tepperman, J. Bassem, A., Kasczorowski, K.A. alosnso, J.M., Ecker, J.R. Li, X., zhang, Y. and Quail, P.H. 2004. **The phytochrome-inteacting transcription factor, PIF3, acts early , selectively, and positively in light-induced chloroplast development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**:16091-16098.
- Moore, M., Harrison, M.S., Peterson, E.C., and Henry, R. 2000. **Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes.** *Journal of Biological Chemistry*, **275**:1529–1532.
- Motohashi, R., Ito, T., Kobayashi, M., Taji, T., Nagata, N., Asami, T., Yoshida, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2003. **Functional analysis of the 37 kDa inner envelope membrane polypeptide in chloroplast biogenesis using a *Ds*-tagged *Arabidopsis* pale-green mutant.** *Plant Journal*, **34**:719-731.
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S. and Shinozaki, K. 2001. **An essential role of a TatC homologue of a Δ pH-dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**:10499-10504.
- Mullet, J. E. 1988. **Chloroplast development and gene expression.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **39**:475-502.
- Nelissen, H., Clarke, J. H., De Block, M., Vanderhaeshen, R., Zielinski, R. E., Dyer, T., Lust, S., Inzé, D. and Van Lijsebettens, M. 2003. **DRL1, a homolog of the yeast TOT4/KTI12 protein, has a function in meristem activity and organ growth in plants.** *Plant Cell*, **15**:639-654.

- Oelmüller, R. 1989. **Photooxidative destruction of chloroplast and its effects on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels.** *Photochemistry and Photobiology*, **49**:229-239.
- Pyke, K.A. 1999. **Plastid division and development.** *Plant Cell*, **11**:549-556.
- Pyke, K. and López-Juárez, E. 1999. **Cellular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*.** *Critical Reviews in Plant Science*, **18**:527-546.
- Pyke, K.A. and Page, A. M. 1998. **Plastid ontogeny during petal development in *Arabidopsis*.** *Plant physiology*, **116**:797-803.
- Reed, R.C., Brady, S.R. and Muday, G.K. 1998. **Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*.** *Plant Physiology*, **118**:1369-1378.
- Reiter, R.S., Coomber, S.A., Bourett, T.M., Bartley, G.E. and Scolnik, P.A. 1994. **Control of leaf and chloroplast development by the *Arabidopsis* gene *pale cress*.** *Plant Cell*, **6**:1253-1264.
- Roldán, M., Gómez-Mena, C., Ruiz-García, L., Salinas, J. and Martínez-Zapatier, J.M. 1999. **Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark.** *Plant Journal*, **20**:581-590.
- Scheres, B., Benfey, P. and Dolan, L. **Root development** (March 27, 2002), *The Arabidopsis Book*, eds. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0009, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Streatfield, S., Weber, A., Kinsman, E. A., Rainer, E. H., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W. M., Pyke, K. A. and Chory, J. 1999. **The phosphoenolpyruvate/phosphate transporter is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression.** *Plant Cell*, **11**:1609-1621.

- Sundberg, E., Slagter, J., Fridborg, I., Cleary, S.P., robinson, C. and Coupland, G. 1997. **ALBINO3, an *Arabidopsis* nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria.** *Plant Cell*, **9**:717-730.
- Surpin, M., Larkin, R. M. and Chory, J. 2002. **Signal transduction between the chloroplast and the nucleus.** *Plant Cell*, **S327-S338**.
- Takahashi, F., Sato-Nara, K., Kobayashi, K., Suzuki, M. and Suzuki, H. 2003. **Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings.** *Journal of Plant Research*, **116**:83-91.
- To, J.P.C., Reiter, W. and Gibson, S. I. 2003. **Chloroplast biogenesis by *Arabidopsis* seedlings is impaired in presence of exogenous glucose.** *Physiologia Plantarum*, **118**:456-463.
- Van den Berg, C. Weisbeek, P. and Scheres, B. 1998. **Cell fate and cell differentiation in the *Arabidopsis* root.** *Planta*, **205**:483-491.
- Vázquez-Duhalt, R. and Greppin, H. 1987. **Growth and production of cell constituents in batch cultures on *Botryococcus sudeticus*.** *Phytochemistry*, **26**:885-8889.
- Vothknecht, U.C. and Westhoff, P. 2001. **Biogenesis and origin of thylakoid membranes.** *Biochemica et Biophysica Acta*, **1541**:91-101.
- Weston, E., Thorogood, K., Viniti, G, and López-Juez, E. 2000. **Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type and blue-light-perception mutants.** *Planta*, **211**:807-815.
- Yu, B. and Benning, C. 2003. **Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*.** *Plant Journal*, **36**:762-770.

- Yu, T.S. and Li, H. 2001. Chloroplast protein translocon components atToc159 and atToc33 are not essential for chloroplast biogenesis in guard cells and root cells. *Plant Physiology*, 127:90-96.
- Zhang,J.Z., Creelman, R.A. and Zhu, J. 2004. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiology*, 135:615-621.
- Zhao, J., Williams, C.C. and Last, R. L. 1998. Induction of *Arabidopsis* Tryptophan pathway enzymes and camalexin by aminoacid starvation, oxidative stress and abiotic elicitor. *Plant Cell*, 10:359-370.