



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
Departamento de Biología Molecular de Plantas

La función de ZDS en la regulación del desarrollo de la hoja en
Arabidopsis thaliana

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ERNESTO LLAMAS PÁMANES

TUTOR:

DRA. PATRICIA LEÓN MEJÍA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR:

DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DR. STEWART GILLMOR

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DRA. SVETLANA SHISHKOVA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2013



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia León Mejía por brindarme la oportunidad realizar mi tesis de licenciatura y de maestría en su laboratorio. Gracias por estos más de tres años aprendizaje.

Un agradecimiento muy especial a la M. en C. Maricela Ramos Vega quien siempre me apoyó con los aspectos técnicos del proyecto y además realizó la figura 13 de esta tesis.

A la Dra. Elizabeth Cordoba Martínez por su ayuda, consejos y aportaciones en la realización de esta tesis.

A mi comité tutor durante la maestría: Dra. Gladys Iliana Cassab López, Dr. Stewart Gillmor y Dra. Svetlana Shishkova. Muchas gracias por los consejos, críticas y revisión a mi trabajo.

A mi jurado de examen de maestría: Dr. Federico Sánchez Rodríguez, Dra. Helena Porta Ducoing, Dra. Berenice García Ponce de León, Dr. José Luis Reyes Taboada y Dr. Eleazar Martínez Barajas. Les agradezco el tiempo dedicado a la revisión y contribuciones de esta tesis.

A la M. en C. Marel Chenge Espinosa, al M. en C. Jesús López Bucio, al Dr. Edgar Baldemar y al M. en C. Alexis Acosta Maspon. Gracias por sus ayuda en algunos experimentos y técnicas y sus aportaciones a este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de la Dra. León y el Dr. Rocha, por su ayuda y enseñanzas.

Este proyecto fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (#127546) y la Dirección General de Asuntos para el Personal Académico-UNAM (IN20821). Durante mi maestría fui apoyado por una beca de maestría otorgada por el CONACYT (2012-2013).

DEDICATORIAS

A mis papás, Ernesto Llamas Caballero y Patricia Pámanes Rojas quienes me han apoyado incondicionalmente durante mi formación académica y personal.

A mis hermanos, Erick Llamas Pámanes y Ricardo Llamas Pámanes que siempre han estado a mi lado.

A mi novia Gabriela Hernández Larios quien siempre me ha brindado su apoyo, en especial durante mis dos años de maestría.

A todos mis amigos y maestros con quienes he compartido distintas etapas de mi vida, en especial, a los que estuvieron durante mi estancia en la Cuernavaca.

RESUMEN

Los carotenoides son isoprenoides que funcionan como pigmentos accesorios para cosechar la luz para la fotosíntesis, constituyen unidades básicas en el aparato fotosintético y actúan como fotoprotectores, que previenen de daños oxidativos. Los carotenoides, pueden ser catabolizados para producir fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), estrigolactonas y otras moléculas señalizadoras. La mutación *clb5-1* afecta al gen que codifica la enzima ζ-caroteno desaturasa (ZDS), que participa en el tercer paso enzimático de la biosíntesis de carotenoides. La mutante albina *clb5-1* (*chloroplast biogenesis 5-1*) tiene un fenotipo más alterado en el desarrollo del cloroplasto, la expresión genética y la morfología de la hoja, en comparación con otras mutantes albinas afectadas en la vía que provee los precursores de los carotenoides o de mutantes en los pasos iniciales de la biosíntesis de carotenoides. En trabajos previos se ha sugerido que la pérdida de la actividad enzimática de ZDS provoca la acumulación de fitoflueno, ζ-carotenos o derivados generando una señal que causa los defectos en la mutante *clb5-1*. En este trabajo se demostró que esta señal la podría generar la actividad enzimática de CCD4 (Carotenoid Cleavage Dioxygenase 4), mediante una vía de escisión y oxidación de carotenoides como en el caso de ABA y de la estrigolactona. Además, mediante el uso de marcadores del desarrollo de la hoja, se demostró que la hoja de la mutante *clb5-1* está afectada en la respuesta a auxina, el establecimiento de la polaridad adaxial-abaxial y en la división y expansión celular. Adicionalmente, se demostró la importancia de los carotenoides y la proteína GUN1 en el desarrollo del embrión. Los datos anteriores sugieren la existencia de un nuevo papel de ZDS en desarrollo de las plantas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	6
1.2. Desarrollo de la hoja en <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
1.2.1. Iniciación de la hoja	8
1.2.2. La formación de los ejes de la hoja	10
1.2.3. La transición del crecimiento proliferativo al expansivo	12
1.3. Desarrollo del cloroplasto	13
1.4. Señalización retrógrada (cloroplasto a núcleo)	15
1.4.1. La vía de señalización Plastid Gene Expression (PGE)	15
1.5. Los carotenoides	16
1.6. Biosíntesis de Carotenoides	17
1.6.1. La desaturación e isomerización en plantas	18
1.6.2. Caroteno desaturasa (CRTI)	19
1.6.3. Apocarotenoides	19
1.7. Carotenoid Cleavage Dioxigenases (CCDs)	20
1.8. Señales generadas a partir de carotenoides	21
2. ANTECEDENTES	22
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6. RESULTADOS	30
6.1. El fenotipo de <i>clb5-1</i> no se debe a la ausencia de ABA o de las estrigolactonas...30	
6.2. Caracterización de los defectos en el desarrollo de la hoja de <i>clb5-1</i>	31
6.2.1. La respuesta a las auxinas está afectada en las hojas de la mutante <i>clb5-1</i>	32
6.2.2. La identidad adaxial y abaxial de la hoja de <i>clb5-1</i> está afectada.....	34
6.2.3. La transición del crecimiento proliferativo al expansivo está afectada en la hoja de <i>clb5-1</i>	36
6.3. La doble mutante <i>ccd4 clb5-1</i> muestra mejora en el fenotipo de hoja y expresión genética	38
6.4. La doble mutante <i>gun1 clb5-1</i> es embrión letal	42
7. DISCUSIÓN	44
7.1. <i>clb5-1</i> genera una señal derivada de carotenoides capaz de regular la expresión genética y el desarrollo de la hoja	44
7.2. La respuesta a auxina está alterada en la hoja de <i>clb5-1</i>	45
7.3. Los dominios adaxiales y abaxiales no se establecen en <i>clb5-1</i>	47
7.4. La señal <i>clb5-1</i> podría modular el ciclo celular en la hoja	48
7.5. CCD4 podría estar participando en la síntesis de la señal derivada de carotenoides en la mutante <i>clb5-1</i>	49
7.6. GUN1 y los carotenoides son necesarios para el desarrollo de la semilla	51
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	53
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO	55
10. FIGURAS DE APOYO	57
11. APÉNDICE	59
12. LITERATURA CITADA	60

1.INTRODUCCIÓN

1.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana es una planta crucífera pequeña, que forma parte de la familia de la mostaza (Brassicaceae), tiene una amplia distribución natural en Europa, Asia y Norte América. Los ecotipos Columbia (Col) y Landsberg erecta (Ler) son los más usados para análisis genéticos y estudios moleculares. Su ciclo de vida se completa en seis semanas e incluye la germinación de la semilla, la formación de la roseta, el crecimiento de la parte aérea, la floración y la maduración de las primeras semillas (Meinke et al., 1998).

Algunas características principales de *Arabidopsis* que han favorecido su utilización como organismo modelo de plantas son; posee un genoma pequeño (125Mb) el cual ha sido secuenciado, se cuenta con mapas genéticos y físicos de los 5 cromosomas, tiene un ciclo de vida corto, produce una gran cantidad de semillas, es fácil su cultivo y manipulación en el laboratorio. Además se tienen métodos de transformación eficiente utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y por último, se cuenta con un gran número de líneas mutantes y recursos genéticos (www.arabidopsis.org).

Desde hace tiempo, se han identificado cientos de mutaciones en *Arabidopsis*, que afectan el desarrollo y crecimiento de la planta. Algunas mutaciones que alteran muchos procesos celulares y fisiológicos como: la gametogénesis, la formación de semillas, el desarrollo de raíz y hoja, la floración, la senescencia, el metabolismo primario y secundario, la transducción de señales, la respuesta a hormonas, interacción con patógenos y con señales del medio ambiente (Meinke et al., 1998). *Arabidopsis* ha sido el modelo por excelencia para el estudio de procesos genéticos, fisiológicos, moleculares y del desarrollo de plantas superiores generando conocimiento que puede ser extrapolado a otras especies vegetales y organismos (www.arabidopsis.org).

1.2. Desarrollo de la hoja en *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana es una planta que crece de 20 a 25 cm de alto, desarrolla hojas que forman una roseta en la base de la planta y otras en el tallo, llamadas hojas caulinares (www.arabidopsis.org). Como se mencionará más adelante, las hojas de *A. thaliana* son de

especial interés en este trabajo, por lo que esta sección se describirán aspectos del desarrollo de este órgano.

Las hojas tienen un papel importante en la fotosíntesis, la respiración y la fotopercepción. Se derivan de una población de células pluripotenciales llamadas SAM (por sus siglas en inglés, Shoot Apical Meristem) a través de la división y diferenciación de las células fundadoras de la hoja. Posteriormente, la actividad de división celular direccional acompaña el crecimiento hacia el exterior del primordio foliar de la periferia del SAM. La diferenciación celular inicia en cuanto se da la extensión del primordio, dando lugar a las células especializadas, que sustentan las funciones fisiológicas de la hoja. Un evento clave en la diferenciación de la hoja es la especificación de los destinos celulares adaxial (la zona superior de la hoja) y abaxial (la zona inferior), ya que produce el desarrollo de una lámina aplanada. Una vez que la forma básica de la hoja se establece, la división celular cesa y la hoja crece predominantemente vía expansión celular para alcanzar su forma y tamaño final (Figura 1a) (Efroni et al., 2010, Barkoulas et al., 2007, Tsukaya, 2002).

En general, los eventos tempranos en el desarrollo de la hoja se pueden dividir en tres procesos principales, la iniciación del primordio foliar, el establecimiento del eje abaxial-adaxial y el desarrollo del meristemo marginal (Tsukaya, 2002) (Figura 1a). Así, Koenig y Sinha (2007) dividen el desarrollo de la hoja en tres ejes de crecimiento: proximal/distal, medial/lateral y adaxial/abaxial (Figura 1b).

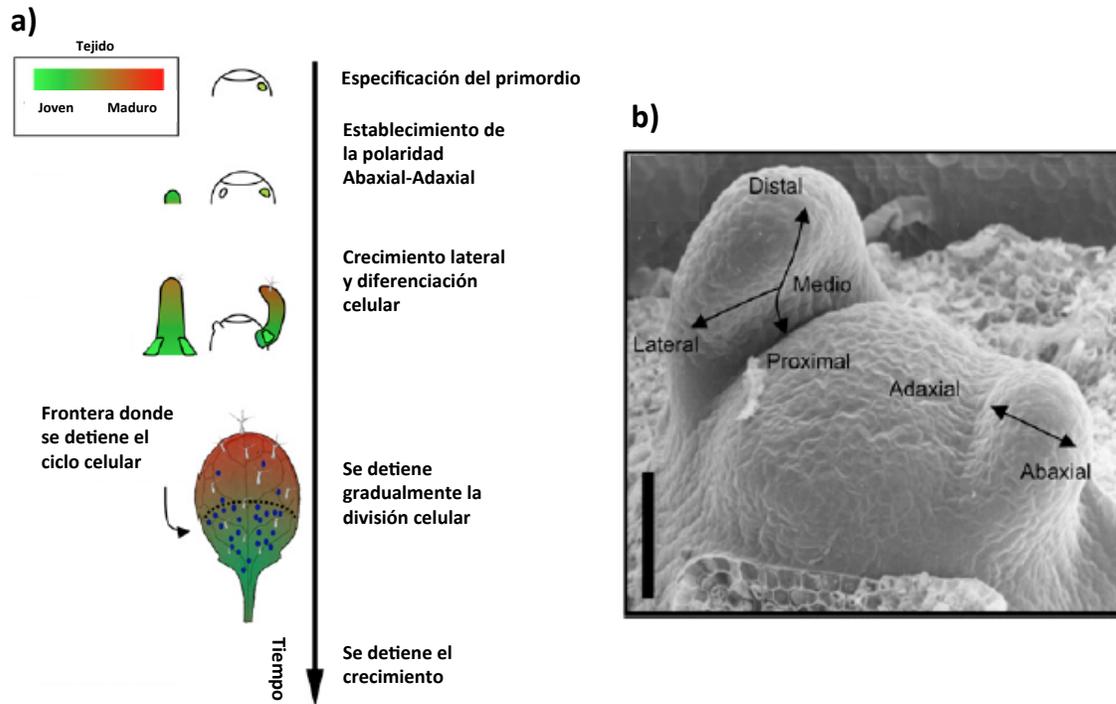


Figura 1. Esquema del desarrollo de la hoja. a) Esquema que explica brevemente la formación de la hoja. b) se muestran los tres ejes de crecimiento proximal-distal, medial-lateral y adaxial-abaxial..Modificada de Efroni *et al.*, 2010.

1.2.1. Iniciación de la hoja

El desarrollo de los órganos laterales inicia con la división de las células indiferenciadas que se encuentran en la zona central del meristemo (SAM). Cuando estas células entran en la zona periférica, se diferencian y se dividen rápidamente estableciendo lo que será la hoja (Hake et al., 2004).

Las fitohormonas como las auxinas, están relacionadas con el control del desarrollo de la hoja, ya que promueven la iniciación de la hoja. Las células fundadoras de la hoja tienen una respuesta incrementada a las auxinas debido al transporte polar de esta fitohormona al meristemo vía PIN1 (PINFORMED1, un facilitador de flujo de auxina). PIN1 se localiza en las células epidérmicas del SAM, dirigiendo el flujo de las auxinas hacia el interior del meristemo. El flujo convergente de las auxinas crea un máximo de actividad en la periferia del SAM, el cual marca los sitios de iniciación de la hoja. Además, la polaridad basal de PIN1 en las células epidérmicas del primordio incipiente, permite la internalización del flujo de las auxinas a través del centro de la hoja, definiendo la posición de la futura vena media o vena central (Barkoulas et al., 2007, Heisler et al., 2005, Reinhardt et al., 2003). La hoja incipiente actúa inicialmente

como un captador de auxinas, tanto que agota la poza de esta fitohormona de las células que se encuentran en proximidad, inhibiendo la iniciación de otros primordios de hoja adicionales en la periferia del SAM (Figura 2). Posterior a la iniciación de la hoja, el primordio de la hoja empieza a producir auxinas y son transportadas hacia el meristemo para contribuir a eventos subsiguientes del desarrollo de otras hojas (Scarpella et al., 2010).

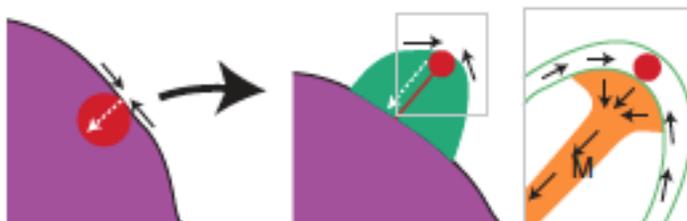


Figura 2. La iniciación de la hoja. La hoja se inicia en los flancos del SAM (morado) y corresponde a los sitios de actividad elevada de auxina (rojo) debido a la convergencia de PIN1, de ahí la auxina es transportada a los tejidos internos (flecha blanca), donde gradualmente se induce la formación del haz vascular. Durante la iniciación de la hoja, un primordio pequeño (verde) se vuelve visible en los flancos del SAM. El flujo de auxina converge para formar un máximo de auxinas en la punta del primordio. Modificado de Scarpella et al., 2010.

Un paso importante en el desarrollo de la hoja, es la pérdida de la pluripotencialidad en el SAM. El papel principal de los genes *KNOX* (class I *knotted*-like homeobox) es mantener la indeterminación celular en el meristemo (Hake et al., 2004). La pérdida de función de los *KNOX* resulta en el consumo de las células del meristemo y el cese del crecimiento durante etapas tempranas del desarrollo. Un gen muy estudiado de dicha familia es *SHOOT APICAL MERISTEMLESS (STM)* en *A. thaliana*, el cual se expresa en tejidos meristemáticos y se reprime en los órganos laterales en desarrollo como son las hojas (Koenig & Sinha, 2007). Además, los genes *KNOX* modifican los balances hormonales regulando negativamente los genes de biosíntesis de las giberelinas (GA) (Efroni et al., 2010). Por otro lado, las proteínas *KNOX* regulan de manera positiva la expresión de los genes de biosíntesis de citocininas por lo tanto aumentan los niveles de estas hormonas (Moon & Hake, 2011).

Los mecanismos de represión de la expresión de *KNOX* en el primordio foliar incipiente son poco conocidos. Sin embargo, ya se han identificado muchos factores se han identificado que son necesarios para el mantenimiento de su represión durante el desarrollo de la hoja. Los factores más estudiados son los genes de la familia de proteínas ARP: *ASYMETRIC LEAVES1 (AS1)*, *ROUGH SHEATH2 (RS2)*, y *PHANTASTICA (PHAN)* (Koenig y Sinha, 2007). Además, el uso de algunos genes reporteros que marcan la actividad de las auxinas, durante la

especificación de la hoja en el SAM, sugieren que éstas contribuyen a la represión de los factores KNOX (Scarpella et al., 2010).

La función de los genes *ARP* como los represores de los genes *KNOX* está conservado en muchas especies. En *A. thaliana* la mutante *as1* muestra expresión ectópica de genes *KNOX* (*BP*, *KNAT6* y *KNAT2*) en las hojas, lo que resulta en la producción de tallos ectópicos. Se sabe que *STM* reprime la expresión de *AS1* en el meristemo previniendo diferenciación prematura en la zona central y permitiendo expresión de los otros genes *KNOX* como *BREVIPEDICELLUS* (*BP*) (Koenig & Sinha, 2007).

1.2.2. La formación de los ejes de la hoja

Como ya se mencionó, después de la iniciación de la hoja, su desarrollo posterior involucra el establecimiento de tres ejes de asimetría llamados: próximo-distal, medial-lateral y adaxial-abaxial (Figura 1b). La correcta adquisición de los destinos celulares entre estos tres ejes es fundamental para que las hojas tengan la forma y tamaño correcto (Efroni et al., 2010). La familia de genes *ARP* juegan un papel importante en la diferenciación entre el eje proximal-distal, pero interesantemente también son necesarios en la diferenciación de la superficie adaxial. Estudios con mutantes, han demostrado que la proteína PHANTASTICA es requerida para la especificación de las superficies adaxiales de la hoja de *Antirrhinum majus*, ya que la pérdida de *PHAN* resulta en una completa abaxialización de la hoja y en la pérdida de la lámina. Otros genes que tienen un papel importante en la designación de las superficie adaxial pertenecen a la familia de los genes *HD-ZIPIII* (por sus siglas en inglés, Class III Homeodomain Leucine Zipper). Estos genes en *A. thaliana* incluyen a *REVOLUTA* (*REV*), *PHAVOLUTA* (*PHV*), *PHABULOSA* (*PHB*), *INCURVATA4* (*ICU4*) y *ATHB8* y estos actúan de forma redundante para especificar los tejidos adaxiales. Los transcritos de todos estos genes son blancos de degradación mediada por los microRNAs (miRNA) miR165 y miR166. Esta degradación en parte es requerida para la especificación del dominio abaxial. Como consecuencia de esta regulación la expresión de *REV*, *PHV* y *PHB*, está restringida a la superficie adaxial de la hoja (Koenig & Sinha, 2007, Barkoulas et al., 2007).

La familia de genes *KANADI* (*KAN*) juega un papel opuesto al de los genes *HD-ZIPIII* y *ARP* en el establecimiento de la polaridad de la hoja. Esta familia de factores de transcripción está compuesta de cuatro miembros, que se caracterizan por tener un dominio llamado GARP

(Sakai et al., 2000). Los genes *KAN* regulan la extensión de la lámina a través de promover la identidad abaxial en las hojas en desarrollo y cumplen esta función previniendo la expresión de los factores adaxiales HD-ZIP III durante el desarrollo de los tejidos abaxiales (Koenig & Sinha, 2007). Los genes *YABBY* (*YAB*) actúan río abajo de los genes *KAN*. En *A. thaliana*, estos genes se expresan en el dominio abaxial pero cuando se combinan múltiples mutaciones *yab* ocurre la adaxialización (Moon & Hake, 2011). Un gen muy estudiado de esta familia es el gen *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*) (Tsukaya, 2013).

También las auxinas son clave para la especificación del eje adaxial-abaxial de la hoja, ya que algunos reguladores parecen estar influenciados por la actividad de las auxinas (Scarpella et al., 2010). El máximo de las auxinas precede y podría controlar el establecimiento del eje adaxial-abaxial a través de *FILAMENTOUS FLOWER* y *REVOLUTA* (Vernoux et al., 2010, Heisler et al., 2005). Además, los factores de respuesta a auxina (ARF) ARF3/ETT y ARF4 facilitan la acción de *KANADI* (*KAN*) en la determinación abaxial (Barkoulas et al., 2007). Los datos indican que la modulación de la actividad de las auxinas y *KAN* están involucrados en establecer la polaridad de la hoja (Pekker et al., 2005) (Figura 3). Otros factores que son importantes para la determinación del eje adaxial-abaxial son *AS1* y *AS2*. Además de reprimir la expresión de genes *KNOX*, promueven la adaxialización regulando positivamente a los genes *HD-ZIP III* (Lin et al., 2003). Finalmente, las modificaciones en la cromatina también puede contribuir al desarrollo abaxial/adaxial. Las histona desacetilasas HDT1/HD2A y HDT2/HD2B, actúan junto a *AS1* y *AS2* para regular al *miRNA165/166* (Ueno et al., 2007).

En resumen, la especificación del eje adaxial-abaxial involucra una dinámica de señalización entre ambos ejes, más que una estricta delimitación de distintos tipos celulares aislados. Por lo tanto, perturbaciones en el desarrollo de la hoja resultan en cascadas de alteraciones en la expresión genética y su significado en el desarrollo puede ser difícil de interpretar (Barkoulas et al., 2007).

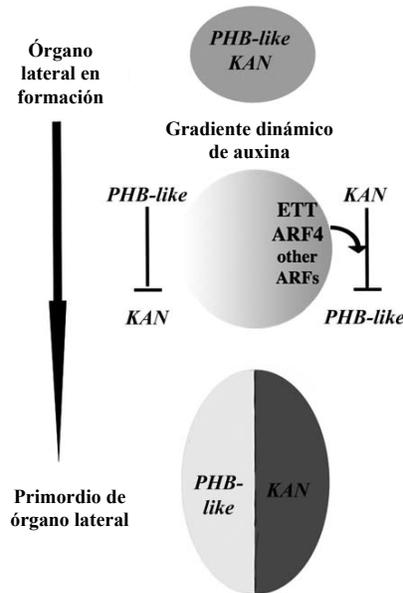


Figura 3. Papel que se ha propuesto para que las auxinas determinen la polaridad abaxial-adaxial de los órganos laterales. Cuando se inicia el primordio sus células coexpresan factores abaxiales y adaxiales. La división de los órganos laterales, en la parte abaxial expresan *KAN* y la parte adaxial expresan *PHB*, estableciéndose un mutuo antagonismo entre ambos tipos de factores. La concentración de las auxinas forma un ligero gradiente y eso se traduce en la acción diferencial de ARFs, permitiendo a *KAN* superar las actividades de *PHB* en el dominio abaxial. Modificado de Pekker et al., 2005.

1.2.3. La transición del crecimiento proliferativo al expansivo

La producción de las hojas planas requiere de una coordinada división celular durante los últimos estados de la expansión de la lámina. Desde hace algún tiempo se creía que mientras la hoja se desarrolla, se da una transición del crecimiento proliferativo a expansivo marcada por una “ola” del arresto del ciclo celular progresando desde la punta de la hoja hasta la base (Efroni et al., 2010, Barkoulas et al., 2007, Koenig & Sinha, 2007). Más recientemente, se ha hecho evidente que la transición de la proliferación a la expansión celular no es tan gradual como se había asumido, sino que es más bien una transición abrupta y es concurrente con la fotomorfogénesis (Andriankaja et al., 2012).

Los genes de *A. thaliana* como *PEAPOD1* (*PPD1*) y *PEAPOD2* (*PPD2*) se requieren para el arresto del ciclo celular específicamente en las divisiones de los progenitores de los estomas y el tejido vascular (White, 2006). Finalmente la proteólisis también es importante para el control de crecimiento en las hojas, dos ligasas de ubiquitina (*HUB1* y *BB*), definen tanto la tasa y la duración de la fase proliferativa del desarrollo del órgano (Barkoulas et al., 2007). Finalmente, las proteínas *JAGGED* (*JAG*) y *NUBBIN* (*NUB*) promueven la división celular en la lámina en desarrollo de las hojas de *Arabidopsis*. *JAG* se expresa en un patrón que coincide

con la actividad de división celular, su expresión se detecta a través del primordio incipiente, se localiza en la lámina y finalmente se excluye en la punta del primordio mientras la división celular se arresta en un gradiente ápico-basal (Dinnyeny et al., 2004).

1.3. Desarrollo del cloroplasto

Junto con las vacuolas y la pared celular, los plástidos son componentes característicos de las células vegetales. Estos organelos están involucrados en procesos centrales como la fotosíntesis y el almacenamiento de reservas. Los plástidos están comúnmente clasificados por los tipos de pigmentos que contienen (Figura 4), por ejemplo los cloroplastos contienen clorofilas y los cromoplastos contienen carotenos. Estos últimos acumulan grandes cantidades de pigmentos de rojos a amarillos, responsables de brindar color a las flores y los frutos de las plantas. Algunos plástidos que carecen de pigmentos se agrupan como leucoplastos y dentro de éstos tenemos aquellos que acumulan almidón (amiloplastos), aceites (oleinoplastos) o proteínas (proteínoplastos). Estos últimos tipos de plástidos son incoloros y están presentes principalmente en tubérculos y semillas (León & Guevara-García, 2008, Raven et al., 2003).

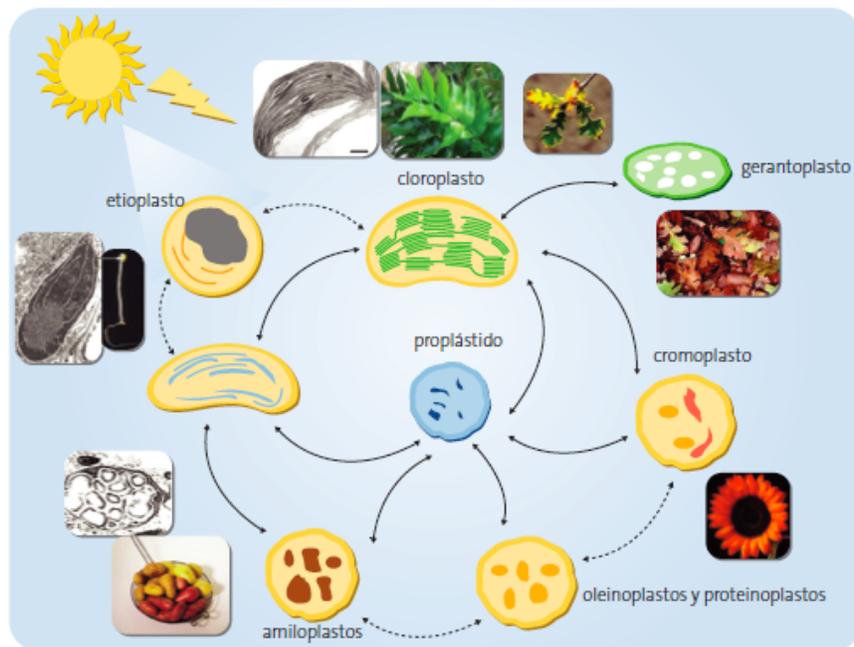


Figura 4. Distintos tipos de plástidos presentes en plantas. Todos los plástidos provienen de los proplástidos, la diferenciación de cada tipo de plástido depende de distintas señales. Tomado de León y Guevara-García, 2008.

En los cloroplastos maduros los pigmentos como la clorofila y los carotenos son receptores de la energía lumínica necesaria para la fotosíntesis. En las plantas, los cloroplastos

son los plástidos más estudiados, presentan usualmente una forma de disco y tienen un diámetro entre cuatro y seis micrómetros (Raven et al., 2003). Una doble membrana, interna y la externa, delimitan al cloroplasto. Dentro del cloroplasto existen extensas membranas llamadas tilacoides que forman vesículas. Estas vesículas contienen un espacio interno o lumen y se extienden paralelamente al eje cloroplástico principal, algunas apareciendo individualmente (tilacoides estromáticos) o como vesículas organizados en pilas denominado como grana (Lopez-Juez & Pyke, 2005).

Los plástidos al igual que la mitocondria son organelos semiautónomos que llevan a cabo varias funciones regulatorias y metabólicas. El genoma de los plástidos, desde las algas verdes hasta las plantas vasculares, está constituido por una molécula circular que contiene aproximadamente 120 genes (Barkan & Goldschmidt-Clermont, 2000). La función de los plástidos es esencial para la vida de los eucariontes fotosintéticos. Esta función depende de las actividades de muchas proteínas, tanto sintetizadas en los plástidos como importadas desde el citosol (codificadas en el núcleo). Muchas de estas funciones se llevan a cabo por complejos enzimáticos con subunidades codificadas en ambos compartimientos celulares. Por lo tanto la coordinación precisa de la expresión de los genes cloroplásticos tanto nucleares como organelares es vital (Fujii & Small, 2011). Es por ello que el proceso de diferenciación de los cloroplastos involucra la contribución tanto del DNA nuclear como del genoma plastídico; aunque el control general reside mayoritariamente en el núcleo. Algunas proteínas cloroplásticas están codificadas en el DNA plastídico y son sintetizadas dentro del cloroplasto, pero la mayoría de las proteínas cloroplásticas (95%) están codificadas en el DNA nuclear, se traducen en el citosol y son importadas al cloroplasto (Raven et al., 2003).

La biogénesis y el desarrollo del cloroplasto en las plántulas se describe como el proceso de diferenciación del plástido progenitor, el proplástido a un cloroplasto maduro, ya sea directamente o pasando por un intermediario generado en condiciones de oscuridad, conocido como etioplasto (Pogson & Albrecht, 2011). El desarrollo del cloroplasto es un proceso complejo y altamente regulado. La transcripción de los genes plastídicos, las diferentes modificaciones post-transcripcionales, la traducción y el ensamblaje de complejos proteicos son pasos críticos de la biogénesis del cloroplasto (Waters & Langdale, 2009). Por lo tanto, la transcripción de los genes del cloroplasto, la maduración del RNA, la traducción y la modificación de proteínas, tienen un gran impacto en la biogénesis y desarrollo del cloroplasto (Pogson & Albrecht, 2011).

1.4. Señalización retrógrada (cloroplasto a núcleo)

A la señalización del cloroplasto o de la mitocondria al núcleo, se le conoce como señalización retrógrada. Este proceso regula la expresión de los genes codificados en el núcleo que codifican para proteínas del organelo y de otras proteínas celulares para orquestar el desarrollo y metabolismo de los organelos. El hecho de que muchas proteínas, sean necesarias para la función del cloroplasto, y que están codificadas en el núcleo requiere de una regulación estrecha entre el estatus funcional del cloroplasto y la transcripción de genes nucleares (Pogson & Albrecht, 2011).

Las diferentes vías de señalización retrógrada revisadas en Estavillo *et al.* (2012) son:

- (a) la vía asociada con la biosíntesis de intermediarios de tetrapirroles como Mg-protoporfirinalX y el grupo hemo
- (b) La vía que inicia con cambios en el potencial redox en la cadena transportadora de electrones.
- (c) La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y singulete de oxígeno (1O_2) es un tercer mecanismo que puede dar cambios en la expresión de genes nucleares. Finalmente, está
- (d) La vía asociada con la expresión de genes plastídicos (PGE)

En este trabajo, en particular nos interesó la vía PGE.

1.4.1. La vía de señalización Plastid Gene Expression (PGE)

Una vía de señalización retrógrada que se genera durante el desarrollo del cloroplasto es la vía de señalización denominada PGE (plastid gene expression). Esta vía se descubrió mediante el estudio de una serie de mutantes de *A. thaliana* llamadas *gun* (*genomes uncoupled*), las cuales al ser tratadas con el inhibidor de la síntesis de los carotenoides norfluorazona acumulan los transcritos para *Light Harvesting Chlorophyll Binding protein (LHCB1.2)*. En plantas silvestres, el tratamiento con norfluorazona causa fotoblanqueamiento, afecta la diferenciación del cloroplasto y provoca la represión de muchos genes nucleares que participan en la fotosíntesis, entre los que se encuentra *LHCB1.2*. Con la caracterización de las mutantes *gun* se encontró que la biosíntesis de los tetrapirroles (compuesto que forma parte de

las clorofila) era importante para esta señalización, aunque la naturaleza de la señal está aún en debate. Estos estudios también mostraron el papel de la proteína GUN1 en la señalización retrógrada. La mutante *gun1*, afecta la señalización de cloroplasto a núcleo, aunque no muestra alteraciones en la biogénesis del cloroplasto en ausencia de inhibidores (Pogson & Albrecht, 2011). La proteína GUN1, pertenece a la subfamilia tipo P de las proteínas Pentatricopeptide Repeat Protein (PPR). GUN1 tiene similitud con la proteína PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMOSOME PROTEIN 2 (PTAC2) y se ha visto que las mutantes carentes de PTAC2 muestran defectos causados por la pérdida de la transcripción de la RNA polimerasa codificada en el plástido (PEP). Se ha propuesto que PTAC2 es parte de un gran complejo multiprotéico asociado con la transcripción plastídica (Pfalz et al., 2006). Además, la proteína GUN1 tiene un dominio SMR (mutS-related) el cual se une al DNA pero cuya función exacta no se ha establecido (Koussevitzky et al., 2007). Probablemente GUN1 tenga una función similar a PTAC2 mediando la expresión de genes plastídicos. En condiciones donde no hay una disrupción en el estatus funcional, del desarrollo del cloroplasto y de la expresión de genes plastídicos (PGE); la expresión de genes nucleares permanece normal. Por otro lado, la inhibición de la PGE (usando inhibidores de la traducción del plástido) altera el estado de la proteína GUN1, activando la señal mediada por ella misma. La señal retrógrada es transmitida al núcleo mediante la acción de factores aún no identificados y dispara la represión de genes cloroplásticos codificados en núcleo (como *LHCB1.2*). La falta de la proteína GUN1, como en la mutante *gun1*, eliminaría la iniciación de la señal retrógrada (Cottage & Gray, 2011, Pogson et al., 2008).

1. 5. Los carotenoides

Los plástidos alojan una variedad de rutas biosintéticas y contienen maquinarias sofisticadas que producen una gran variedad de compuestos que realizan funciones celulares vitales. Muchos de estos compuestos producidos son importantes para la agricultura y la nutrición humana. Entre ellos se encuentran los isoprenoides plastídicos (clase de compuestos orgánicos formados por dos o más unidades derivados del hidrocarburo de cinco carbonos, el isopreno) (Walter et al., 2010).

Los carotenoides son compuestos isoprenoides que comprenden un grupo diverso de pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos compuestos tienen diversas funciones, ya que sirven como pigmentos accesorios para cosechar la luz para la fotosíntesis y

constituyen unidades estructurales básicas en el aparato fotosintético, además actúan como fotoprotectores previniendo de daños oxidativos (Lu y Li, 2008). Las escisiones (cortes) oxidativas de los carotenoides dan lugar a los apocarotenoides que incluyen a moléculas señalizadoras como hormonas, volátiles, aromas, cromofóros, entre otras moléculas (Walter et al., 2010).

En las plantas, los carotenoides son sintetizados *de novo* en casi todos los tipos de plástidos, pero se acumulan en grandes cantidades en los cloroplastos y cromoplastos (Howitt & Pogson, 2006). Los carotenoides forman dos grandes grupos, los llamados carotenos y su derivados hidrogenados, denominados como las xantofilas (Dall'Osto et al., 2013). En cloroplastos, los carotenoides están localizados en las membranas fotosintéticas e integrados con proteínas de unión a clorofila para formar complejos pigmentos-proteína, mientras en los cromoplastos, los carotenoides están asociados con lípidos polares y proteínas asociadas a los carotenoides para formar lipoproteína que secuestran y retienen grandes cantidades de carotenos (Vishnevetsky et al., 1999).

1.6. Biosíntesis de Carotenoides

Como otros isoprenoides, la biosíntesis de carotenoides (Figura 5) inicia con la síntesis de dos bloques de cinco carbonos, el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero alílico dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Ambos bloques se sintetizan a partir del gliceraldehído 3-fosfato y piruvato a través de 7 pasos biosintéticos (Cordoba et al., 2009). Tres moléculas de IPP y una de DMAPP se condensan por la geranyl-geranyl difosfato (GGDP) sintasa para producir GGDP, una molécula de 20 carbonos que es el precursor directo de los carotenoides (Lu y Li, 2008). La biosíntesis de carotenos puede ser dividida en dos partes. En la primera se produce una molécula lineal con dobles enlaces *trans*. En la segunda parte esta molécula se modifica, cicliza y oxigena produciendo diferentes carotenoides. La primera parte de la vía inicia con la condensación de dos moléculas de GGDP por la fitoeno sintasa (PSY) produciendo el primer caroteno (fitoeno). La síntesis de este caroteno de 40C representa uno de los pasos limitante de la vía. Posteriormente, en plantas, el fitoeno es desaturado a licopeno por dos enzimas evolutivamente relacionadas; la fitoeno desaturasa (PDS) y la ζ -caroteno desaturasa (ZDS). También dos isomerasas *cis-trans* (Z-ISO y CRTISO) participan en estas reacciones para convertir el fitoeno poli-*cis* en licopeno todo-*trans*. El licopeno es posteriormente ciclizado o hidroxilado para producir los α -carotenos o los β -carotenos, los cuales a su vez son

hidroxilados para producir luteína y zeaxantina, respectivamente (Figura 5) (DellaPenna & Pogson, 2006).

Existen otras ramas metabólicas importantes que se originan del GGDP, antes de que sea tomado por la enzima PSY para producir carotenoides. Por ejemplo, cuando la geranilgeranil reductasa (GGR) cataliza la reducción de GGDP al fitol, el cual se convierte en la cadena lateral de las clorofilas, filoquinonas y tocoferoles. Además, GGDP es también el sustrato para la *ent*-copalil difosfato sintasa (CPS), que junto con la *ent*-kaureno sintasa (KS) llevan el flujo metabólico hacia la biosíntesis de giberelinas (Lu & Li, 2008).

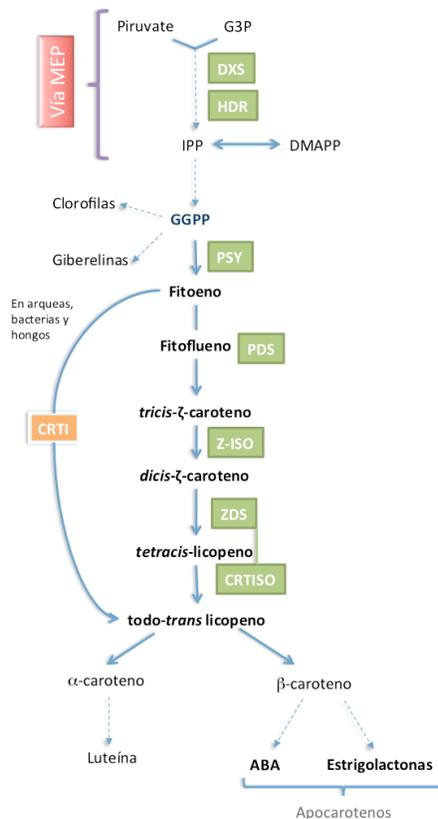


Figura 5. Vía biosintética de los carotenoides. Modificada de Lu y Li, 2008.

1.6.1. La desaturación e isomerización en plantas

Como se mencionó, las desaturaciones de la molécula de fitoeno son catalizadas por las enzimas fitoeno y ζ -caroteno desaturasas (PDS y ZDS). La generación de los dobles enlaces en estas reacciones involucra un mecanismo de deshidrogenación (la eliminación de dos átomos de hidrógeno en cada desaturación) y se ha demostrado que el aceptor de estos hidrógenos es la molécula de plastoquinona (Breitenbach, 2002). La PDS es la primera de

estas desaturasas y cataliza la conversión de fitoeno a ζ -caroteno (9,15,9'-*tricus*- ζ -caroteno) vía el intermediario fitoflueno (9,15-*cis*-fitoflueno). Antes de que actué la ZDS, el 9,15,9'-*tricus*- ζ -caroteno es isomerizado para dar lugar a 9,9'-*dicis*- ζ -caroteno, que es el sustrato directo de la enzima ZDS. Esta isomerización se lleva a cabo por la enzima Z-ISO (Chen et al., 2010), o de una manera no enzimática a través de la luz (Fraser et al., 2009). El 9,9'-*dicis*- ζ -caroteno es desaturado en dos diferentes posiciones por la ZDS produciendo el intermediario 7,9,9'-*tricus*-neurosporeno y posteriormente 7,9,7',9'-*tetracus*-licopeno. Esta reacción también involucra una segunda reacción de isomerización *cis-trans* la cual es catalizada por la enzima conocida como CRTISO (por sus siglas en inglés Carotenoid Isomerase), que actúa en paralelo con ZDS sobre los 7,9,7',9'-*tetracus*-licopeno para producir todo-*trans* licopeno, también esta reacción puede ser catalizada por la luz (Sandmann, 2009, Isaacson et al., 2002, Park et al., 2002).

1.6.2. Caroteno desaturasa (CRTI)

Interesantemente, el análisis de la biosíntesis de carotenos en arqueas, bacterias y hongos mostró que las reacciones de desaturación para la síntesis del licopeno todo-*trans*, en estos organismos, es catalizada por una sola enzima llamada caroteno desaturasa (CRTI). Estos datos contrastan con la desaturación poli-*cis* de cianobacterias y plantas que involucra a las dos desaturasas evolutivamente relacionadas (PDS y ZDS) y las dos isomerasas (Z-ISO y CRTISO) que se describieron anteriormente. Es decir, CRTI, por si sola, realiza las mismas reacciones de desaturación e isomerización catalizadas por las cuatro enzimas de la primera parte de la vía de la biosíntesis de carotenoides (Figura 5) (Sandmann, 2009).

1.6.3. Apocarotenoides

Se sabe que diferentes carotenoides pueden ser catabolizados por enzimas como CCOs (carotenoid cleavage oxygenases), aunque en plantas estas enzimas actúan como dioxigenasas y son llamadas CCDs (Carotenoid Cleavage Dioxygenases, por sus siglas en inglés) (Walter et al., 2010), las cuales producen moléculas derivadas de carotenos conocidas como apocarotenoides. Además de ser catabolizados por vía enzimática, los carotenoides también pueden ser modificados por reacciones (no enzimáticas) inducidas por la luz (DellaPenna & Pogson, 2006). Estos apocarotenoides tienen diversas funciones, actúan como señales para el desarrollo de la planta y defensa, como agentes antifúngicos, como volátiles; y además contribuyen al sabor y aroma de flores y frutos (Walter et al., 2010, Auldridge et al.,

2006). Las fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) y las estrigolactonas son algunos de los apocarotenoides más conocidos, las cuales regulan una gran variedad de procesos biológicos durante el desarrollo de las plantas (Xie et al., 2010, Lu & Li, 2008, DellaPenna & Pogson, 2006).

1.7. Carotenoid Cleavage Dioxygenases (CCDs)

Las CCDs pertenecen a una familia multigénica de nueve miembros en *Arabidopsis* (CCD1, 4, 7, 8 y NCED2, 3, 5, 6 y 9) (Huang et al., 2009). Su caracterización bioquímica demostró que la mayoría de las CCDs tienen promiscuidad por sus sustratos. Estas CCDs tienen diferentes localizaciones subcelulares, por ejemplo CCD1 es citosólica, mientras otras tienen péptidos de tránsito para su localización a plástidos. La familia de CCDs incluyen a las enzimas NCEDs (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases), las cuales todas escinden epoxixantofilas y producen xantoxianina que es el precursor de la hormona ABA. La primera CCD fue clonada a partir de una mutante de maíz afectada en la biosíntesis de ABA y se mostró que dicha enzima escinde específicamente el doble enlace 11-12 del sustrato nueve-cis-epoxycarotenoide, de donde derivó el nombre de NCEDs. En *A. thaliana*, el subgrupo de NCEDs contiene cinco miembros, todos dirigidos a plástidos y todos involucrados en la biosíntesis de ABA (Rosati et al., 2009).

Se ha demostrado que la CCD1 se localiza en el citosol, contrastando con todas las otras CCDs. Estudios de escisión de carotenos de 40 carbonos han mostrado que las escisiones duales son necesarias para la formación de apocarotenoides de 13 carbonos que dan lugar a compuestos de aromáticos y algunos de esencia (Rosati et al., 2009). Aunque los sustratos para la CCD1 están inaccesibles para una enzima citoplásmica, existen cantidades significativas de carotenoides en la membrana externa de los plástidos, los cuales podrían ser accesibles para dicha enzima (Auldrige et al., 2006).

Finalmente, las enzimas CCD4 son las menos caracterizadas. Por análisis proteómicos se sabe que CCD4 está localizada en plástidos y en particular en regiones suborganelares conocidas como plastoglobulos. Una característica en común de las CCD4 es su actividad de escisión 9-10 o 9-10/9'-10'. En contraste con la CCD4, las actividades y funciones de las enzimas CCD7 y CCD8 son menos controversiales. Los genes *CCD7* y *CCD8* se identificaron en mutantes que mostraban mayor ramificación de la parte aérea (tallos). El papel específico de

ambas enzimas está relacionado con la producción de la hormona inhibitoria de la ramificación, las estrigolactonas. Mediante el estudio de las mutantes *max* (more axillary branching), se encontró que la mutante *max3* de *A. thaliana* está afectada en el gen *CCD7*. La mutante *max4* está comprometida con la función del gen *CCD8* (Walter et al., 2010, Rosati et al., 2009).

1.8. Señales generadas a partir de carotenoides

Además de las hormonas ABA y estrigolactonas, en los últimos años se han identificado apocarotenoides que funcionan como moléculas señalizadores. Este es el caso del compuesto volátil de cadena corta llamado β -ciclocitral (β -CC), el cual es capaz de difundir en la célula. Se sabe que la producción de $^1\text{O}_2$ es una de las respuestas tempranas a estrés por alta luz en *Arabidopsis* y se descubrió que el exceso de $^1\text{O}_2$ causa oxidación de β -carotenos formándose el β -CC. Este compuesto se acumula 1.5 veces más después de una hora de tratamiento con estrés por luz. Interesantemente, dicha acumulación está acompañada por la inducción de genes específicos de respuesta a estrés por $^1\text{O}_2$. Esta inducción es específica, ya que no se aumenta la respuesta de genes responsivos a H_2O_2 . Existe evidencia reciente que apoya que el β -CC funciona como la señal que transmite el estrés causado por la acumulación de $^1\text{O}_2$ y es capaz de incrementar la tolerancia al daño fotooxidativo (Estavillo et al., 2012, Ramel et al., 2012).

En el trabajo de Kachanovsky *et al.*, (2012) se mostró el papel que tienen los metabolitos derivados de algunos carotenoides que son capaces de regular la expresión genética en el fruto de tomate. Las mutaciones *yellow-flesh* y *tangerine* afectan enzimas de la biosíntesis de carotenoides que actúan en vía enzimática lineal que controlan la acumulación del licopeno en el fruto de tomate. La mutante *yellow-flesh* está afectada en la *PSY1*, la primera enzima limitante de la vía de síntesis de los carotenoides. La mutante *tangerine* está afectada en la enzima CRTISO, una enzima río abajo en la vía. Se esperaría que *yellow-flesh* fuera epistática a *tangerine*, pero interesantemente la mutación *tangerine* es epistática a *yellow-flesh*, ya que el fenotipo de la doble mutante es igual al fenotipo *tangerine*. En la doble mutante la transcripción de *PSY1* se recupera parcialmente al nivel de producir suficiente fitoeno y producir los carotenoides subsecuentes en la vía. Esta respuesta pudiera ser causada por la composición aberrante de carotenoides, que podrían funcionar como una señal, causada por el fondo *tangerine*. La naturaleza de la señal se desconoce, pero se ha propuesto que un incremento de la concentración de prolicopeno, *cis*-neurosporeno, y la acción de alguna CCD

podrían producir señales como *cis*-carotenos o apocarotenoides. Estas moléculas señalarían para regular la transcripción de *PSY1*.

Por último, existe otro compuesto no identificado que funciona como hormona e inhibe el desarrollo de la parte aérea (Van Norman et al., 2011). La mutante *bypass1* (*bps1*) parece generar una señal derivada de carotenoides independiente de ABA y estrigolactonas. *bps1* sobreproduce una sustancia móvil en las raíces que provoca el detenimiento del crecimiento de la parte aérea, tiene hojas pequeñas y radializadas, y un desarrollo de raíz anormal. Se ha demostrado, que la producción de esta señal móvil depende de carotenoides (directa o indirectamente) pero su identidad aún se desconoce, pero se cree que la proteína BPS1 podría ser un regulador negativo que controla su síntesis o entrada de la señal móvil al xilema (Van Norman et al., 2004).

2. ANTECEDENTES

Desde hace algún tiempo en el laboratorio se han estudiado algunas mutantes que afectan el desarrollo del cloroplasto (chloroplast biogenesis, *clb*). Entre ellas existen varias que afectan la síntesis de carotenos, y en particular la mutante *clb5-1*. *clb5-1* afecta al gen que codifica para la enzima ζ-caroteno desaturasa (ZDS). La ausencia de esta enzima afecta la biogénesis del cloroplasto en etapas muy tempranas de su desarrollo. La enzima ZDS, como se mencionó anteriormente, cataliza el segundo conjunto de desaturaciones del fitoeno. En consecuencia la mutante *clb5-1* es una planta albina de tamaño muy pequeño. Las mutaciones en los genes que codifican para otras enzimas de la vía de carotenos, como PDS y PSY, también resultan en plántulas albinas, sin embargo la mutante *clb5-1* tiene cotiledones irregulares curvados hacia abajo y sus hojas verdaderas son radiales, como proyecciones en forma de dedos sin diferenciación entre el peciolo y la hoja. Este fenotipo de la hoja es específico de dicha mutante y no se observa en las otras de las mutantes deficientes en carotenoides como *cla1*, *clb6* y *pds3*, que aunque son albinas tienen una morfología de hoja más normal. También, la mutante *clb5-1* tiene defectos importantes en la expresión de una variedad de genes cloroplásticos. Aunque ZDS participa el tercer paso de la vía de carotenoides, el desarrollo del cloroplasto en la mutante de dicha enzima está detenido en etapas más tempranas a comparación de mutantes tanto de la vía MEP, que provee los precursores para los carotenoides (IPP y DMAPP), como en las mutantes de los pasos iniciales de la vía específica de los carotenoides (Figura 6). Un análisis inicial del desarrollo de la hoja

de *clb5-1*, usando el marcador de la identidad adaxial de la hoja *pFIL-GUS*, mostró que la polaridad de las hojas primarias, aunque no de los cotiledones, está afectada (Figura de apoyo 1). Finalmente, la expresión de varios genes requeridos para el desarrollo del cloroplasto, codificados tanto en núcleo como en cloroplasto, está severamente disminuida en la mutante *clb5-1* en comparación con las otras mutantes anteriormente descritas y con la planta silvestre. Dichos defectos incluyen la baja acumulación de transcritos de genes nucleares directamente involucrados en la biosíntesis de carotenoides, como DXS (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase), HDR (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase) y para la enzima PSY, es también muy baja en *clb5-1*. Sin embargo, los defectos en la transcripción no son generalizados, ya que los transcritos de enzimas como *PDS3* o *CRTISO* son similares entre la mutante *clb5-1* y otras mutantes albinas e incluso entre las plantas de tipo silvestre (Figura de apoyo 2) (Avendaño-Vázquez et al., No publicado).

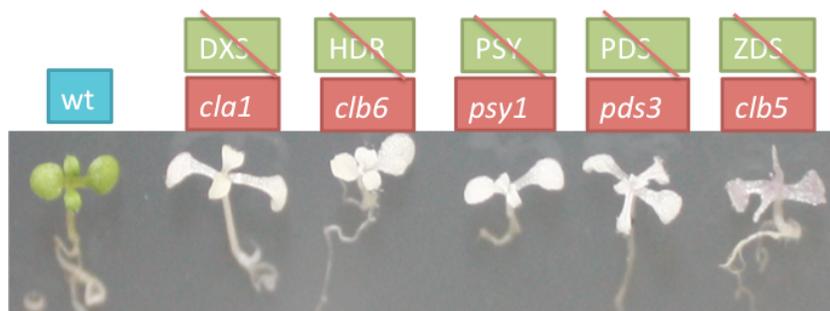


Figura 6. Morfología de las mutantes albinas afectadas en biosíntesis de carotenoides

Interesantemente, cuando la mutante *clb5-1* se crece en presencia de los herbicidas fluridona o norflurazona, que son compuestos que inhiben a la enzima PDS, el fenotipo de la hoja de *clb5-1* se recupera parcialmente presentando una lámina aplanada. La complementación parcial de la morfología de hoja se aprecia mejor siguiendo la expresión de marcadores de desarrollo como *REV:GUS* que es específico del tejido vascular, y con el cual también se observa un sistema vascular más complejo en presencia de los herbicidas. También se ha encontrado que la luz es otro factor que recupera parcialmente el fenotipo de la hoja de *clb5-1*. Cuando *clb5-1* se crece en baja luz ($1.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), aunque su fenotipo se mantiene albino, la morfología de su hoja se asemeja a la de la planta silvestre. Ya que la mutante *pds3* no muestra los defectos en las hojas o en la expresión genética como los que se observan en de *clb5-1*, se podría hipotetizar que la acumulación de los intermediarios producido entre las enzimas PDS y ZDS (fitoflueno, ζ -caroteno o algún otro derivado de ellos), sea la responsable de las alteraciones de *clb5-1*. Aunque las hormonas ABA y estrigolactonas se sintetizan a partir de esta vía, es difícil pensar que la reducción de estas hormonas causen

el fenotipo de *clb5-1*, ya que otras mutantes en los pasos anteriores en la vía como *cla1*, *clb6*, *psy* y *pds3* también deben de tener niveles reducidos de ambas hormonas y no muestran dicho fenotipo (Avendaño-Vázquez et al., No publicado).

El análisis mediante HPLC de los carotenoides, mostró que en las plántulas *clb5-1* se acumulan al menos 14 diferentes intermediarios, consistentes con fitoflueno y ζ -carotenos. Algunos de éstos son probablemente productos de oxidación de los ζ -carotenos donde la oxigenación resulta en un incremento de la hidrofobicidad. Concordantemente, ni en las plántulas *clb5-1* tratadas con fluridona, ni en la mutante *pds3* fueron detectados fitofluenos, ζ -carotenos o sus derivados. Estos datos son consistentes con que las mutantes *pds3* y *clb5-1* tratadas con fluridona no muestran alteraciones en la morfología de sus hojas y su expresión genética es más parecida a los niveles silvestres. Sin embargo, ninguna de estas especies de carotenoides desaparecen o disminuyen en las plantas *clb5* crecidas en baja luz. Incluso el nivel de fitoflueno y ζ -carotenos se aumenta, por lo que los datos apoyan que la identidad del compuesto, causante del fenotipo de *clb5-1* (hoja y expresión genética), pudiera ser un derivado (apocarotenoide) de estos carotenos, sin embargo su identidad es aún desconocida. Una posible explicación para la supresión del fenotipo de *clb5-1* se podría deber a que en condiciones de luz baja se disminuye la producción de la señal al inhibir o disminuir modificaciones de carotenoides o su degradación (Avendaño-Vázquez et al., No publicado). Como se describió anteriormente, se sabe que los carotenoides sufren modificaciones enzimáticas y no enzimáticas que incluyen la oxidación y escisión y además son sensibles a la luz (Camara & Bouvier, 2004). Es importante mencionar que muchos de los apocarotenoides producidos a través de estos procesos de modificación, tienen actividad señalizadora (Walter et al., 2010).

Hasta el momento estos datos sugieren que una nueva señal (un caroteno o derivado de éste), a partir de ahora esta señal será mencionada como la señal *clb5-1*, es generada como consecuencia de la pérdida de la actividad enzimática de ZDS, dando lugar al fenotipo de la mutante *clb5-1*. Esta señal regula la expresión de muchos genes codificados en el cloroplasto y en el núcleo algunos de los cuales afectan el desarrollo de la hoja. En esta regulación creemos que participa la intercomunicación de cloroplasto y núcleo, a lo que se le conoce como señalización retrógrada (Pogson & Albrecht, 2011, Avendaño-Vázquez et al., No publicado)

3. HIPÓTESIS

Ya que existe un defecto en las hojas de mutantes en la enzima ZDS, entonces los carotenos lineales acumulados en esta mutante funcionan directa o indirectamente como señales que afectan el desarrollo de la hoja y expresión genética nuclear.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Análisis morfológico y fisiológico del desarrollo de la hoja en *clb5-1* y determinación de las posibles señales que alteran dicho proceso.

Objetivos particulares:

1. Análisis morfológico de la mutante *clb5-1* crecida en diferentes concentraciones de las hormonas ABA y estrigolactona.
2. Análisis morfológico en diferentes etapas del desarrollo de las hojas de la mutante *clb5*, usando marcadores moleculares de hoja.
3. Análisis de la posible participación de las enzimas CCDs en la generación de la señal derivada de carotenoides en la mutante *clb5-1*.
4. Análisis de la posible vía de señalización retrógrada (mediada por GUN1) por la cual la señal derivada de la acumulación de intermediarios de carotenos en la mutante *clb5-1* modula la expresión genética nuclear.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Vegetal y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipos Heynh Columbia (Col-0) y Lansberg *erecta* (Ler). La germinación de semillas bajo condiciones estériles se realizó en medio con sales basales Murashige y Skoog 0.2X (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con 1% (2w/v) de sacarosa, 1X solución de vitamina B5 (Gamborg's, Sigma, Inc., St Louis, MO), 0.05% (w/v) de MES, solidificado con 0.8% (w/v) de fitoagar. Para el

crecimiento de plantas adultas se utilizó Metro-Mix 200 (SunGro, Bellevue, WA). Las plántulas se crecieron 16 horas luz, 8 horas de oscuridad en condiciones estándar ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) a 22°C en cámaras de crecimiento.

5.2. Esterilización y estratificación de semillas

Antes de someterse a experimentación las semillas se sometieron al siguiente proceso de esterilización y estratificación. El proceso de esterilización de semillas se realiza en una campana de flujo laminar. Las semillas se embeben en agua por 30 minutos. Posteriormente, se retira el agua y se añade un mililitro de etanol absoluto por un minuto. Se retira el etanol y se añade un mililitro de solución de hipoclorito de sodio al 20%, se agita durante siete minutos. Se retira la solución de hipoclorito y se realizan 3 lavados con agua estéril. Las semillas se someten a estratificación, es decir, se colocan en total oscuridad a 4°C durante cuatro días.

5.3. Extracción de DNA genómico de plantas

Para el aislamiento de DNA genómico se utilizó la técnica de extracción por CTAB de acuerdo a los siguientes pasos:

- Se pulveriza el tejido vegetal con la ayuda de pistilos y nitrógeno líquido en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Se agrega 300 μL de buffer 2X CTAB (ver apéndice) y se incuba a 65°C por 30 minutos. Posteriormente se deja enfriar.
- Se añade 300 μL de cloroformo y se mezcla en un vortex.
- Se centrifuga por dos minutos a 13,000 rpm para separar las fases.
- Se transfiere la fase acuosa de arriba a un nuevo tubo.
- Se agrega 300 μL de 2-propanol y se mezcla.
- Se centrifuga por 10 minutos para formar una pastilla de DNA.
- Se remueve el sobrenadante y se lava la pastilla con 500 μl de etanol al 70%.
- Se centrifuga por 10 minutos.
- Se remueve el etanol y se deja secar el tubo.
- Se agrega 50 μL de agua y se mezcla.

5.4. Análisis por PCR

5.4.1. Lista de oligonucleótidos usados

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
GUN1-TR-P	5'-GTG GGT TCT GCT GTT TCT TTG-3'
CCD4 FW	5'-ACA GAC TGT GAA ATC ATC CAC-3'
CCD4 Rv	5'-TCT CCT TTA GAC ACA TCA AGC-3'

GUN1-R	5'- GCT GTG GCG GTT GTT ATG TGG-3'
GUN1-T-LP	5'-ATG CTG CAT ATC AGS TTT CGG-3'
Sail LB	5'-GCC TTT TCA GAA ATG GAT AAA TAG CCT TGC TCC-3'
Salk LBb1	5'-GCG TGG ACC GCT TGC TGC AAC T-3'

5.4.2. Reactivos PCR

Buffer PCR 10X	2.5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2.5 µl
dNTPs 10 mM	0.25 µl
Oligo Fw (60 ng/µl)	1.0 µl
Oligo Rv (60 ng/µl)	1.0 µl

5.4.3. Programa general para las reacciones

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	30
Alineamiento	55	1 min	
Extensión	72	1 min/kb	
Extensión final	72	7 min	1

5.5. Análisis de la expresión de β-glucuronidasa (GUS)

La detección de la actividad histoquímica de GUS se realizó usando X-Gluc como sustrato. Las plántulas se embebieron en la solución de tinción (1mg/ml de X-Gluc, 100mM de Buffer de Fosfatos (pH 7), 5mM de Ferrocianuro de Potasio, 5mM de Ferricianuro de Potasio, EDTA 500mM, 1% Tritón X-100) y se les aplica vacío por 2 minutos. Posteriormente se dejan incubar a 37°C toda la noche.

5.6. Clareo de tejidos

Después de la detección de GUS se clarearon las plántulas de la siguiente manera. Se incuban las plántulas en la solución I (HCl 0.24N en metanol 20%) por 60 minutos. Después, se remueve la solución I y se añade la solución II (NaOH 7% en etanol 60%) en igual cantidad y se incuban a temperatura ambiente por 25 minutos. Se remueve la solución II y se agrega etanol 70% durante 30 minutos. Por último se remueve el etanol y se agrega glicerol al 50% con 2% DMSO.

5.7. Generación y análisis de las líneas marcadoras en los fondos *pds3*, *spc1-2* y *clb5-1*.

Para obtener las líneas marcadoras en los fondos mutantes *pds3*, *spc1-2* y *clb5-1* se realizaron cruzas de plantas que contuvieran el marcador de interés y la respectiva mutación. Se realizaron cruzas recíprocas entre las líneas marcadoras homocigotas de *CYCB1;1::D-box:GUS-GFP* (Eloy et al., 2011), *gPHB::GUS* (Gillmor et al., 2010), y *DR5:GUS* (Ulmasov et al., 1997) y plantas heterocigotas para las mutaciones *pds3*, *spc1-2* y *clb5-1*, respectivamente. Para esto se tomó el polen de la planta donadora y se transfirió al carpelo de la receptora. Las semillas se recolectaron al madurar las silicuas, entre dos a tres semanas después de haber realizado la crusa. Se obtuvieron plantas F1, las cuales portaban las mutaciones *pds3*, *spc1-2* y *clb5-1*, respectivamente, ya que segregaban embriones albinos en sus silicuas. Se colectaron las semillas F2 y se obtuvieron plántulas albinas que contenían el gen marcador de interés. En el caso de la línea marcadora *pFIL:GUS* ya se tenía en el fondo mutante *clb5-1*.

5.8. Obtención de las dobles mutantes *ccd4 pds3*, *ccd4 spc1-2* y *ccd4 clb5-1*

Las dobles mutantes *ccd4 pds3*, *ccd4 spc1-2* y *ccd4 clb5-1* se obtuvieron mediante cruzas entre plantas homocigotas para *ccd4* (*ccd4* es una mutante de inserción de SALK_097984C). El polen de plantas heterocigotas para *pds3*, *spc1-2* y *clb5-1* se transfirió al carpelo de plantas *ccd4*. Las semillas se recolectaron al madurar, después de dos semanas de haber realizado la crusa. Las semillas de la F1 dieron lugar a plantas F1 y de estas, se seleccionaron sólo las que segregaron embriones albinos. Después, se obtuvieron plantas F2 que también segregaron embriones albinos. A estas plantas se les extrajo DNA y se genotipificaron, mediante PCR (Figura suplementaria 2), para buscar la mutación homocigótica *ccd4*. Posteriormente, la F3 segregó las plantas dobles mutantes.

5.9. Generación del esquema comparativo de la morfología de las hojas

Para generar el esquema comparativo de la morfología de las hojas de diferentes líneas, se disectaron las primeras hojas verdaderas y se montaron en portaobjetos para su observación en el microscopio óptico. Se obtuvieron imágenes con una cámara digital y después con un editor de imágenes se cambió el color y se conservó la morfología de las primeras hojas verdaderas.

5.10. Generación de las dobles mutantes *gun1 pds3*, *gun1 spc1-2* y *gun1 clb5-1*

Para obtener las dobles mutantes *gun1 pds3*, *gun1 spc1-2* y *gun1 clb5-1* se realizó una cruce entre plantas homocigotas para *gun1* (la mutante *gun1* es una mutante de inserción SAIL_290_D09) y plantas heterocigotas para *pds3*, *spc1-2* y *clb5-1* respectivamente. Se tomó el polen de las mutantes de la vía de síntesis de carotenoides y se transfirió al carpelo de plantas *gun1*. Después, se obtuvieron plantas F1, las cuales segregaban embriones albinos lo que indicaba la presencia de las mutaciones *pds3*, *spc1-2* y *clb5-1* respectivamente. La semilla F2 se cultivó y se obtuvieron plantas, las cuales se corroboró que segregaran embriones albinos. Para asegurarse de que estas plantas F2 tuvieran la mutación *gun1*, se les extrajo DNA y se genotificaron mediante PCR(Figura suplementaria 3). Se encontraron varias líneas F2, de cada una de las dobles mutantes, que contenían la mutación en estado homocigótico para *gun1*. Se procedió a recolectar su semilla para su posterior germinación. Finalmente, la generación F3 segregó plantas dobles mutantes.

5.11. Extracción de proteínas

El tejido vegetal recolectado se pulverizó con la ayuda de nitrógeno líquido en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Las muestras se resuspendieron en proporción 1:1 v/v en un buffer de extracción de proteínas (Ver apéndice). La mezcla se centrifugó a 4°C y se tomaron 2 µl del sobrenadante para cuantificar las proteínas con el método de Bradford (Bradford, 1976). Los extractos de proteína se desnaturailzaron con buffer de Laemmli (Laemmli, 1970) (0.125 M Tris-Cl, pH 6.8, 20% v/v glicerol, 4% v/v SDS, 2% v/v 2-mercaptoetanol y SDS 2X) en proporción 1:1 v/v. Las muestras se incubaron a 95°C por cinco minutos justo antes de usarse.

5.12. SDS PAGE

Para la electroforesis de proteínas las muestras y el marcador de peso molecular se corrieron en un gel desnaturante SDS-poliacrilamida al 10% (ver apéndice) en un buffer de corrida Tris-glicina (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina, 0.1% SDS). Los geles se corrieron a 120 Volts durante 2 horas. El gel se usó para electrotransferir las proteínas a una membrana.

5.13. Western blot anti ZDS

Los extractos proteicos se separaron por SDS-PAGE al 10% y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por 90 minutos a 0.35 Amperes en una cámara de electrotransferencia con buffer (ver apéndice) a 4°C. La membrana que contiene las proteínas se tiñó con Ponceau's (ver apéndice) al 0.2% para verificar la presencia de proteínas, la cual puede ser usada como control de carga. Para el anticuerpo contra DXS se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en PBS (Ver apéndice) con Tween 20 al 0.1% por dos horas. En el caso del anticuerpo contra ZDS se bloqueó la membrana a 37°C con BSA al 3%. Posteriormente, se eliminó el exceso de leche de las membranas mediante tres lavados sucesivos de al menos 5 minutos con la solución de lavado para Western blot (ver apéndice). Se agrega el anticuerpo primario en la solución de lavado con 2% de leche descremada se pone a incubar durante dos horas a temperatura ambiente. Se desecha la solución con el anticuerpo primario y se lava la membrana con 3 lavados sucesivos de al menos 5 minutos con la solución de lavado para Western blot. Después, se agrega el anticuerpo secundario (anti conejo AP para ZDS o anti ratón AP para DXS) con la solución de lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se hacen tres lavados con la solución de lavado y por último un lavado con agua. Las membranas se revelaron mediante el kit BCIP/NBT de Invitrogen.

6. RESULTADOS

6.1. El fenotipo de *clb5-1* no se debe a la ausencia de ABA o de las estrigolactonas

Debido a la importancia de las hormonas vegetales en el desarrollo de las plantas, existía la posibilidad, aunque remota, que la falta del ABA y de las estrigolactonas pudieran contribuir al fenotipo de *clb5-1*. Otras mutantes afectadas en pasos de la vía MEP y en pasos iniciales de la vía de los carotenoides también tendrían niveles bajos de estas hormonas, sin embargo, no muestran un fenotipo alterado de hoja (Figura 6). Para corroborar que la reducción de los niveles de estas hormonas no causan el fenotipo *clb5-1*, se analizó el crecimiento de la mutante *clb5-1* en presencia de ABA y estrigolactonas. Las semillas heterocigotas para *clb5-1* se germinaron en medio GM y a los dos días las plántulas albinas (homocigotas para la mutación) se transfirieron a medios suplementados con 0.5 μ M, 1 μ M de ABA ó 5 μ M de GR24 (estrigolactona sintética) (Gomez-Roldan et al., 2008) cada uno por separado. Como control, también se transfirieron las plántulas *pds3* a los mismos medios. Después de varias semanas

con el tratamiento, se analizó el desarrollo de la hoja de las plántulas *clb5-1*. Se observó que el desarrollo de la hoja de *clb5-1* se retardó en comparación con el de *pds3*, crecida en las mismas concentraciones de ABA. Con dicha hormona, la morfología de la hoja de *clb5-1* no mostró una mejora sustancial y de hecho se mostraban aún más retardadas en su desarrollo en comparación con una *clb5-1* crecida sin ABA. En cuanto a las plántulas de *clb5-1* crecidas en GR24, las hojas de forma radiales permanecen. Curiosamente, las plántulas *pds3* mostraron una mayor ramificación en la parte aérea con un mayor número de hojas verdaderas (Figura 7). Esta respuesta a estrigolactona en *pds3* no fue la esperada ya que GR24 inhibe la ramificación de la parte aérea (Gomez-Roldan et al., 2008). Mediante este análisis se demostró que la falta de ABA o estrigolactona no son las causantes del fenotipo de hoja en forma radial de *clb5-1*.

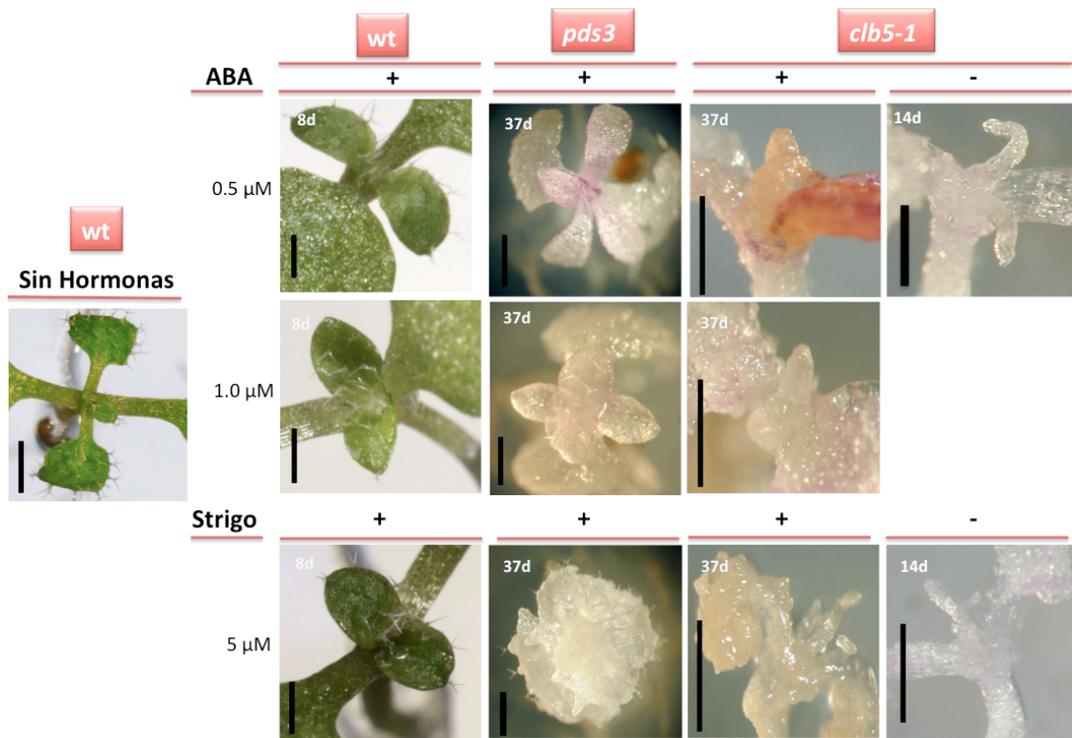


Figura 7. Morfología de la mutante *clb5-1* y *pds3* crecida en ABA y estrigolactona. Las plántulas fueron transferidas a los dos días después de germinar a medio suplementado con ABA o GR24. d-días. Barra negra indica 0.5mm

6.2. Caracterización de los defectos en el desarrollo de la hoja de *clb5-1*

Con el propósito de tener una idea más clara de los defectos en el desarrollo de la hoja de *clb5-1*, ocasionados por la acumulación de fitoflueno, ζ-caroteno o apocarotenoides derivados de estos, se desarrolló un análisis morfológico de la hoja que será descrito en las siguientes secciones. Como se mencionó en la introducción el desarrollo de la hoja de plantas es un proceso complejo que requiere de la expresión coordinada de múltiples genes y

reguladores. Por lo tanto la caracterización del patrón de expresión de algunos genes es indicador del estado de desarrollo alcanzado en estos órganos. Debido a lo anterior, se realizó un análisis morfológico detallado usando líneas marcadoras del desarrollo de hojas y cotiledones, tanto en el fondo *clb5-1* y en algunos casos en el fondo *spc1-2* (mutante alélica de *clb5-1*) y en *pds3*.

6.2.1. La respuesta a las auxinas está afectada en las hojas de la mutante *clb5-1*

La fitohormona auxina (siendo el ácido indolacético (IAA) la auxina más importante producida en plantas) ha sido implicada en el control del desarrollo de la hoja. Durante la iniciación de este órgano, un flujo convergente de las auxinas crea un máximo de actividad en la periferia del meristemo apical (SAM), marcando los sitios de iniciación de la hoja. En el primordio incipiente de la hoja, el flujo de las auxinas converge en las células de los bordes para formar un máximo de actividad de auxina en la punta, de ahí se genera el flujo de las auxinas a tejidos internos. Este proceso es importante para definir la vena media y posteriormente, inducir la formación de otros haces vasculares (Scarpella et al., 2010, Barkoulas et al., 2007, Heisler et al., 2005, Reinhardt et al., 2003). Finalmente, la auxina durante el proceso de iniciación de las hojas, también está asociada al control del establecimiento del eje adaxial-abaxial de la hoja (Pekker et al., 2005).

Debido al importante papel de la auxina en el desarrollo de la hoja, se decidió analizar la respuesta a auxina en la hoja de *clb5-1* a través del uso del reportero *DR5:GUS* (Ulmasov et al., 1997). Este gen reportero ha sido usado para determinar las respuestas máximas a las auxinas dentro de las células de un cierto tejido responsivo a dicha hormona (Sabatini et al., 1999). Para esto se introdujo el gen *DR5:GUS* al fondo mutante *clb5-1* y la expresión del mismo se analizó a través de ensayos histoquímicos de GUS en las hojas de las plantas de interés. Se comparó la expresión del reportero *DR5:GUS* en plantas silvestres y plantas *clb5-1*. En plantas silvestres, la actividad histoquímica de GUS, aparece progresivamente en el tejido que se convertirá en haces vasculares (Mattsson et al., 2003). En congruencia con lo reportado a los 5 días, en las plantas silvestres la expresión de *DR5:GUS*, es visible en la punta del primordio de la hoja emergente, antes de la diferenciación de la vena media (Figura 8a). También, congruente con lo reportado, a los 7 días, la tinción de GUS se observó en la parte distal de la hoja que corresponde con el máximo de auxinas de la hoja (Figura 8b) (Sieburth & Lee, 2010). En las raíces de las plantas silvestres a los 5 y 7 días, la tinción de GUS se observa

en el meristemo radicular, como se ha reportado (Bai & Demason, 2008, Van Norman et al., 2004) (Figura 8h y 8i) En contraste a este patrón de expresión, en las plantas *clb5-1* de 10 días, no se observó expresión detectable de GUS en la punta del primordio de la hoja (Figura 8d). Esto es similar incluso a los 14 días donde la punta de las hojas de *clb5-1* continuó sin mostrar expresión detectable del reportero (Figura 8f). Contrariamente, las raíces de las plántulas *clb5-1* de 10 y 14 días sí mostraron tinción de GUS en el meristemo radical, aunque ésta es ligeramente menor que en las raíces silvestres (Figura 8k y 8n).

Para determinar si la falta de expresión de GUS en las hojas de *clb5-1* se origina por la falta de auxinas o por un decremento de la respuesta del tejido a las auxinas, se comparó la tinción de GUS entre tejido *clb5-1* y silvestre incubado durante 14 horas con 5 μ M de la auxina sintética, ácido α naftalén acético (NAA). Como control estos tejidos se incubaron durante 14 horas en agua. Como puede verse en la Figura 6c las plantas silvestres incubadas con NAA mostraron una fuerte tinción de GUS en hojas y raíces, tal y como se ha reportado (Bai & Demason, 2008). En contraste las plantas *clb5-1* tanto a los 10 y 14 días incubadas en NAA mostraron una clara expresión de GUS en cotiledones, hipocotilos y raíces, pero una muy baja tinción en las hojas (Figura 8e y 8g, respectivamente). Estos datos sugieren que la hoja primaria de *clb5-1* tiene una baja o inexistente respuesta a las auxinas. Esta deficiencia en la respuesta, por lo menos del reportero DR5, podría afectar aspectos del desarrollo de la hoja como: 1) el establecimiento del eje adaxial-abaxial y el crecimiento de la lámina de la hoja, ya que la actividad de auxina puede mediar la vía de KAN (Pekker et al., 2005). 2) La formación del patrón vascular dentro de las hojas está mediada por la auxina y 3) por último, dicha hormona indirectamente modula la división y expansión celular (Scarpella et al., 2010).

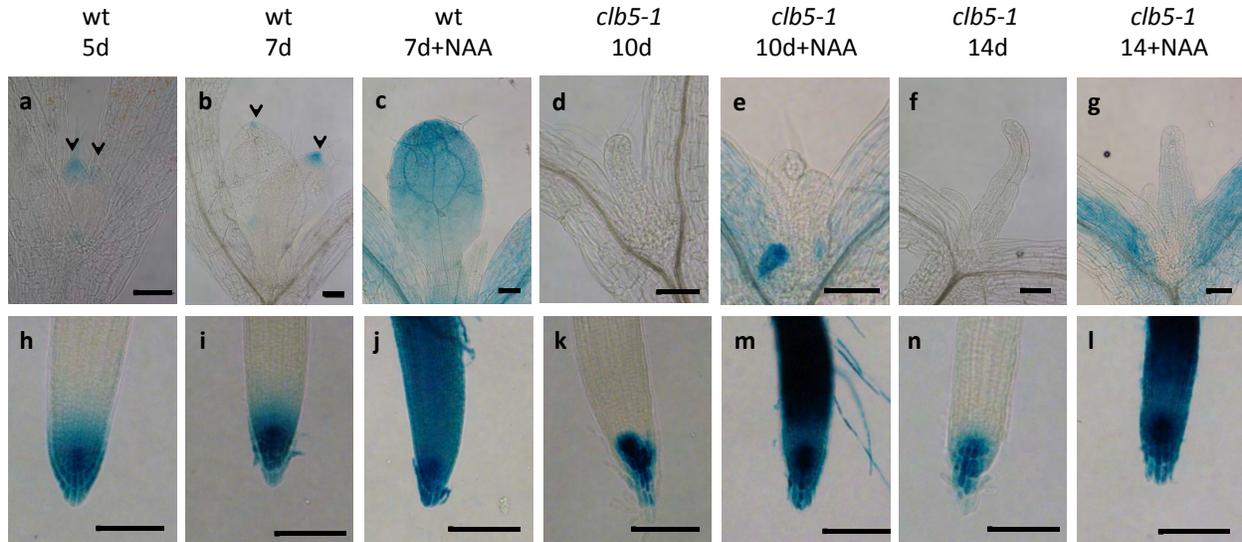


Figura 8. Tinción de DR5:GUS en planta silvestres y *clb5-1*. La inducción de DR5 por auxina se analizó después de 14 horas de incubación con 5 μ M de NAA; el tejido mostrado de hoja y raíz corresponde a una misma planta. Las flechas negras indican la tinción distal de GUS en el primordio foliar y la hoja de plantas silvestres. Barra negra indica 100 μ m.

6.2.2. La identidad adaxial y abaxial de la hoja de *clb5-1* está afectada

Un paso crítico en el desarrollo de la hoja es la especificación de los destinos celulares que conformarán las regiones adaxial y abaxial, que generarán el desarrollo de una lámina aplanada (Figura 1) (Efroni et al., 2010). Con el propósito de determinar con más detalle cuáles son los defectos en la polaridad de la hoja de *clb5-1* se utilizaron marcadores de identidad abaxial y adaxial.

Como se mencionó en los antecedentes, ya se contaba con la línea *pFIL:GUS* en el fondo *clb5-1*. Esta línea se considera como una línea marcadora de la región abaxial del primordio foliar y de los haces vasculares (Nelissen et al., 2003). En los estudios iniciales, se había observado que de forma similar a las plantas silvestres el marcador de GUS se expresa en la parte abaxial de los cotiledones de *clb5-1*. Sin embargo en las primeras hojas de *clb5-1* sólo se observa una ligera expresión de GUS, en contraste con el patrón abaxial observado en las plántulas silvestres (Figura de apoyo 1). Este patrón de expresión indicó que la polaridad de la hoja en *clb5-1* estaba afectada (Avendaño-Vázquez et al., No publicado). También, algunos datos preliminares demostraron que las plantas *clb5-1* que crecen en presencia del inhibidor norflurazona (NF), muestran una recuperación parcial del fenotipo de la hoja (Figura de apoyo 3). Con la idea de demostrar si junto con esta recuperación parcial también se observaba el restablecimiento del patrón de expresión de genes marcadores del desarrollo de este órgano

como *FIL*, se decidió analizar la expresión de *pFIL:GUS* en las hojas de *clb5-1* después del tratamiento con NF. Como se observa en la Figura 9, la expresión del reportero GUS se restableció en toda la hoja de la mutante *clb5-1* que estuvo en presencia de NF, similar a una planta silvestre.

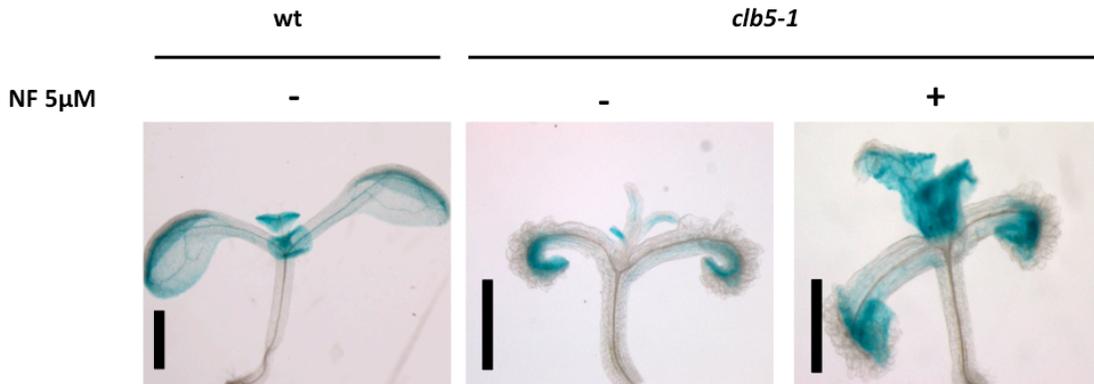


Figura 9. Patrón de expresión del marcador de identidad abaxial *pFIL:GUS* en plántula silvestre de 8d y *clb5-1* de 14 días crecidas en medio GM, *clb5-1* de 14 días crecidas por 4d en medio GM y después, transferidas a medio GM con 5µM de norflurazona. Barra negra indica 1mm.

Otra línea marcadora de identidad adaxial que se analizó fue *gPHB:GUS*, la cual es expresada en el SAM, en el primordio vascular y en el lado adaxial de los cotiledones en embriones silvestres (Figura 8a) (Gillmor et al., 2010). Cuando la plántula silvestre se desarrolla, la expresión de *gPHB:GUS* se observa predominantemente en el tejido vascular adaxial y en los dominios adaxiales de los cotiledones y hojas (Figura 10b-d). En el fondo mutante *clb5-1* los embriones en estado de cotiledones doblados tienen un patrón de expresión muy similar al embrión silvestre (Figura 10e). Más tarde en el desarrollo, la expresión de GUS también se observa en los haces vasculares de los cotiledones de plántulas, sin embargo en las primeras hojas verdaderas de las plántulas de 10 y 14 días, se detectó una baja expresión de GUS, que se restringe a la parte central de las hojas, que corresponde con los haces vasculares. Sin embargo, no se observó expresión en dominios adaxiales de la hoja (Figura 10g-h). De lo anterior, se puede concluir que en los embriones *clb5-1* y en los cotiledones de las plántulas *clb5-1* la polaridad adaxial no parece estar afectada. Sin embargo, en las hojas verdaderas la baja expresión del gen reportero, restringida sólo a tejido vascular, sugiere que la polaridad adaxial de las hojas está por lo menos comprometida.

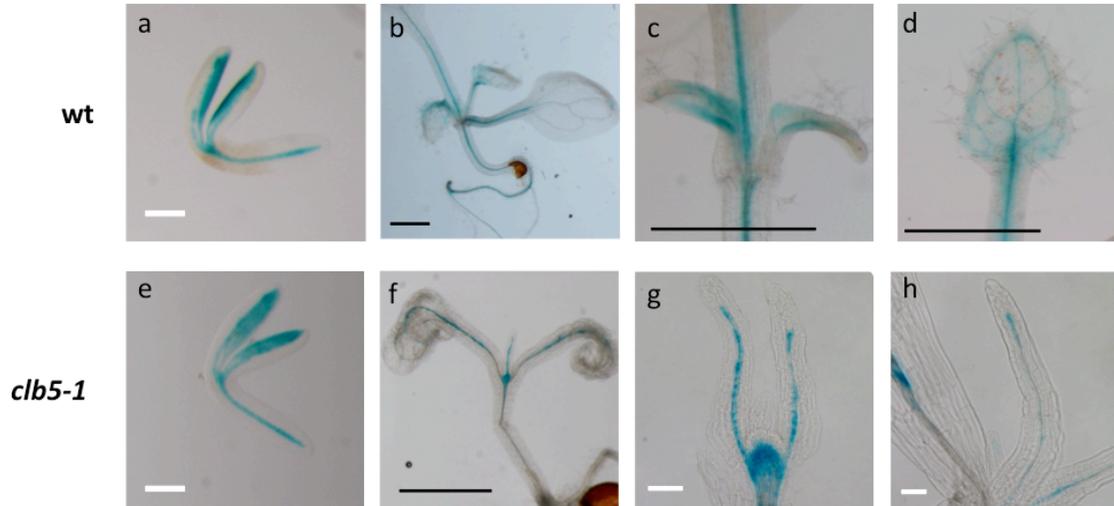


Figura 10. Patrón de expresión de *gPHB:GUS* en embriones en etapa de cotiledones doblados y plántulas silvestres (wt) (a-d) y *clb5-1* (e-h). (a) Expresión de *gPHB:GUS* en embrión silvestre en etapa bending cotyledons, (b) en plántula silvestre de 7 días, (c) en hojas silvestres de 7 días vistas de lado y (b) vistas desde arriba (d). (e) Expresión de *gPHB:GUS* en embriones *clb5-1* en etapa bending cotyledons, (f) en plántula *clb5-1* de 10 días y en hojas *clb5-1* de (g)10 días y (h) 14 días. Barra blanca indica 0.1mm y barra negra indica 1mm.

Los datos anteriores sugieren que la señal *clb5-1*, causa una alteración, directa o indirecta, en la expresión de los genes que forman los dominios adaxiales y abaxiales. También, existe la posibilidad de que la alteración de la expresión genética de estos marcadores esté relacionada con la falta de respuesta a la auxina, ya que los reguladores claves del eje adaxial-abaxial están influenciados por la auxina (Scarpella et al., 2010). Por ejemplo, algunos factores de respuesta a auxina (ARF) se encargan de facilitar la acción del factor KAN durante la determinación abaxial (Figura 3) (Pekker et al., 2005). Todos estos aspectos podrían afectar a la formación de una hoja con un peciolo y lámina aplanada.

6.2.3. La transición del crecimiento proliferativo al expansivo está afectada en la hoja de *clb5-1*

El desarrollo temprano de la hoja está determinado por la proliferación celular y la subsecuente expansión de dichas células, que inicia desde la punta de la hoja y procede hacia la base de la hoja (Andriankaja et al., 2012). Para conocer si la transición del crecimiento proliferativo al expansivo en la hoja de la mutante *clb5-1* estaba afectada, se usó la línea reportera *CYCB1;1::D-box:GUS*. Dicha línea es útil para monitorear la actividad mitótica en meristemas (Eloy et al., 2011). En el trabajo de Andriankaja et al., (2012) se observó que cuando la hoja recién emerge la tinción de GUS se observaba en toda la hoja, indicando la zona proliferativa, en los siguientes tres días de desarrollo la zona teñida disminuyó

gradualmente desde la punta hasta la base y finalmente cuando la hoja se desarrolla totalmente, la expresión del reportero fue imperceptible.

Con base en lo anterior, se procedió a analizar la expresión de *CYCB1;1::D-box:GUS* en la plántula control y las mutantes *pds3*, *spc1-2* y *clb5-1*. Las plántulas se analizaron en el mismo estado de desarrollo, es decir cuando el primer par de hojas verdaderas habían emergido. En la plántula control de 6 días y en la mutante *pds3* de 8 días, se observa que la actividad de GUS está localizada en la base de la hoja (Figura 11). Este patrón de expresión es consistente con la disminución de la zona de proliferación (Andriankaja et al., 2012). Cabe mencionar que en *pds3* a simple vista se observó una expresión más fuerte del reportero. En contraste, en la mutante *clb5-1* y *spc1-2* de 10 días, cuando la hoja emerge, aparece una fuerte expresión de GUS en casi toda la hoja. A los 14 días, esta expresión se localizó desde la base de la hoja hasta la punta del primer par de hojas verdaderas, es decir parece que no hubo expansión celular ya que no se aprecia una disminución en la zona de proliferación como en la planta control y *pds3* (Figura 11). Por lo tanto esto apoya a que a lo largo de las hojas de *clb5-1* y *spc1-2* existen células en fase G2/M.

Se sabe que las ciclinas tipo B se expresan específicamente durante G2 y mitosis, y estas ciclinas deben ser degradadas después de la mitosis (Donnelly et al., 1999), por lo que este patrón de expresión del reportero en *clb5-1* sugiere que existe una continua división celular a lo largo de toda la hoja. Con base en estos resultados se esperaría que existiera un mayor número de células en la hoja de *clb5-1*, sin embargo, el corte transversal de las hojas de *clb5-1* había mostrado que la hoja consiste en un cilindro interno de tejido vascular rodeado por una sola capa de células epidérmicas, las cuales son más largas que en plántulas silvestres y *pds3*. Además las hojas de *clb5-1* carecen de tejido del mesófilo (Figura de apoyo 4) (Avenidaño-Vázquez et al., No publicado). Por lo anterior, la expresión de GUS en la hoja de *clb5-1* no es congruente con el número de células en la hoja. Una posible explicación es que las ciclinas tipo B se están expresando y se acumulan a lo largo de la hoja de *clb5-1*, pero no completan la mitosis o la completan más lento. Eso podría explicar por qué existe un menor número de células en la mutante *clb5-1* aunque este marcador se exprese.

También, existe la posibilidad de que el patrón de expresión observado se deba a que no hay una transición al crecimiento expansivo de las células de la hoja, por lo que las células en división ocupan casi todo el volumen de la hoja de la mutante *clb5-1*. Debido a lo anterior las

células en división se encuentran compactadas y sin expandirse lo que generaría la expresión localizada de GUS a lo largo de la hoja radial.

Estos resultados apoyan que la afectación en la división celular en la hoja de *clb5-1* es consecuencia de la alteración en la expresión genética causada por la señal *clb5-1* (Avenida-Vázquez et al., No publicado), lo que afectaría directa o indirectamente el ciclo celular.

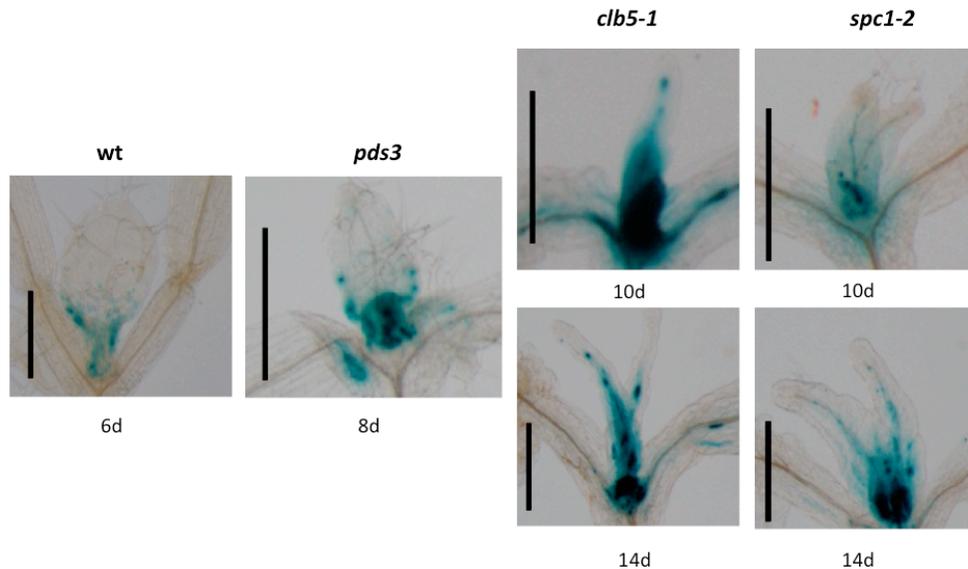


Figura 11. Análisis comparativo de la expresión de CYCB1;1::D-box:GUS en las primeras hojas verdaderas de plantas silvestres, *pds3*, *clb5-1* y *spc1-2*. d indica días. La barra indica 0.5 mm.

6.3. La doble mutante *ccd4 clb5-1* muestra mejora en el fenotipo de hoja y expresión genética

Las enzimas CCDs son importantes en la producción de apocarotenoides, y estos últimos pueden funcionar como señales para el desarrollo de la planta (Rosati et al., 2009; Xie et al., 2010). Por lo anterior, se puede hipotetizar que el fitoflueno, el ζ -caroteno o derivados de estas moléculas que se acumulan en la mutante *clb5-1*, pudieran ser blancos, directos o indirectos, de las enzimas CCDs. En particular nos interesaron las enzimas CCD7, CCD8 y la CCD4, que es la menos caracterizada. Para analizar dicha posibilidad se decidió analizar el fenotipo de plantas que carecían de alguna de estas enzimas en el fondo *clb5-1*. Dado lo anterior, se generaron las dobles mutantes *ccd7/max3 clb5-1*, *ccd8/max4 clb5-1* y *ccd4 clb5-1* y el fenotipo de las hojas se analizó. Como se observa en la Figura 12, la doble mutante *ccd4 clb5-1* mostró una mejora evidente en la morfología de sus hojas (La doble mutante *ccd4 clb5-1*

se genotipificó mediante PCR como se muestra en la figura suplementaria 2). A los 15 días de desarrollo estas plantas muestran una lámina plana, en lugar de las proyecciones tipo dedo característico de la mutante *clb5-1*. Cabe mencionar que la mutante sencilla de *ccd4* carece de fenotipo en las hojas (Figura 12) por lo que resultó muy interesante que la ausencia de esta CCD en *clb5-1* mostrara un fenotipo. Por otro lado, debido a que la mutación *clb5-1* está en el ecotipo Ler mientras que la mutante *ccd4* en el fondo Col, existía la posibilidad de que la mejoría de hoja se debiera a la heterosis o vigor híbrido. Es decir, que el fenotipo pudiera deberse a la contribución de alelos provenientes de cualquiera de los dos ecotipos de una manera que no está relacionada con los genes *CCD4* y *ZDS*. Para analizar dicha posibilidad como control se utilizó una cruce entre una planta heterocigota para *clb5-1* y una planta silvestre del ecotipo Col. La progenie albina de esta cruce resultó en plántulas con el fenotipo de *clb5-1* (Dato no mostrado).

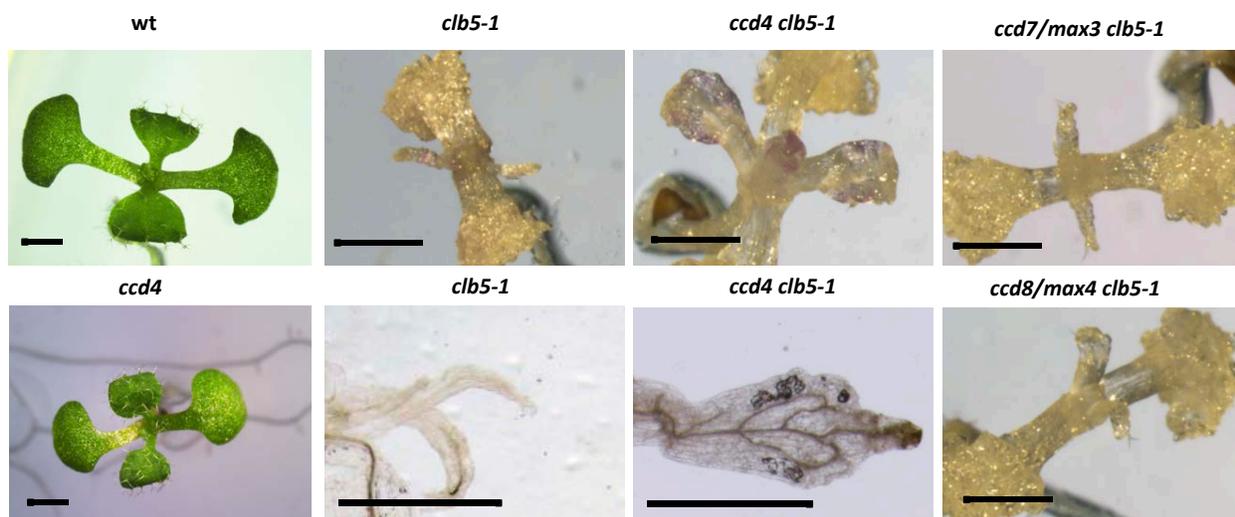


Figura 12. Fenotipo de la doble mutante *ccd4 clb5-1* comparado con la planta silvestre de 8 días, la mutante *ccd4* de 8 días, la doble mutante *ccd7/max3 clb5-1* de 15 días, la doble mutante *ccd8/max4 clb5-1* de 15 días. La barra negra indica 1mm.

Debido a la evidente mejoría en la morfología de la hoja de la doble mutante *ccd4 clb5-1*, se procedió a analizar si la expresión a nivel de proteína, también mejoraba en esta planta. Por tal motivo se realizó un ensayo tipo western blot para detectar el nivel de expresión de la enzima DXS de la vía MEP. De forma sorprendente la doble mutante no sólo mejora en el fenotipo de la hoja, sino que también recupera la expresión genética de DXS a niveles semejantes al de una planta silvestre (Figura 13). Adicionalmente, no fueron detectados niveles de expresión de DXS en los extractos de las dobles mutantes *ccd7/max3 clb5-1* y *ccd8/max4*

clb5-1, como sucede en *clb5-1* (Figura 14). Por lo tanto, la mejora del fenotipo de *clb5-1* se da solamente en el fondo mutante *ccd4* y no en los fondos *ccd7* o *ccd8*. Este resultado sugiere que la enzima CCD4, podría estar involucrada en el rompimiento (escisión y oxidación) directo o indirecto de los fitofluenos, ζ -carotenos o derivados de ellos acumulados en la mutante *clb5-1*.

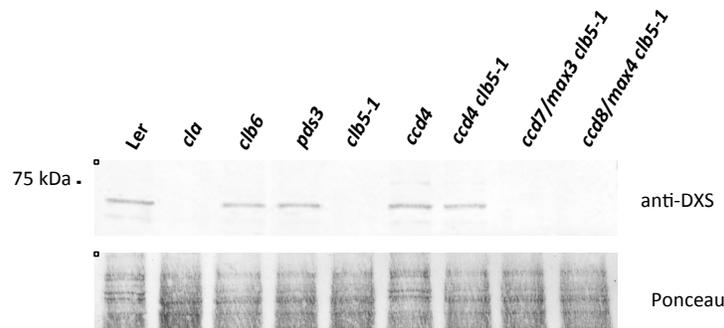


Figura 13. Western blot anti DXS de plantas Ler y *ccd4* de 8 días, las mutantes albinas *cla*, *clb6*, *pds3*, *clb5-1* de 15 días y las dobles mutantes *ccd7/max3 clb5-1* y *ccd8/max4 clb5-1* de 15 días. Como control de carga se muestra las proteínas teñidas con Ponceau. (Western blot realizado por Maricela Ramos-Vega).

Adicionalmente, para facilitar la comparación entre la morfología de las primeras hojas verdaderas de estas dobles mutantes, se realizó un análisis comparativo de *clb5-1* en contraste con: (a) sus mutantes alélicas *clb5-2*, *clb5-3*, *spc1-2*; (b) las mutantes sencillas *ccd4*, *pds3*; (c) las dobles mutantes *ccd4 clb5-1*, *ccd4 spc1-2*, *ccd4 pds3*, *ccd7/max3 clb5-1*, *ccd8/max4 clb5-1* y (d) una línea sobreexpresora de ZDS (Figura 14). Lo anterior se realizó cortando, a partir de la base del peciolo, las primeras hojas verdaderas de dichas plantas. Una vez cortadas la hojas se montaron en un portaobjetos donde se fotografiaron y mediante un software de manejo de imágenes (iDraw) se obtuvieron sólo los contornos, para facilitar la comparación morfológica entre ellas.

Por ejemplo, si se compara *clb5-1* con la mutante alélica *clb5-3*, esta última muestra una hoja con morfología casi normal, sugiriendo que esta mutante pareciera no ser nula (Figura 14h). Este hecho ha sido comprobado a través de análisis de su mensajero y de su proteína (Avendaño-Vázquez et al., No publicado). De forma semejante, la hoja de la mutante *spc1-2*, a diferencia de *clb5-1*, se caracteriza por tener una forma de rombo alargado, con un fenotipo menos drástico (Figura 14m) (Dong et al., 2007). Con el propósito de verificar este hecho se realizó un análisis de proteínas por western blot anti ZDS en la mutante *spc1-2*. Con este análisis se detectó una proteína de mayor peso molecular que podría corresponder a ZDS más

la inserción de T-DNA (Figura suplementaria 1). La proteína detectada en esta mutante pudiera tener cierta actividad catalítica, lo que podría explicar por qué el fenotipo de *spc1-2* no es tan drástico como el de *clb5-1* (Figura 14f) o *clb5-2* (Figura 14g).

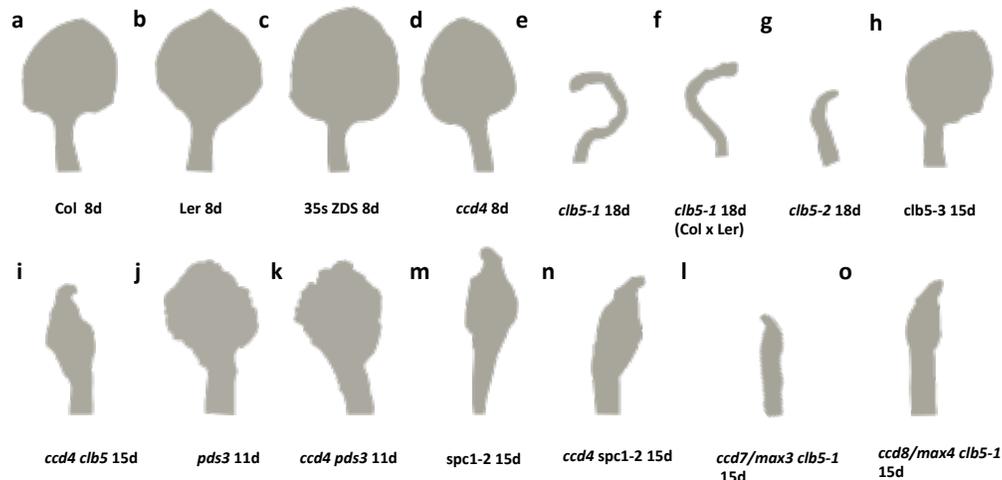


Figura 14. Esquema comparativo de la morfología de la primera hoja de distintas plantas mutantes y silvestres. Las hojas están a escala.

También, en este análisis comparativo se puede observar que las hojas de Col, Ler, la sobre-expresora de ZDS y *ccd4* tienen un peciolo diferenciado y una lámina redonda (Figura 14a-d). En contraste, las plántulas *clb5-1* de la cruce control (Col x *clb5-1*[Ler]) muestran una hoja alargada sin diferencia entre peciolo y lámina, básicamente idéntica a la morfología de la hoja de *clb5-1* (Figura 13f). Además, es evidente que la mutante *pds3* tiene hojas verdaderas más parecidas a las hojas silvestres, pero con el borde ligeramente serrado (Figura 14j).

En este mismo análisis se observa que las dobles mutantes entre *ccd4 pds3* y *ccd4 spc1-2* (Figura 14k y 14n) parecen no tener diferencias en la morfología de la hoja con respecto a las mutantes sencillas *pds3* y *spc1-2* respectivamente (Figura 14j y 14m). La mejora en la morfología de la hoja se aprecia en la doble mutante *ccd4 clb5-1*, donde se puede observar hojas tanto de tipo rombo alargado (Figura 14i), parecidas a las de *spc1-2*, y hojas con la lámina más redondeada. Esta supresión de fenotipo en las hojas de *ccd4 clb5-1*, no se observó en las dobles mutantes *ccd7/max3 clb5-1* y *ccd8/max4 clb5-1* (Figura 12, 14l y 14o).

Los resultados anteriores, proveen una evidencia importante sobre la generación de la señal *clb5-1*, ya que ésta parece ser sintetizada a través de una vía de escisión de carotenoides como en el caso de la síntesis del ABA y de las estrigolactonas (Walter et al.,

2010, Xie et al., 2010). La falta de la enzima CCD4 restaura parcialmente el fenotipo de la hoja en la mutante *clb5-1*, ya que el 75% de las plántulas *cd4 clb5-1* ya no muestran las proyecciones tipo dedo (Figura 13 y 14i).

6.4. La doble mutante *gun1 clb5-1* es embrión letal

Como se ha mencionado, los datos obtenidos apuntan a que un apocarotenoide derivado, a través de CCD4, es responsable del fenotipo de la mutante *clb5-1*. Esta señal modula la expresión de múltiples genes codificados tanto en núcleo como en cloroplasto. Una pregunta por responder es cómo esta señal generada en el cloroplasto es capaz de modular la expresión de genes nucleares. Se sabe que el cloroplasto es capaz de señalizar al núcleo su estado de desarrollo a partir de la señalización retrógrada (Cottage & Gray, 2011). Existen múltiples vías de señalización retrógrada y se han identificado algunos elementos importantes en estas vías de señalización. Uno de dichos elementos es la proteína GUN1 una proteína implicada en la vía PGE.

Con el propósito reanalizar si GUN1 podría participar en la generación de la expresión genética aberrante en *clb5-1*. Se había investigado los niveles de transcripción de *GUN1* en dicha mutante y se observó una disminución en la acumulación de su transcrito en comparación con otras mutantes albinas y la planta silvestre. Estos datos sugerían que la señal generada en la mutante *clb5-1* podría utilizar elementos de la vía PGE como GUN1. Por lo anterior, la vía PGE podría estar alterada y a su vez afectar el estado de la proteína GUN1, activando una señal al núcleo mediada por ella misma (Pogson *et al.*, 2008). Dado lo anterior, se planteó que la falta de la proteína GUN1 en *clb5-1* eliminaría la señal retrógrada, por lo tanto la expresión de genes nucleares podría alterarse y provocar cambios fenotipos en una doble mutante *gun1 clb5-1*, por ejemplo algún cambio en la morfología de la hoja.

Para analizar de una manera mas directa la posible participación de GUN1 en la transmisión de la señal derivada de ζ -carotenos, se generaron las siguientes dobles mutantes: *gun1 clb5-1*, *gun1 spc1-2* y *gun1 pds3*, esta última como un posible control (Materiales y métodos). Primero, se aislaron las dobles mutantes homocigotas. Las silicuas de las plantas F2 adultas *gun1 -/- clb5-1 +/-* mostraron un fenotipo interesante. Después de la polinización de la flor y que la silicua se empieza a desarrollar, semanas después se observaron embriones verdes y embriones albinos, estos últimos en una proporción del 25%, los cuales indican la

presencia de la mutación *clb5-1*. Sin embargo, conforme la silicua maduraba los embriones albinos que correspondían a la doble mutante *gun1 clb5-1* (*gun1*^{-/-} *clb5-1*^{-/-}) se volvieron cafés y cuando finalmente la silicua se secó estas semillas se colapsaron y convirtieron en semillas tipo pasa o “shrunken” (25% de las semillas de la silicua *gun1*^{-/-} *clb5-1*^{+/-}) (Figura 15). Este fenómeno no ocurre en silicuas de plantas heterocigotas para *clb5-1*, ni en silicuas de la mutante *gun1* (Dato no mostrado). Se cosecharon las semillas de plantas *gun1*^{-/-} *clb5-1*^{-/+} y posteriormente se separaron las semillas normales de las semillas tipo pasas. Se cultivaron ambos tipos de semillas por separado y se corroboró que sólo germinaron las semillas normales, mientras que las semillas tipo pasas que corresponden a la mutante *gun1*^{-/-} *clb5-1*^{-/+} fueron incapaces de germinar. De forma interesante, se observó que cuando las silicuas de una planta adulta *gun1*^{-/-} *clb5-1*^{-/+} se cubrían con aluminio (para evitar que la silicua recibiera luz) algunas de las semillas (30%) provenientes de embriones albinos podían germinar (Figura 15h). También se observó que cuando los embriones albinos maduros (que se encontraban presentes antes de la desecación de la silicua) se transferían a un medio GM fueron capaces de germinar. En los dos casos anteriores, embriones *gun1 clb5-1*, cubiertos con aluminio y transferidos, se obtuvo una germinación del 30% que dio lugar a plántulas albinas severamente detenidas en su desarrollo, aún más que las plantas *clb5-1*. Interesantemente, las dobles mutantes *gun1 spc1-2* y *gun1 pds3* resultaron tener el mismo fenotipo que las *gun1 clb5-1* (Figuras suplementarias 2 y 3). Estos datos indican que los genes de las desaturasas (*PDS* y *ZDS*) de la vía de biosíntesis de carotenoides son indispensables junto con *GUN1* para el desarrollo del embrión y de la semilla.

Si *GUN1* fuese importante en la vía de señalización retrógrada, que causa los defectos de expresión genética en la mutante *clb5-1*, se esperaba que en la doble mutante *gun1 clb5-1* mostrara una supresión del fenotipo de *clb5-1*. En cambio, la falta de *GUN1* en *clb5-1* provocó serios defectos en el desarrollo del embrión y la semilla. Con estos resultados, no se logró obtener información acerca de la relación de *GUN1* con los cambios de la expresión genética nuclear, pero sí se obtuvo información acerca de la importancia de dicha proteína, junto con *PDS* y *ZDS*, en el desarrollo del embrión y la semilla. Indicando que dichos eventos son al menos parcialmente independientes.



Figura 15. Fenotipo de la doble mutante *gun1 clb5-1*. a) Silicua inmadura de una planta adulta *gun1 -/- clb5-1 +/-*, segregando embriones albinos. b) silicua madura *gun1 -/- clb5-1 +/-*, segregando embriones albinos que se volvieron cafés. c) silicua seca *gun1 -/- clb5-1 +/-*, se observan las semillas tipo pasa o shrunken. d) semillas normales provenientes de silicua *gun1 -/- clb5-1 +/-*. e) semillas tipo pasa o shrunken provenientes de silicuas *gun1 -/- clb5-1 +/-*. f) Sólo germinaron las plantas provenientes de semillas normales. g) Plántulas *gun1 -/- clb5-1 -/-* provenientes de embriones de silicuas maduras *gun1 -/- clb5-1 +/-* transferidos a medio de crecimiento. h) Plántulas *gun1 -/- clb5-1 -/-* provenientes de silicuas *gun1 -/- clb5-1 +/-* cubiertas con aluminio. Barra negra o blanca indican 1mm.

7. DISCUSIÓN

7.1. *clb5-1* genera una señal derivada de carotenoides capaz de regular la expresión genética y el desarrollo de la hoja

En la actualidad, se han descrito más de 700 diferentes carotenoides y su diversidad estructural ha evolucionado probablemente en relación a sus diversas funciones. Se sabe que estos compuestos actúan como vitaminas y hormonas, como sustrato para la síntesis de productos volátiles, y como pigmentos en flores y frutos (DellaPenna & Pogson, 2006, Cuttriss & Pogson, 2006). Además, los carotenoides tienen funciones esenciales en la fotosíntesis de las plantas, como componentes del aparato fotosintético para la captación de luz y fotoprotección (Nelson & Ben-Shem, 2004). Cabe mencionar que además de las hormonas como el ABA y las estrigolactonas, recientemente se han encontrado moléculas derivadas de carotenoides que funcionan como señalizadores y que afectan la expresión genética (Estavillo

et al., 2012, Ramel et al., 2012, Kachanovsky et al., 2012, Van Norman et al., 2011, Van Norman et al., 2004). Por lo que, es posible que existan carotenoides aún no identificados con funciones señalizadoras. Particularmente, la mutación *clb5-1* afecta al gen que codifica para la enzima ζ -caroteno desaturasa (ZDS). Aunque la enzima ZDS afecta el tercer paso de la vía de carotenoides el desarrollo morfológico, específicamente el de la hoja, y su expresión genética están drásticamente afectados drásticamente en comparación con otras mutantes de enzimas río arriba en la biosíntesis de carotenoides (Avendaño-Vázquez et al., No publicado). Se ha propuesto que la acumulación de algún intermediario (s), producido (s) entre las enzimas PDS y ZDS (fitoflueno o ζ -carotenos o sus derivados), es responsable de las alteraciones en *clb5-1*, esta (s) molécula(s) es (son) capaz (capaces) de regular la expresión de genes y el desarrollo de la hoja. En este trabajo, se demostró que el fenotipo de *clb5-1* no puede ser explicado por la ausencia de las fitohormonas ABA o de las estrigolactonas, ya que la adición de éstas fitohormonas no rescata o mejora el fenotipo de *clb5-1* (Figura 7). Todo esto apoya la idea de que el fenotipo se debe a la acumulación de la señal que se genera en la mutante *clb5-1*.

7.2.La respuesta a auxina está alterada en la hoja de *clb5-1*

La auxina es una fitohormona que está involucrada en la iniciación y desarrollo de la hoja, incluyendo el establecimiento de los ejes de este órgano (Vernoux et al., 2010, Pekker et al., 2005). La iniciación de los primordios foliares es especificada en los flancos del SAM y corresponden a los sitios de actividad elevada de la auxina, los cuales resultan de la convergencia de la polaridad de los transportadores PIN1 en la epidermis. Después el flujo de la auxina converge para formar un máximo de auxina en la punta del primordio donde la auxina se transporta a tejidos internos para que gradualmente induzca la formación de la vena media (Scarpella et al., 2010). Con la rápida expansión del primordio creciente, la concentración de auxina forma un ligero gradiente, el cual se traduce en la acción diferencial de grupos específicos de los factores ARFs (ARF3/ETT y ARF4) permitiendo a KANADI obtener mayor actividad en el dominio abaxial. Los gradientes de estos ARFs en el primordio ayudan a traducir diferencialmente la presencia de auxina para mantener el destino abaxial y así establecer el eje adaxial-abaxial (Figura 3) (Pekker et al., 2005).

Mediante el análisis del reportero de DR5:GUS en el fondo *clb5-1*, se demostró que ni en el primordio ni en las hojas de *clb5-1* existe un máximo de auxinas (Figura 8), como sucede en las plantas silvestres (Petricka & Nelson, 2007, Bai & Demason, 2008). La falta de expresión

de este reportero en los primordios y hojas de *clb5-1* se puede explicado por los bajos niveles de auxina o bien por una baja capacidad de respuesta de esta mutante a la fitohormona. Sin embargo, a adición de NAA no indujo la expresión de dicho reportero en las hojas, pero sí en la raíz donde se observó una respuesta a auxinas (Figura 6). Lo anterior sugiere que la señal *clb5-1* altera la percepción o transducción de la señal de auxina en la hoja, lo que podría afectar varios aspectos del desarrollo de este órgano como son el establecimiento del eje adaxial-abaxial, el crecimiento de la lámina de la hoja (Pekker et al., 2005), la formación del patrón vascular, la modulación de la división y la expansión celular (Scarpella et al., 2010).

La baja o nula respuesta a auxina en la hoja de *clb5-1*, podría ser la consecuencia de que la señal producida en esta mutante altera la expresión de genes requeridos para la percepción de esta hormona, para la transducción de su señal o catabolismo aumentado. Dentro de los posibles blancos se encuentran la expresión de los receptores de auxina TIR1 o AFBs así como algunos activadores de la transcripción como los factores ARF. Una baja transcripción de éstos últimos podrían provocar que no se active la transcripción de genes que contienen los elementos de respuesta a la auxina (*AuxRes*). Otros blancos posibles son los genes *AUX/IAA*, que codifican para represores de los ARFs, aunque en este caso se requeriría que su expresión estuviera incrementada y en consecuencia la transcripción de los genes inducibles por auxina como *DR5* estaría reprimida (Vernoux et al., 2010). Por lo tanto, resulta de interés, un análisis futuro de los niveles de expresión de estos elementos claves para comprender por qué la hoja de *clb5-1* no responde a las auxinas y cómo es que la señal *clb5-1* pudiera estar afectando la expresión de receptores o efectores de la vía de señalización por auxina.

Buscando en la literatura mutantes con características similares a *clb5-1* se encontraron algunas con fenotipos aberrantes de hoja y con una respuesta alterada a auxina en dicho órgano. La mutante *bps1*, mencionada anteriormente, tiene hojas pequeñas y radiales, sin embargo, en contraste con *clb5-1*, las hojas de *bps1* si tienen un máximo de actividad de auxinas en la punta, pero al agregar auxina exógena, la respuesta a auxina no se incrementa (Van Norma et al., 2011; Sieburth y Lee, 2010; Van Norman et al., 2004). Otras mutantes con morfología, vasculatura y división celular alterada debido a cambios en la respuesta a auxina en la hoja son *asymmetric leaf1 (as1)* y *asymmetric leaf2 (as2)* (Zgurski et al., 2005). Además de las mutantes, en plantas de tomate se ha reportado una estructura similar a la hoja radial de *clb5-1*; esta estructura llamada “naked pin” se forma cuando se bloquea el transporte polar de

auxina usando inhibidores del transporte de auxina. Los “naked pins” también son característicos de plantas con mutaciones en el transportador polar PIN1 (Braybrook & Kuhlemeier, 2010, Reinhardt et al., 2000). Los ejemplos anteriores resaltan una vez más la importancia de la auxina en el desarrollo de la hoja, por lo que los defectos de la hoja en *clb5-1* podrían ser explicados por la falta de respuesta a esta hormona.

Resulta interesante destacar que a pesar de que la hoja y el primordio foliar de *clb5-1* no mostraron aparente respuesta a auxina, en esta planta si se desarrollan apéndices radiales tipo hojas, sugiriendo que en los flancos del SAM la auxina si es capaz de especificar la iniciación de la hoja. Por lo tanto, se puede especular que en el SAM la actividad de auxina pareciera ser suficiente para la iniciación de la hoja, pero en estadios posteriores cuando el primordio se empieza a desarrollar, la respuesta a auxina se encuentra alterada como consecuencia de la señal *clb5-1*. Para poder conocer los eventos moleculares se necesitará hacer un análisis más detallados durante la iniciación de la hoja, que permita responder si los puntos de convergencia de actividad máxima de auxina en los flancos del SAM están alterados. Otro aspecto que llama la atención es que en la estructura radial de *clb5-1* hay presencia de una vena media, que se observa mediante los marcadores vasculares *REV:GUS* (Avendaño-Vázquez et al., No publicado) y *gPHB:GUS* (Figura 8f-h). Es aceptado que el flujo de auxina converge en la punta del primordio foliar donde se internaliza a tejidos internos e induce la formación de la vena media (Scarpella et al., 2010). Por lo tanto resulta sorprendente que a pesar de que en *clb5-1* no existe un máximo de auxinas en la punta del primordio si se diferencia la vena media (Petricka & Nelson, 2007, Zgurski et al., 2005). Una posible explicación de la presencia de la vena media podría deberse a que una mínima acumulación o percepción de auxina es suficiente para inducir la formación de este haz vascular, pero indetectable por el marcador DR5, aunque dicha posibilidad requerirá de estudios más detallados para poder corroborarse.

7.3.Los dominios adaxiales y abaxiales no se establecen en *clb5-1*

Como se mencionó, la concentración de auxina es importante para el desarrollo de las hojas y se sabe que ésta forma a su vez un gradiente de expresión de los factores transcripcionales ARFs en el primordio de la hoja, que promueven a su vez la expresión diferencial de otros factores transcripcionales. De esta manera factores como KAN tienen una mayor actividad en el dominio abaxial (Figura 3) (Pekker et al., 2005). También existe evidencia

que la auxina precede y podría controlar el establecimiento del eje adaxial regulando la expresión de factores como *FILAMENTOUS FLOWER* y *REVOLUTA* (Heisler et al., 2005). Nuestro análisis del patrón de expresión de *pFIL:GUS* (Nelissen et al., 2003) mostró que la polaridad de los cotiledones de *clb5-1* no está afectada (Figura 7), en contraste, en las hojas la polaridad está fuertemente disminuida. Estos resultados son congruentes con la expresión del gen *gPHB:GUS* que marca la identidad adaxial, ya que se mostró que la polaridad no está afectada en cotiledones, pero la polaridad sí está notablemente disminuida en las hojas verdaderas de *clb5-1*. El uso de dichas líneas marcadoras sugieren que no hay polaridad en la hoja, por lo que creemos que este apéndice está afectado en etapas muy tempranas y no hay una actividad antagonista entre los dominios adaxial-abaxial, la cual es necesaria para la formación de una lámina aplanada.

Como se ha mostrado que la auxina precede y controla la expresión de los factores de transcripción *REV* y *FIL* (Heisler et al., 2005), la baja expresión de los marcadores *REV:GUS* y *pFIL:GUS* podría ser explicada por los defectos observados debidos a la baja o nula respuesta a esta auxina. La auxina también podría afectar directamente la expresión de *gPHB:GUS*, pero una demostración de esta posibilidad requiere estudios futuros más detallados. Por otro lado, es claro que la baja expresión de *REV:GUS*, *FIL:GUS* y *gPHB:GUS* podría ser causada por alteraciones de la expresión genética directas o indirectas causada por la señal *clb5-1*.

7.4. La señal *clb5-1* podría modular el ciclo celular en la hoja

En el desarrollo de una hoja silvestre, después de la especificación de los destinos celulares adaxiales y abaxiales, y una vez que la forma básica de este órgano ha sido establecida, la división celular cesa y la hoja crece predominantemente por expansión celular (Efroni et al., 2010, Diretto et al., 2007). Por lo anterior, se analizó la transición del crecimiento proliferativo al expansivo en la hoja en *clb5-1*, usando la línea reportera *CYCB1;1::D-box:GUS*. A pesar de que hay pocas células en la hoja radial de *clb5-1* (Figura de apoyo 4), existe un fuerte patrón de expresión del reportero a lo largo de esta estructura (Figura 11). Es decir, la línea reportera sugiere una continua división celular, pero el número de células en la hoja de *clb5-1* no es congruente con lo anterior. Esto puede ser explicado por la expresión y acumulación de las ciclinas B en las células de la hoja de *clb5-1*, estas ciclinas B no se degradan o se degradan más lento, por lo que la mitosis no se completa o se completa lentamente.

En contraste con la explicación anterior, pudiera ser que el patrón de GUS observado a lo largo de la hoja radial, se debiera a que no hay una expansión de las células y por el hecho de que el volumen de la hoja de *clb5-1* es menor al de una planta silvestre, por lo que las células en división están “concentradas en la estructura radial. Por lo anterior, la expresión del reportero se observa fuerte y localizada.

Algunas posibles causas de los defectos en la división celular en la hoja de *clb5-1* incluyen: a) que la falta de respuesta a la auxina en la hoja cause defectos en la división y la expansión celular, ya que se sabe que esta hormona regula estos procesos aunque no se conoce el mecanismo a través del cual lo hace (Perrot-Rechenmann, 2010, Scarpella et al., 2010). b) Otra posibilidad es que la señal *clb5-1* cause alteraciones en la expresión y/o degradación de ciclinas B, ya sea de manera directa o a través de afectar la expresión de factores que regulen dicho proceso (Avendaño-Vázquez et al., No publicado). Por lo tanto, en un futuro será importante estudiar en mayor detalle algunos otros aspectos del ciclo celular en la hoja de *clb5-1*. Además se requerirá del uso de marcadores de expansión celular y realizar un conteo del número de células que se encuentran en mitosis a lo largo de la hoja radial de *clb5-1*.

7.5. CCD4 podría estar participando en la síntesis de la señal derivada de carotenoides en la mutante *clb5-1*

La evidencia de la existencia de señales móviles derivadas de carotenoides, que regulan varios aspectos de la fisiología de las plantas es cada vez más clara. El ABA, la estrigolactona y el β -cyclocitral son ejemplos claros de carotenoides solubles en agua que son capaces de regular la expresión genética nuclear, la dominancia apical, la ramificación, el desarrollo de la raíz, la respuesta al estrés, etc (Ramel et al., 2012, Gomez-Roldan et al., 2008). Se ha demostrado que los carotenoides sintetizados en las plantas pueden ser catabolizados por las CCDs y otras enzimas para producir apocarotenoides (DellaPenna & Pogson, 2006). Por ejemplo, las NCEDs escinden epoxi-xantofilas para producir xantoxianina el precursor de ABA y la CCD7 y CCD8 están relacionadas con la producción de estrigolactona. La CCD1 forma apocarotenoides de 13 carbonos que dan lugar a compuestos aromáticos y de esencia. De la familia de las CCDs, la CCD4 es la enzima menos caracterizada, ya que su actividad de escisión y función es controversial (Rosati et al., 2009, Winterhalter & Rouseff, 2001).

Se ha demostrado que la mutante *clb5-1* acumula fitoflueno, ζ -carotenos o sus derivados producido entre las enzimas PDS y ZDS; y se ha propuesto que alguno de dichos compuestos son capaces de regular la expresión genética y el desarrollo de la hoja (Avendaño-Vázquez et al., No publicado). Dada la importancia de las CCDs en la producción de hormonas como ABA y estrigolactona y señales que afectan la expresión genética, se planteó la hipótesis de que el fitoflueno, el ζ -caroteno o sus derivados pudieran generar apocarotenoides a través de las enzimas CCDs, como CCD7, CCD8 o, la poco caracterizada, CCD4. Si alguna de dichas enzimas estuviera involucrada en la síntesis de la señal *clb5-1*, su ausencia prevendría la generación de esta señal. El análisis fenotípico y de expresión genética de las dobles mutantes en este trabajo demostró que en ausencia de CCD4 la mutante *clb5-1* tiene una complementación parcial en la morfología de la hoja y recupera la expresión de DXS a nivel de proteína. Se sabe que CCD4 escinde sustratos en la posición 9,10 y 9',10' y se cree que aceptan diferentes tipos de (apo)carotenoides como sustratos (Huang et al., 2009). Nuestros datos apoyan fuertemente que CCD4 participa en la modificación directa o indirecta de los carotenos, acumulados en *clb5-1*, los cuales son responsables de los efectos que se observan en esta mutante. Este resultado apoya la idea de la existencia de un nuevo apocarotenoide generado a través de CCD4 que funciona como señal en *clb5-1* y aporta evidencia importante para la elucidación de la vía de síntesis de esta señal. Por lo tanto conocer los patrones expresión de ZDS y CCD4 será importante para dar evidencias de los posibles lugares y condiciones donde esta señal se produce de manera natural en la planta y cuales son sus implicaciones biológicas y fisiológicas. Sin descartar la posibilidad de que esta señal podría sólo producirse por la falta de ZDS, lo que generaría una señal que normalmente no existe en el desarrollo de las plantas.

Ahora, se está obteniendo una doble mutante *ccd1 clb5-1*, para conocer si CCD1 también podría participar en la generación de la señal *clb5-1*. Como la adición de ABA y estrigolactona en la mutante *clb5-1* no recupera el fenotipo de hoja (Figura 5) podría sugerir que la generación de la señal podría ser independiente de la vía de síntesis del ABA y/o las estrigolactonas, aunque no se descarta la participación de alguna CCDs, como las NCDEs, en la síntesis de la señal debido a que son promiscuas y parcialmente redundantes (Auldrige et al., 2006).

7.6. GUN1 y los carotenoides son necesarios para el desarrollo de la semilla

Debido a que la señal derivada de carotenos en *clb5-1* es capaz de modular la expresión de genes nucleares y plastídicos, se analizó si esta señal podía ligarse a la regulación cloroplasto-núcleo mediada por la vía de señalización PGE (Cottage & Gray, 2011). En este trabajo se analizó la participación de algunos de los participantes de dicha vía de señalización. Estudios iniciales, mostraron que los niveles de expresión del gen *GUN1* estaban disminuidos en la mutante *clb5-1*, en comparación con los de otras mutantes albinas y la planta silvestre (Avendaño-Vázquez et al., No publicado). La proteína GUN1 es un miembro de la familia de las PPR que se ha demostrado que se requiere para la señalización retrograda cloroplasto núcleo, la cual es causada por la interrupción de la expresión plastídica (Cottage & Gray, 2011, Cottage et al., 2008). Para conocer si la señal derivada de carotenoides se relaciona o converge con la vía PGE, se decidió analizar el fenotipo de la hoja en mutantes que carecieran del factor GUN1. Sorprendentemente, las semillas de *gun1 clb5-1* parecen ser intolerantes a la desecación (o probablemente fotooxidación) y por lo tanto letales. Esta conclusión tiene base en que cuando se transfirieron las semillas *gun1 clb5-1* antes de la etapa de la desecación, a medio de crecimiento el 30% de la población de estas semillas fueron capaces de germinar, dando lugar a plántulas albinas pequeñas, con un fenotipo más fuerte en comparación con la mutante *clb5-1* (Figura 13). La misma tasa de sobrevivencia se observó cuando las semillas se desarrollaron sin la presencia de luz. Estos defectos del desarrollo de la semilla, no son específicos de *gun1 clb5-1*, la semilla doble mutante *gun1 pds3* igualmente es letal pero recuperan viabilidad cuando se desarrollan en ausencia de luz o son transferidas a medio antes de la desecación (Figuras suplementarias 2 y 3). Este resultado indica que el desarrollo de las semillas silvestres requiere de la síntesis de carotenoides y GUN1. De esta manera se ha descubierto un papel importante de los carotenoides en el desarrollo temprano del embrión y de la semilla.

En este análisis encontramos que el fenotipo de la doble mutante *gun1 clb5-1* es aún más pleiotrópico que el de la mutante *clb5-1*, por lo que no se puede concluir si la señal generada en *clb5-1*, está relacionada con la vía de señalización retrógrada PGE. Sin embargo, estos datos claramente demostraron la convergencia entre la vía de biosíntesis de carotenoides y la proteína GUN1. Sin embargo, las bases moleculares de esta relación se desconocen, por lo que será de interés abordar este tema un futuro, ya que hasta donde sabemos nunca se ha reportado un fenotipo letal para alguna mutante *gun1*, o *gun1* en otro fondo mutante.

En una búsqueda en la literatura, encontramos dos mutantes que tienen fenotipos similares a *gun1 clb5-1*. La mutación en *EMB1211*, la cual resulta en embriones albinos en la silicua, que al madurar dan lugar a semillas tipo pasa. Estas semillas germinan y generan plántulas pequeñas y albinas. Estos defectos en el desarrollo son muy parecidos a los que ocurren en *gun1 clb5-1*. El gen *EMB1211* codifica una proteína que podría participar en la construcción y mantenimiento de las membranas tilacoideas de cloroplasto (Liang et al., 2010). Por otro lado, la mutante *Atppr2*, que codifica para una proteína PPR con una función desconocida, también resulta en embriones albinos que conforme maduran se vuelven semillas tipo pasa que son inviables. La mutante alélica, de *Atppr2*, *emb2750* tiene un fenotipo menos severo y es capaz de germinar y da lugar a plántulas pequeñas detenidas en su desarrollo con cotiledones albinos deformes, parecidos a plántulas *gun1 clb5-1*. Se sabe que *AtPPR2* se expresa en partes de la planta donde hay divisiones celulares y se cree que regula la división celular. De manera interesante, se propuso que la alteración de la funcionalidad normal del plástido causada por la mutación *deAtppr2* pudiera generar una señal retrograda que bloquee la división celular (Lu et al., 2011). Las alteraciones en la función general de los plástidos de *emb1211* y *Atppr2* podrían contribuir a los defectos en la embriogénesis. En *gun1 clb5-1* o en *gun1 pds3*, la alteración de la funcionalidad de los plástidos podría generar defectos en la embriogénesis como en dichas mutantes. Esta alteración de la funcionalidad en los plástidos podría estar aumentada por el estrés que podría estar generando la luz y la desecación en los embriones *gun1 clb5-1* y *gun1 pds3*.

El fenotipo de las dobles mutantes *gun1 clb5-1* y *gun1 pds3*, pudiera ser consecuencia de la suma de los defectos que causa cada una de las mutaciones de forma individual. Se sabe que los carotenoides son necesarios para el ensamblaje de complejos fotosintéticos, fotoprotección, síntesis de vitaminas y hormonas, por lo que mutaciones en la vía de síntesis afectan estos procesos (Pogson & Albrecht, 2011, Cazzonelli & Pogson, 2010). Por otro lado, GUN1 se encarga de regular genes relacionados con las vías de percepción de la calidad e intensidad de luz; la biosíntesis de la antocianina, para proteger a los cloroplastos; aspectos del desarrollo de la planta, como la extensión del hipocótilo y la expansión de los cotiledones. Todo lo anterior en respuesta a estímulos del desarrollo y estreses ambientales (Cottage & Gray, 2011). La suma de todos los defectos podría provocar una severa alteración de los plástidos en las dobles mutantes. Como consecuencia, no se descarta una señal retrograda que bloquee la división celular u otros procesos del desarrollo, causando el fenotipo severo de las dobles mutantes, tal y como se sugirió para *Atppr2* (Lu et al., 2011). Otra posibilidad radica en la idea

que plantea que una función desconocida del plástido participa en el fenotipo embrión letal causado por las mutaciones de proteínas plastídicas PPR (Bryant et al., 2011, Schmitz-Linneweber & Small, 2008). Por lo tanto, se requieren estudios moleculares y genéticos más profundos para analizar estas posibilidades.

Resulta de interés mencionar que algunas de las plántulas *gun1 clb5-1* a simple vista acumulan grandes cantidades de antocianinas en las hojas (Figura 13 h). Se cree que los plástidos proveen la información necesaria para regular la biosíntesis de antocianina en las plántulas de *A. thaliana* (Cottage & Gray, 2011, Cottage et al., 2008). Además, en las plántulas *gun1*, está alterada la acumulación y la expresión de los genes tempranos de la biosíntesis de antocianina. Las antocianinas han sido implicadas en la tolerancia a estrés como es el caso de la sequía, ya que se cree que funcionan como osmoreguladores en las células vegetales (Gould, 2004). Por lo que la intolerancia a la desecación en la semilla *gun1 clb5-1*, que se protegieron de la luz o desecación, podría estar ligada a las afectaciones en la biosíntesis y acumulación de antocianina.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con base en los resultados generados en este trabajo, se puede proponer el siguiente modelo: en el cloroplasto, la falta de la enzima ZDS provoca la acumulación de carotenos lineales como fitoflueno, ζ -caroteno o productos de oxidación derivados de éstos. Alguno (s) de dichos productos es (son) procesado (s), directa o indirectamente por CCD4, dando lugar a la señal *clb5-1*, independiente de las hormonas como el ABA y la estrigolactona. Esta señal es capaz de modular a la par, la expresión genética de varios genes nucleares y cloroplásticos (Avendaño-Vázquez et al., No publicado), entre los que podrían encontrarse genes reguladores que bloqueen la respuesta a la auxina en la hoja. Por ejemplo, se podría estar afectando a los factores de respuesta a auxina (ARF) o los genes que transducen la respuesta a auxina (TIR1, AFBs). Como consecuencia de una respuesta alterada a la auxina, la expresión de algunos genes reguladores como KAN (Pekker et al., 2005), FIL y REV (Vernoux et al., 2010, Heisler et al., 2005) y, probablemente, PHB estaría alterada y esto traería como consecuencia defectos en la determinación del eje adaxial-abaxial de la hoja (Barkoulas et al., 2007). Otra posibilidad, sería que la señal *clb5-1* afecte, de forma directa o indirecta, la expresión de los genes que especifican los dominios de la hoja, independientemente a la respuesta a la auxina, así como la división y expansión celular (Figura 16).

Desde el punto de vista evolutivo, es interesante que en plantas se requieren de cuatro pasos enzimáticos para formar licopeno a partir de fitoeno, cuando en otros organismos se requiere de una sola enzima. Las desaturasas (PDS y ZDS) sólo están presentes en las cianobacterias, *Chlorobaculum* y organismos fotosintéticos eucariontes incluyendo las plantas (Sandmann, 2009). Es posible pensar que las desaturasas de la vía de biosíntesis de carotenoides hayan sido seleccionadas para poder generar señales capaces de modular el desarrollo de estos organismos, coordinando la funcionalidad de los plástidos o la biosíntesis de los carotenos.

En un futuro, será de suma importancia conocer el patrón de expresión de ZDS y CCD4 para conocer si la señal *clb5-1* es producida naturalmente en alguna etapa del desarrollo de *Arabidopsis*. También, será importante determinar de que manera la señal *clb5-1* modula la expresión genética, tomando ventaja de las tecnologías de secuenciación masiva, como es el caso del RNA-seq. De esta manera se podrán abordar preguntas como: ¿por qué la hoja no tiene respuesta a la auxina?. Por último, ensayos de actividad enzimática de CCD4 y la determinación de los perfiles de los carotenoides de *ccd4 clb5-1*, serán muy importantes para determinar la biogénesis de la señal *clb5-1*, lo que podría llevar al descubrimiento de una nueva hormona vegetal.

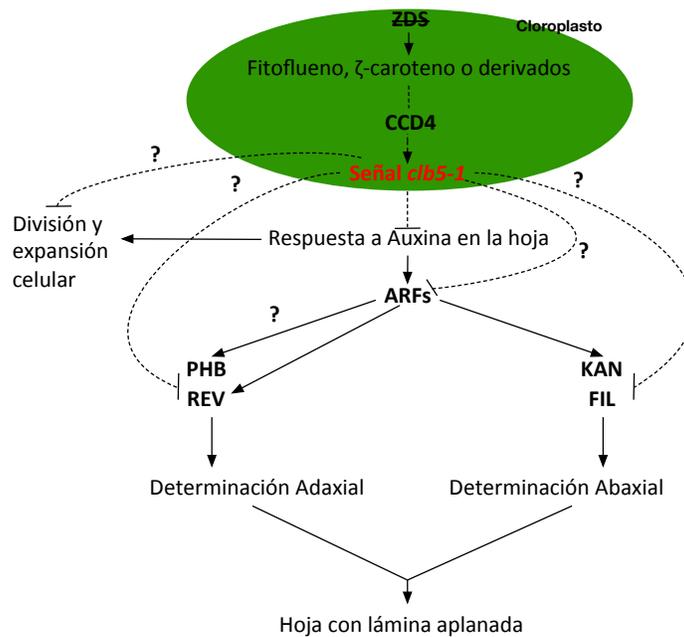


Figura 16. Modelo propuesto de la generación y acción de la señal *clb5-1* en *A. thaliana*

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

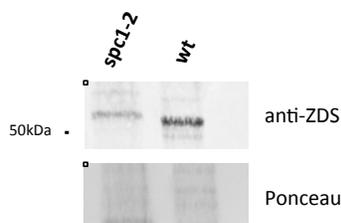


Figura suplementaria 1. Western blot anti-ZDS de la mutante *spc1-2* y wt. Se cargaron 10 µg de proteína. Se muestra tinción con Ponceau como control de carga.

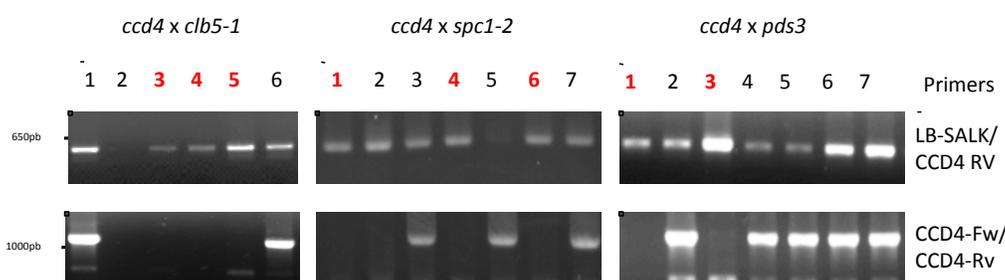


Figura suplementaria 2. Genotipificación de las dobles mutantes *ccd4 clb5-1*, *ccd4 spc1-2* y *ccd4 pds3*. Se genotipificaron plantas F2 que segregaron embriones albinos (indicativos la presencia de las mutaciones *clb5-1*, *spc1-2* y *pds3*). Las que no amplificaron el gen silvestre (usando los oligos CCD4-Fw/CCD4-Rv) pero que sí amplificaron la región de la inserción de T-DNA SALK (usando los oligos LB-SALK/CCD4-Rv) contienen la mutación *ccd4* en estado homocigoto y están indicadas con números en rojo.

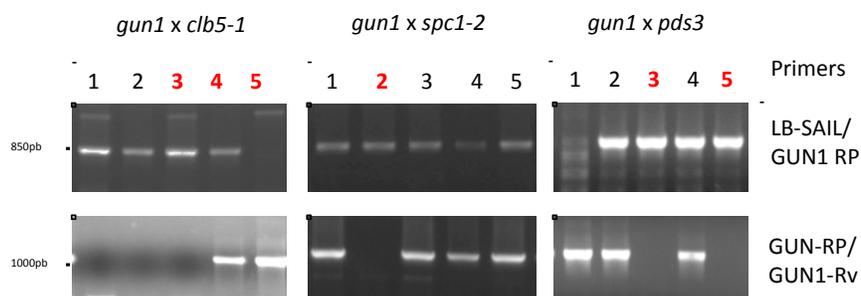


Figura suplementaria 3. Genotipificación de las dobles mutantes *gun1 clb5-1*, *gun1 spc1-2* y *gun1 pds3*. Se genotipificaron plantas F2 que segregaron embriones albinos (indicativos la presencia de las mutaciones *clb5-1*, *spc1-2* y *pds3*). Las que no amplificaron el gen silvestre (usando los oligos GUN1-RP/GUN1-Rv) pero que sí amplificaron la región de la inserción de T-DNA SAIL (usando los oligos LB-SAIL/GUN1-Rv) contienen la mutación *gun1* en estado homocigoto, indicadas por números en rojo..

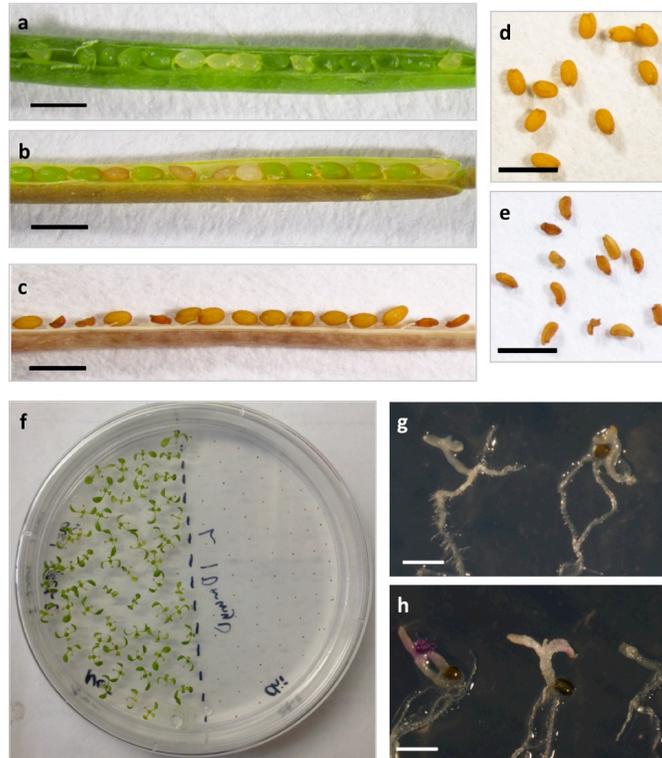


Figura suplementaria 4. Fenotipo de la doble mutante *gun1 spc1-2*. a) Silicua inmadura de una planta adulta *gun1 -/- spc1-2 +/-*, segregando embriones albinos. b) silicua madura *gun1 -/- spc1-2 +/-*, segregando embriones albinos que se volvieron cafés. c) silicua seca *gun1 -/- spc1-2 +/-*, se observan las semillas tipo pasa o shrunken. d) semillas normales provenientes de silicua *gun1 -/- spc1-2 +/-*. e) semillas tipo pasa o shrunken provenientes de silicuas *gun1 -/- spc1-2 +/-*. f) Sólo germinaron las plantas provenientes de semillas normales. g) Plántulas *gun1 -/- spc1-2 -/-* provenientes de embriones de silicuas maduras *gun1 -/- spc1-2 +/-* transferidos a medio de crecimiento. h) Plántulas *gun1 -/- spc1-2 -/-* provenientes de silicuas *gun1 -/- spc1-2 +/-* cubiertas con aluminio. Barra negra o blanca indican 1mm.

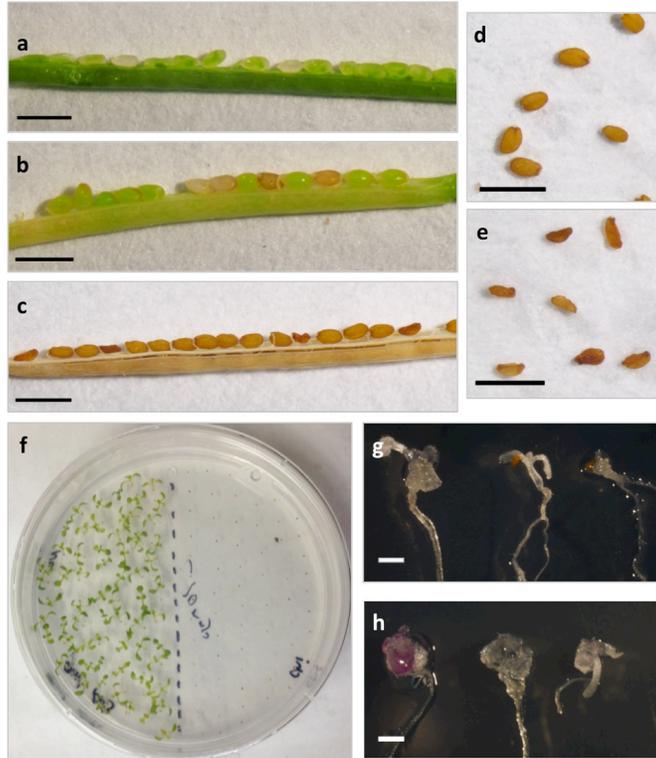


Figura suplementaria 5. Fenotipo de la doble mutante *gun1 pds3*. a) Silicua inmadura de una planta adulta *gun1 -/- pds3 +/-*, segregando embriones albinos. b) silicua madura *gun1 -/- pds3 +/-*, segregando embriones albinos que se volvieron cafés. c) silicua seca *gun1 -/- pds3 +/-*, se observan las semillas tipo pasa o shrunken. d) semillas normales provenientes de silicua *gun1 -/- pds3 +/-*. e) semillas tipo pasa o shrunken provenientes de silicuas *gun1 -/- pds3 +/-*. f) Sólo germinaron las plantas provenientes de semillas normales. g) Plántulas *gun1 -/- pds3 -/-* provenientes de embriones de silicuas maduras *gun1 -/- pds3 +/-* transferidos a medio de crecimiento. h) Plántulas *gun1 -/- pds3 -/-* provenientes de silicuas *gun1 -/- pds3 +/-* cubiertas con aluminio. Barra negra o blanca indican 1mm.

10. FIGURAS DE APOYO

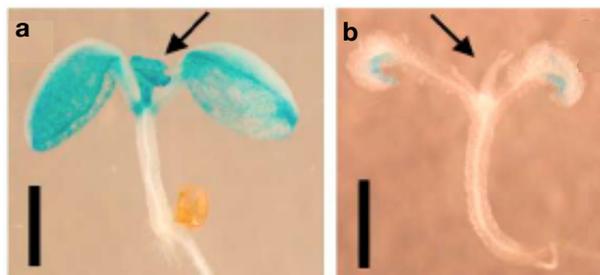


Figura de apoyo 1. Patrón de expresión de la línea marcadora *pFIL:GUS* en a) planta silvestre de 7 días y en b) *clb5-1* de 15 días. Las flechas negras señalan las primeras hojas verdaderas. Barra 1mm. Tomado de Avendaño-Vázquez et al. No publicado.

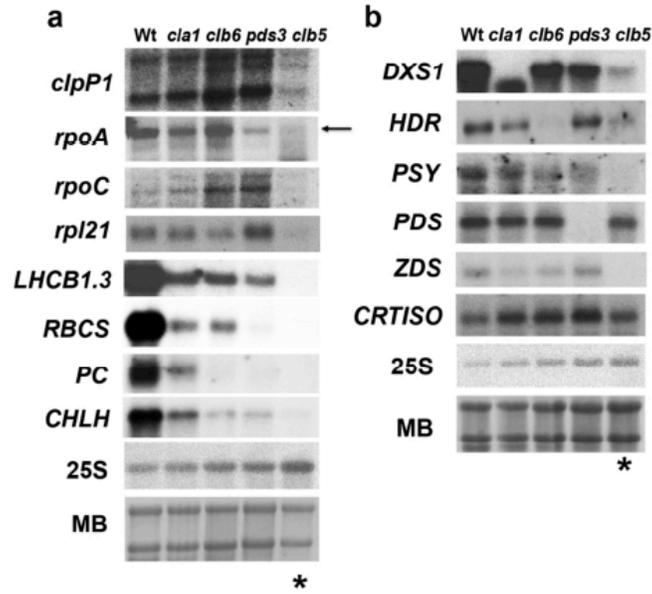


Figura de apoyo 2. Expresión de genes codificados en núcleo y cloroplásticos. a) Expresión de genes marcadores implicados en la función del cloroplasto incluyendo: *clpP1* (catalytic subunit of the ATP-dependent ClpP serine protease), *rpoA* (subunit A of the plastid RNA polymerase PEP), *rpoC* (subunit C of the plastid RNA polymerase PEP), *rpl21* (plastid ribosomal protein), *LHCB1.3* (chlorophyll binding protein), *RBCS* (Subunidad pequeña de la RUBISCO), *PC* (Plastocianina), *CHLH* (La subunidad H de la Mg-chelataasa). b) Genes codificados en núcleo involucrados en la vía biosintética de los carotenoides incluyendo: *DXS1* (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase), *HDR* (2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate reductoisomerase), *PSY* (Phytoene synthase), *PDS* (phytoene desaturase), *ZDS* (zeta carotene desaturase), *CRTISO* (carotene isomerase). Tomado de Avendaño-Vázquez et al. No Publicado.

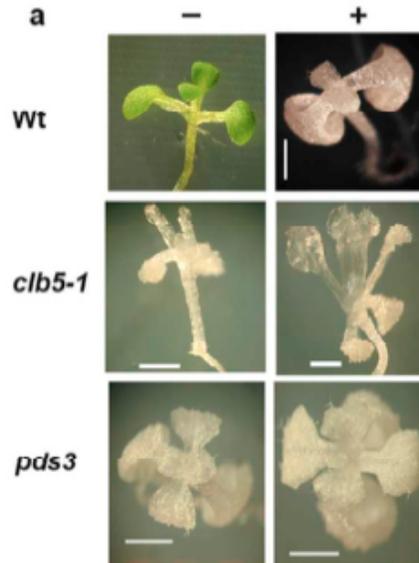


Figura de apoyo 3. Tratamiento con fluridona. a) Morfología de plántulas *clb5-1 pds3* de 15 días tratadas con fluridona (+) o sin tratamiento (-). La planta silvestre sin fluridona y la tratada con fluridona tienen 8 días. Tomado de Avendaño-Vázquez et al. No publicado.

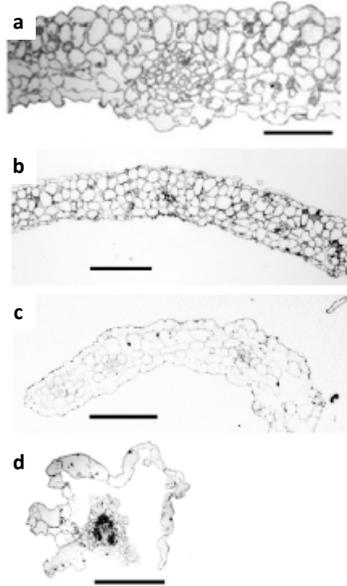


Figura de apoyo 4. Micrografías de secciones transversales de la segunda hoja de plántulas de 21 días a) silvestre, b) *clb6*, c) *pds3* y d) *clb5-1*. Barra indica 100 μm . Tomada de Avendaño-Vázquez et al., No publicado.

11. APÉNDICE

Buffer CTAB 2X

Tris HCl pH 8	100 mM
NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM
CTAB (bromuro de cetil-metil-amonio)	2%
Agua destilada	

Buffer de extracción de proteínas

Hepes pH 7.5	100 mM
EDTA	5 mM
EGTA	5 mM
DTT	10mM
Na ₃ VO ₄	10mM
NaF	10mM
B-glicerolfosfato	50mM
PMSF	1mM
Antipain	5 $\mu\text{g/ml}$
Aprotinin	5 $\mu\text{g/ml}$
Leupetin	5 $\mu\text{g/ml}$
Glicerol	10%
Polivinilpirrolidona	7.5%

Buffer de transferencia proteínas

Tris HCl pH 8.8	6 g
Glicina	28.8 g
Metanol	400 ml
Agua destilada	cbp 2 L

Gel concentrador para gel de poliacrilamida (2ml)

Mezcla de acrilamida 30%	0.33 ml
Tris/Glicina 1 M (pH 6.8)	0.25 ml
SDS 10%	0.02 ml
Persulfato de sodio 10%	0.02 ml
TEMED	0.001 ml
Agua destilada	

PBS 10X

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
Aforar a 1 L con agua destilada	
Ajustar pH a 7.4 con HCl, esterilizar	

Ponceau's

Ponceau's	0.2%
Ácido acético	1%
Agua destilada	

Solución de lavado para Western blot

Tween 20	0.1%
NaCl	0.5 mM
PBS	1X

12. LITERATURA CITADA

- Andriankaja M, Dhondt S, De Bodt S, *et al.*, 2012. Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Dev Cell* **22**, 64-78.
- Auldrige ME, Mccarty DR, Klee HJ, 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 315-21.
- Avendaño-Vázquez AO, Córdoba E, San Román C, *et al.*, No publicado. Mutations in the zeta-carotene desaturase uncover a novel carotenoid derived signal required for chloroplast biogenesis and leaf development in *Arabidopsis*.
- Bai F, Demason DA, 2008. Hormone interactions and regulation of PsPK2::GUS compared with DR5::GUS and PID::GUS in *Arabidopsis thaliana*. *Am J Bot* **95**, 133-45.
- Barkan A, Goldschmidt-Clermont M, 2000. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* **82**, 559-72.
- Barkoulas M, Galinha C, Grigg SP, Tsiantis M, 2007. From genes to shape: regulatory interactions in leaf development. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 660-6.
- Braybrook SA, Kuhlemeier C, 2010. How a plant builds leaves. *Plant Cell* **22**, 1006-18.
- Breitenbach J, 2002. Interaction of bleaching herbicides with the target enzyme ζ -carotene desaturase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **73**, 104-9.

- Bryant N, Lloyd J, Sweeney C, Myouga F, Meinke D, 2011. Identification of nuclear genes encoding chloroplast-localized proteins required for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **155**, 1678-89.
- Camara B, Bouvier F, 2004. Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch Biochem Biophys* **430**, 16-21.
- Cazzonelli CI, Pogson BJ, 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* **15**, 266-74.
- Chen Y, Li F, Wurtzel ET, 2010. Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. *Plant Physiol* **153**, 66-79.
- Cordoba E, Salmi M, Leon P, 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J Exp Bot* **60**, 2933-43.
- Cottage A, Gray JC, 2011. Timing the switch to phototrophic growth: a possible role of GUN1. *Plant Signal Behav* **6**, 578-82.
- Cottage A, Mott E, Wang JH, *et al.*, 2008. Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B, eds.: Springer, 1201-5.
- Cuttriss AJ, Pogson BJ, 2006. Carotenoids In: Wise RR, Hooper JK, eds. *Carotenoids in the structure and function of plastids*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Dall'osto L, Piques M, Ronzani M, *et al.*, 2013. The Arabidopsis *nox* mutant lacking carotene hydroxylase activity reveals a critical role for xanthophylls in photosystem I biogenesis. *Plant Cell* **25**, 591-608.
- Dellapenna D, Pogson BJ, 2006. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 711-38.
- Dinneny JR, Yadegari R, Fischer RL, Yanofsky MF, Weigel D, 2004. The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* **131**, 1101-10.
- Diretto G, Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G, 2007. Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS One* **2**, e350.
- Dong H, Deng Y, Mu J, *et al.*, 2007. The Arabidopsis Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a zeta-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Res* **17**, 458-70.
- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG, 1999. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Dev Biol* **215**, 407-19.
- Efroni I, Eshed Y, Lifschitz E, 2010. Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. *Plant Cell* **22**, 1019-32.
- Eloy NB, De Freitas Lima M, Van Damme D, *et al.*, 2011. The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. *Plant J* **68**, 351-63.
- Estavillo GM, Chan KX, Phua SY, Pogson BJ, 2012. Reconsidering the nature and mode of action of metabolite retrograde signals from the chloroplast. *Front Plant Sci* **3**, 300.
- Fraser PD, Enfissi EM, Bramley PM, 2009. Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. *Arch Biochem Biophys* **483**, 196-204.
- Fujii S, Small I, 2011. The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes. *New Phytol* **191**, 37-47.
- Gillmor CS, Park MY, Smith MR, Pepitone R, Kerstetter RA, Poethig RS, 2010. The MED12-MED13 module of Mediator regulates the timing of embryo patterning in Arabidopsis. *Development* **137**, 113-22.
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, *et al.*, 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189-94.
- Gould KS, 2004. Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *J Biomed Biotechnol* **2004**, 314-20.

- Hake S, Smith HM, Holtan H, Magnani E, Mele G, Ramirez J, 2004. The role of knox genes in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 125-51.
- Heisler MG, Ohno C, Das P, *et al.*, 2005. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* **15**, 1899-911.
- Howitt CA, Pogson BJ, 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* **29**, 435-45.
- Huang FC, Molnar P, Schwab W, 2009. Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *J Exp Bot* **60**, 3011-22.
- Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J, 2002. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* **14**, 333-42.
- Kachanovsky DE, Filler S, Isaacson T, Hirschberg J, 2012. Epistasis in tomato color mutations involves regulation of phytoene synthase 1 expression by cis-carotenoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 19021-6.
- Koenig DP, Sinha NR, 2007. Genetic Control of Leaf Shape. In: *Life Sciences*. 1-8.
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, *et al.*, 2007. Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* **316**, 715-9.
- León P, Guevara-García A, 2008. El cloroplasto: un organelo clave en la vida y en el aprovechamiento de las plantas. In: López-Munguía A, ed. *Una ventana al que hacer científico, Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 Aniversario*. México DF: UNAM.
- Liang Q, Lu X, Jiang L, Wang C, Fan Y, Zhang C, 2010. EMB1211 is required for normal embryo development and influences chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Physiol Plant* **140**, 380-94.
- Lin WC, Shuai B, Springer PS, 2003. The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES-domain gene ASYMMETRIC LEAVES2 functions in the repression of KNOX gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *Plant Cell* **15**, 2241-52.
- Lopez-Juez E, Pyke KA, 2005. Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol* **49**, 557-77.
- Lu S, Li L, 2008. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr Plant Biol* **50**, 778-85.
- Lu Y, Li C, Wang H, Chen H, Berg H, Xia Y, 2011. AtPPR2, an Arabidopsis pentatricopeptide repeat protein, binds to plastid 23S rRNA and plays an important role in the first mitotic division during gametogenesis and in cell proliferation during embryogenesis. *Plant J* **67**, 13-25.
- Mattsson J, Ckurshumova W, Berleth T, 2003. Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. *Plant Physiol* **131**, 1327-39.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M, 1998. Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science* **282**, 662, 79-82.
- Moon J, Hake S, 2011. How a leaf gets its shape. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 24-30.
- Nelissen H, Clarke JH, De Block M, *et al.*, 2003. DRL1, a homolog of the yeast TOT4/KTI12 protein, has a function in meristem activity and organ growth in plants. *Plant Cell* **15**, 639-54.
- Nelson N, Ben-Shem A, 2004. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 971-82.
- Park H, Kreunen SS, Cuttriss AJ, Dellapenna D, Pogson BJ, 2002. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *Plant Cell* **14**, 321-32.
- Pekker I, Alvarez JP, Eshed Y, 2005. Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* **17**, 2899-910.

- Perrot-Rechenmann C, 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001446.
- Petricka JJ, Nelson TM, 2007. Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol* **144**, 173-86.
- Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz KJ, Oelmüller R, 2006. pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* **18**, 176-97.
- Pogson BJ, Albrecht V, 2011. Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant Physiol* **155**, 1545-51.
- Pogson BJ, Woo NS, Forster B, Small ID, 2008. Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci* **13**, 602-9.
- Ramel F, Birtic S, Ginies C, Soubigou-Taconnat L, Triantaphylides C, Havaux M, 2012. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5535-40.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SH, 2003. *Biology of Plantas*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C, 2000. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**, 507-18.
- Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, *et al.*, 2003. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255-60.
- Rosati C, Diretto G, Giuliano G, 2009. Biosynthesis and engineering of carotenoids and apocarotenoids in plants: state of the art and future prospects. *Biotechnol Genet Eng Rev* **26**, 139-62.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, *et al.*, 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**, 463-72.
- Sakai H, Aoyama T, Oka A, 2000. Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* **24**, 703-11.
- Sandmann G, 2009. Evolution of carotene desaturation: the complication of a simple pathway. *Arch Biochem Biophys* **483**, 169-74.
- Scarpella E, Barkoulas M, Tsiantis M, 2010. Control of leaf and vein development by auxin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001511.
- Schmitz-Linneweber C, Small I, 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* **13**, 663-70.
- Sieburth LE, Lee DK, 2010. BYPASS1: how a tiny mutant tells a big story about root-to-shoot signaling. *J Integr Plant Biol* **52**, 77-85.
- Tsukaya H, 2002. Leaf development. *Arabidopsis Book* **1**, e0072.
- Tsukaya H, 2013. Leaf development. *Arabidopsis Book* **11**, e0163.
- Ueno Y, Ishikawa T, Watanabe K, *et al.*, 2007. Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 are involved in the establishment of polarity in leaves of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 445-57.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ, 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**, 1963-71.
- Van Norman JM, Frederick RL, Sieburth LE, 2004. BYPASS1 negatively regulates a root-derived signal that controls plant architecture. *Curr Biol* **14**, 1739-46.
- Van Norman JM, Murphy C, Sieburth LE, 2011. BYPASS1: synthesis of the mobile root-derived signal requires active root growth and arrests early leaf development. *BMC Plant Biol* **11**, 28.
- Vernoux T, Besnard F, Traas J, 2010. Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001487.

- Vishnevetsky M, Ovadis M, Zuker A, Vainstein A, 1999. Molecular mechanisms underlying carotenogenesis in the chromoplast: multilevel regulation of carotenoid-associated genes. *Plant J* **20**, 423-31.
- Walter MH, Floss DS, Strack D, 2010. Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta* **232**, 1-17.
- Waters MT, Langdale JA, 2009. The making of a chloroplast. *EMBO J* **28**, 2861-73.
- White DW, 2006. PEAPOD regulates lamina size and curvature in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13238-43.
- Winterhalter P, Rouseff RL, 2001. *Carotenoid-derived aroma compounds*. Washington DC: American Chemical Society.
- Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K, 2010. The strigolactone story. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 93-117.
- Zgurski JM, Sharma R, Bolokoski DA, Schultz EA, 2005. Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of asymmetric leaf1 and asymmetric leaf2 Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **17**, 77-91.