



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

Departamento de biología molecular de plantas

Estudio del mecanismo de participación de la enzima dioxigenasa de escisión de carotenos 4 (CCD4) en la modulación del desarrollo de la hoja mediada por  $\zeta$ -carotenos

## **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Maestro en ciencias

P R E S E N T A

Julio Salvador Sierra Camarena

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Patricia León Mejía  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Svetlana Shishkova  
Instituto de Biotecnología  
Dr. Christopher Wood  
Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Mor.

Agosto de 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 mi familia, por apoyarme incondicionalmente.

A mis amigos, por ser mi segunda familia y estar siempre ahí.

A todos los miembros del laboratorio León, por los innumerables consejos para que este trabajo fuera mejor.

A la Dra. Patricia León, por guiarme durante la elaboración de este trabajo. También a los miembros del comité de tutores, por sus importantes comentarios.

A los sinodales, por recordarme siempre que todo se puede mejorar.

Al CONACYT, por otorgarme la beca de maestría.

A la UNAM y el instituto de biotecnología por abrirme las puertas y permitirme seguir creciendo profesionalmente.

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Patricia León Mejía y financiado por PAPIIT IN204617 y CONACYT 220534.**

# ÍNDICE GENERAL

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
SEÑALIZACIÓN RETRÓGRADA .....	5
<i>Señalización retrógrada durante la biogénesis .....</i>	<i>6</i>
<i>Señalización retrógrada operacional .....</i>	<i>8</i>
SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES.....	10
<i>Biosíntesis de carotenoides .....</i>	<i>12</i>
<i>Regulación de la biosíntesis de carotenoides.....</i>	<i>14</i>
APOCAROTENOIDES.....	16
<i>Dioxigenasa de escisión de carotenos 4 (CCD4) .....</i>	<i>19</i>
<i>Funciones de apocarotenoides.....</i>	<i>20</i>
DESARROLLO DE LA HOJA DE <i>A. THALIANA</i> .....	21
<i>I. Iniciación del primordio foliar .....</i>	<i>22</i>
<i>II. Establecimiento de la polaridad adaxial/abaxial .....</i>	<i>24</i>
<i>III. Desarrollo del meristemo marginal.....</i>	<i>27</i>
<i>Papel de las auxinas en el desarrollo de la hoja.....</i>	<i>27</i>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>29</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>32</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>33</b>
MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	33
<i>Condiciones de crecimiento de A. thaliana Col-0 para generar plantas transgénicas .....</i>	<i>33</i>
<i>Condiciones de crecimiento de Nicotiana benthamiana .....</i>	<i>33</i>
EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO .....	34
ELABORACIÓN DE CONSTRUCCIONES .....	34
TRANSFORMACIÓN DE <i>A. THALIANA</i> CON <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> POR INFILTRACIÓN DE PRIMORDIOS FLORALES .....	38
<i>Selección de plantas transgénicas y obtención de plantas homocigotas.....</i>	<i>39</i>
ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>CCD4</i> .....	40
<i>Tratamientos con inhibidores de la traducción del cloroplasto .....</i>	<i>41</i>
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA ENZIMA <i>CCD4</i> .....	41
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA LÍNEA MUTANTE <i>CCD4</i> .....	42
<i>Análisis morfológico de la hoja .....</i>	<i>44</i>
<i>Análisis de la senescencia de las hojas.....</i>	<i>45</i>
CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS SOBREENPRESORAS DE <i>CCD4</i> .....	46
<i>Extracción de RNA total .....</i>	<i>46</i>
<i>Hibridación de RNA .....</i>	<i>46</i>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>CCD4</i> .....	49
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>CCD4</i> .....	57
PATRÓN DE EXPRESIÓN DE <i>CCD4</i> EN TRATAMIENTOS CON LINCOMICINA Y ESPECTINOMICINA.....	58
ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA MUTANTE <i>CCD4</i> .....	59
<i>Análisis morfológico de la hoja .....</i>	<i>66</i>
<i>Análisis de la senescencia de la hoja.....</i>	<i>68</i>
<i>Efecto de la inhibición de la traducción en el cloroplasto sobre la morfología de la hoja en Col-0 y ccd4..</i>	<i>70</i>
SOBREENPRESIÓN DE <i>CCD4</i> .....	76

<i>Fenotipo de las líneas sobreexpresoras de CCD4</i> .....	78
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>80</b>
<i>Conclusiones y perspectivas</i> .....	90
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>92</b>
<b>INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA DE PROTOCOLOS Y SOLUCIONES</b> .....	<b>97</b>
PROTOCOLO GENERAL DE PCR .....	97
SOLUCIONES .....	97
<i>Medio de crecimiento GM 1X</i> .....	97
<i>Solución enzimática para obtener protoplastos de N. benthamiana</i> .....	97
<i>Solución de tinción de GUS</i> .....	98
<i>Amortiguador de hibridación para Northern blot</i> .....	98
<i>Hibridación de RNA</i> .....	98
<i>Mezcla de reacción para marcar la sonda con [<math>\alpha^{32}P</math>] dCTP para Northern blot</i> .....	99
<i>Medio de infiltración para transformar A. thaliana</i> .....	99
<i>Mezcla de crecimiento en sustrato</i> .....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los diferentes plástidos se originan de proplástidos.....	4
Figura 2. La señalización retrógrada tiene un papel muy importante en la biogénesis y homeostasis de los plástidos. ....	7
Figura 3. Vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), donde se sintetizan los precursores de muchas moléculas; entre ellas los carotenos. ....	11
Figura 4. La biosíntesis de carotenos depende exclusivamente de los precursores sintetizados en la vía MEP. ....	14
Figura 5. Estructura general de las CCDs .....	17
Figura 6. Las CCDs constituyen una pequeña familia de genes.....	18
Figura 7. Mantenimiento de las células pluripotentes del SAM.....	23
Figura 8. Especificación de los primordios foliares en los flancos del SAM. ....	24
Figura 9. Anatomía del meristemo apical y sección transversal de la hoja.....	24
Figura 10. Defectos morfológicos en hojas con diferentes grados de adaxialización.....	25
Figura 11. Vías génicas clave en el control del desarrollo de la hoja. ....	26
Figura 12. Fenotipo de la mutante <i>clb5</i> .....	30
Figura 13. La polaridad de <i>clb5</i> está comprometida. ....	30
Figura 14. La doble mutante <i>clb5-ccd4</i> presenta una recuperación en la morfología de la hoja. ....	31
Figura 15. Diagrama para la generación de las construcciones mediante recombinación Gateway. ....	36
Figura 16. Esquema del proceso de transformación y generación de líneas transgénicas.....	40
Figura 17. Nomenclatura empleada para la descripción de los estados del desarrollo de <i>A. thaliana</i> de acuerdo con Boyes et al. (2001). ....	42
Figura 18. Diagrama para la elaboración de un análisis de componentes principales (PCA)..	44
Figura 19. Procesamiento de imágenes para analizar la maduración de las hojas. ....	45
Figura 20. Sitio de inserción de T-DNA en el gen <i>CCD4</i> y sitio de alineamiento de la sonda de DNA marcada con [ $\alpha^{32}$ P] dCTP. ....	47
Figura 21. Patrón de expresión de <i>CCD4</i> en estados tempranos del desarrollo. ....	50
Figura 22. Patrón de expresión de <i>CCD4</i> en plantas 1.02 correspondientes a las tres líneas analizadas.....	51
Figura 23. Patrón de expresión de <i>CCD4</i> en estados de desarrollo 1.04 a 1.06.....	53
Figura 24. Expresión de <i>CCD4</i> no está presente en hojas jóvenes. ....	54
Figura 25. Patrón de expresión de <i>CCD4</i> comparado con <i>PDS3</i> y <i>ZDS</i> . ....	55
Figura 26. Expresión de <i>CCD4</i> en hojas de roseta maduras y caulinares. ....	56
Figura 27. Expresión de <i>CCD4</i> en órganos florales (a y d-h) y silicuas (b-c). ....	56
Figura 28. Localización subcelular de <i>CCD4</i> . ....	58
Figura 29. Efecto de la inhibición de la traducción plastídica en el patrón de expresión de <i>CCD4</i> , <i>ZDS</i> y <i>PDS3</i> . ....	59
Figura 30. Sitio de la inserción de T-DNA en el gen <i>CCD4</i> y genotipificación de la mutante. .	60
Figura 31. Progresión del desarrollo de la mutante <i>ccd4</i> en comparación a <i>Col-0</i> .....	61
Figura 32. Análisis de componentes principales para la morfología y desarrollo de <i>ccd4</i> y <i>Col-0</i> . ....	63
Figura 33. Gráfica de eigenvalores.....	64
Figura 34. Dendrograma para el análisis de agrupamiento de individuos <i>ccd4</i> y <i>Col-0</i> .....	65
Figura 35. Análisis morfológico de hojas de <i>ccd4</i> y <i>Col-0</i> . ....	67

Figura 36. Histogramas de frecuencia de pixeles en intensidades de grises en imágenes de 0 a 255 pixeles. ....	69
Figura 37. Diferencias morfológicas en plantas maduras de <i>ccd4</i> y Col-0. ....	70
Figura 38. Fenotipos observados en plantas crecidas en lincomicina.....	72
Figura 39. Proporción de fenotipos de hoja en plantas crecidas en lincomicina.....	73
Figura 40. Proporción de fenotipos de la hoja de <i>ccd4</i> y Col-0 en inhibidores de la traducción del cloroplasto. ....	74
Figura 41. Progresión del desarrollo de <i>ccd4</i> y Col-0 en inhibidores de la traducción del cloroplasto. ....	76
Figura 42. Northern blot para confirmar la sobreexpresión de <i>CCD4</i> en 12 líneas.....	77
Figura 43. Fenotipo de las líneas sobreexpresoras de <i>CCD4</i> . ....	79
Figura 44. líneas sobreexpresoras de <i>CCD4</i> en etapa reproductiva.....	80
Figura 45. Modelo propuesto en este trabajo.....	89
Figura 46. Alineamiento múltiple de CCDs de <i>A. thaliana</i> .....	101
Figura 47. Mapa de construcciones elaboradas en este trabajo.....	102
Figura 48. Patrón de expresión de <i>CCD4</i> , <i>PDS3</i> y <i>ZDS</i> en el inhibidor espectinomicina. ....	103

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en este trabajo.....	38
Tabla 2. Segregación de líneas reporteras P <sub>CCD4</sub> ::GUS.....	49
Tabla 3. Segregación para una o dos inserciones de las líneas sobreexpresoras analizadas..	78
Tabla 4. Suplementaria 1, construcciones realizadas en este trabajo .....	100



# Lista de abreviaturas

- ABA:** Ácido abscísico.
- AP2:** Factor de transcripción APETALA2.
- CaMV:** Virus de mosaico de la coliflor (del inglés, *cauliflower mosaic virus*).
- CCD:** Dioxigenasa de escisión de carotenos.
- CDK-E1:** Cinasa dependiente de ciclina E1.
- CDP-ME:** 4-(citidina 5-difosfato)-2-6-metil-D-eritritol.
- CDP-ME2P:** CDP-ME-2 fosfato.
- CDS:** Región codificante (del inglés, *coding sequence*).
- CHLD:** Subunidad D de la Mg-quelatasa.
- CK:** Citocininas.
- CLB1-6:** del inglés *Chloroplast biogenesis* 1-6.
- CLV1-3:** CAVATA1-3.
- CMK:** CDP-ME cinasa.
- CPTA:** Hidroclorato de trimetilamina.
- CRTISO:** Caroteno isomerasa.
- CTAB:** Bromuro de centrimonio.
- DDE:** Días después de estratificación.
- DMAPP:** Dimetilalil difosfato.
- DXP:** 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato.
- DXR:** DXP-reductasa.
- DXS:** DXP-sintasa.
- EROs:** Especies reactivas de oxígeno.
- Ex1/2:** Proteínas EXECUTER1/2.
- FIL:** Factor de transcripción FILAMENTOUS FLOWER.
- GFP:** Proteína verde fluorescente.
- GGPP:** Geranil-geranil difosfato.
- GGPPS:** GGPP sintasa.
- GM:** Medio de crecimiento MS adicionado con vitaminas Gamborg.
- gun:** mutantes “genomas desacoplados” (del inglés, *genomes uncoupled*).
- GUS:** beta-glucoronidasa.
- HMBPP:** 4-hidroxi-2-metilbut-2-enil difosfato.
- HPL:** Hidroperóxido liasa.
- HSP90:** Proteína de choque térmico 90 (del inglés, *Heat shock protein 90*).
- IPP:** Isopentenil difosfato.
- KNOX1:** Factores homeobox de clase 1 tipo knotted.
- LCYB/CRTL-B:** beta-licopeno ciclasa.
- LCYE:** épsilon-licopeno ciclasa.
- LHCb:** Complejo de captura de luz b (del inglés, *Light harvesting complex b*).
- MCT:** MEP acitidil transferasa.
- MDS:** MEcPP sintasa.
- MEcPP:** Metileritritol ciclodifosfato.
- MEP:** Vía de síntesis del metileritritol fosfato.
- MES:** Ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico.
- MOPS:** Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.
- MS:** Medio de crecimiento Murashige-Skoog.

**MVA:** Vía de síntesis del ácido mevalónico.

**NCBI:** *National Center of Biotechnology Information.*

**NCED:** Dioxigenasa de escisión de 9-cis-epoxicaroteno.

**NF:** Norfluorazona.

**PAP:** 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato.

**PCA:** Análisis de componentes principales.

**PDS:** Fitoeno desaturasa.

**PhANGS:** Genes nucleares asociados a la fotosíntesis (del inglés, *Photosynthesis associated nuclear genes*).

**PIN1:** Transportador de auxinas PIN-formed 1.

**PPF:** Flujo fotosintético de fotones (*Photosynthetic photon flux*).

**PPI:** IPP isomerasa.

**PPR:** Dominio con repeticiones pentatricopeptídicas (del inglés, *pentatricopeptide repeat*).

**PRANGs:** Genes nucleares asociados al estado redox del fotosistema (del inglés, *Photosystem redox-associated nuclear genes*).

**PRIN2:** Insensible al estado redox del plástido 2 (del inglés, *plastid redox insensitive 2*).

**PRPS1:** Proteína ribosomal S1.

**PSII:** Fotosistema II (del inglés, *photosystem II*).

**PSY:** Fitoeno sintasa.

**pTAC:** Cromosoma del plástido transcripcionalmente activo (del inglés, *Plastid transcriptionally active chromosome*).

**RAP2.4:** Relacionada a AP2.

**RES:** Especies electrófilas reactivas de carotenoides. (del inglés, *reactive electrophilic species*).

**RGB:** Canales Rojo-Verde-Azul de una fotografía.

**SAM:** Meristemo apical del brote (del inglés, *shoot apical meristem*).

**SIG:** Factores sigma plastídicos.

**SORGs:** Genes nucleares de respuesta a oxígeno singlete (del inglés, *singlet-oxygen response genes*).

**SSC:** Amortiguador de citrato de sodio salino.

**STM:** Factor de transcripción *Shoot meristemless*.

**WUS:** WUSCHEL (factor de transcripción).

**X-Gluc:** Ácido glucorónico 5-bromo-4-cloro-3-indolil.

**ZAT10:** Proteínas con dedos de zinc (del inglés, *salt tolerance zinc finger*)

**ZDS:** zeta-caroteno desaturasa.

**Z-ISO:** zeta-caroteno isomerasa.

**ARF:** Factores de respuesta a auxinas (del inglés, *auxin response factors*).

**KAN:** Factores de transcripción KANADI.

**HD-ZIP III:** Factores de transcripción.

**MYB:** Factores de transcripción de la familia MYB.

**BP:** Miembro de los genes homeobox de clase 1 tipo-Knotted1, BREVIPEDICELLUS 1.

**AS1:** Proteína con dominio MYB, ARABIDOPSIS PHANTASTICA-LIKE 1.

**LOB:** Proteína involucrada en el desarrollo de órganos laterales, LATERAL ORGAN BOUNDARIES.

**ARPs:** ASSYMETRIC LEAVES 1 (AS1) / ROUGH SHEATH (RS2) / PHANTASTICA (PHAN).

# Resumen

Los cloroplastos son organelos semiautónomos que se diferencian a partir de proplástidos. Estos organelos comunican su estatus metabólico y de desarrollo al núcleo por un mecanismo de señalización retrógrada, que permite coordinar la expresión de genes nucleares y plastídicos. Las señales retrógradas pueden actuar durante el desarrollo del cloroplasto (biogénicas) y en los ajustes de su estado funcional (operacionales). Se ha descrito que los carotenoides también son precursores de moléculas señalizadoras y sensores, generadas por especies reactivas de oxígeno o por catálisis enzimática por miembros de las CCDs (*Carotenoid Cleavage Dioxygenase*). Una de estas señales es la denominada ACS1 (*Apocarotenoid derived signal 1*) descrita en la mutante *clb5* e involucrada en el desarrollo de la hoja. Se ha demostrado que la enzima CCD4 juega un papel importante en dicho proceso y por lo tanto entender los aspectos moleculares de esta regulación es importante. Para develar si durante el desarrollo de la planta se genera un apocaroteno, mediante CCD4, se estudió el patrón de expresión del gen *CCD4* y se comparó con el de genes de la vía de carotenogénesis en diferentes estados de desarrollo, usando el gen reportero GUS. Así mismo, se analizaron los fenotipos asociados a la alteración de los niveles endógenos de CCD4 caracterizando morfológicamente a la mutante *ccd4* y líneas sobreexpresoras en *Arabidopsis thaliana*. Este trabajo demostró que el patrón de expresión de *CCD4* es característico en hojas en contraste con el de otros genes de la vía de carotenogénesis. Además, la localización del transcrito de *CCD4* es diferente al de la proteína en estructuras florales. Se encontró también que la mutante *ccd4* posee un fenotipo de hojas más circulares comparado con la planta silvestre. Aunado a esto, plantas sobreexpresoras de *CCD4* presentan alteración en el número de hojas de roseta. Lo anterior apoya el papel de CCD4 en la generación de una señal que afecta el desarrollo de la hoja.

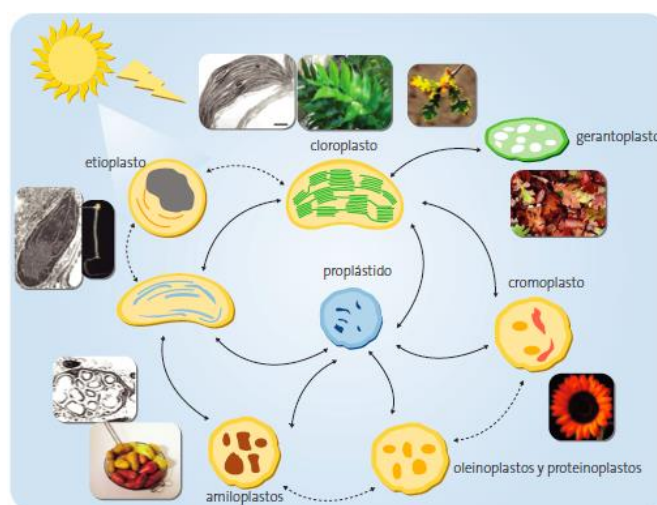
# Abstract

Chloroplasts are semiautonomous organelles which differentiate from proplastids. These organelles communicate their metabolic and biogenic status to the nucleus through a retrograde signaling mechanism that allows proper coordination of nuclear and plastid gene expression. Retrograde signals might be present during chloroplast development (biogenic signaling) or in functional mature chloroplasts (operational signaling). It has been shown that carotenes are precursors of molecules with signaling and sensory activity. Such molecules are the result of carotene oxidation by reactive oxygen species (RES) or enzyme catalysis by the Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCDs) family. One of these signals has been named Apocarotenoid Derived Signal 1 (ACS1) and was described in the *clb5* mutant. Such a signal is involved in leaf development. It has been demonstrated that CCD4 plays a central role in ACS1 biogenesis, so it is important to understand the underlying mechanism in which CCD4 is involved. To understand if, during plant development, there is an apocarotenoid signal generated by CCD4 capable of impacting leaf development, we used GUS staining to study the expression pattern of *CCD4* gene and made a comparison with that of carotenogenic pathway genes in several growing states. Furthermore, we carried out a morphological characterization of plants with altered endogenous levels of CCD4 in comparison to wild type Col-0, by phenotyping the *ccd4* mutant and overexpressor *CCD4* lines. This thesis shows that *CCD4* has a characteristic expression pattern, different from several carotenogenic pathway genes. In addition, accumulation of *CCD4* transcript is different to the CCD4 enzyme accumulation in flower organs. We also found the *ccd4* mutant has rounder leaves than Col-0. Interestingly, overexpression of *CCD4* results in morphological defects in cotyledons and leaves, supporting the role of CCD4 in generating an apocarotenoid signal capable of affecting leaf development.



# Introducción

En los eucariontes fotosintéticos como las plantas, la fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos, que son un tipo de plástidos presentes en los tejidos verdes, y representa la fuente principal de azúcares para la planta (López-Juez y Hills 2011). Los plástidos son organelos semiautónomos en los que se lleva a cabo la síntesis de metabolitos y cumplen también con funciones regulatorias. Comúnmente se clasifican de acuerdo con sus pigmentos en: cloroplastos, leucoplastos y cromoplastos, o a su función en: amiloplastos u oleinoplastos. Los plástidos derivan de organelos no diferenciados, denominados proplástidos, en respuesta a señales ambientales y del desarrollo (Jarvis y López-Juez 2013; López-Juez y Pyke 2005). Todos los plástidos poseen una doble membrana y un genoma propio, que refleja su origen endosimbionte. Entre los plástidos más ampliamente estudiados se encuentran los cloroplastos, que se caracterizan por su forma de disco, un desarrollo característico del sistema interno de membranas y la presencia de clorofila, pigmento esencial para la fotosíntesis (Jarvis y López-Juez 2013; Keeling 2010). (Figura 1).



*Figura 1. Los diferentes plástidos se originan de proplástidos*

Los plástidos son organelos semiautónomos que poseen una doble membrana y un genoma propio. Los diferentes tipos de plástidos se suelen clasificar de acuerdo con los pigmentos que poseen y a su función. El cloroplasto presenta clorofila y en ellos se lleva a cabo la fotosíntesis (León y Guevara 2008).

El proceso de diferenciación y funcionamiento del cloroplasto depende de la expresión de alrededor de 3500 genes, tanto nucleares como plastídicos. En estos organelos, la mayor parte de los genes del genoma del plástido han sido transferidos al núcleo y se reconoce que

las primeras señales para su diferenciación y funcionamiento se originan del núcleo, en respuesta a señales específicas del tejido y medioambientales (Tanaka y Hanaoka 2013). Se sabe que el cloroplasto comunica su estatus metabólico y de desarrollo al núcleo por un mecanismo denominado “señalización retrógrada”, que permite coordinar la expresión de genes nucleares y plastídicos (Chan *et al.* 2016; Leister *et al.* 2017).

## *Señalización retrógrada*

La señalización retrógrada es un mecanismo de comunicación entre un organelo y el núcleo. Este mecanismo juega un papel central en la biogénesis y homeostasis operacional de los plástidos. En los últimos años se han descrito diversos factores involucrados en esta señalización, pero poco se sabe aún de su función e incluso de la naturaleza de muchos de estos. Constantemente se descubren nuevas señales involucradas en la señalización retrograda, lo que vuelve a esta un área de continuo estudio (Waters y Langdale 2009; Tanaka y Hanaoka 2013; Lepistö *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2016).

Muchas de las señales y vías retrógradas descritas están involucradas en el reajuste del estatus biogénico u operacional del organelo, y son originadas por modificaciones en la homeostasis del cloroplasto debido a alteraciones medioambientales o del desarrollo (Chan *et al.*, 2016). Existen muchos procesos en el cloroplasto que desencadenan regulaciones, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, de genes nucleares lo que requiere de múltiples señales con funciones discretas y complementarias. La respuesta a nivel celular a un estímulo es variable como resultado de que los cloroplastos pueden presentar diferentes estados fisiológicos. Tal heterogeneidad tiene como consecuencia que una fuente de estrés no cause una perturbación única, por lo que se generan diferentes señales que varían espacialmente y temporalmente (Lepistö *et al.*, 2012).

Actualmente se han clasificado a las señales retrógradas en dos grupos, aquellas que actúan durante el desarrollo del organelo (biogénicas) y aquellas que participan en los ajustes de la función del organelo (operacionales). A continuación, se describen los avances en el entendimiento de estas señales (Chan *et al.*, 2016).

### *Señalización retrógrada durante la biogénesis*

Las vías de señalización biogénica se han elucidado en parte por el descubrimiento de que la inhibición de la síntesis de carotenos, con el herbicida norflurazona, tiene como consecuencia el albinismo de la planta y también la represión de la expresión de genes nucleares asociados a la fotosíntesis (PhANGs, del inglés *Photosynthesis-associated Nuclear Genes*) tales como aquellos de la familia LHCb (del inglés *Light Harvesting Complex b*, complejo colector de luz). Tras la identificación de los mutantes *gun* (del inglés *genomes uncoupled* o genomas desacoplados), usando el herbicida norflurazona, se han identificado a algunos de los componentes de la señalización retrograda que participan durante la biogénesis del cloroplasto (Chan *et al.*, 2016).

De los seis mutantes *gun* descritas, cinco están relacionados con el metabolismo de tetrapirroles. Las mutantes *gun4* y *gun5* están afectadas en la biosíntesis de Mg-protoporfirina IX (Mg-ProtoIX), precursor de la clorofila. Se ha propuesto que Mg-ProtoIX (Figura 2) interacciona con proteínas de choque térmico 90 (HSP90, del inglés *Heat Shock 90*) y con el factor de transcripción nuclear hipocótilo elongado 5 (HY5, del inglés *Long Hypocotyl 5*) que regula a los PhANGs (Kindgren *et al.*, 2012). La Mg-ProtoIX también está relacionado con la señalización por luz, ya que interacciona con la proteína fosfatasa 5 asociada al fitocromo (PAPP5, del inglés *Phytochrome-Associated Protein Phosphatase 5*) (Adhikari *et al.*, 2011).

Tres de las mutantes *gun* (*gun2*, *gun3* y *gun6*) están afectadas en el metabolismo de porfirina (grupos hemo). Se ha propuesto también a la porfirina como la señal derivada de tetrapirroles de mayor importancia, pero el mecanismo preciso aún se desconoce (Figura 2, Chan *et al.*, 2016).



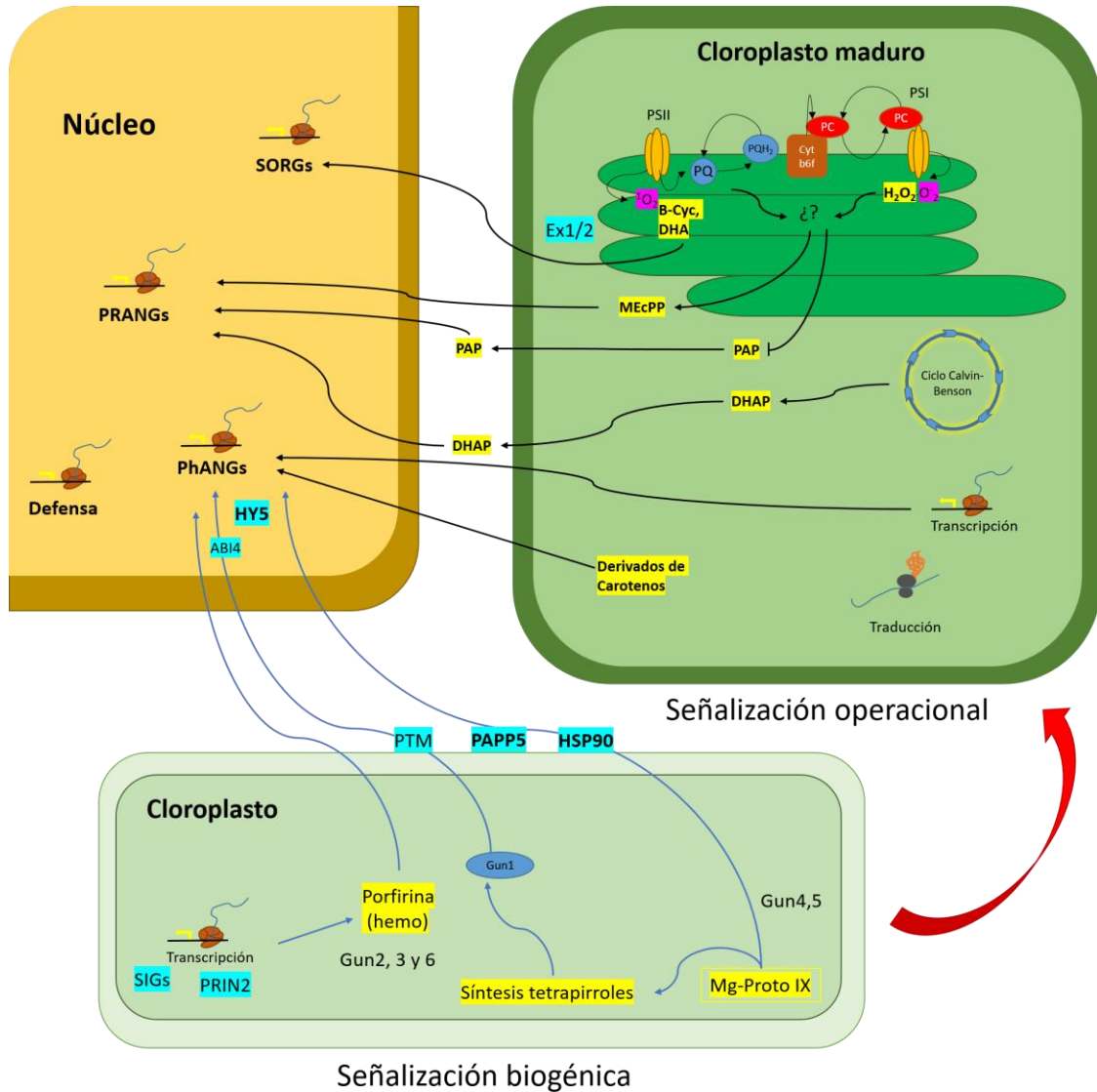


Figura 2. La señalización retrógrada tiene un papel muy importante en la biogénesis y homeostasis de los plástidos.

Las señales y vías descritas están involucradas en muchos procesos. Una sola fuente de estrés no implica una única perturbación ni un único desencadenador de señales. SORg: genes nucleares de respuesta a oxígeno singlete, PRANGs: genes nucleares de respuesta al estado redox del fotosistema, PhANGs: genes nucleares asociados a la fotosíntesis, SIGs: factores sigma del cloroplasto, PRIN2: factor de transcripción *insensible al estado redox plastídico 2*, Mg-Proto IX: Mg-protoporfirina IX, HY5: factor de transcripción *hipocótilo elongado 5*, GUN1-6: genomas desacoplados, HSP90: proteína de choque térmico 90, PAPP5: Proteína fosfatasa 5 asociada al fitocromo, PTM: factor de transcripción de tipo PHD con dominios transmembranales, ABI4: factor de transcripción *insensible a ácido abscísico 4*, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, PAP: 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato, MeCPP: metileritritol ciclodifosfato, β-cic: β-ciclocitral, DHA: dihidroactinidiolida, Ex1/2: proteínas executor, PQ: plastoquinona, PQH: plastoquinona reducida, Cyt b6f: citocromo b6f, PC: plastocianina, PI/II: fotosistema I/II (modificado de Chan *et al.*, 2016).

Finalmente, la última mutante *gun* caracterizada (*gun1*) presenta un fenotipo distintivo, ya que plantas *gun1* tratadas con norfluorazona o con el inhibidor de la traducción del plástido lincomicina, exhiben una desrepresión de la expresión de los PhANGs. GUN1 es una proteína perteneciente a la familia PPR (del inglés *Pentatricopeptide repeat*) y genéticamente está relacionada al complejo transcripcional del cloroplasto, formado por algunos componentes como PRIN2 (codificado en el plástido) así como por los factores sigma plásticos (SIGs, codificados en el núcleo). Por ello, existe una relación entre la transcripción y traducción del plástido en la regulación de los PhANGs. La producción de la señal en la que GUN1 está implicada también requiere del factor de transcripción insensible a ácido abscísico 4 (ABI4, del inglés *Abscisic Acid Insensitive 4*) que se une al promotor de *LHCb1.2* (*Light harvesting Complex b1.2*) (Koussevitzky *et al.*, 2007).

### *Señalización retrógrada operacional*

El principal fin durante la señalización retrógrada en el cloroplasto maduro, es la modulación y ajuste de su homeostasis en respuesta a cambios ambientales (Chan *et al.*, 2016). En este grupo de señalización retrógrada se han descrito a diversas vías y factores, pero aún no quedan claros diversos aspectos, tales como tráfico intracelular o mecanismo molecular de acción de las señales.

Una de las vías descritas involucra a las especies reactivas de oxígeno (EROs), generadas durante la fotosíntesis a causa de factores ambientales como: sequía y luz intensa. En el fotosistema II (PSII) se generan moléculas de  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  y  $^1O_2$ . Estas ERO son percibidas por mecanismos que aún no están claros y que alteran la expresión de genes nucleares asociados a redox (PRANGs, del inglés *Plastid Redox-associated Nuclear Genes*). Aún no se sabe si las mismas moléculas ERO pudieran actuar como señales *per se* o requieren de otros actores ya que, en general, la vida media asociada a estas especies es muy corta, a excepción de  $H_2O_2$  (Chi *et al.*, 2013; Kim y Apel 2013).

La producción de  $^1O_2$  conlleva al incremento de la expresión de genes de respuesta a  $^1O_2$  (SORGs, del inglés *Singlet Oxygen-responsive Genes*) y el incremento de esta ERO tiene como consecuencia la producción de compuestos volátiles derivados de  $\beta$ -carotenos, tales como el  $\beta$ -ciclocitral y dihidroactinidiolida (Ramel *et al.*, 2012; Sewelam *et al.*, 2014). El

mecanismo preciso por el cual estos compuestos actúan aún se desconoce. Otro factor involucrado en la señalización desencadenada por ERO son las proteínas *Executer* (Ex1 y Ex2), de localización plastídica, que están involucradas en la percepción y transducción de  $^1\text{O}_2$ , pero su relación con  $\beta$ -ciclocitral no está clara (Wagner *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007).

El estado redox de la cadena fotosintética de transporte de electrones coincide con los cambios de expresión de los PhANGs y PRANGs. La respuesta en el núcleo está mediada por diversos factores de transcripción como: ZAT10 (Rossel *et al.*, 2007), Rap2.4 a (Hiltscher *et al.*, 2014) y proteínas de choque térmico (Jung, *et al.*, 2013). Esta respuesta también incluye a la cinasa dependiente de ciclina E1 (CDK-E1), que forma parte de complejo mediador CDK-E1 y que también regula a PhANGs como el *LHCb1* (Blanco *et al.*, 2014).

También se ha descrito al compuesto metileritritol-ciclodifosfato (MEcPP) como una señal retrograda, que controla la expresión de diversos genes nucleares de respuesta a estrés. El MEcPP es un intermediario de la vía MEP involucrado en la síntesis de isoprenoides plastídicos y parece estar involucrado en la respuesta a estrés oxidativo (Xiao *et al.*, 2012). La acumulación de MEcPP, como resultado de estrés oxidativo generado por heridas y luz intensa, conduce al incremento de la hidroxiperóxido liasa y resistencia al patógeno *Pseudomonas syringae*. Otra molécula señalizadora involucrada en la respuesta a perturbaciones desencadenadas por: ERO, estrés osmótico, daño en la membrana y tolerancia oxidativa, es la 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato (PAP) (Estavillo 2011, Rossel *et al.*, 2006, Wilson *et al.*, 2009). Se sabe que esta molécula se sintetiza en el cloroplasto y tiene un efecto en la expresión de diversos genes nucleares como son el factor transcripcional ZAP10 (del inglés *salt tolerance zinc finger*) y la ascorbato peroxidasa (APX2)

Se ha reportado que GUN1 también opera en plantas adultas, contribuyendo al control operacional del cloroplasto y controlando la acumulación de las proteínas ribosomales S1 (PRPS1). Así mismo, GUN1 interacciona con enzimas involucradas en la biosíntesis de tetrapirroles, particularmente con la subunidad D de la Mg-quelataza (CHLD); más aún, la asociación de PRPS1 y CHLD con complejos proteicos es modulada por GUN1, por lo que la señalización retrograda podría requerir la formación de complejos proteicos dependientes de GUN1 (Tadini *et al.*, 2016).

## *Síntesis de isoprenoides*

El cloroplasto, al igual que otros tipos de plástidos, también está involucrado en la biosíntesis de metabolitos de gran importancia para la planta, tales como: aminoácidos, lípidos, hormonas, vitaminas e isoprenoides (Staehein y Newcomb 2001; Walter *et al.*, 2010). Dentro del grupo de los isoprenoides se encuentran los carotenoides, que son los pigmentos naturales más abundantes. Los carotenoides cumplen funciones esenciales como pigmentos accesorios del aparato fotosintético y son fotoprotectores (Nisar 2015). Los carotenoides también son precursores de hormonas, como el ácido abscísico (ABA) y las estrigolactonas, así como de moléculas señalizadoras y sensores, generadas tras su oxidación por ERO, las cuales funcionan como señales retrógradas y que se describieron anteriormente.

Los carotenoides son sintetizados en todos los tipos de plástidos, pero se acumulan más en la membrana del tilacoide de los cloroplastos y en los cromoplastos. Los carotenoides se clasifican en dos grandes grupos: los carotenos y las xantofilas (Howitt y Pogson 2006). Todos los carotenoides se sintetizan a partir de la condensación y modificación de dos unidades básicas de 5 carbonos, el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalil difosfato (DMAPP) lo que da lugar al compuesto geranyl-geranyl difosfato (GGPP, C-20); precursor de los carotenos (Figura 3). La síntesis de los precursores IPP y DMAPP en la célula vegetal se lleva a cabo por dos vías independientes, localizadas en diferentes compartimentos. La vía del ácido mevalónico (MVA) se lleva a cabo en el citosol, mientras que en los plástidos tiene lugar la vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP, figura 3). La vía plastídica MEP es la responsable de la síntesis de los precursores de carotenos (Kirby 2009; Zhao 2013; Vranová 2013).

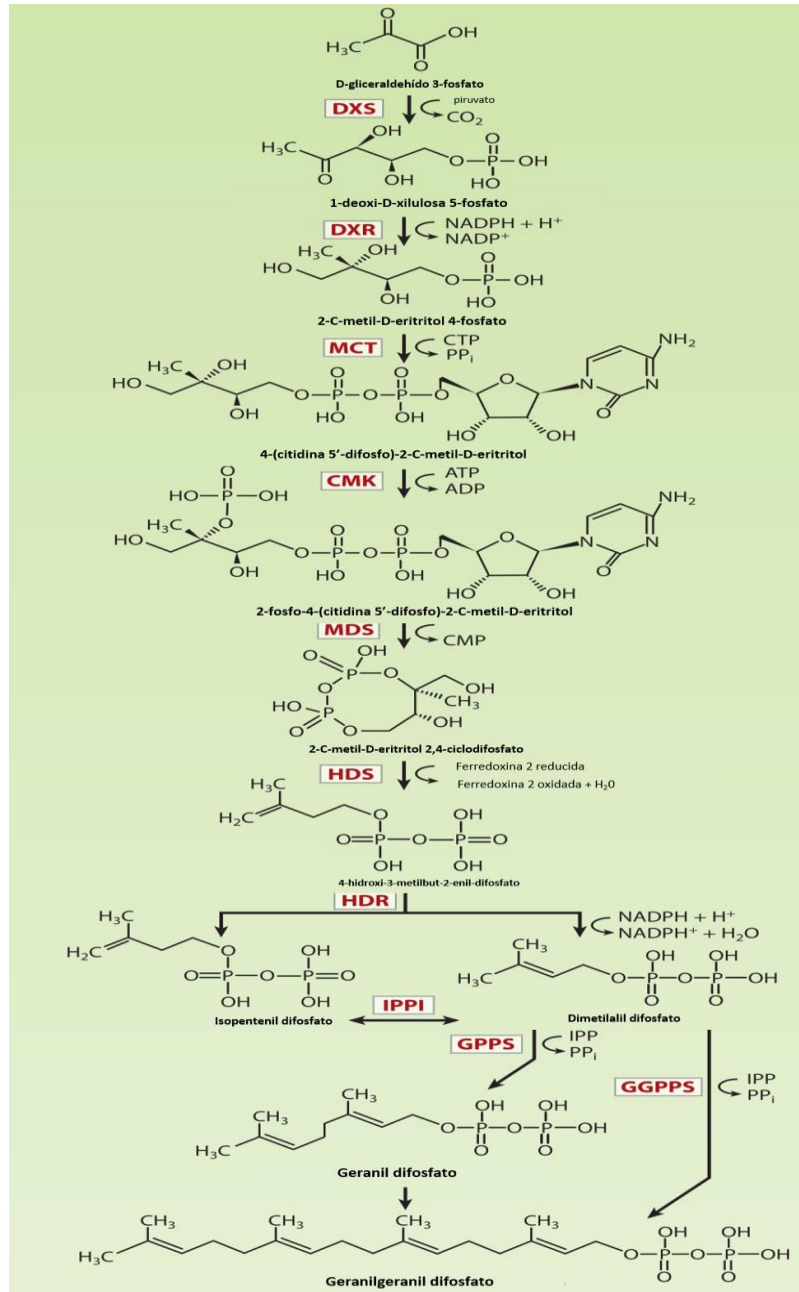


Figura 3. Vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), donde se sintetizan los precursores de muchas moléculas; entre ellas los carotenos.

Las enzimas que participan en esta vía están codificadas por genes nucleares de copia única en *A. thaliana*, con excepción de DXS (de la cual hay 3 copias). La primera reacción, catalizada por la enzima DXP sintasa (DXS), involucra la condensación de gliceraldehído-3-fosfato con piruvato produciendo 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP). Posteriormente DXP experimenta una reducción y rearrreglo intramolecular catalizado por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR), produciendo 2-C-metil-D-eritritol (MEP). El MEP es posteriormente convertido vía 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) y CDP-ME 2-fosfato (CDP-ME2P) en 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) por las enzimas MEP citidililtransferasa (MCT), CDP-ME kinasa (CMK) y ME-cPP sintasa (MDS) respectivamente. Finalmente, la enzima 4-hidroxi-2metilbut-2-enil difosfato (HMBPP) sintasa transforma al ME-cPP en HMBPP, mientras que en el último paso de la vía MEP la HMBPP reductasa convierte el HMBPP en una mezcla 5:1 de IPP y DMAPP. Los compuestos resultantes pueden ser isomerizados por la IPP isomerasa (IPPI) para

posteriormente usarse en la síntesis de geranil difosfato (por la geranil difosfato sintasa, GPPS) o geranil-geranil difosfato (por la enzima geranil-geranil difosfato sintasa GGPPS). Tomado y modificado de Vranová 2013.

### *Biosíntesis de carotenoides*

La biosíntesis de carotenoides, o carotenogénesis, inicia con la condensación de dos moléculas de geranil-geranil difosfato (GGPP, figura 3) por la acción de la enzima fitoeno sintasa (PSY), produciendo una molécula lineal de C-40, **15-*cis* fitoeno** (Figura 4). Esta primera reacción es también la reacción limitante de la vía (Ruiz-Sola *et al.*, 2012).

Comúnmente la enzima PSY emplea todo-*trans* GGPP como sustrato para producir **15-*cis*-fitoeno**. El gen *PSY* en *A. thaliana* se expresa prácticamente en todos los tejidos, aún en aquellos no fotosintéticos, y presenta altos índices de coexpresión con el resto de los genes de la vía. Se ha demostrado que PSY forma parte de un complejo de alto peso molecular, que también contiene a las enzimas IPP isomerasa (PPI) y GGPP sintasa (GGPPS). La existencia de dicho complejo pudiese significar la conducción de precursores isoprenoides, producidos en el estroma, a la ruta de síntesis de carotenos (Ruiz-Sola *et al.*, 2012).

En los pasos subsecuentes de la carotenogénesis ocurren una serie de cuatro reacciones de desaturación (deshidrogenación) y dos de isomerización. Las reacciones de desaturación transforman, secuencialmente, el fitoeno en: fitoflueno (7,8,11,12,7',8'-hexahidro- $\psi,\psi$ -caroteno),  $\zeta$ -caroteno (7,8,7',8'-tetrahidro- $\psi,\psi$ -caroteno), neurosporeno (7,8-dihidro- $\psi,\psi$ -caroteno) y licopeno ( $\psi,\psi$ -caroteno). Estas reacciones de desaturación son llevadas a cabo por dos enzimas relacionadas filogenéticamente: la fitoeno desaturasa (PDS) y la  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS) (Ruiz-Solá y Rodríguez-Concepción 2012; Nisar *et al.*, 2015).

Las reacciones de isomerización son catalizadas por las enzimas  $\zeta$ -caroteno isomerasa ( $\zeta$ -ISO) y caroteno isomerasa (CRTISO) respectivamente, y también son producidas por la luz, pero con más baja eficiencia (Figura 4). El todo-*trans*-licopeno es posteriormente ciclizado o hidroxilado para producir  $\alpha$ -carotenos o  $\beta$ -carotenos (Figura 4). La ciclización en uno o dos de los extremos de la cadena lineal del hidroxicarbono C-40 del todo-*trans*-licopeno, marca el punto de división de la vía en dos direcciones en las plantas, una de estas conduce a carotenoides con dos anillos  $\beta$  ( $\beta$ -caroteno y derivados  $\beta,\beta$ -xantofilas como la zeaxantina, violaxantina y neoxantina), y la otra conduce a la formación de carotenos con un anillo  $\beta$  y

otro  $\epsilon$  ( $\alpha$ -caroteno y derivados de  $\beta, \epsilon$ -xantofilas como la luteína) (Ruiz-Solá y Rodríguez-Concepción 2012).

En las plantas, existen dos tipos de licopeno ciclasas que catalizan la producción de anillos  $\epsilon$  y  $\beta$ . La  $\beta$ -ciclase (LCYB/CRTL-B) cataliza la formación de anillos  $\beta$  y la  $\epsilon$ -ciclase (LCYE/CRTL-E) la formación de anillos  $\epsilon$ . Los carotenos cíclicos pueden a su vez ser modificados mediante hidroxilaciones, generando xantofilas (Figura 4). En plantas, se han descrito dos tipos de caroteno hidroxilasas; las tipo-BCH, que catalizan la hidroxilación de anillos  $\beta$  y las enzimas citocromo P450, que catalizan la hidroxilación de anillos  $\beta$  y  $\epsilon$  (Ruiz-Solá y Rodríguez-Concepción 2012; Nisar *et al.*, 2015).

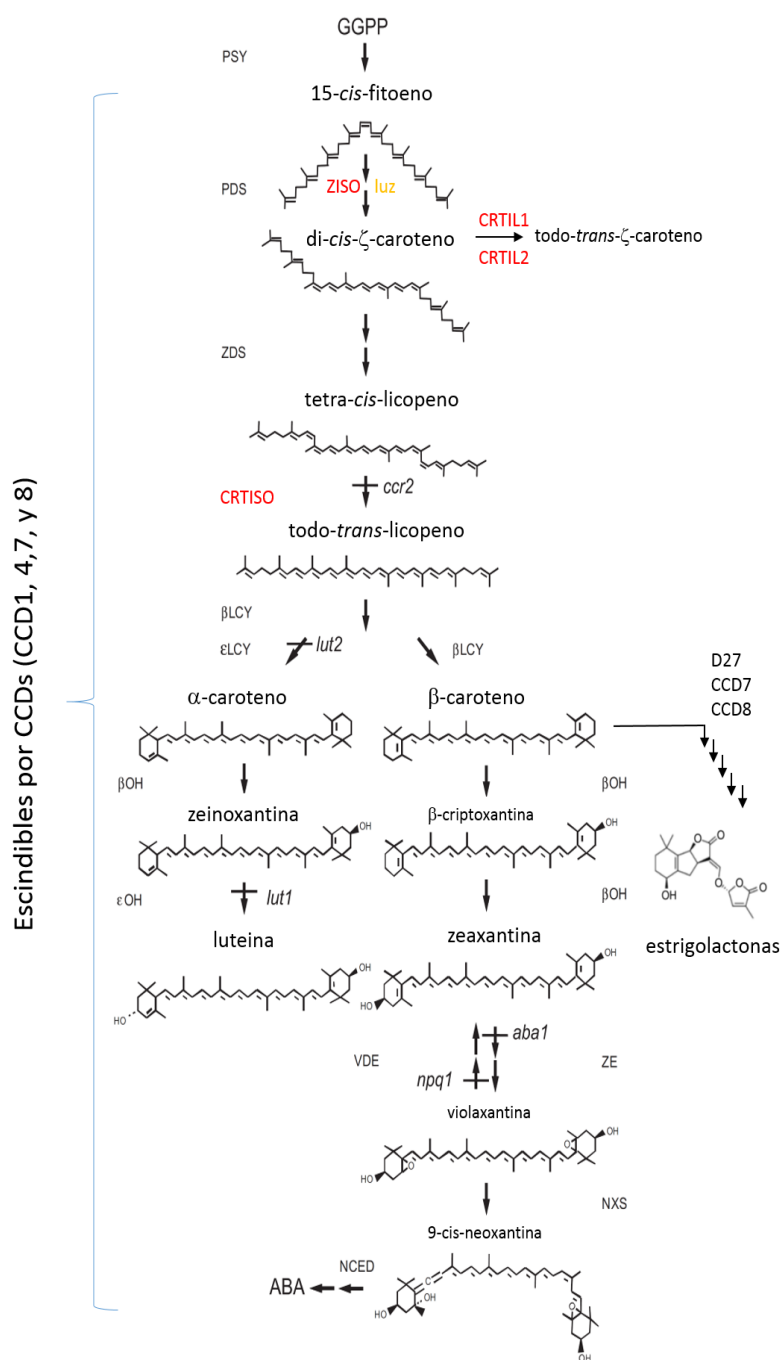


Figura 4. La biosíntesis de carotenos depende exclusivamente de los precursores sintetizados en la vía MEP.

La carotenogénesis inicia con la condensación de dos moléculas de GGDP por la acción de la enzima PSY. Modificado de Howitt y Pogson (2006) con información de McQuinn *et al.* (2015).

### Regulación de la biosíntesis de carotenoides

La carotenogénesis está regulada durante el ciclo de vida de la planta como resultado de diferentes requerimientos de estos y ante diferentes estímulos ambientales. Existen diversos puntos de control en la carotenogénesis, tanto en la entrada de metabolitos a la vía como en el flujo de estos dentro de la vía. En primera instancia, la biosíntesis de carotenos depende de la disponibilidad de los sustratos precursores generados de la vía MEP (IPP y



DMAPP). La sobreexpresión de la primera enzima de dicha vía (DXS) tiene como consecuencia un incremento en los niveles de carotenos, mientras que su silenciamiento conlleva a la reducción de carotenos hasta en un 13%. El segundo punto de regulación está dado por la enzima HDR (que cataliza la producción de IPP y DMAPP) y su sobreexpresión en algunas plantas también conduce a la acumulación de carotenos. De manera general, tras la activación de la vía MEP, se estimula la producción de carotenoides y la vía MEP es afectada por diversos factores bióticos y abióticos (Cazzonelli 2010; Hannoufa y Hossain 2012).

La actividad de la enzima PSY constituye otro punto de control importante en la carotenogénesis. La expresión del gen *PSY* responde a diversos factores como: los niveles de la hormona ABA, alta salinidad, sequía, baja temperatura y fotoperiodo; pero también existen diversas modificaciones postranscripcionales y postraduccionales que regulan su actividad. Se ha reportado que metabolitos carotenogénicos regulan negativamente a PSY y, por ende, el contenido total de carotenoides (Cazzonelli *et al.*, 2010; Toledo-Ortiz *et al.*, 2010; Arango *et al.*, 2014; Nisar *et al.*, 2015).

La carotenogénesis también puede ser regulada por el estatus redox a nivel de las enzimas caroteno desaturadas, ya que, tanto PDS como ZDS actúan como aceptores de electrones asociadas a la membrana que se unen a un cofactor dependiente del estado redox en un motivo de unión a flavina. Las quinonas actúan como aceptores de electrones para las reacciones de desaturación (llevadas a cabo por PDS y ZDS) y daños en la biosíntesis de plastoquinonas, o en el flujo de electrones en la membrana del tilacoide, resultan en plantas albinas que acumulan fitoeno (Norris *et al.*, 1998). Este punto de regulación resulta importante ya que une directamente a la fotosíntesis y la carotenogénesis

También se han reportado mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la isomerización de carotenoides, como es el caso de la metiltransferasa de histonas SET2; que modifica la metilación de histonas alrededor del promotor de la isomerasa CRTISO (Cazzonelli *et al.*, 2009). Otra forma de regulación de los niveles de carotenos es la existencia de isoformas tejido-específicas de enzimas y diversas hormonas, como es el caso de la enzima licopeno ciclasa (LCY- $\beta$  y LYC- $\epsilon$ ), ya que en algunas plantas existen LYC específicas de tejidos. La modulación de los niveles de LCY- $\beta$  o LYC- $\epsilon$  puede resultar en el

desvío del flujo hacia carotenos con anillos  $\beta$ - o  $\epsilon$ - (Hannoufa y Hossain 2012). La oxidación enzimática de carotenoides, vía peroxidasas/lipooxigenasas u oxidación fotoquímica no enzimática (en condiciones de estrés por luz intensa) también contribuyen a mantener la homeostasis de los carotenoides.

Otra forma de regulación, en la disponibilidad de metabolitos carotenogénicos, es la localización subcelular de dichos metabolitos. Se ha reportado la existencia de complejos multienzimáticos asociados a la membrana (metabolones) (Ruiz-Solá y Rodríguez-Concepción, 2012). Uno de dichos metabolones pudiese estar conformado por enzimas desaturasas y ciclasas de la vía de biosíntesis de carotenos, dicho complejo podría regular la disponibilidad de fitoeno para la síntesis de carotenos cíclicos y, así mismo, modular el flujo hacia carotenos con anillos  $\beta$ - o  $\epsilon$ . Se ha propuesto la existencia hipotética de cuatro metabolones: I) conformado por las enzimas IDI, GGDS y PSY, para sintetizar fitoeno a partir de IPP y DMAPP; II) conformado por las subunidades catalíticas PDS, Z-ISO, ZDS y CRTISO, para la síntesis de licopeno a partir de fitoeno y III) que consta de PDS, Z-ISO, ZDS, CRTISO y  $\beta$ -LCY, para la síntesis de  $\beta$ -caroteno a partir de fitoeno y IV) consiste en  $\beta$ -LCY,  $\epsilon$ -LCY y CYP79 hidroxilasas para mediar la síntesis de luteína a partir de licopeno (Ruiz-Solá y Rodríguez-Concepción, 2012; Nisar et al., 2015). Pero la existencia de estos complejos aún no ha sido demostrada de manera experimental y es un punto de interés en el área.

## *Apocarotenoides*

Las escisiones oxidativas de carotenoides dan lugar a apocarotenoides, sustancias con funciones de señalización y hormonales (Cazzonelli y Pogson, 2010; Walter *et al.*, 2010, Walter *et al.*, 2015). La primera reacción de escisión de apocarotenoides suele ser la limitante en la biogénesis de apocarotenoides específicos. Dichas reacciones son llevadas a cabo generalmente por una familia evolutivamente conservada de dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCD, *Carotenoid Cleavage Dioxygenase*), aunque los apocarotenoides también pueden ser generados por reacciones no enzimáticas inducidas por la luz (Prescott 1996).

Las CCDs pertenecen a una familia de dioxigenasas con Fe no hémico, que se encuentran ampliamente distribuidas en diversos *taxa* (Siu *et al.*, 2014). De manera general, las enzimas

capaces de activar moléculas de O<sub>2</sub> se dividen en oxidasas (las cuales usan oxígeno como oxidante y reducen el O<sub>2</sub> a peróxido de hidrógeno o agua) y las oxigenasas (capaces de incorporar átomos de oxígeno de la molécula de O<sub>2</sub> en los productos). Las monooxigenasas catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno en el producto; mientras que las dioxigenasas incorporan los dos átomos de oxígeno en el producto (Bugg, 2003). La estructura general de las CCDs consiste en un esqueleto de 7 hojas-β y α-hélice alternadas (Figura 5). La similitud a nivel de secuencia de las diferentes CCDs es baja, pero todas conservan cuatro residuos de histidina del sitio activo (Figura suplementaria 1, Walter *et al.*, 2015).

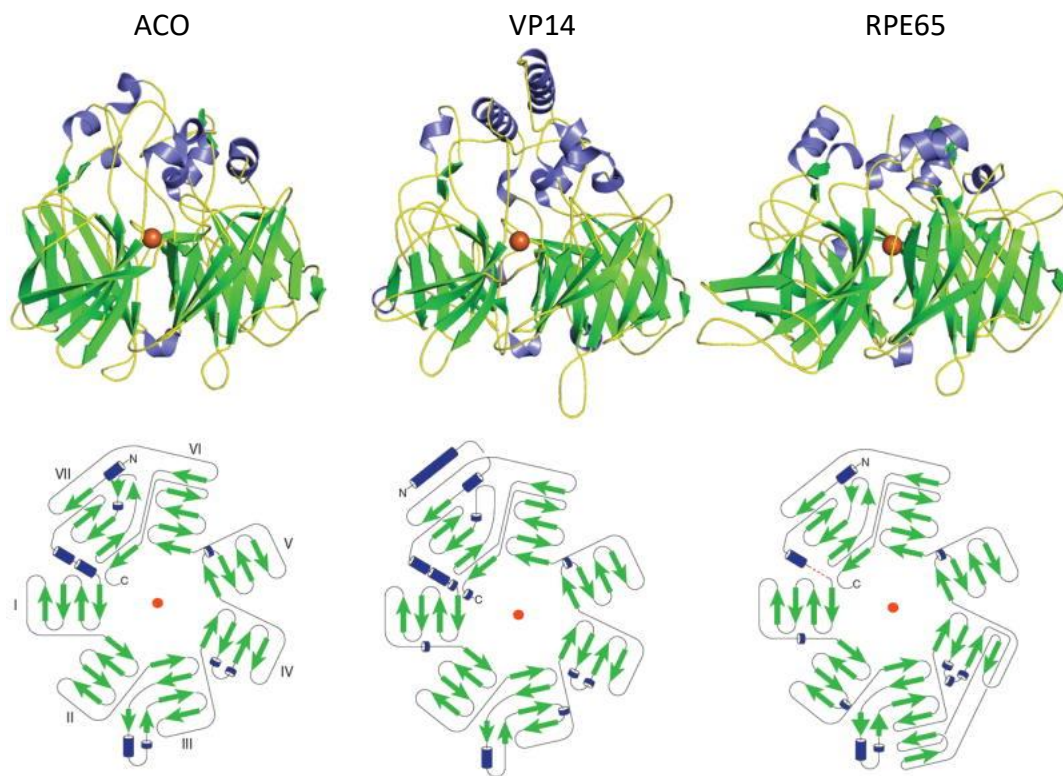


Figura 5. Estructura general de las CCDs

Las estructuras de CCDs inferidas por difracción de rayos X corresponden a 1) *Synechocystis* ACO (*Apocarotenoid oxygenase*), 2) VP14 de maíz y 3) RPE65 (*retinal pigment epithelium*) de bovino. La estructura general de las CCDs consiste en un esqueleto de 7 hojas-β hélice. El centro catalítico se muestra en naranja, las α-hélices y láminas-β se muestran en azul y verde, respectivamente (Sui *et al.*, 2014).

En plantas, las CCDs están representadas por una pequeña familia de genes, que en *A. thaliana* está compuesta de nueve miembros (Figura 6) (Huang *et al.*, 2009). Cinco de estos genes incluyen dioxigenasas de 9-*cis*-epoxicaroteno (*NCED*) y cuatro CCDs (*CCD1*, 4, 7 y 8).

Las enzimas CCDs generalmente son promiscuas, tomando como sustratos diversos carotenos ya sean lineales, unicíclicos o bicíclicos (Auldridge *et al.*, 2006; McQuinn *et al.*, 2015). Recientemente, a través del uso de inhibidores específicos para CCDs como el D15 (Sergeant *et al.* 2009), y haciendo uso de mutantes para las diferentes CCDs, se han empezado a entender el papel que algunos apocarotenos tienen en el desarrollo de la planta (McQuinn *et al.*, 2015).

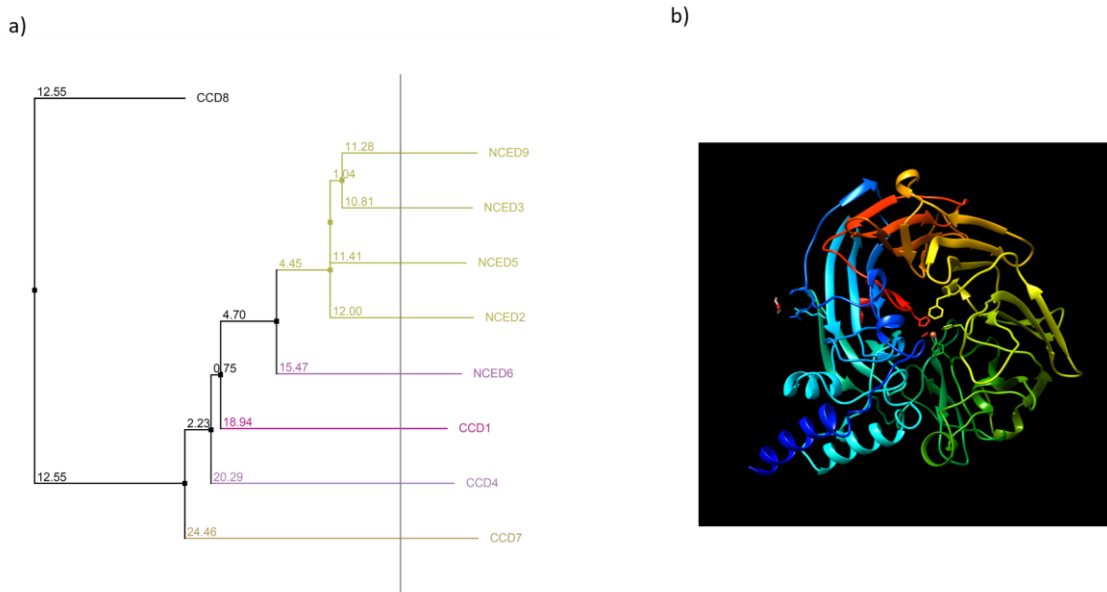


Figura 6. Las CCDs constituyen una pequeña familia de genes.

En *A. thaliana* está compuesta de nueve miembros. Cinco incluyen a las dioxigenasas de 9-*cis*-epoxycaroteno (NCED), involucradas en la síntesis de ABA (NCED2, 3, 5, 6 y 9) y cuatro CCDs (*Carotenoid Cleavage Dioxygenase*: CCD1, 4, 7 y 8). El dendrograma **a**) relaciona a las CCDs por su similitud a nivel de secuencia y se generó a partir de un alineamiento múltiple obtenido por el algoritmo Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). **b**) Modelo de CCD4, donde se aprecian las 7 hojas  $\beta$ -hélice y el sitio catalítico en el centro generado mediante I-TASSER (Zhang 2008; Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015).

En el caso de plantas, las CCDs están codificadas en el núcleo, pero varias de ellas tienen una localización subcelular en los plástidos. Por ejemplo, en *A. thaliana* 8 de éstas se localizan en plástidos, a excepción de CCD1 que es citosólica (Simkin *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las 5 NCEDs están involucradas en la síntesis de la hormona ABA (NCED2, 3, 5, 6 y 9), involucrada en las respuestas a estrés de las plantas (Tan *et al.*, 2003). Por otro lado, CCD7 y CCD8 son requeridas para la síntesis de la fitohormona estrigolactona, que es una hormona relacionada con la inhibición de la ramificación de las raíces y tallos de plantas y

establecimiento de asociaciones simbióticas en la raíz (Walter *et al.*, 2015). Mutaciones en ambas CCDs tienen efectos en la ramificación de la planta (Auldrige *et al.*, 2006) y este fenotipo es restaurado tras la adición de estrigolactona (GR24) exógena. La actividad de las enzimas CCD7 y CCD8 durante la síntesis de estrigolactona es secuencial, lo que fue demostrado usando cepas de *E. coli* que acumulan todo-*trans*- $\beta$ -caroteno y confirmado por estudios *in vitro* (Alder *et al.*, 2012).

Por otro lado, las enzimas CCD1 y CCD4 se han implicado en la síntesis de apocarotenoides con funciones como sabores y aromas en diversas plantas, pero en *A. thaliana* esta función solo se ha demostrado para CCD1. La enzima CCD1 parece no ser específica y con actividad en los dobles enlaces C-9,10 y hasta el momento no se ha reportado un fenotipo evidente para mutantes *ccd1-1*, pero sus semillas presentan un incremento de 37% de carotenos en relación con la silvestre, principalmente de violaxantina y neoxantina (Auldrige *et al.*, 2006).

#### Dioxigenasa de escisión de carotenos 4 (CCD4)

Comparada con las otras enzimas CCDs de plantas, la enzima CCD4 es la dioxigenasa menos caracterizada, por lo que su papel aún no está claro. Se ha demostrado que CCD4 tiene localización plástica, sugiriendo su posible papel en la producción de volátiles. El primer miembro de la subfamilia CCD4 se identificó en *Chrysanthemum morifolium* y su actividad enzimática se ha reportado en *Crocus sativus*, *C. morifolium*, *A. thaliana*, *Rosa damascena* y *Malus doméstica*. La subfamilia CCD4 posee miembros sin intrones o bien con uno o dos intrones (Ahrazem *et al.*, 2010). Se ha reportado que CCD4 tiene como sustrato a  $\beta$ -carotenos y que controla la coloración en la hoja y vena media, así como en el epicarpo del durazno (Brandi *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2014). También se ha reportado su importancia en la pigmentación de algunos órganos de diversas plantas (Rubio-Moranga *et al.*, 2014). Además, mediante ensayos *in vitro*, se ha demostrado que CCD4 tiene actividad de escisión de los dobles enlaces C-7',8' de zeaxantina para generar  $\beta$ -criptoxantina (Ma *et al.*, 2013). En los cítricos, la escisión de  $\beta$ -criptoxantina vía CCD4 produce  $\beta$ -citrulina, responsable de la pigmentación característica de los frutos de los cítricos. (Rubio-Moranga *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha analizado la actividad enzimática de CCD4 del azafrán (*Crocus sativus*) (CsCCD4) a través de ensayos *in vivo* en *E. coli*, y se ha reportado que CCD4 tiene preferencia por  $\beta$ -caroteno como sustrato, aunque también se detectaron niveles de  $\beta$ -ciclocitral que es

producto de una actividad enzimática C-7,8 (7',8') a partir de algún otro tipo de caroteno. La sobreexpresión de CsCCD4 resulta en bajos niveles de luteína, neoxantina y violaxantina. Reportes indican que la expresión de CsCCD4 incrementa tras diversos tipos de estrés como heridas, estrés osmótico y por temperatura, lo que sugieren que los apocarotenoides generados por CsCCD4 pudieran tener una función importante para la respuesta adaptativa a diversos tipos de estrés en plantas (Fusciate *et al.*, 2014).

### *Funciones de apocarotenoides*

Como se ha descrito, los productos de la degradación de carotenoides tienen diversas funciones biológicas, algunas son específicas de ciertos tejidos como la raíz, donde son necesarios para el establecimiento de asociaciones simbióticas o interacción planta-insecto (para el caso de la hormona micorrizina). En otros casos, estas señales tienen efectos para el desarrollo general de la planta; por ejemplo, las hormonas ABA y estrigolactona. Sin embargo, para la mayoría de los apocarotenoides aún se desconocen sus funciones, muchas de las cuales pudieran involucrar señalización (Nisar *et al.*, 2015). Por ejemplo, y de manera interesante para este trabajo, estudios recientes apuntan a la existencia de moléculas derivadas de carotenos con funciones importantes en el desarrollo, tal es el caso del fenotipo que se observa en la mutante llamada *bypass1 (bps1)*, que presenta defectos en el desarrollo de los haces vasculares, raíces cortas y la interrupción del desarrollo del meristemo del brote (SAM). Dichos fenotipos son revertidos tras la inhibición de la biosíntesis de carotenos (Van Norman y Sieburth 2007). Otro caso es la mutante *Carotenoid chloroplast regulatory1 (ccr1)*, dicha mutante está afectada en una histona-metiltransferasa lo que tiene como consecuencia la metilación de histonas en el locus de la enzima caroteno isomerasa CRTISO, provocando bajos niveles de expresión de CRTISO y a su vez la disminución de la acumulación de luteína e incremento de los derivados de  $\beta$ -caroteno (Park *et al.*, 2002). La mutante *ccr1* presenta más hojas de roseta y caulinares comparado con la silvestre (Cazzonelli *et al.*, 2009). Estos fenotipos sugieren que señales provenientes de carotenos pudieran modular diversos aspectos del desarrollo de la planta.

También se ha propuesto la existencia de señales derivadas de carotenos involucradas en el desarrollo de raíces laterales, tras observarse que la inhibición de la síntesis de carotenos (ya sea empleando inhibidores como la norfluorazona (NF) o el hidrocloreto de

trimetilamina) se afecta el desarrollo de raíces laterales. El empleo de inhibidores de CCDs apunta a que dicha señal podría ser generada por alguna CCD específica de la raíz (Van Norman *et al.*, 2014).

Finalmente, se ha reportado recientemente que la oxidación de  $\beta$ -caroteno por  $^1\text{O}_2$  puede resultar en productos de cadena corta, designados colectivamente como especies electrófilas reactivas de carotenoides (RES), dichas moléculas son capaces de inducir la expresión de los genes SORGs ante un estrés por luz intensa y permitir la aclimatación de la planta (Havaux 2014).

Todos estos datos aportan evidencias importantes de que a partir de apocarotenos se generan señales que impactan diversos aspectos del desarrollo de las plantas y las respuestas a diversos tipos de estrés. Tal vez uno de los aspectos menos estudiados es el efecto de los apocarotenos en el desarrollo de estructuras foliares (hojas y flores); por lo que la identificación de dichas señales, y su modo de acción, resulta sin duda un aspecto novedoso en la biología del desarrollo de plantas.

### *Desarrollo de la hoja de A. thaliana*

Las hojas son los órganos donde se realiza la fotosíntesis y por ende son los órganos que contienen cloroplastos y donde se lleva a cabo la diferenciación de estos. Por lo tanto, no resulta del todo ilógico que el cloroplasto pueda ejercer un dialogo durante la diferenciación de este organelo a través de señalización retrógrada.

El desarrollo de la hoja es un proceso que ha sido ampliamente estudiado. Las hojas emergen a partir de pequeños grupos de células en los costados del meristemo apical del brote (SAM por sus siglas en inglés). La diferenciación celular en el primordio foliar comienza tan pronto como el primordio emerge, dando lugar a tipos celulares especializados propios de este órgano (Barkoulas *et al.*, 2007).

Los estudios de la hoja de *A. thaliana* han permitido identificar aspectos importantes del proceso de desarrollo, pero aún hay mecanismos sin elucidar. Es importante destacar que el desarrollo de hojas simples, como la de *A. thaliana*, difiere de las hojas compuestas y de las hojas de monocotiledóneas. Durante el desarrollo de la hoja se pueden identificar tres

eventos principales; I) inicio del primordio foliar, II) establecimiento de la polaridad abaxial/adaxial y III) desarrollo del meristemo marginal.

El establecimiento del primordio foliar se desencadena por una concentración máxima de auxinas a los costados del SAM dependiente del transportador de auxinas PIN-FORMED1 (PIN1). Dicho transportador se orienta hacia células vecinas con altas concentraciones de auxinas. La concentración máxima de auxinas es esencial para establecer la identidad de las células del primordio foliar (Bennett 2015).

### *I. Iniciación del primordio foliar*

El SAM se puede dividir en diferentes zonas, en la zona central las células se dividen a una tasa baja permaneciendo en un estado indiferenciado, y en la zona periférica se forman los primordios foliares (Sluis y Hake 2015). El SAM consta de tres capas; L1 (epidérmica), L2 (subepidérmica, túnica) y L3 (interna o corpus). En el SAM tienen lugar divisiones celulares en la zona central, aunque de forma lenta, lo que conduce al desplazamiento de las células pluripotentes hacia la periferia.

A medida que las células se alejan del SAM, pierden su capacidad pluripotente y adquieren un estado de división activa. La transición de un estado quiescente al proliferativo está controlada por señales móviles generadas por el factor de transcripción WUSCHEL (WUS) y los genes *CLAVATA* (*CLV1-CLV3*), que se expresan en la zona central del SAM (Figura 7. Kalve *et al.*, 2014; Mandel *et al.*, 2016). El mantenimiento del SAM requiere de factores clave como son los genes *KNOX* Clase I, (class I *knotted*-like homeobox, que incluyen a *SHOOT APICAL MERISTEMLESS (STM)*, *KNAT1*, *KNAT2*, *KNAT6*); quienes suprimen la biosíntesis de giberelinas y aumentan la de citocininas (Hake *et al.*, 2004; Kalve *et al.*, 2014).



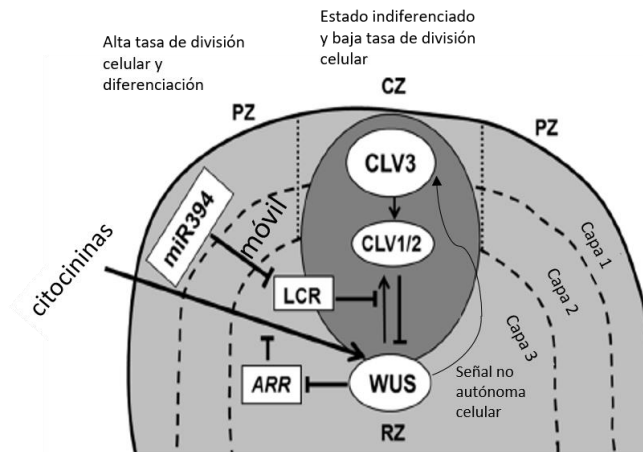


Figura 7. Mantenimiento de las células pluripotentes del SAM.

La transición de un estado quiescente a proliferativo está controlada por el factor de transcripción WUSCHEL (WUS) y los genes *CLAVATA* (*CLV1-CLV3*), que son expresados únicamente en la zona central del SAM. *CLV3* codifica a un ligando que es producido en la túnica y que se mueve al cuerpo (LCR), donde se une a los receptores *CLV1* (receptor cinasa LRR) y/o *CLV2* (proteína tipo receptor), esto desencadena la inhibición de la actividad de WUS, que es esencial para mantener el estado pluripotente. A su vez, WUS induce la producción de una señal que activa la expresión de *CLV3*. Así mismo, la acumulación de WUS es inhibida por un micro RNA (*mir394*) producido en las células que entran a división. La afectación de WUS provoca que las células pluripotentes del SAM se agoten y como consecuencia la desaparición de los meristemos. Zona Central (CZ), Zona Periférica (PZ). Tomado de Kalve *et al.* (2014).

Para que el primordio foliar emerja del SAM, se debe disminuir la expresión de los factores *KNOX I*, en este proceso están involucrados diversos factores de transcripción (Tsuyaka 2013). Se han descrito dos mecanismos generales para la especificación de los primordios foliares, como son la supresión mutua entre las proteínas con dominio MYB conocidas como ARPs (*ASYMMETRIC LEAVES 1* [AS1]/ *ROUGH SHEATH* [RS2]/ *PHANTASTICA* [PHAN]) y las proteínas *KNOX I*. Cada uno de estos factores funcionan como reguladores negativos de la expresión de manera recíproca (Figura 8, Barkoulas *et al.*, 2007).

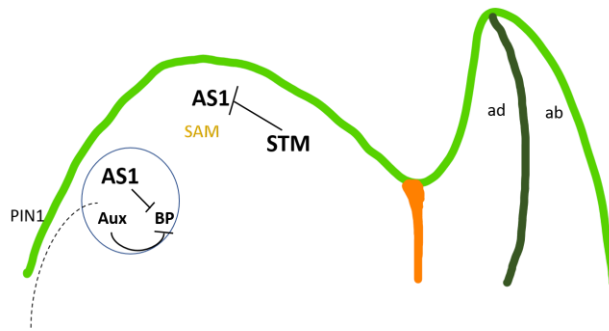


Figura 8. Especificación de los primordios foliares en los flancos del SAM.

Está dada por un mecanismo que involucra a la proteína AS1 con dominio MYB y las proteínas KNOX-I. En el primordio foliar AS1, junto con la hormona auxina, reprimen la expresión de la proteína KNOX-I, BREVIPEDICELLUS (BP); mientras que, en el SAM, el gen KNOX-I STM reprime la expresión de AS1, dicha represión está también mediada por cofactores como las proteínas LOB (LATERAL ORGAN BOUNDARIES) tipo AS2 (Barkoulas *et al.*, 2007).

## II. Establecimiento de la polaridad adaxial/abaxial

El establecimiento de los dominios adaxial y abaxial (Figura 9) es necesario para el crecimiento de la lámina. La falta de la identidad adaxial o abaxial tiene como consecuencia plantas con deformaciones en cotiledones y hojas (Figura 10). Los mecanismos de acción de los reguladores de la polaridad adaxial o abaxial son complejos y su actividad está altamente influenciada por señales fisiológicas en respuesta a cambios ambientales. Dichos reguladores son mayoritariamente factores de transcripción (Liu *et al.*, 2012).

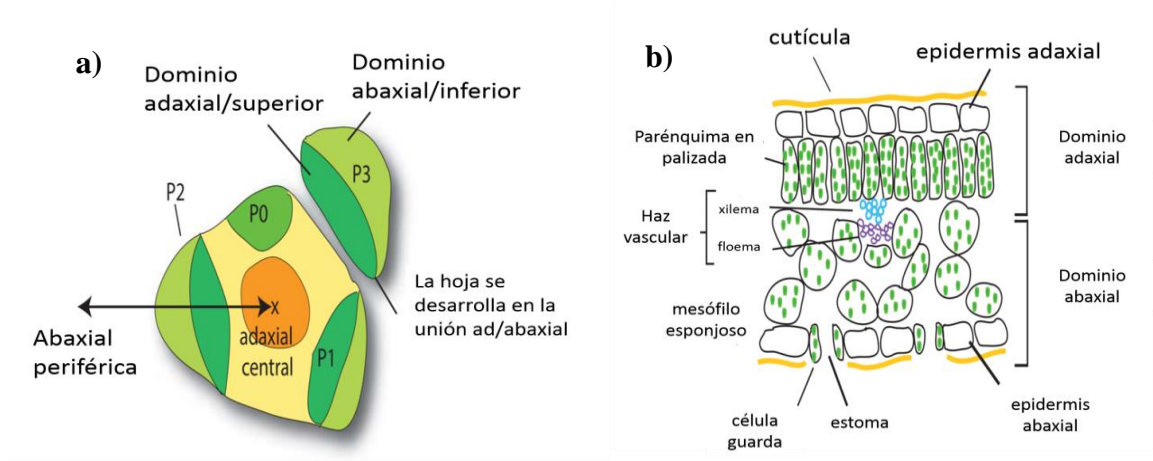


Figura 9. Anatomía del meristemo apical y sección transversal de la hoja.

El meristemo apical (a) consta de una zona central, donde se encuentran las células pluripotentes y una zona periférica, que da lugar a los primordios foliares. Los dominios ad/abaxial podrían considerarse subdominios (plastocron 0, P0) de la zona periférica. La anatomía ad/abaxial de la hoja (b), el dominio adaxial se especializa en la captura de luz, el dominio abaxial presenta un

arreglo de células menos compactas que facilita el intercambio gaseoso; modificado de Liu *et al.* (2012).

Los dominios adaxial y abaxial del primordio foliar se vuelven evidentes desde etapas tempranas del desarrollo. Mutaciones que conducen a la adaxialización tienen como consecuencia hojas dobladas hacia arriba, por el contrario, mutaciones que causan abaxialización presentan hojas con el efecto contrario (Liu *et al.*, 2012).

Se han identificado diversos factores de transcripción involucrados en el establecimiento de la polaridad adaxial/abaxial (Husbands *et al.*, 2009). Entre los genes necesarios para el establecimiento del dominio adaxial se encuentran los pertenecientes a la familia *HD-ZIP III* (Prigge *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012), además de los genes *AS1* y *AS2* que regulan positivamente a los *HD-ZIP III* y reprimen a los genes *YABBY*. Para el establecimiento del dominio abaxial se requiere de los genes *KANADI* (*KANADI1-4*, proteínas con dominio MYB de unión a DNA), los factores de respuesta a auxina *ARF3/ETT* y *ARF4*, así como los *YABBY/FILAMENTOUS FLOWER* (Barkoulas *et al.*, 2007).

La pérdida de función de algún gen *HD-ZIP III* tiene como consecuencia diversos grados de abaxialización, que en algunos casos resulta en hojas sin lámina con características abaxiales en su circunferencia, como es el caso de la triple mutante *rev phb phv* (figura 10). Los fenotipos menos drásticos presentan hojas en forma de trompeta o en casos aún menos afectados, las hojas presentan un doblez hacia abajo (Liu *et al.*, 2012).



Figura 10. Defectos morfológicos en hojas con diferentes grados de adaxialización.

Las plantas con actividad ectópica de los HD-ZIP III muestran diversos grados de adaxialización (A-C); por el contrario, aquellas con actividad HD-ZIP III reducida muestran diferentes grados de abaxialización (D-F). La triple mutante *phb phv rev* presenta dos cotiledones con abaxialización (G)

o ausencia de cotiledones y SAM (H). La mutante dominante de *phabulosa* presenta cotiledones extra con adaxialización (tomado de Liu *et al.*, 2012).

Por otro lado, la pérdida de función de genes *KANADI*, conduce a la adaxialización de la hoja con fenotipos similares a la ganancia de función de *HD-ZIP III*. Los factores *KANADI* son represores de la transcripción y entre sus blancos mejor descritos se encuentra el gen *ASYMMETRIC LEAVES 2*, que promueve la identidad adaxial de la hoja. Los *KANADI* se unen al correpresor *TOPLESS* (Causier *et al.*, 2012) y también interactúan físicamente con *ARF3* (Pekker *et al.*, 2005), aunque *KANADI* podría inhibir la transcripción mediante más de un mecanismo (Kelly *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). En el genoma de *A. thaliana* existen cuatro genes *KANADI* que actúan de manera redundante y los fenotipos más drásticos se observan en mutantes para tres o más de ellos.

Los mRNAs de *HD-ZIP III* y *KANADI* se acumulan en patrones complementarios; mientras que los mRNAs de los genes *HD-ZIP III* se acumulan en los dominios central y adaxial, así como en el sistema vascular, los mRNAs de *KANADI* se acumulan en el dominio abaxial de la hoja. Existe una asociación generalizada entre *HD-ZIP III* y su papel como promotor del crecimiento y la acción inhibitoria de *KANADI* (Figura 11).

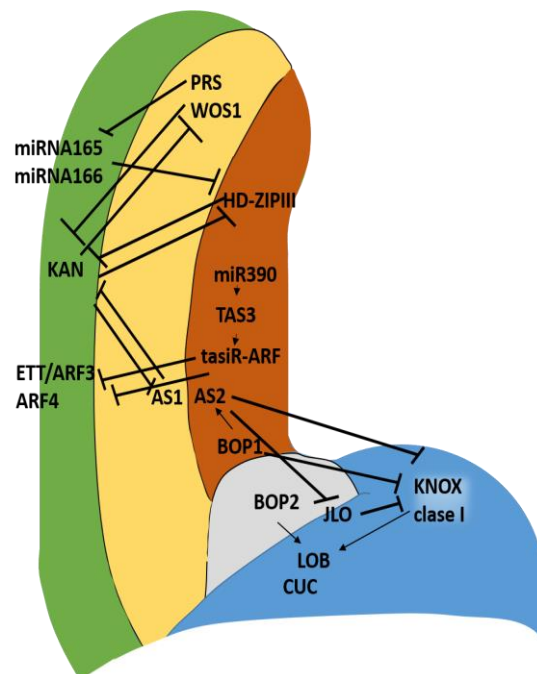


Figura 11. Vías génicas clave en el control del desarrollo de la hoja.

Se muestran las interacciones clásicas descritas en *A. thaliana* (modificado de Tsukaya 2013).

### *III. Desarrollo del meristemo marginal*

Posterior al establecimiento de la polaridad ad/abaxial, la proliferación celular en el primordio se acelera y las diferencias morfológicas entre el peciolo y la lámina se vuelven conspicuas. La porción apical del primordio foliar presenta células pequeñas no polarizadas con orientación oblicua, transversa y longitudinal en relación con el eje proximal-distal. La porción basal del primordio consta de células polarizadas longitudinalmente y dispuestas en paralelo con el eje proximal-distal. La zona de unión entre el peciolo y la lámina funciona como meristemo intercalar, ya que son fuentes de células para la construcción de la lámina foliar y el peciolo. Las células que dan lugar al peciolo experimentan división anticlinal, y las que dan lugar a la lámina foliar experimentan división aleatoria. No está claro en qué medida el meristemo marginal contribuye a la expansión de la lámina foliar; pero se ha propuesto que más bien es el meristemo laminar (localizado en la zona intermedia de la región adaxial/abaxial) el mayor contribuyente al crecimiento de la lámina (Andriankaja *et al.*, 2014; Barkoulas *et al.*, 2007; González *et al.*, 2015; White 2006).

### **Papel de las auxinas en el desarrollo de la hoja**

La auxina es una de las principales hormonas reguladoras del crecimiento en plantas y está involucrada en muchos aspectos del desarrollo. El ácido acético 3-indol es la forma más común en la que encontramos a la auxina en las plantas y es sintetizado a partir del aminoácido triptófano (vía dependiente de triptófano Trp-D-IAA) (Hagen *et al.*, 2007; Zhao 2010). De manera remarcable, el gradiente de concentración de las auxinas en los tejidos parece ser el factor más importante para influenciar la arquitectura de la planta y su desarrollo. Esto debido a que las células pueden presentar diferentes grados de sensibilidad a los tipos de auxina presente y, por ende, mostrar diferentes respuestas dependiendo de su contexto. Como consecuencia, en un gradiente de auxinas, las células adoptan diferentes programas de desarrollo (Vanneste y Friml 2012; Pierre-Jerome *et al.*, 2013; Calderón-Villalobos *et al.*, 2012).

La relevancia de las auxinas en el desarrollo de la hoja se ha evidenciado con la caracterización de mutantes para el transportador de auxinas PIN1 (*pin1*), en dichas mutantes la organogénesis en el SAM está comprometida y efectos similares presentan las

plantas tratadas con inhibidores del transporte de auxinas. El transportador PIN1 está involucrado en el establecimiento de una zona de concentración máxima de auxinas en el futuro primordio foliar, por lo tanto, los primordios foliares actúan como pozas para auxinas (Scapella *et al.*, 2010). Una vez establecido el máximo de auxina, la acción de dicha hormona en el inicio de la hoja probablemente está mediado por el gen MONOPTEROS (MP), que codifica un factor de transcripción miembro de la familia de los *AUXIN RESPONSE FACTORS* (ARF). Los mutantes *monopteros* muestran defectos similares a las mutantes *pin1* en el desarrollo de órganos.

La auxina también participa en el establecimiento del eje ad/abaxial junto con ARF3/4, que actúan junto a factores *KAN* para promover el destino abaxial en la hoja. Se ha demostrado que el establecimiento de una zona con niveles bajos de auxina, en el dominio adaxial del primordio foliar, contribuye al establecimiento del dominio adaxial (Qi *et al.*, 2014). Además de esto, las auxinas tienen un papel en el desarrollo de los haces vasculares (Baylis *et al.*, 2013). En resumen, el desarrollo foliar es sumamente complejo y depende de la participación de un número importante de factores que regulan, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. El establecimiento y diferenciación de las diferentes estructuras de las hojas. Este proceso es modulado también por aspectos medioambientales, no claramente entendidos.

# Antecedentes

Mutaciones involucradas en el funcionamiento y desarrollo del cloroplasto (López-Juez y Hills 2011) afectan la expresión de genes nucleares a lo que se le conoce como regulación retrógrada, muchos de dichos genes se requieren en el procesamiento de RNA, traducción y transporte de proteínas del organelo, así como de la biosíntesis de diversos metabolitos plastídicos como son los isoprenoides (Budziszewski 2001). Este tipo de mutantes han sido útiles para identificar genes importantes tanto en el proceso de desarrollo del cloroplasto como en la señalización retrógrada. En el trabajo de Gutiérrez-Nava *et al.* (2004) se identificaron diferentes genes nucleares necesarios para el desarrollo del cloroplasto, denominados *CHLOROPLAST BIOGENESIS (CLB 1-6)*. En las mutantes *clb* el desarrollo del cloroplasto está afectado y presentan niveles bajos de pigmentos en comparación con la planta silvestre (clorofila [2%] y  $\beta$ -carotenos [8%]), lo que resulta en plántulas albinas y una disminución en la expresión de múltiples genes nucleares y plastídicos. Con base en la expresión de genes nucleares y plastídicos (*rrn16S*, *rpl21* y *accD*, *RBCS*, *psbA*), se sabe que la interrupción en la progresión del desarrollo del cloroplasto en estas mutantes ocurre en estados de desarrollo tempranos específicos (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004).

Una de dichas mutantes, denominada *clb5*, resultó de especial interés debido a que el desarrollo del cloroplasto está detenido en etapas muy tempranas (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004). La caracterización molecular de dicha mutante demostró que su fenotipo es resultado de la falta de expresión del gen que codifica a la enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa (*ZDS*) (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014). Adicionalmente esta mutante, en comparación con las otras mutantes *clb*, presenta alteraciones en el desarrollo de sus hojas dando lugar a hojas aciculares sin diferenciación entre el pecíolo y la lámina, con una apariencia translúcida y alteraciones pronunciadas en su anatomía interna (Figura 12). El análisis de los patrones de expresión de genes marcadores del desarrollo de la hoja como *PHB* (expresión adaxial de la hoja) y *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, expresión abaxial de la hoja) demostró que la polaridad de la hoja, en *clb5* está comprometida (Figura 13). Así mismo, la expresión de múltiples genes nucleares y cloroplásticos importantes en la función del organelo está disminuida en comparación con otras de las mutantes albinas *clb*, aunque esta falta de expresión no es global (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014).

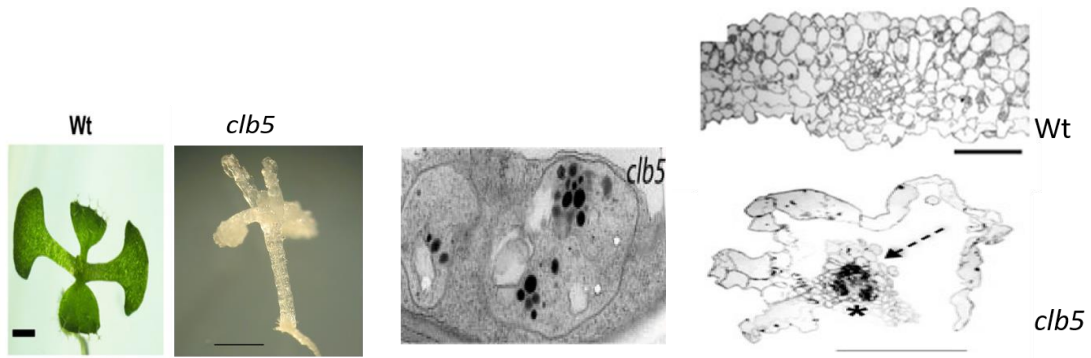


Figura 12. Fenotipo de la mutante *clb5*

La mutante *clb-5* presenta cloroplastos arrestados en etapas tempranas del desarrollo. Además, presenta hojas aciculares con apariencia traslúcida y alteraciones en su anatomía interna (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004).

En Avendaño-Vázquez *et al.* (2014), también se demostró que el fenotipo de *clb5* no es consecuencia de los bajos niveles de ABA o estrigolactonas (hormonas derivadas de los carotenos) resultante de la falta de carotenos, ni de la sobreacumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), sino por la acumulación de los pigmentos intermediarios fitoflueno y  $\zeta$ -caroteno como consecuencia de la ausencia de ZDS. Como se mencionó, los carotenos dan lugar a diversos apocarotenoides producidos por enzimas CCD. Mediante un análisis genético de dobles mutantes entre *clb5* y genes *CCD*, se encontró que la doble mutante *ccd4 clb5* presenta un fenotipo en la hoja más parecido al tipo silvestre y un restablecimiento en los niveles de expresión de diversos genes y proteínas. Esto apoya a que CCD4 juega un papel relevante en la generación de un apocarotenoide responsable del fenotipo en la mutante *clb5* (Figura 14).

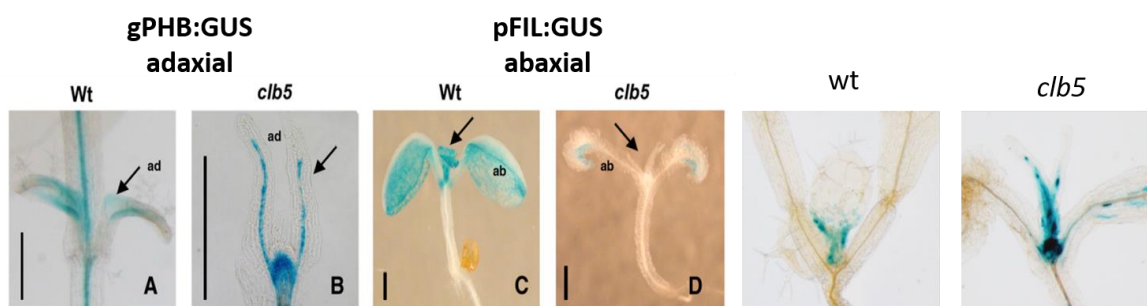


Figura 13. La polaridad de *clb5* está comprometida.

El uso de marcadores del desarrollo de la hoja ha demostrado que la polaridad de la hoja en *clb-5* está comprometida (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014).



Como se mencionó, CCD4 es una enzima plastídica y se ha reportado que está localizada en plastoglóbulos, que son estructuras suborganelares ovaladas o tubulares ricas en lípidos, que pueden estar en los cloroplastos ancladas a los tilacoides (Ytterberg *et al.*, 2006). Se sabe que CCD4 es capaz de degradar al  $\beta$ -caroteno en las posiciones 9,10 para dar lugar a la molécula  $\beta$ -ionona; sin embargo, esta actividad se ha detectado con proteínas recombinantes de varias especies de plantas, *E. coli* o *in vitro* (Huang *et al.*, 2009). Por lo que la capacidad de esta enzima para producir otros apocarotenoides, a partir de otros carotenos como sustratos, es aún desconocida.

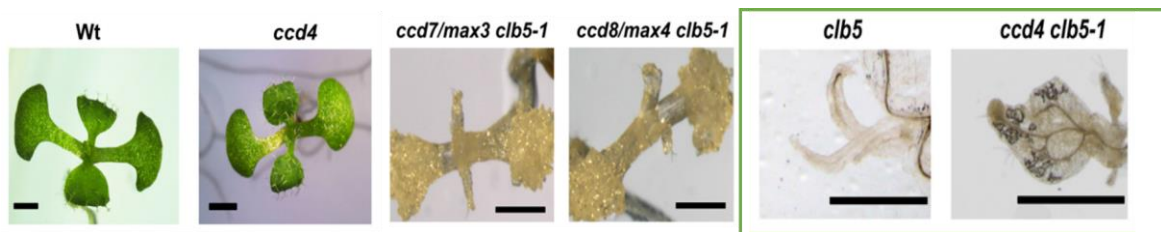


Figura 14. La doble mutante *clb5-ccd4* presenta una recuperación en la morfología de la hoja.

La generación de dobles mutantes *clb5 ccd4*, *clb-5 ccd7*, *clb-5 ccd8* demuestra que CCD4 está involucrada en el restablecimiento de la morfología de la hoja (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014).

# Hipótesis

Resulta muy interesante que en respuesta a la acumulación de ciertos carotenoides y su posterior procesamiento a través de CCD4, el desarrollo de la hoja en *clb5* se vea afectado, sugiriendo una regulación directa del cloroplasto en este proceso de desarrollo. Por lo tanto, entender los aspectos moleculares de esta regulación es importante. Los datos hasta ahora obtenidos demuestran que CCD4 juega un papel importante en dicho proceso y por lo tanto hipotetizamos que: durante el desarrollo de plantas silvestres existe un apocaroteno, producido mediante la participación de CCD4, que modula el desarrollo de la hoja.

## Objetivo General

Estudiar el patrón de expresión del gen *CCD4* y los fenotipos asociados a la alteración de sus niveles endógenos durante el desarrollo de *A. thaliana*.

## Objetivos específicos

- 1) Analizar el patrón de expresión del gen *CCD4* y la localización subcelular de la enzima CCD4.
- 2) Comparar el patrón de expresión del gen *CCD4* con el de los genes *PDS3* y *ZDS*, que codifican a enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenos.
- 3) Analizar el patrón de expresión del gen *CCD4* en plantas tratadas con inhibidores de la traducción del cloroplasto.
- 4) Llevar a cabo un análisis morfológico de la mutante *ccd4* durante el desarrollo de la hoja y en diferentes condiciones de crecimiento.
- 5) Generar líneas transgénicas que sobreexpresen el gen *CCD4*.
- 6) Analizar la morfología foliar de líneas sobreexpresoras del gen *CCD4*.

# Metodología

## *Material vegetal y condiciones de crecimiento*

Para generar las plantas transgénicas se utilizaron plantas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0).

### *Condiciones de crecimiento de A. thaliana Col-0 para generar plantas transgénicas*

Las semillas se germinaron en condiciones estériles *in vitro*, para lo cual se siguió un protocolo de desinfección y estratificación de la siguiente manera; las semillas se hidrataron por 10 min en H<sub>2</sub>O destilada estéril, después se deshidrataron con etanol absoluto por 2 min, seguido de 4 min en hipoclorito de sodio al 20% (considerando la concentración comercial de *Cloralex*<sup>®</sup> como el 100%) y finalmente se hicieron 4 lavados con H<sub>2</sub>O estéril. Las semillas desinfectadas se distribuyeron en medio de sales basales Murashige-Skoog 0.2 X suplementado con vitaminas (Gamborg *et al.* 1966) adicionado con 1% (w/v) de sacarosa, MES 0.05% (w/v) y solidificado con 0.8% (w/v) de agar (*Micropropagation agar type I*, Caisson), (GM 0.2X). Las semillas se estratificaron en la oscuridad a 4°C por tres días y se germinaron en una cámara de crecimiento a 90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  PPF (del inglés, Photosynthetic Photon Flux).

Para el crecimiento de plantas en tierra. Después de 12 días de crecimiento *in vitro* las plántulas se transfirieron a sustrato Metromix (Sun gro) suplementado con Osmocote (Classic 14-14-14, Everris) y se crecieron en condiciones de día largo (16 h luz: 8 h de oscuridad) a 90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  PPF y 22 °C. En el caso de plantas para transformar, una vez que la planta presentó frutos (silicuas), la primera inflorescencia (aproximadamente 25 días después de estratificación, DDE) se removió para estimular el crecimiento de inflorescencias laterales durante un periodo de 7 días previos a la transformación.

### *Condiciones de crecimiento de Nicotiana benthamiana*

Plantas de tabaco *N. benthamiana* silvestre se crecieron en sustrato Metromix (Sun gro), adicionado con Osmocote Cassic 14-14-14 (Everris). Las plantas se mantuvieron a 25 °C y se usaron las hojas de plantas adultas de seis semanas para ser infiltradas con *A. tumefaciens* y analizar la localización subcelular de CCD4.

## *Extracción de DNA genómico*

Para la extracción de DNA genómico, se utilizó el método *CTAB* con algunas modificaciones. El tejido vegetal se trituró con nitrógeno líquido, posteriormente se agregaron 300 µl de *buffer* *CTAB* 2X y se incubó a 65 °C por 30 min, se agregaron 300 µl de cloroformo, se mezcló con un vórtex y se centrifugó a 13000 rpm, posteriormente se transfirió el sobrenadante y se agregaron 300 µl de isopropanol frío. La muestra se centrifugó por 10 min a 12000 rpm y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%, la muestra se recentrifugó por 10 min y se dejó secar. Finalmente, la pastilla se disolvió en 50 µl de H<sub>2</sub>O grado biología molecular y se mezcló por inversión.

## *Elaboración de construcciones*

Para la elaboración de las construcciones se empleó el sistema de recombinación BP-LR de Gateway (Curtis y Grossniklaus 2003). Dicha tecnología de clonación está basada en el sistema de recombinación específica de sitio usado por el fago λ. En este sistema, el fago λ integra su DNA al cromosoma de *Escherichia coli*. Tanto el fago λ como *E. coli* poseen sitios de recombinación específicos, attP en el fago λ y attB en *E. coli*. El proceso de integración es reversible y ambos eventos son catalizados tanto por proteínas codificadas en el DNA del fago λ (Integrasa y Xis) como en el genoma de *E. coli* (Integration Host Factor, IHF). El sistema Gateway consiste en una versión *in vitro* de las reacciones de integración y escisión. Con el fin de que las reacciones de recombinación sean direccionales, se emplean dos sitios específicos diferentes; att1 y att2. Los sitios de recombinación se recombinan de manera muy específica uno con el otro; así, en una reacción BP, el sitio attB1 sólo se recombina con el sitio attP1, resultando en los sitios attL1 y attR1. Por otro lado, el sitio attB2 se recombina con el sitio attP2, resultando en el sitio attL2 y attR2. La misma especificidad ocurre en las reacciones LR.

Como primer paso se aislaron por PCR los fragmentos de interés usando una DNA polimerasa de alta fidelidad (KK2102, Kapa Biosystems). Para cada reacción de PCR se empleó DNA genómico en una reacción de volumen final de 50 µl. Cada tubo de reacción constó de 0.3 mM de cada dNTP, 0.3 µM de cada uno de los oligonucleótidos, 1 U de DNA polimerasa HIFI y 10 ng de DNA genómico. Las muestras se sometieron a los siguientes

ciclos en un termociclador (T100 BIO-RAD): 3 min a 95°C para desnaturalización global y 29 ciclos de 98°C 20 s para desnaturalizar, 60°C 15 s de alineamiento, 72°C 15-60 s/Kb de extensión y 72°C 5 min de extensión final. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 1%. Uno de los fragmentos correspondió a la región codificante (CDS, del inglés *coding sequence*) del gen *CCD4* sin el codón de paro (*CCD4* nStp), un segundo fragmento constó de la CDS y el codón de paro (*CCD4* Stp), un tercer fragmento consistió en la región intergénica 5' (denominada aquí *P<sub>CCD4</sub>*), que incluye las regiones regulatorias y la UTR 5'y finalmente un cuarto que incluía ambas regiones (*P<sub>CCD4</sub>::CCD4nStp*) sin el codón de paro. Cada uno de los fragmentos se aislaron a partir de DNA genómico de *A. thaliana* Col-0, usando oligonucleótidos específicos con los extremos 5' modificados para cada caso (Tabla 1, Figura 15). Posteriormente, los fragmentos se emplearon como templado para una segunda PCR con el par de oligonucleótidos attB1 y attB2, para generar el sitio de recombinación B de Gateway completo.

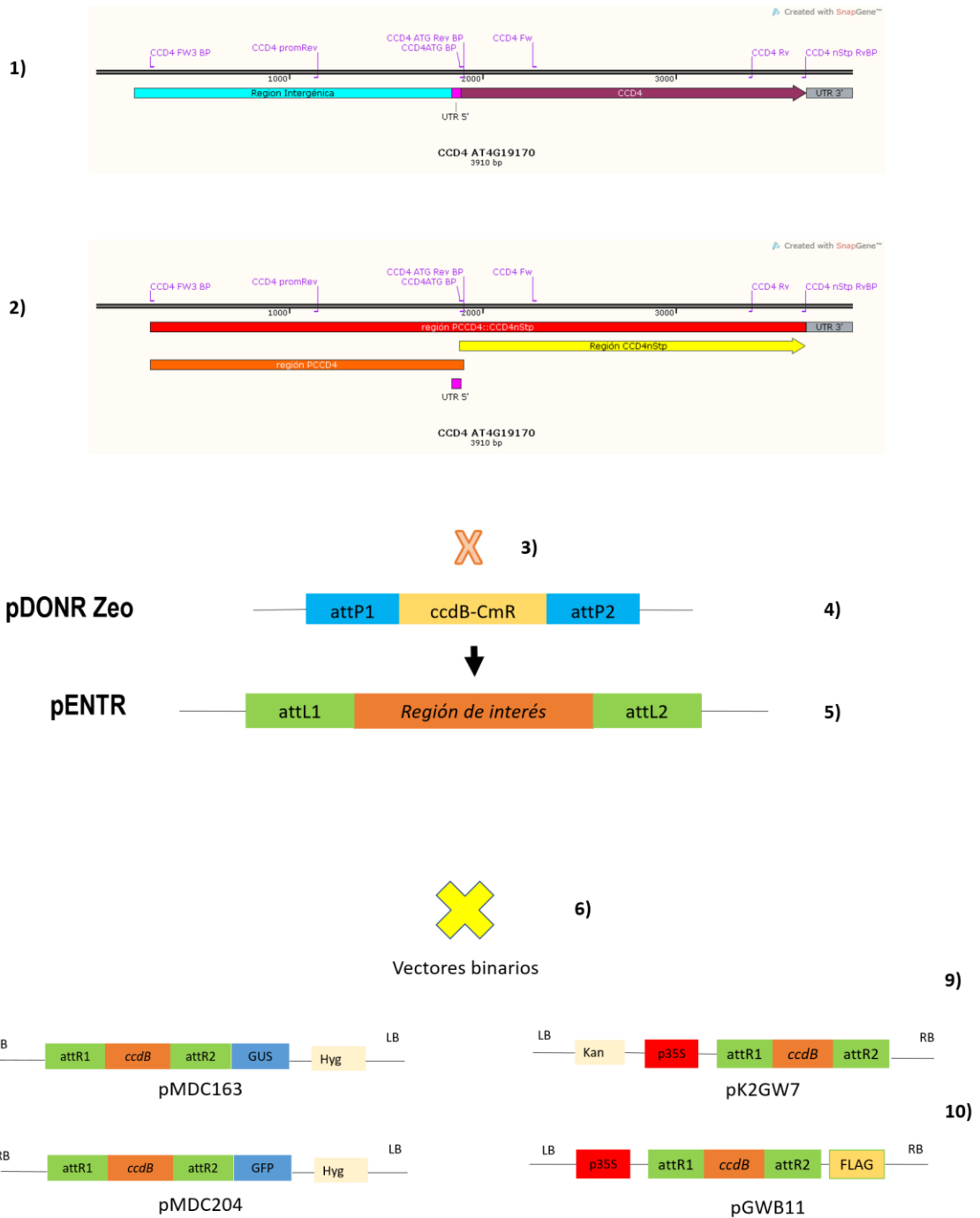


Figura 15. Diagrama para la generación de las construcciones mediante recombinación Gateway.

En primera instancia se generaron los sitios de recombinación (1-3) mediante PCR usando oligonucleótidos con el extremo 5' modificado. Posteriormente se recombinó el fragmento generado por PCR con el vector pDONRzeo (4) por una reacción BP. Los vectores pENTR con los fragmentos integrados se recombinaron (6) con los vectores binarios de expresión mediante una reacción LR. Se generaron construcciones con los genes reporteros GUS (7) y GFP (8), así como aquellos para sobreexpresar CCD4 (9 y 10).

Los fragmentos obtenidos por PCR se purificaron por un gel de agarosa 1% y posteriormente se extrajeron de la agarosa empleando un Kit de purificación (Gene JET Gel extraction Kit,

Thermo Scientific®). Posteriormente los fragmentos purificados se recombinaron con el vector de entrada pDONR zeo, mediante una reacción BP Gateway para generar las construcciones: pENTR- $P_{CCD4}$ , pENTR- $CCD4nStp$ , pENTR- $CCD4Stp$  y pENTR- $P_{CCD4}::CCD4nStp$  (Tabla suplementaria 1). Cada una de estas recombinaciones se usaron para transformar, por electroporación, a células de *E. coli* DH5- $\alpha$ . Las clonas se seleccionaron en medio LB con zeocina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la presencia del vector en las colonias obtenidas se confirmó por PCR (Tabla 1). Se seleccionó una clona positiva para la purificación del plásmido usando el kit de Roche (Roche®) para su posterior secuenciación y descartar cualquier tipo de mutación.

Las construcciones obtenidas en la recombinación BP se recombinaron con los vectores destino binarios; pK2GW7, que tiene el promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV) y nos permite tener expresión constitutiva; pMDC163, que contiene el CDS del gen *uidA* que codifica a la enzima  $\beta$ -glucoronidasa, para estudiar el patrón de expresión; con el mismo fin se usó el vector pMDC204, con la CDS del gen de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* GFP) y finalmente pGWB11, con el promotor 35S y un epítipo con el motivo DYKDDDDK (FLAG), para generar las construcciones:  $P_{35S}::CCD4Stp$ ,  $P_{CCD4}::GUS$ ,  $P_{CCD4}::GUS$ ,  $P_{CCD4}::GFP$ ,  $P_{CCD4}::GFP$  y  $P_{35S}::CCD4:FLAG$  (Figura 16). También se generó una construcción  $P_{ZDS}::ZDS:YFP$  en el vector pHGY, para la fusión de ZDS a la proteína amarilla fluorescente (YFP) a partir de la construcción pENTR- $P_{ZDS}::ZDS$ , que ya existía en el laboratorio (Figura 15). Las recombinaciones LR fueron introducidas en *E. coli* y cada una de las clonas se confirmaron por PCR. Cada uno de los vectores de expresión se secuenciaron para confirmar que no hubiese mutaciones usando los oligonucleótidos mostrados en la tabla 1.

*Tabla 1. Oligonucleótidos usados en este trabajo.*

Nombre	Secuencia
CCD4 FW3 BP	5' <b>AAA AAG CAG GCT TCC</b> TGA CAA GTG TAC TTG CTA AG 3'
CCD4 nStp RvBP	5' <b>AGA AAG CTG GGT TAA</b> GCT TAT TAA GGT CAC TTT CC 3'
CCD4 ATG BP	5' <b>AAA AAG CAG GCT TCG</b> GAG AGC AAT GGA CTC TGT T 3'
CCD4 ATG Rev BP	5' <b>AGA AAG CTG GGT TAA</b> CAG AGT CCA TTG CTC TCC 3'
CCD4 Stp Rv BP	5' <b>AGA AAG CTG GGT TTT</b> AAA GCT TAT TAA GGT CAC TTT CC 3'
HPTI I 5'	5' CTG AAA CCG AAC TGC C 3'
SPC1B2 RV	5'- CAG CAC CCA CCT ACA TCA CCA -3'
CCD4 ATG Rv	5' AACACAGTCCATTGCTCTCC 3
35S UP	5' CCA ACC ACG TCT TCA AAG CAA -3'
GUS 4R	5' ACC ATC AGC ACG TTA TCG AAT CC 3'
GFP Rv Bal	5' GTT CTT TTG CTT GTC GGC CAT G3'
CCD4 nStp Rv	5'-AAG CTT ATT AAG GTC ACT TTC CTT G-3'
CCD4 promRev	5' GTTCCACATTTGTGGGTGCTG 3'
CCD4 Fw	5'-ACA GAC TGT GAA ATC ATC CAC-3'
CCD4 Rv	5'- TCT CCT TTA GAC ACA TCA AGC-3'
CCD4 FW3	5' CTGACAAGTGTACTTGCTAAG 3'
ZDS-nstp-R	5' GAC CAG ACT TAG CTC ATC AGG AAC 3'
4870-R	5'- CGT GTC AAG GTT GCG AAT GTC-3'
4870 Exo11 F	5'- GGA GAT CCG TAT ATG CGA ATG-3'
4870F-ATG-GW	5'- CAC CAT GGC TTC AGT CGT CTT C-3'

## *Transformación de A. thaliana con Agrobacterium tumefaciens por infiltración de primordios florales*

Las construcciones en los vectores destino pMDC163, pMDC204, pK2GW7, pGWB11 y pHGY se usaron para transformar *A. tumefaciens* por electroporación. Las clonas se seleccionan en medio LB adicionado con los antibióticos apropiados para cada caso (Tabla suplementaria 1). Se empleó PCR usando los pares de oligonucleótidos mostrados en la tabla 1 para seleccionar una clona de cada construcción y establecer un preinóculo en 10 mL de LB líquido con Rifampicina 100 µg/ml+Ampicilina100 µg/ml+Antibiótico específico del vector (Tabla suplementaria 1). Tras 24 h de crecimiento a 30°C en agitación, se inocularon 800 mL de medio de cultivo LB con el preinóculo de cada construcción y los antibióticos apropiados, y los cultivos se incubaron a 30°C por 24 horas en agitación.

Para transformar a *A. thaliana* por infiltración se siguió el protocolo publicado con algunas modificaciones (Davis *et al.* 2009). Las plantas crecidas como se describió anteriormente, se prepararon 24 h antes de la infiltración eliminando las silicuas y flores presentes en cada



inflorescencia y dejando únicamente los botones florales no abiertos. Una vez que el cultivo de *A. tumefaciens* llegó a saturación, se centrifugó y la pastilla de células se resuspendió en 1L de medio de infiltración (ver receta en información suplementaria). Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ L de detergente Silwett L-77 (0.05%) y la solución de infiltración se colocó en una cámara de vacío donde la parte aérea de las plantas se sumergió en medio de infiltración y se sometieron a vacío a -50 MPa por 1 min. Transcurrido este tiempo se liberó el vacío rápidamente. Posteriormente para eliminar el exceso de medio de infiltración las plantas se sumergieron en agua y se colocaron horizontalmente en una cámara húmeda por 24 h en el cuarto de crecimiento con fotoperiodo (16:8 h luz: oscuridad con 90  $\mu$ mol/m<sup>2</sup> s PPF). Transcurridas 24 h las plantas se colocaron verticalmente y se mantuvieron en cuartos de crecimiento hasta la producción de semillas. Las semillas, se secaron y almacenaron a 12°C (Figura 16) (Emami *et al.*, 2013).

### *Selección de plantas transgénicas y obtención de plantas homocigotas*

Las plantas transgénicas de las construcciones: P<sub>35S</sub>::CCD4, P<sub>CCD4</sub>::GUS, P<sub>CCD4</sub>::GFP, P<sub>35S</sub>::CCD4:FLAG y P<sub>ZDS</sub>::ZDS:YFP correspondientes a la generación T1, fueron seleccionadas *in vitro* en medio GM 1X adicionado con los antibióticos higromicina 50  $\mu$ g/ml o kanamicina 50  $\mu$ g/ml dependiendo del vector del que se trate (Tabla suplementaria 1, Figura 16). Las plántulas resistentes (verdes) se trasplantaron al sustrato Metromix 200 (Sungro) adicionado con Osmocote (Classic 14-14-14, Everris) y se mantuvieron en cuartos de crecimiento hasta la obtención de semilla. Cada plántula resistente de la generación T1 corresponde a una línea independiente.

Las semillas colectadas de las plantas T1, que corresponden a la generación T2, se sembraron *in vitro* en presencia del antibiótico apropiado (Tabla suplementaria 1) para seleccionar plántulas resistentes y registrar el patrón de segregación de la resistencia que permitió inferir el número de copias del transgen en cada línea. Las líneas que presentaron una inserción del transgen, segregaron en una proporción de  $\frac{3}{4}$  de plantas resistentes y  $\frac{1}{4}$  sensible. Aquellas líneas con más de una inserción presentaron un patrón de segregación diferente. Para determinar si los patrones de segregación se ajustan a la segregación mendeliana para un locus 3:1 se realizó una prueba estadística de  $X^2$  usando la siguiente expresión.

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde  $O$  son el número de plantas en una categoría y  $E$  es el número de plantas esperadas en dicha categoría, los grados de libertad ( $df$ )= (número de clases -1),  $\alpha=0.01$ .

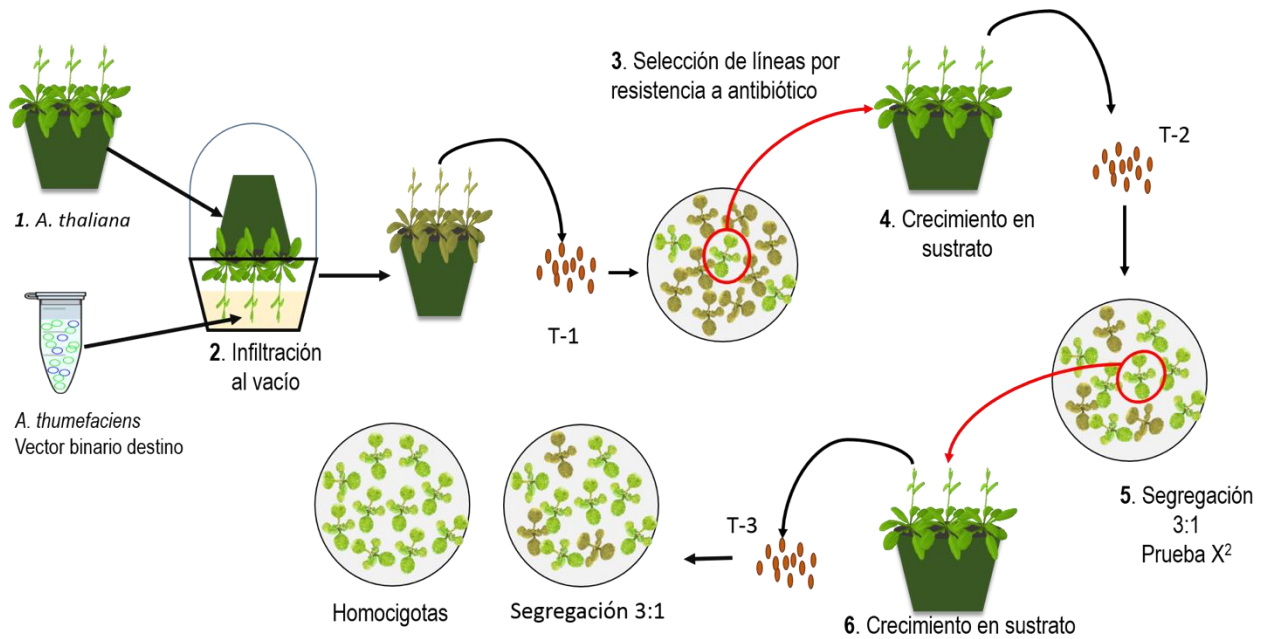


Figura 16. Esquema del proceso de transformación y generación de líneas transgénicas.

1) las plantas de 1 mes y medio se preparan para la transformación un día anterior 2) y son sumergidas en medio de infiltración con *A. tumefaciens* transformada con la construcción de interés, las plantas se dejan secar y las semillas correspondientes a la generación T1 se colectan y 3) se seleccionan las transgénicas por su resistencia a antibiótico, cada planta así seleccionada 4) corresponde a una línea cuya progenie (T2) es cultivada in vitro 5) para registrar el patrón de segregación, si corresponde a 3:1, se seleccionan plantas 6) para confirmar la segregación y obtener plantas homocigotas en la generación T3.

### Análisis del patrón de expresión del gen CCD4

La detección de la actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) se llevó a cabo a través de una tinción histoquímica usando ácido glucorónico 5-bromo-4-cloro-3-indolil (X-Gluc) de acuerdo con el protocolo publicado por Jefferson (1987). Las plántulas se sumergieron en una solución de tinción que contiene 1  $\mu\text{g/ml}$  de X-Gluc, 100 mM de buffer de fosfatos (pH7), 5 mM de ferrocianuro de potasio, 5 mM de ferricianuro de potasio, EDTA 500 mM y 1% tritón X-100 se aplicó un vacío a -50 MPa por 2 min y las plántulas se incubaron a 37°C por 5 horas.

Transcurridas las 5 horas de incubación se procedió a clarear los tejidos haciendo cambios de etanol al 70% hasta que se eliminó completamente los pigmentos. Por último, se removió el etanol y las plantas se conservaron en glicerol al 50%.

### *Tratamientos con inhibidores de la traducción del cloroplasto*

Para inhibir la traducción del cloroplasto, semillas de plantas silvestres (Col-0), la mutante *ccd4* y las líneas reporteras se germinaron in vitro en medio GM 1X suplementado con 300  $\mu\text{M}$  de lincomicina (Li) o 100  $\mu\text{M}$  de espectinomicina (Ep). El patrón de expresión de  $P_{\text{CCD4}}::\text{GUS}$  en inhibidores de la traducción se analizó en plántulas de 15 y 20 DDE, dicho patrón se comparó con el de PDS3 y ZDS.

### *Localización subcelular de la enzima CCD4*

Para estudiar la localización subcelular de CCD4 se empleó un sistema de expresión heteróloga transitorio en *N. benthamiana*, usando la construcción con la fusión traduccional  $P_{\text{CCD4}}::\text{CCD4}:\text{GFP}$ . Para ello se usó *A. thumefaciens* con las construcciones de la proteína verde fluorescente:  $P_{\text{CCD4}}::\text{CCD4}:\text{GFP}$ ,  $P_{35S}::\text{GFP}$  como control y la cepa auxiliar p19 (Circelli *et al.*, 2010). Los cultivos se inocularon en 50 ml de medio LB líquido y crecieron por 20 horas, el cultivo se centrifugó a 7,500 *g* por 10 minutos y las células se resuspendieron en 5 ml de 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Posteriormente se cuantificó la densidad óptica (DO) del cultivo a 600 nm y se mezcló, en una relación 1:1 de DO de las cepas  $P_{\text{CCD4}}::\text{CCD4}:\text{GFP}$  o  $P_{35S}::\text{GFP}$  con la cepa auxiliar p19, en un volumen de 5 ml de  $\text{MgCl}_2$ . A la mezcla se le agregó 5  $\mu\text{l}$  de acetosiringona y se incubó por 3 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se infiltró -con una jeringa- en el envés de las hojas de plantas de *N. benthamiana* de un mes de edad. La señal fluorescente de GFP se analizó después de 96 horas de la infiltración con un microscopio de epifluorescencia. Para el análisis de la localización subcelular se aislaron protoplastos de las hojas infiltradas. Las hojas se cortaron en trozos pequeños y se incubaron por 3 horas en una solución enzimática para la degradación de la pared celular (ver información de apoyo: solución enzimática) con una agitación a 40 rpm y en la oscuridad. Una vez pasado el tiempo de digestión los protoplastos se recuperaron en tubos cónicos de 15 ml y se observaron en un microscopio confocal Olympus FV1000.

## Caracterización fenotípica de la línea mutante *ccd4*

Con el fin de tener un análisis morfológico detallado de la línea mutante *ccd4* y contrastarla con la planta silvestre (Col-0), se procedió primeramente a corroborar la presencia de la mutación a través de una genotipificación usando los pares de oligonucleótidos SALK LBa1 *forward* ó SALK LBb1 *forward*, específicos para el T-DNA o CCD4, con el oligonucleótido *Reverse*, específico para *CCD4* (Figura 20). Una vez confirmada la inserción en la mutante, se llevó a cabo el análisis fenotípico tanto en estados tempranos de desarrollo *in vitro* como en plantas crecidas en sustrato. Para el análisis *in vitro*, las semillas se germinaron en la cámara de crecimiento en medio GM 1X (90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s PPF). Se registró el número de individuos en los estados de desarrollo 0.5 a 1.04 según la nomenclatura de Boyes *et al.* 2001 (Figura 17) hasta los 15 DDE.

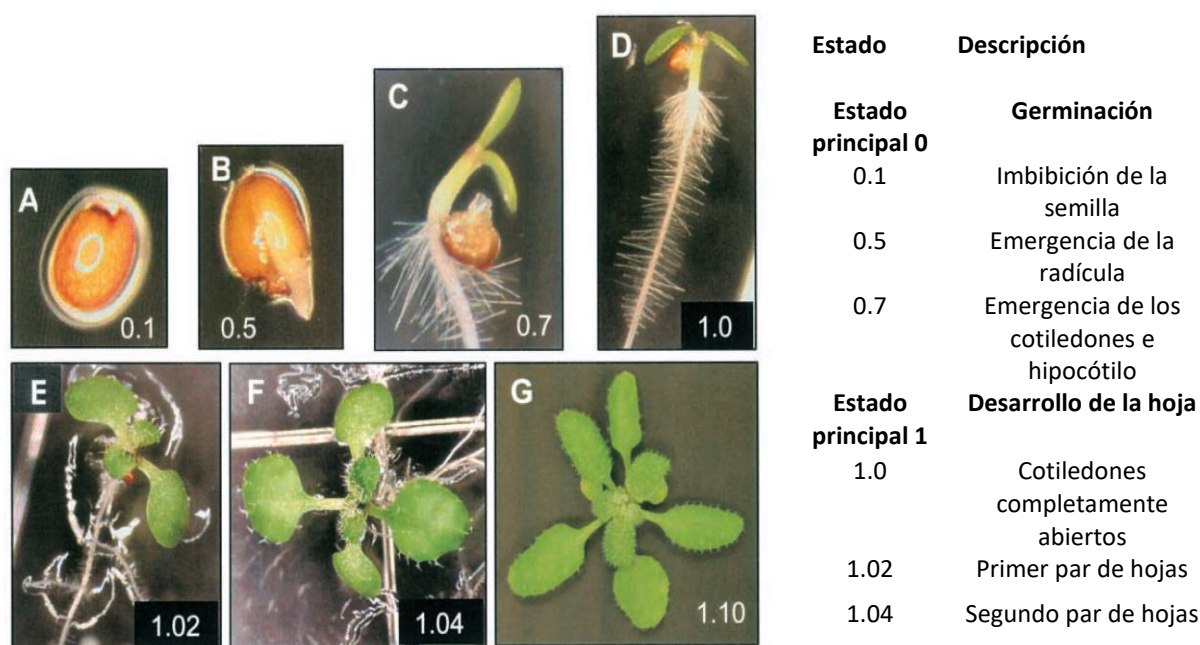


Figura 17. Nomenclatura empleada para la descripción de los estados del desarrollo de *A. thaliana* de acuerdo con Boyes *et al.* (2001).

Las plantas Col-0 y *ccd4* crecidas en sustrato, se trasplantaron a tierra después de 15 días de crecimiento *in vitro* se pusieron en macetas con sustrato *Metromix* (Sungro) adicionado con 25 g de *osmocote classic* 14-14-14 (Everris) y se crecieron a 70  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s<sup>1</sup>. Se comenzaron a analizar a partir del quinto día en sustrato, 20 días después de germinación. Se analizó un

<sup>1</sup> La cantidad de luz usada para la fenotipificación fue de 70  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s por ser esta la condición estándar del laboratorio, en un futuro se evaluarán diferentes cantidades de luz.

total de 32 plantas por genotipo (Col-0 y *ccd4*). El análisis consistió en medir la distancia entre los primeros pares de hojas cada dos días hasta el sexto par de hojas en el día 30. También se registraron los siguientes parámetros: el número de hojas, aparición del escapo, aparición de las primeras flores y frutos, área, perímetro y centroide, hasta los 42 DDE.

Para calcular el área, perímetro y centroide se tomaron fotos de las plantas cada dos días. Un aspecto importante para este análisis radica en resaltar los objetos de interés, en este caso las plantas, para ello cada imagen (matriz de píxeles) se procesó computacionalmente como se describe a continuación. Las imágenes RGB se calibraron y separaron en los tres canales (rojo, verde y azul), se tomó la matriz de píxeles del canal verde y se le restó la del canal rojo usando la siguiente operación,  $(i1-i2) k1+k2$ ; donde  $i1$ = matriz del canal verde,  $i2$ = matriz del canal rojo y  $k1=12$ ,  $k2=4$ ; estos valores se modificaron un poco dependiendo de la luz. Con la operación anterior los objetos en verde brillan más y los objetos que no forman parte de las plantas se eliminan casi en su totalidad. La imagen resultante debe tener un alto contraste entre las regiones de interés, correspondientes a las plantas y el contorno. El siguiente paso consiste en generar una imagen binaria, para ello se debe seleccionar un umbral adecuado entre 0-255 de intensidad de luz (*thresholding*), que nos permitiera mantener la mayor cantidad de objetos conectados pertenecientes a una plántula; se analizaron los diferentes algoritmos, tanto globales como locales implementados en FIJI (Schneider *et al.*, 2012; Schindelin *et al.*, 2012; 2015).

Una vez establecido el umbral para cada imagen se generó la imagen binaria, con valores de 0 para el fondo (negro) y 1 para aquellos que forman parte de las plantas (blanco), de esta manera todos los objetos blancos que constituyen a las plantas se pueden seleccionar usando la herramienta de selección *wand tool* en FIJI (Schneider *et al.*, 2012; Schindelin *et al.*, 2012; 2015) y de esta forma obtener parámetros morfológicos como son: el área, perímetro y circularidad. Con estos datos se generó una matriz de 61X72, donde las observaciones, o variables, se organizaron en las columnas.

La matriz constó de datos cuantitativos y binarios (presencia/ ausencia). Con esta matriz, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, ver Figura 18) así como un análisis de agrupamiento con distancias euclidianas. El PCA nos permitió evidenciar aquellas

variables que pudieren ser diferentes entre la mutante y la silvestre y que nos pudiesen indicar diferencias en el desarrollo. El análisis de *agrupamiento* nos permitió visualizar la cercanía entre los individuos y evidenciar la formación de grupos si tales existen.

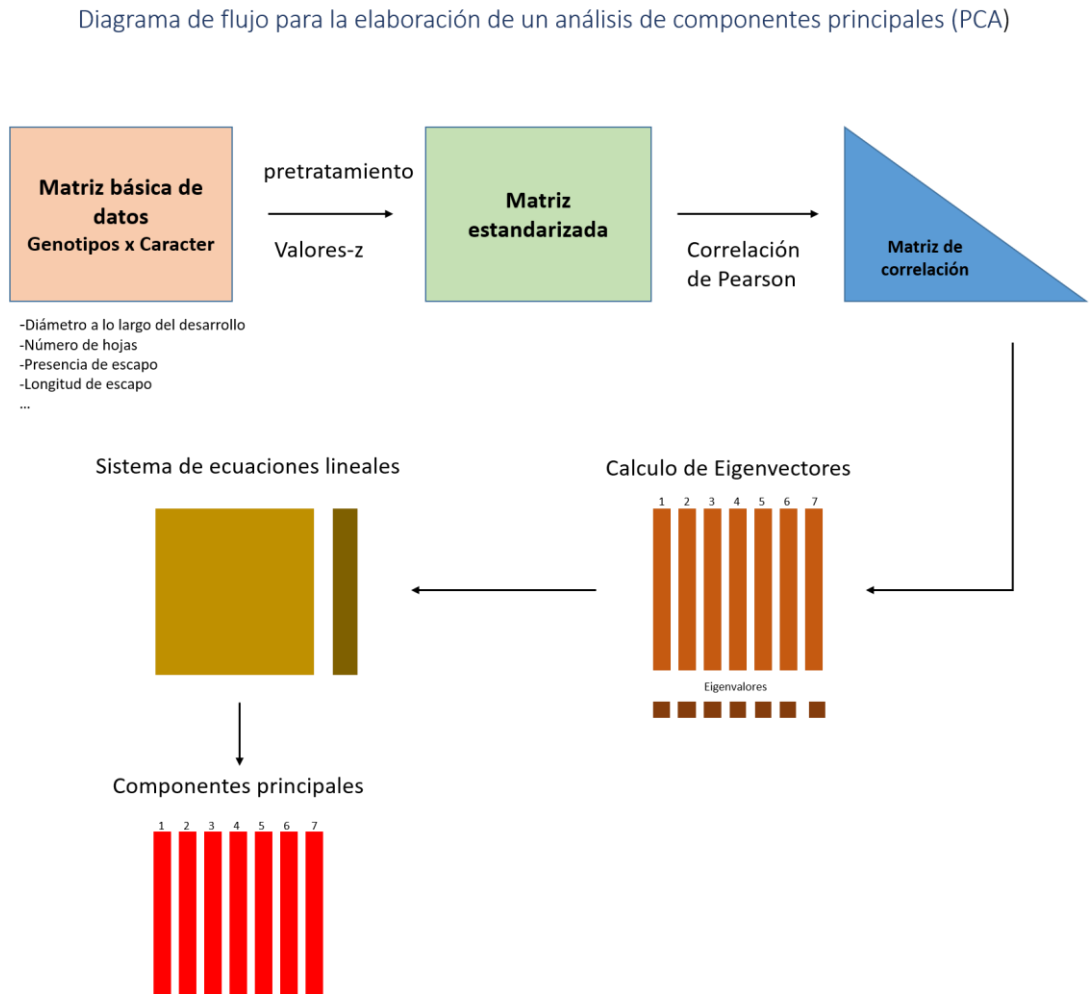


Figura 18. Diagrama para la elaboración de un análisis de componentes principales (PCA).

La matriz de datos es estandarizada para generar una matriz de valores z, posteriormente se genera una matriz de correlación (Abdi y Williams 2010).

### Análisis morfológico de la hoja

Para analizar los fenotipos de la hoja de la línea mutante *ccd4* con respecto a la silvestre Col-0, ambas se crecieron a  $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s PPF}$  en día largo. Las hojas de ambas plantas se colectaron a los 26 DDE, dado que en esta etapa las primeras hojas se encuentran completamente maduras mientras que las hojas jóvenes continúan expandiéndose (Boytes *et al.*, 2001). Una vez que las hojas se colectaron, éstas se colocaron entre láminas de acetato distribuidas horizontalmente en una línea y se digitalizaron con un escáner a 600

dpi. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software *FIJI* (Schneider *et al.*, 2012; Schindelin *et al.*, 2012; 2015). Para cada hoja se hicieron las siguientes mediciones; área (mm<sup>2</sup>), perímetro y circularidad.

### *Análisis de la senescencia de las hojas*

Como medida indirecta de la senescencia de la hoja se analizó el tono de verde de las mismas en plantas de *ccd4* y *Col-0*. Con este fin se generó la distribución de intensidades de grises en imágenes con 6 pares de hojas de roseta de plantas de 30 DES. Las imágenes RGB se procesaron con el software *FIJI* (Schneider *et al.*, 2012; Schindelin *et al.*, 2012; 2015) y se generaron histogramas de frecuencias en los canales R (rojo), G (verde) y B (azul) con el fin de explorar la distribución de píxeles en cada uno. El fondo blanco de la imagen se eliminó para descartar los picos correspondientes a valores altos de intensidad de luz que no formaban parte de las hojas obteniendo una imagen binaria de la original (valores 0 y 1, Figura 19. línea 2). Se estableció manualmente el umbral evitando eliminar secciones correspondientes a las hojas, posteriormente se combinó la imagen original RGB con la imagen binaria usando el operador *AND*. El resultado se ve reflejado en los histogramas (Figura 19 línea 3c, 3d y 3e) ya que desaparecen los picos correspondientes a los píxeles del fondo blanco y las distribuciones de aquellos que forman parte de las hojas se vuelven más evidentes.

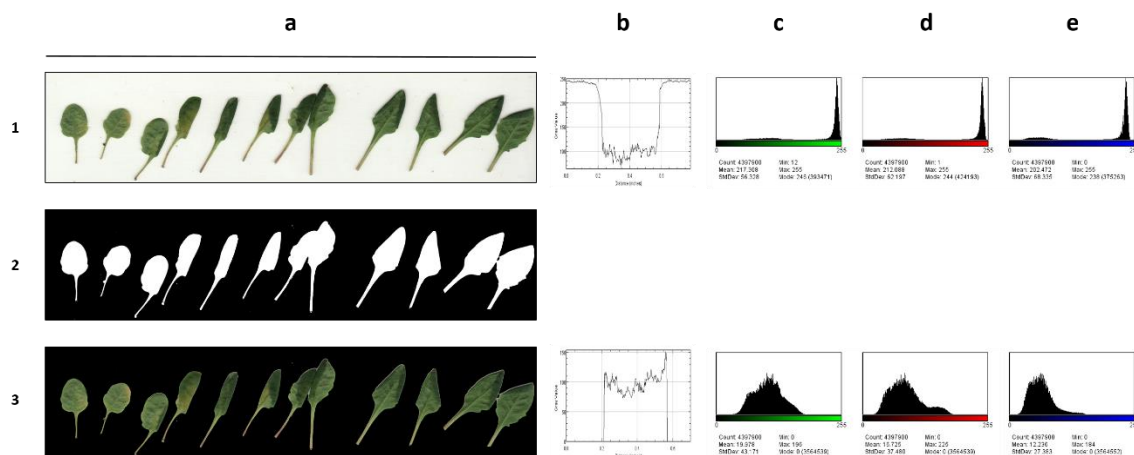


Figura 19. Procesamiento de imágenes para analizar la maduración de las hojas.

Diagrama que ejemplifica el procesamiento de las imágenes para analizar la maduración de las hojas en *Col-0* y *ccd4* de manera indirecta a través de los tonos de verde. Las imágenes con hojas escaneadas un fondo blanco (1a) presentan una alta frecuencia de píxeles con valores altos en los canales verde (1c), rojo (1d) y azul (1e) que corresponden al fondo blanco. El contraste entre los píxeles en blanco y aquellos que constituyen las hojas es muy pronunciado,

como lo muestra una gráfica de una sección que cruza por una de las hojas (1b), esto permite llevar a cabo una segmentación de manera sencilla y obtener una imagen binaria (2a). La imagen binaria es combinada con la original (1a) usando el operador *AND*, para eliminar los píxeles del fondo blanco (3a) y ver con mayor claridad a aquellos que forman parte de las hojas solamente (3c, d y e). Una gráfica de una sección que cruza a una hoja en la nueva imagen en fondo negro nos permite apreciar cómo hemos limitado la información a aquella correspondiente a las hojas (3b).

Los datos obtenidos para cada grupo de 6 pares de hojas por planta se combinaron para un total de n=28, que es el número de plantas analizadas por genotipo, las distribuciones para los canales rojo, verde y azul se compararon entre Col-0 y *ccd4*

## *Caracterización de líneas sobreexpresoras de CCD4*

### *Extracción de RNA total*

Se extrajo RNA total de las líneas sobreexpresoras (p35S::CCD4:FLAG), Col-0 y la mutante *ccd4* a los 12 días de crecimiento *in vitro* después de la estratificación. El tejido se colectó en nitrógeno líquido y se trituró congelado a través de mortero. Se agregó 1 ml de TRIzol® (Life technologies™) por cada 50-100 mg de tejido. Las muestras se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 200 µl de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugaron a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. El RNA se precipitó empleando 500 µl de isopropanol al 100% por 10 min a temperatura ambiente y se recuperó por centrifugación a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. Finalmente la pastilla de RNA se lavó con etanol al 75%, se centrifugó a 7,500 g por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y las muestras de RNA se secaron. Finalmente, el RNA se resuspendió en 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O.

### *Hibridación de RNA*

Para realizar la hibridación tipo *northern blot*, la sonda utilizada se diseñó de regiones específicas para el gen *CCD4*, partiendo de un alineamiento múltiple de los genes con homología a *CCD4* presentes en *A. thaliana* (NCED2, 3, 5, 6 y 9; CCD1, 7, 8), con el algoritmo *Muscle* (Edgar R.C. 2004). A partir de este análisis se seleccionó un fragmento de 450 bps cerca del extremo 5' de *CCD4* (Figura 20). Esta región, también se comparó contra la base de datos nt/nr (Nucleotide collection) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para confirmar que sólo



tuviese similitud con *CCD4*. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar dicho fragmento por PCR a partir de DNA genómico usando una enzima de alta fidelidad como se describió anteriormente. El fragmento se purificó y se marcó radioactivamente con 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha^{32}$ P] dCTP usando un kit comercial siguiendo las indicaciones del fabricante (*Amersham GE Healthcare Life Sciences*).

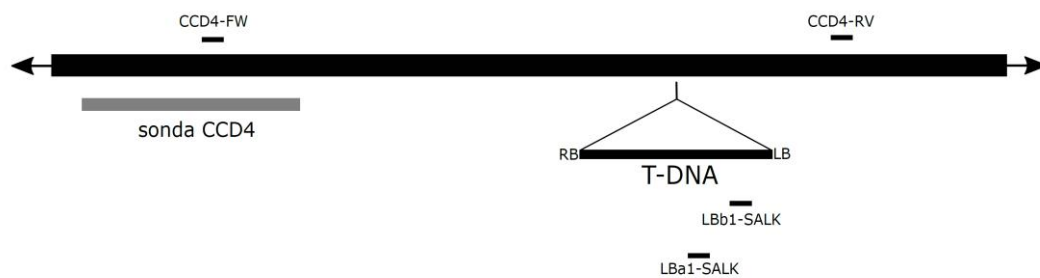


Figura 20. Sitio de inserción de T-DNA en el gen *CCD4* y sitio de alineamiento de la sonda de DNA marcada con [ $\alpha^{32}$ P] dCTP.

Se muestran también los oligonucleótidos específicos para *CCD4* (CCD4-FW y CCD4-RV) así como los oligonucleótidos específicos del borde izquierdo (LB) del T-DNA (LbBa1-SALK y LbBb1-SALK).

Para realizar el *northern blot* se emplearon 10  $\mu$ g de RNA de cada línea sobreexpresora ( $P_{35S}::CCD4:FLAG$ ), Col-0 y *ccd4*, los últimos como controles; se resuspendieron en el Buffer de Carga (Formamida, MOPS 1X, formaldehído, 1  $\mu$ l de bromuro de etidio). Las muestras se calentaron 5 min a 65°C y se colocaron en hielo inmediatamente hasta ser sometidas a una electroforesis en un gel desnaturizante de agarosa al 1.2% en buffer MOPS 1X (20 mM MOPS, 5 mM acetato de sodio, 2 mM EDTA, pH7.0 y Formaldehído 2% concentración. final). El RNA se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon durante 16 horas en buffer de transferencia SSC 10X (ver sección de soluciones en información de apoyo). El RNA se fijó a la membrana con UV usando un *stratalinker* 120 mJ/cm<sup>2</sup> y para comprobar la eficiencia de la transferencia y la carga de cada muestra se tiñó con una solución de azul de metileno (Acetato de sodio 0.5 M pH 5.2 y azul de metileno 0.03%) (Streit *et al.*, 2008, con modificaciones).

Posteriormente la membrana se prehibridó con una solución de prehibridación (ver sección de soluciones en información de apoyo) por 5 horas a 65°C. Transcurrido este tiempo, se agregó la sonda marcada, la cual previamente se desnaturizó calentando a 95°C por 5 min. La membrana se hibridó por 20 horas a 65°C. Posteriormente la membrana se lavó por 30 minutos con SSC 2X + SDS 1% (ver información de apoyo), seguido de un lavado con SSC 0.5

X + SDS 1% a 65°C y un lavado final con SSC 0.1X + SDS 1%. La membrana es expuesta a un filme de rayos X por 36 h a -70°C y revelada para su análisis.

# Resultados

## *Patrón de expresión del gen CCD4*

Con el objetivo de hacer una descripción detallada de las etapas del desarrollo en las que se expresa el gen *CCD4* y entender de manera global y sencilla su dinámica de expresión, se utilizó el gen reportero GUS. Para ello se generó una construcción que contiene un fragmento de 1620 bps, denominado  $P_{CCD4}$ , que consta de la mayor parte de la región intergénica y el UTR 5' del gen *CCD4*, este se recombinó con el vector binario pMDC163 que contiene la región codificante del gen *uidA*, dicha construcción se denominó  $P_{CCD4}::GUS$ . La identidad del fragmento se confirmó por PCR y secuenciación (no mostrada). Con esta construcción se transformaron plantas y se obtuvieron 12 de líneas resistentes a higromicina que correspondieron a plantas transgénicas T1. Dichas líneas fueron crecidas a  $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (condición estándar para la generación de semillas), y la presencia del transgen en plantas adultas se confirmó por ensayos histoquímicos.

Se estuvo particularmente interesado en caracterizar con detalle el patrón de *CCD4* durante el desarrollo de las hojas, así como de hojas modificadas como las estructuras florales. De las 12 líneas transgénicas independientes que se obtuvieron se seleccionaron 4, las cuales presentaban una segregación 3:1 de la resistencia a higromicina, de acuerdo a la prueba estadística de  $X^2$  (Tabla 2). Dicha segregación indicó que probablemente hay una sola inserción del transgen en su genoma, por lo que resulta más sencillo realizar los análisis posteriores y conservar una línea homocigota en la que se puedan llevar a cabo estudios posteriores.

*Tabla 2. Segregación de líneas reporteras  $P_{CCD4}::GUS$*

Línea	Fenotipo	Observado	Esperado	Valor P
L6	Sensible	14	17	0.40081417
	Resistente	54	51	
L7	Sensible	11	10	0.71500065
	Resistente	29	30	
L8	Sensible	19	25	0.16585666
	Resistente	81	75	
L9	Sensible	16	21	0.20771209
	Resistente	68	63	

Los estados de desarrollo en los cuales se analizó el patrón de expresión se nombraron de acuerdo con lo propuesto por Boyes *et al.* (2001). Las tinciones histoquímicas de GUS se llevaron a cabo en plántulas crecidas *in vitro* en los estados 0.1 a 1.06, estado en el cual se aprecia el tercer par de hojas verdaderas (Figura 17).

Debido al tiempo requerido para obtener las líneas homocigotas, un análisis inicial del patrón de expresión se llevó a cabo en plantas transgénicas heterocigotas, correspondientes a la generación T2 con la construcción P<sub>CCD4</sub>::GUS, con el propósito de corroborar la presencia de GUS y saber si las líneas seleccionadas tenían un patrón semejante. Como se observa en las figuras 22 y 23 el patrón de expresión de *CCD4* fue similar en las cuatro líneas analizadas, pero la línea 6 presentaba dos poblaciones de plantas con diferente intensidad tras la tinción de GUS, por este motivo, los posteriores análisis se llevaron a cabo sólo en las líneas 7, 8 y 9 (Figura 22 y 23). La expresión de *CCD4* en los estados 0.1 a 0.5 se presenta de manera uniforme en los cotiledones y el haz vascular de la raíz y no se presenta ninguna otra zona de la misma (Figura 21). En etapas tempranas del estado 1.02 (Boyes *et al.*, 2001), la expresión es clara en cotiledones, raíz y base del hipocótilo.

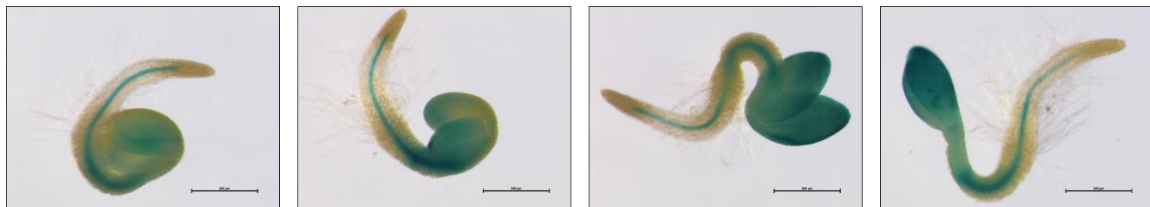


Figura 21. Patrón de expresión de *CCD4* en estados tempranos del desarrollo.

Conforme la plántula progresa en el desarrollo, la expresión en los cotiledones se vuelve más generalizada. Por lo contrario, la expresión en el hipocótilo se reduce.

Inicialmente no se observó expresión en el primer par de hojas jóvenes, pero a medida que el primer par de hojas se desarrolla, la expresión de *CCD4* aparece en el extremo distal de la misma de forma muy localizada (Figura 22 a-f). Posteriormente, la expresión puntual de *CCD4* se extiende hacia la base de la hoja de manera no uniforme sobre las areolas, conforme ésta se desarrolla, pero es claramente intensa sobre los haces vasculares. Este patrón es muy característico de *CCD4* cuando se le compara con el patrón que se observa en genes que codifican para enzimas de la vía de biosíntesis de carotenos, tales como *ZDS* y *PDS3* (Figura 25), en los cuales a pesar de que también existe una zona particular de

expresión, se aprecia un frente homogéneo que se extiende hacia la base de la hoja conforme ésta madura.

El patrón de expresión de *CCD4* en los primeros tres pares de hojas de roseta, de plántulas *in vitro*, es característico y consistente en las tres líneas seleccionadas (Líneas 7, 8 y 9) analizadas. Se puede apreciar que la expresión de *CCD4* ocurre en toda la hoja, pero es más intensa en los haces vasculares que en las areolas.

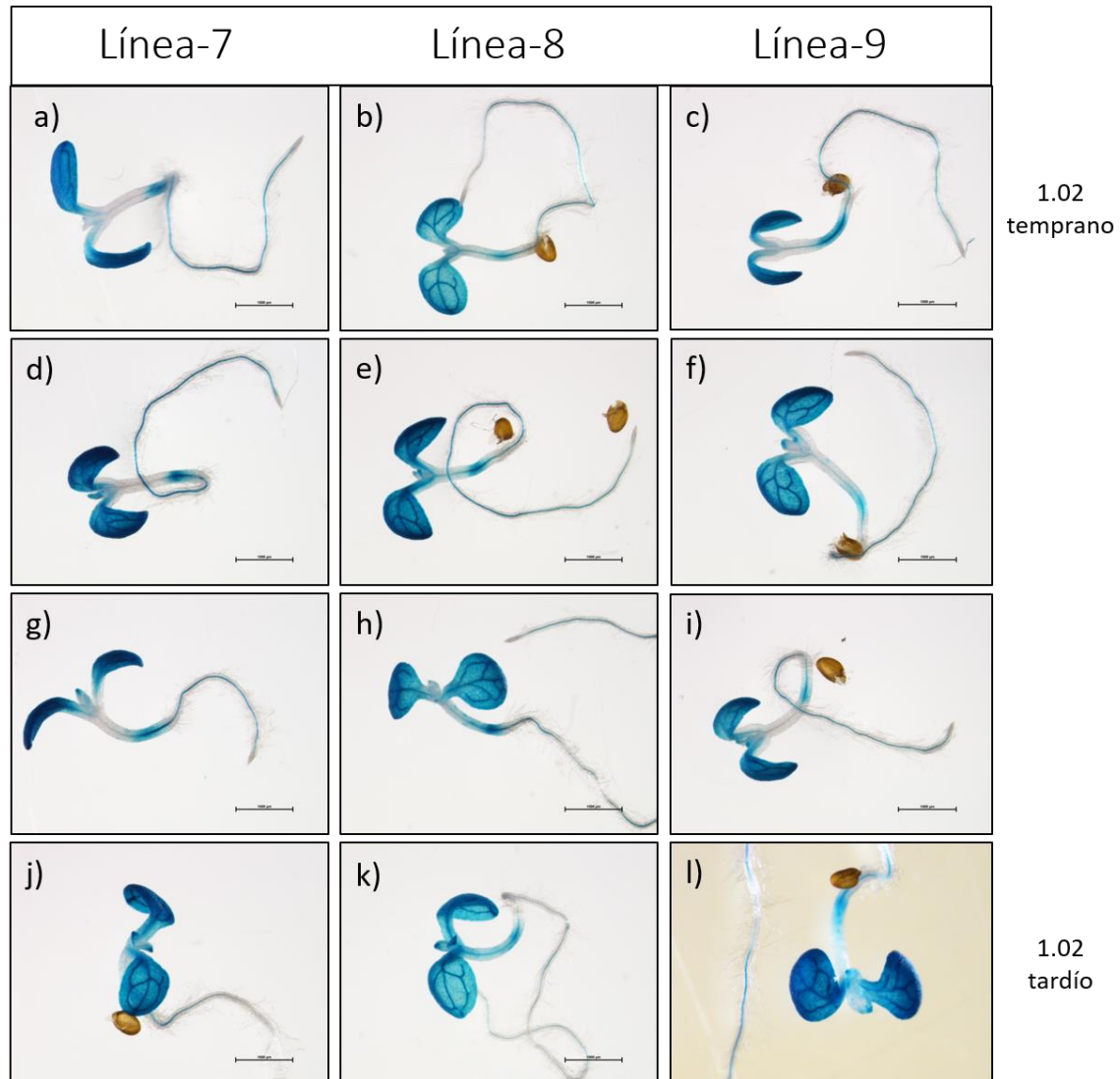


Figura 22. Patrón de expresión de *CCD4* en plantas 1.02 correspondientes a las tres líneas analizadas.

Patrón de expresión de *CCD4* de las líneas 7, 8 y 9. (a-l) Plantas en el estado 1.02 temprano (a-i) y tardío (j-l) en las que se puede observar que la expresión comienza en el extremo distal de la hoja y posteriormente se extiende a la base de la misma conforme madura. La expresión en los cotiledones es generalizada en este estado, pero es más intensa en los haces vasculares. La expresión se reduce en el hipocótilo conforme la planta crece.

Nuestro análisis de plantas crecidas en sustrato mostró que *CCD4* se expresa en toda la hoja en las primeras hojas maduras de roseta, pero de manera más intensa en los haces vasculares. En las hojas caulinares *CCD4* no presenta un patrón definido y parecería ser más intenso en zonas con daño consecuencia del corte y manipulación (Figura 26), pero este es un aspecto aún por explorar. *CCD4* también se expresa en flores y de manera particular en los haces vasculares de los sépalos, aunque también se detecta una baja expresión en el resto del sépalo (Figura 27), dicho patrón se asemeja al observado en los primeros dos pares de hojas jóvenes. La expresión también se aprecia en los haces vasculares de los pétalos y en los estambres. En el gineceo, *CCD4* se expresa de forma detectable en el ápice y la base, pero no así en la zona media; dicho patrón se mantiene en los frutos jóvenes. Las silicuas maduras presentan una expresión en el ápice y la base exclusivamente (Figura 27c).

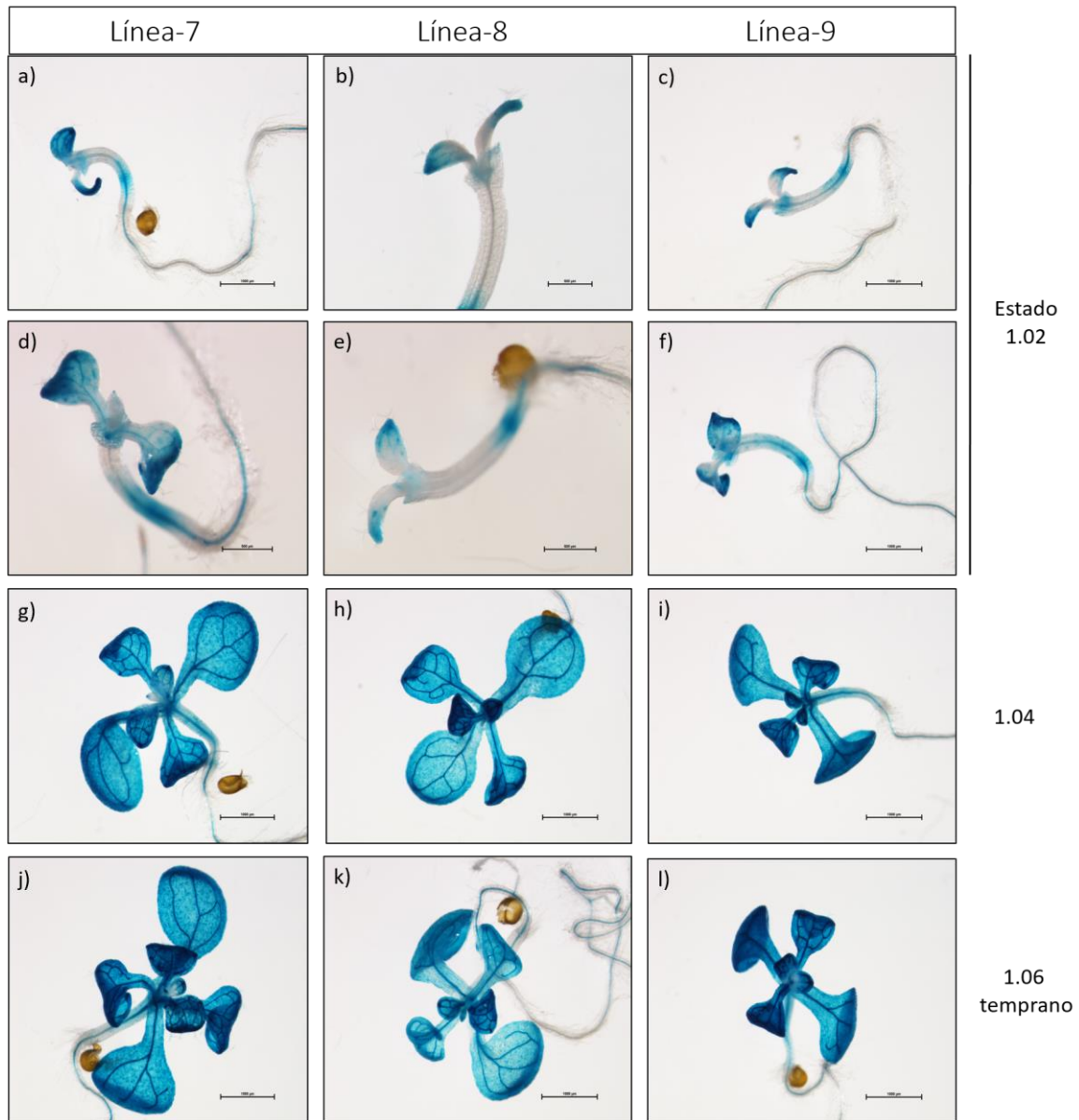


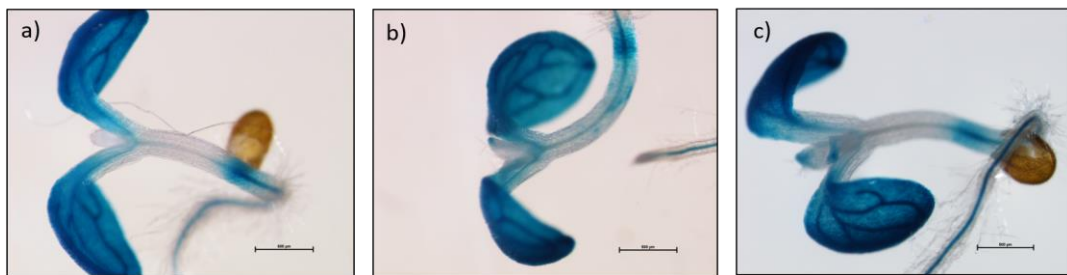
Figura 23. Patrón de expresión de *CCD4* en estados de desarrollo 1.04 a 1.06.

(a-f) Plantas a las que se les cortaron los cotiledones para ver con más detalle la expresión de *CCD4* en el primer par de hojas; se aprecia que, conforme la hoja crece, *CCD4* se expresa hacia la base y predominantemente en los haces vasculares. (g-i) Plantas en el estado 1.04 nos permiten apreciar la expresión en los haces vasculares y el patrón localizado en la punta del primordio foliar emergente. (j-l) En el estado 1.06 temprano, apreciamos la expresión generalizada en el primero y segundo par de hojas.

Como se mencionó, el patrón de expresión aquí descrito se obtuvo con plantas transgénicas con la construcción  $P_{CCD4}::GUS$ , la cual es una fusión transcripcional; es decir, que el gen reportero *GUS* se expresa bajo el control del promotor de *CCD4*. Sin embargo, es importante mencionar que ya que esta construcción carece de la región codificante cualquier efecto regulatorio tanto transcripcional como postranscripcional contenido en esta región estaría

excluido, aunque es importante mencionar que no todos los elementos involucrados en la regulación postranscripcional están ausentes, pues esta construcción cuenta con el UTR 5'. Aun así, es necesario generar plantas transgénicas con una construcción que incluya la región codificante P<sub>CCD4</sub>::CCD4:GUS ya que su análisis podría arrojarnos un patrón ligeramente diferente, debido a que regulaciones mediadas por secuencias contenidas en la región CDS podrían ser importantes a nivel de la estabilidad del transcrito o proteína.

### Estado de desarrollo 1.02



*Figura 24. Expresión de CCD4 no está presente en hojas jóvenes.*

(a) *CCD4* no se expresa en estados iniciales de desarrollo del primordio foliar. Posteriormente se expresa en la punta de la hoja (b) y progresa hacia la base conforme esta crece (c).



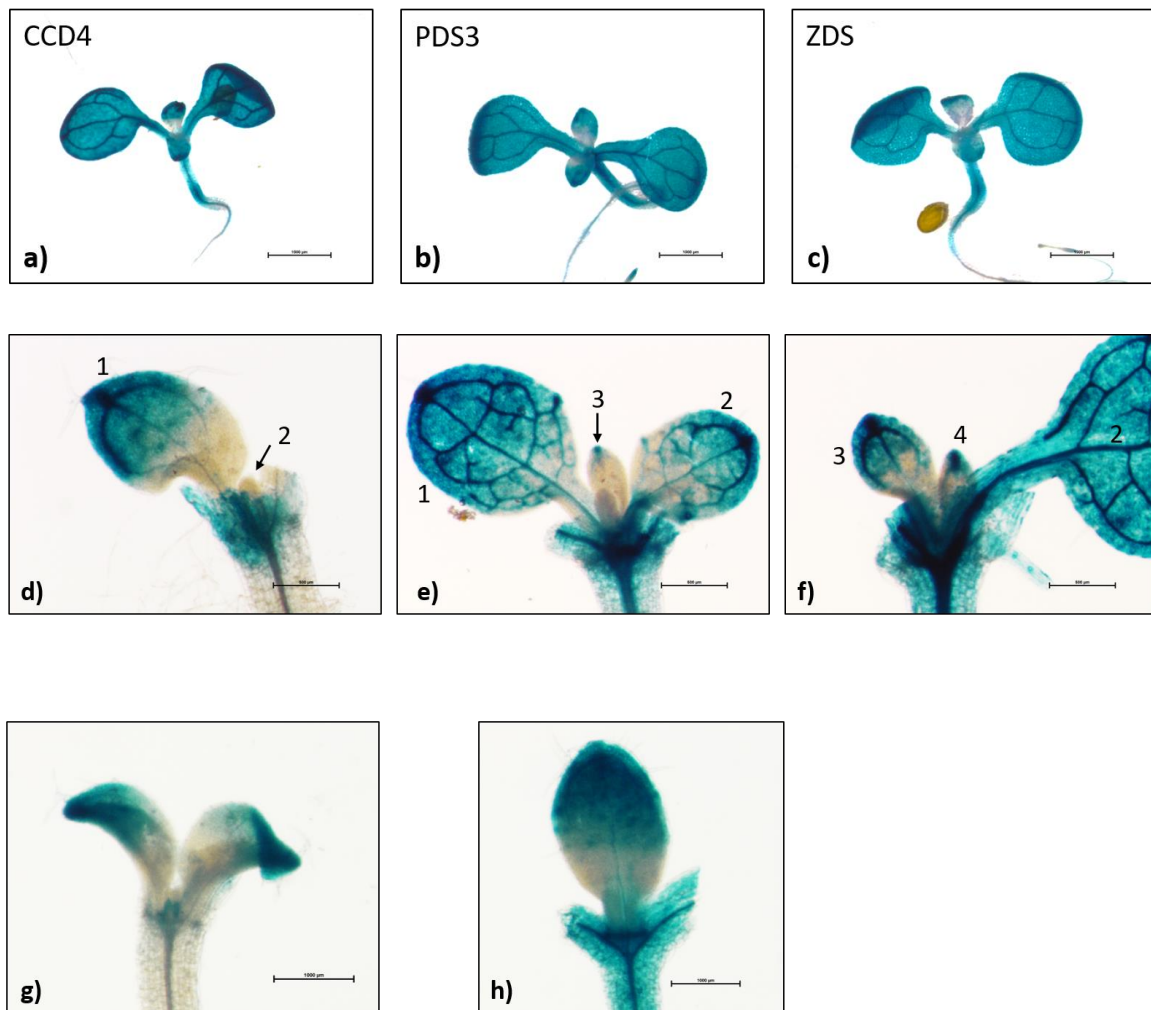


Figura 25. Patrón de expresión de *CCD4* comparado con *PDS3* y *ZDS*.

(a-b) Se puede apreciar que, en términos generales, el patrón de *CCD4* en plantas en el estado de desarrollo 1.02 es muy parecido al de *PDS3* y *ZDS*. Cuando analizamos con detalle la expresión de *CCD4* en los primeros dos pares de hojas (d-f) podemos darnos cuenta de que la expresión es más intensa en los haces vasculares y que inicia en la punta de la hoja y desciende hacia la región proximal, por los haces vasculares conforme la hoja madura. En comparación, esto no pasa en el patrón de *ZDS*, donde el frente de expresión hacia la región proximal es homogéneo (g-h).

Por esta razón se ha generado la construcción  $P_{CCD4}::CCD4::GUS$  que nos permitirá contrastar el patrón de la fusión transcripcional y explorar la regulación de *CCD4* por mecanismos postraduccionales que afecten significativamente la localización de *CCD4* en los órganos de la planta.

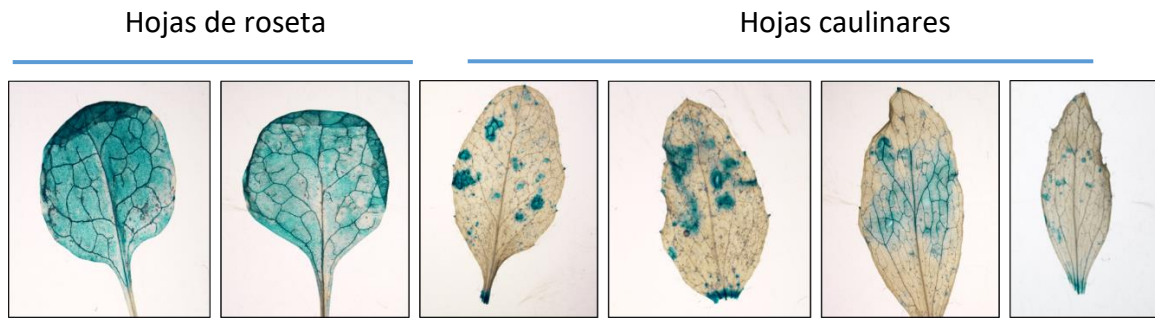


Figura 26. Expresión de *CCD4* en hojas de roseta maduras y caulinares.

El patrón de las hojas de roseta es notablemente generalizado, pero más intenso en los haces vasculares; por el contrario, en las hojas caulinares se aprecia un patrón no uniforme que pudiese ser consecuencia del daño.

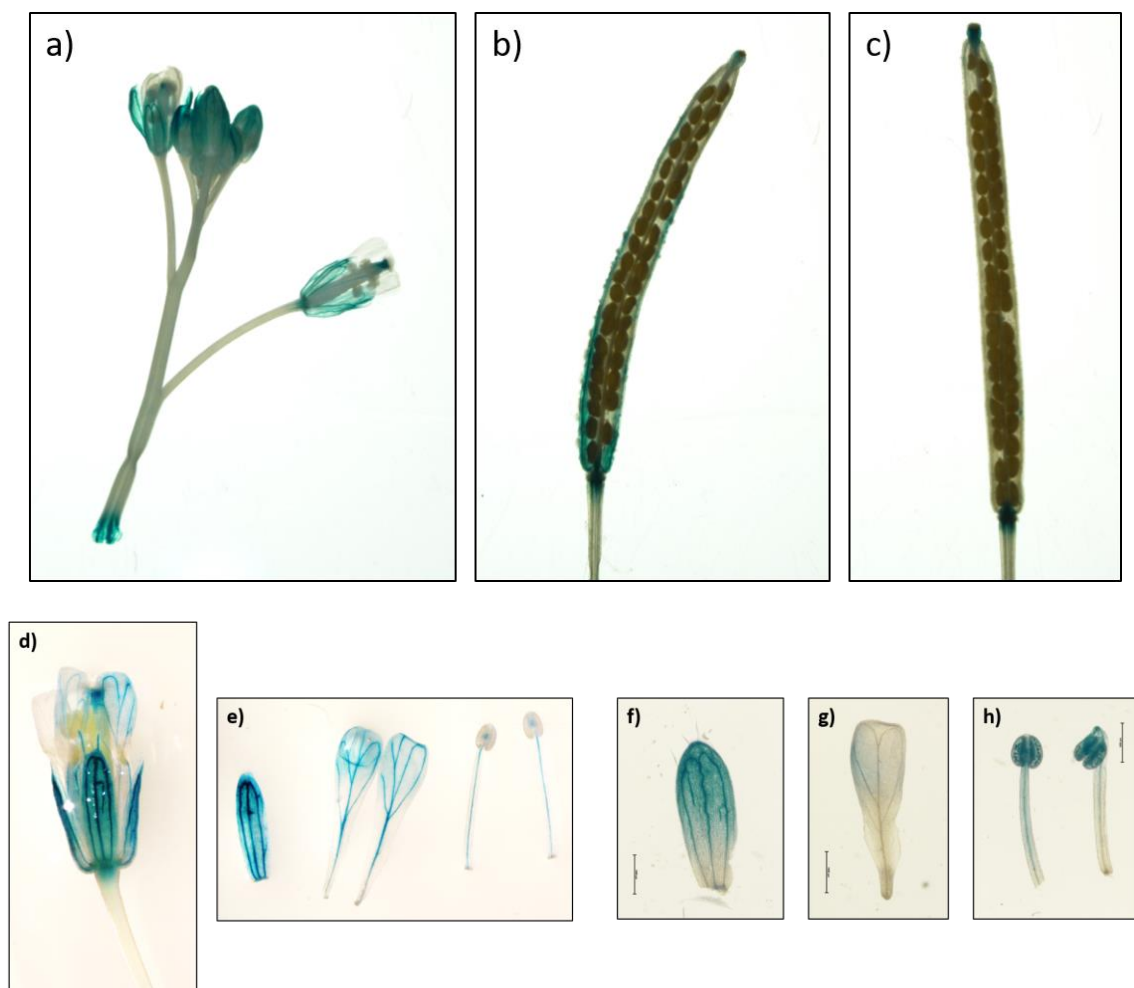


Figura 27. Expresión de *CCD4* en órganos florales (a y d-h) y silicuas (b-c).

Las silicuas presentan expresión desde la base hasta la zona media y en la punta, un fruto maduro solo presenta expresión en la punta y la base (c). La flor presenta expresión en la punta de los sépalos y haces vasculares de los mismos (d-e). Los pétalos tienen un patrón de expresión en los haces vasculares, pero no es exclusivo de estos (e). Finalmente, los estambres expresan *CCD4* solo en el haz vascular (e). En contraste, el patrón de expresión de *CCD4* en plantas con la fusión traduccional  $P_{CCD4}::CCD4::GUS$  (f-h) se diferencia en dos aspectos importantes, la reducción drástica de la expresión en los haces vasculares de los pétalos (g) y estambres (h).

## *Localización subcelular de CCD4*

En este trabajo, se decidió corroborar la localización subcelular de CCD4 en un sistema de expresión heteróloga en *N. benthamiana* para en un futuro, generar plantas transgénicas de *A. thaliana* y analizar los efectos que tienen diferentes condiciones de crecimiento en dicha localización. Así mismo, se podrán llevar a cabo cruces con mutantes para la vía de biosíntesis de carotenos y sobreexpresoras de CCD4, y evaluar los efectos que esto podría tener en la localización subcelular a consecuencia de la disponibilidad de metabolitos o algún otro factor.

Por lo tanto, a través de una expresión transitoria de CCD4 en *N. benthamiana*, pudimos explorar la localización subcelular de CCD4. Con este propósito, como se mencionó en el apartado de materiales y métodos, se realizó una construcción que consta de 3393 bp correspondientes a la región intergénica de *CCD4*, el UTR5' y la región codificante de CCD4; dicho fragmento se recombinó en el vector binario pMDC204 para generar la fusión de CCD4 con la proteína GFP. La construcción generada fue corroborada a través de PCR para confirmar la presencia del fragmento en el vector. Finalmente, esta construcción fue secuenciada para descartar cualquier tipo de mutación.

Con estos ensayos corroboramos que la enzima CCD4 tiene localización subcelular en el cloroplasto, que coincide a lo reportado en la literatura (Rottet *et al.*, 2016). Cabe comentar que la señal de GFP detectada no fue tan intensa; sin embargo, esto podría deberse a que se trata de un sistema heterólogo y que desconocemos en qué momento se expresa CCD4 en condiciones naturales, a pesar de esto, fue suficiente para lograr detectarla claramente en el cloroplasto (Figura 28). Por otro lado, con esta información no podemos decir que su localización suborganelar sea en los plastoglóbulos, con tal fin es necesario generar una construcción con un gen marcador de plastoglóbulos como FBN4. Estudiar la localización subcelular de CCD4 nos permitirá en un futuro explorar la relevancia biológica de la señal generada en la mutante *clb-5*, en términos de disponibilidad de sustratos y tipos celulares donde se pudiera generar la señal ACS1.

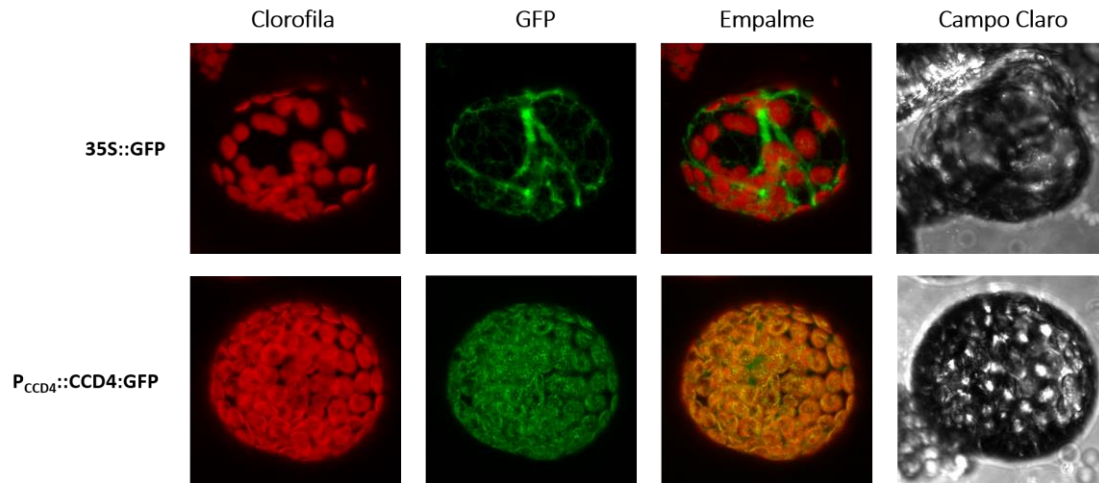


Figura 28. Localización subcelular de *CCD4*.

Localización subcelular de *CCD4* mediante expresión transitoria en protoplastos de *N. benthamiana*, se muestran resultados representativos de 3 réplicas biológicas. *CCD4* tiene localización en el cloroplasto, aunque la señal de GFP es muy localizada; probablemente en los plastoglóbulos.

### *Patrón de expresión de CCD4 en tratamientos con lincomicina y espectinomina*

Debido a que se ha reportado que la inhibición de la traducción plastídica afecta el patrón de expresión del marcador de auxinas y otros genes (Zheng *et al.*, 2016) así como defectos en el desarrollo de la hoja (Tameshige *et al.*, 2013), se procedió a explorar los efectos que la inhibición de la traducción plastídica tiene en el patrón de expresión de *CCD4*, *PDS3* y *ZDS* usando plantas transgénicas con la fusión transcripcional  $P_{CCD4}::GUS$  y las fusiones traduccionales  $P_{PDS3}::PDS3:GUS$  y  $P_{ZDS}::ZDS:GUS$  respectivamente. Las plantas se germinaron con los inhibidores espectinomina a 100  $\mu M$  (Parker *et al.*, 2014) y lincomicina a 300  $\mu M$ . El análisis del patrón de expresión se limitó a aquellas plantas albinas con un fenotipo de hoja acicular similar al observado en *clb5*. El patrón de expresión de *CCD4*, *PDS3* y *ZDS* se ve afectado por la inhibición de la traducción plastídica; la expresión de estos genes, tanto en espectinomina como en lincomicina, ocurre a lo largo de toda la hoja (Figura 29). La expresión ectópica observada es característica y común para los tres genes, también es consistente en la mayoría de las plantas con esta morfología de hoja, especialmente con espectinomina; donde el fenotipo de hoja acicular es más común. Por otro lado, en lincomicina podemos encontrar una mayor variedad de fenotipos de hoja; desde

lanceoladas o con diversos grados de acerraciones, en todo caso el patrón de expresión se ve afectado y se extiende de manera no uniforme sobre la lámina (Figura suplementaria 3).

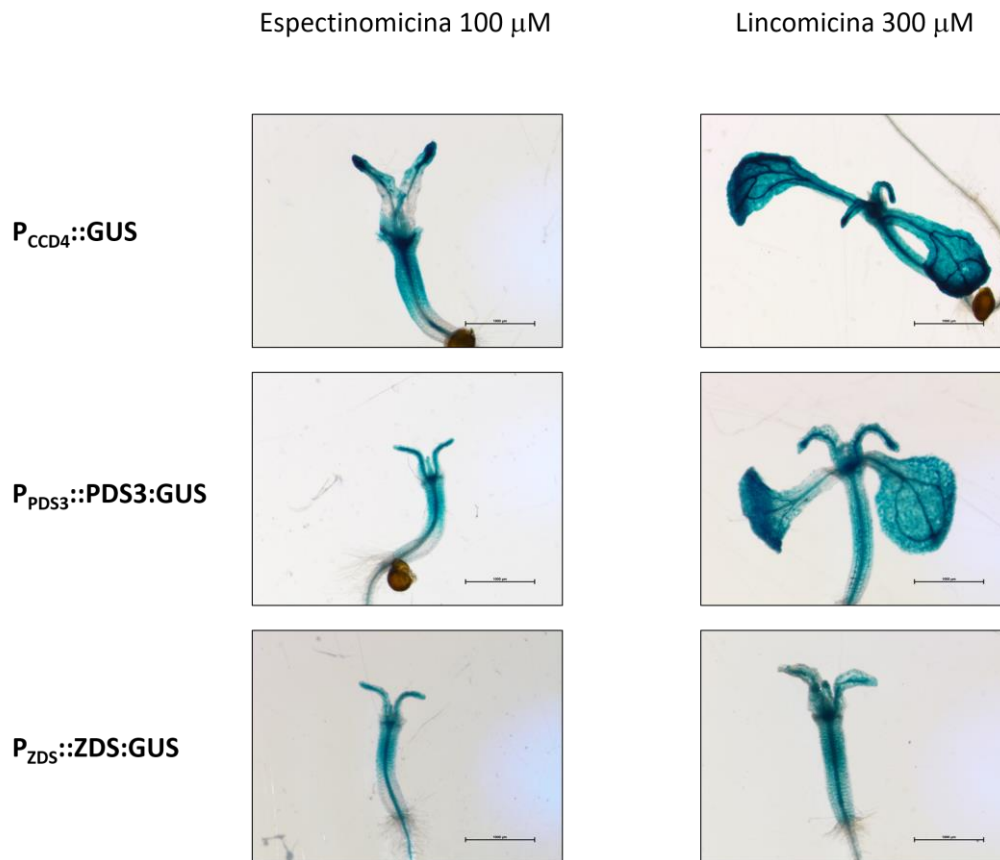


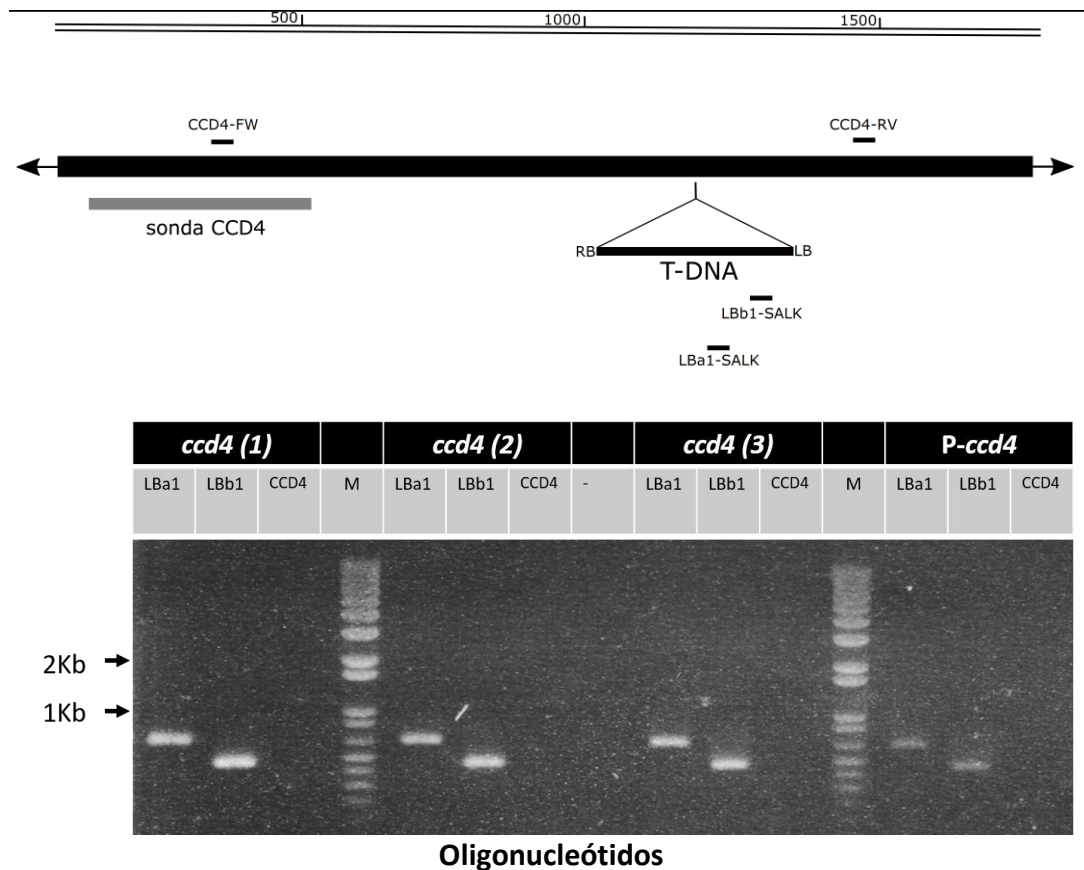
Figura 29. Efecto de la inhibición de la traducción plastídica en el patrón de expresión de *CCD4*, *ZDS* y *PDS3*.

Con el uso de estos inhibidores, el patrón de expresión de estos genes se ve afectado y ocurre una expresión ectópica a lo largo de toda la hoja acicular.

### *Análisis fenotípico de la mutante *ccd4**

Debido a que no se ha reportado un fenotipo para la mutante *ccd4* en términos morfológicos, y dado que los datos iniciales muestran que *CCD4* es necesaria para generar la señal mediada por apocarotenos (ACSI), identificar algún fenotipo asociado a la falta de esta enzima en una mutante nula, podría darnos idea de cuándo esta señal es fisiológicamente necesaria en la planta. Para hacer el análisis fenotípico de la mutante *ccd4*, primero se corroboró la presencia de la inserción mediante PCR con los pares de oligonucleótidos LbB1 y LbA1, específicos para el T-DNA y *CCD4* FW específico para *CCD4* (Figura 20). También a través de PCR se confirmó que las plantas fueran homocigotas para la inserción usando dos pares de oligonucleótidos específicos de secuencia de *CCD4* (*CCD4* FW/*CCD4* RV). Una vez

confirmado el estado homocigoto de la inserción de T-DNA en el gen de *CCD4* (Figura 30), se procedió a tomar una serie de mediciones morfológicas en la planta mutante y silvestre crecidas en condiciones de día largo (16:8 h luz: oscuridad) a 70  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 22 °C en tierra e *in vitro* (90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 22 °C).



**Par 1) LBa1 SALK/CCD4 Rv ---650 bps**  
**Par 2) LBb1 SALK/CCD4 Rv ---400 bps**  
**Par 3) CCD4 Fw/CCD4 Rv-----1.13 kb**

Figura 30. Sitio de la inserción de T-DNA en el gen *CCD4* y genotipificación de la mutante.

En el panel a) se muestra la localización y orientación de la inserción de T-DNA (SALK\_097984) en la región codificante de *CCD4* y sitios de apareamiento de los oligonucleótidos LBb1-SALK/LBa1-SALK en el borde izquierdo (LB) del T-DNA; también se muestran los sitios de apareamiento de los oligonucleótidos específicos CCD4-Fw/CCD4-Rv en la secuencia de *CCD4*.

Nuestros resultados fueron obtenidos de un análisis total de 30 plantas para la mutante *ccd4* y el mismo número para el control Col-0 crecidas en sustrato y de 407 para *ccd4* y 507 para Col-0 en condiciones *in vitro*. Las plantas crecidas en tierra se trasplantaron a sustrato a los 15 días de crecimiento *in vitro*, cuando presentaron el segundo par de hojas. Las mediciones se tomaron a partir del 5 día después del trasplante. El registro de los estados

de desarrollo *in vitro* a los 0.5, 2, 3, 9, 13 y 15 días después de estratificación, y que corresponde a diferentes estados de desarrollo según Boyes *et al.* 2001, no arrojó diferencias significativas entre la mutante *ccd4* y su correspondiente ecotipo silvestre Col-0 (Figura 31). Estos datos sugieren que no existe un fenotipo asociado a la mutación de *CCD4* que nos indique alguna diferencia en la progresión del desarrollo en estas etapas *in vitro* comparado con el fenotipo silvestre en las condiciones de crecimiento usadas.

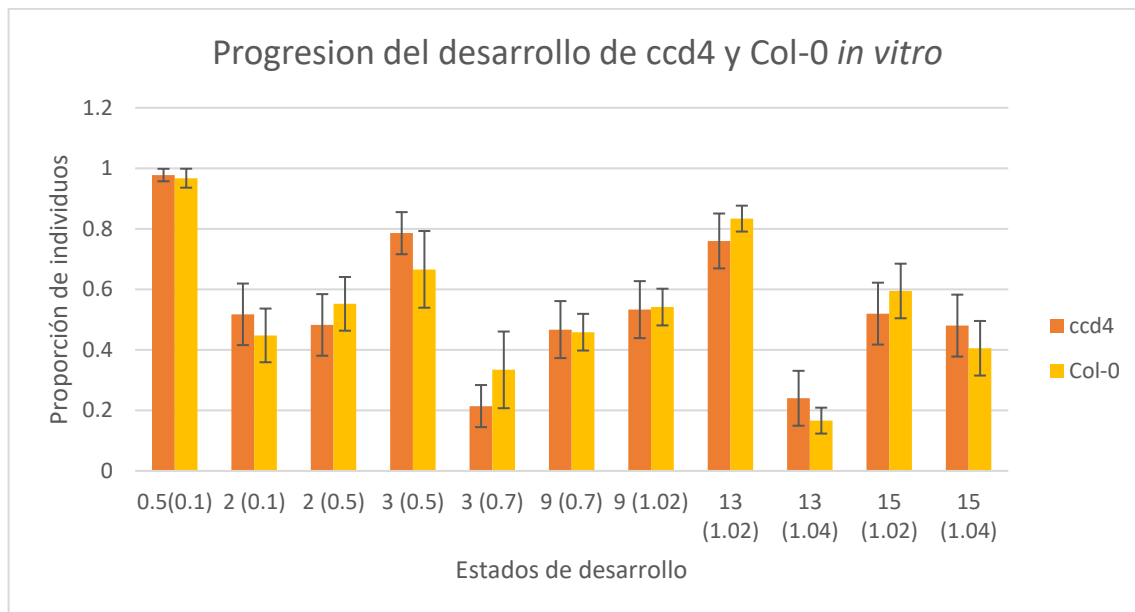


Figura 31. Progresión del desarrollo de la mutante *ccd4* en comparación a Col-0.

Se muestran las proporciones de plántulas en los estados de desarrollo de 0.1 a 1.04 a los 0.5 (12 h), 2, 3, 9, 13 y 15 días después de estratificación (Boyes *et al.* 2001). Los estados de desarrollo, en el eje x, se muestran en paréntesis, el eje y corresponde a la proporción de individuos para cada genotipo. Como podemos percatarnos, no hay diferencias significativas entre la proporción de individuos de *ccd4* y Col-0 en el desarrollo *in vitro*. Los datos corresponden a 6 repeticiones con un total de n=407 para *ccd4* y n=507 para Col-0.

También se obtuvieron datos referentes al desarrollo y dimensiones de las plantas crecidas en sustrato. Para discriminar entre aquellas variables con mayor diferencia, se procedió a hacer un análisis de componentes principales, el cual nos permite explicar la máxima variación con el menor número de componentes y visualizar en un gráfico las tendencias de los datos multidimensionales. De esta manera, podemos inferir qué variables son relevantes en la organización de las unidades experimentales (UE) observada en un gráfico de dos o tres dimensiones.

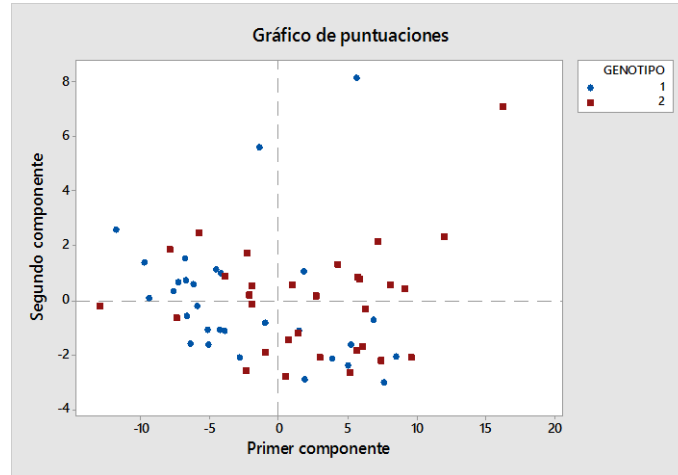


La gráfica de dos dimensiones de la figura 32a nos permitió observar la dispersión de cada uno de los individuos analizados (cada individuo representado por un punto (plantas Col-0, genotipo 1 y *ccd4* genotipo 2, referidos aquí como; UE) cuando se grafican con respecto a los primeros dos componentes. Estos dos componentes explican el 56% de la variación de los datos (Figura 33), y como podemos apreciar, las UE no forman conglomerados o asociación alguna en particular (Figura 32a). Las UE están distribuidas a lo largo del eje del primer componente y no homogéneamente entorno al origen. Una distribución homogénea nos indicaría que las UE son todas iguales, pero este no es el caso de nuestros datos. La distribución que observamos presenta más elementos *ccd4* en los cuadrantes I y IV, pero no exclusivamente, además también hay elementos Col-0 junto con *ccd4*.

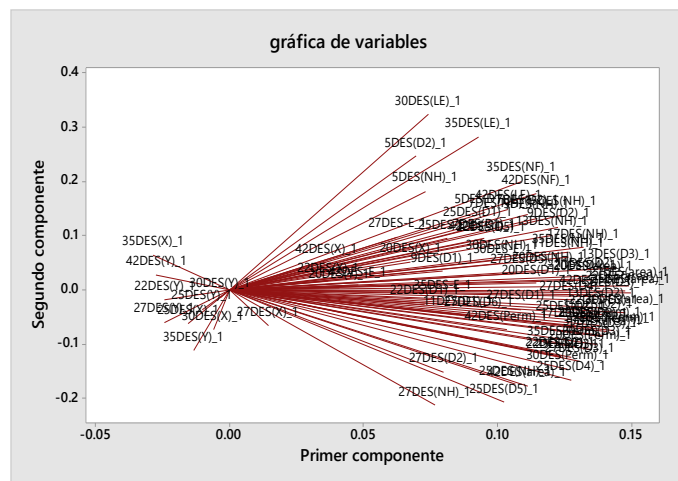
La mayor parte de las variables analizadas tienen una tendencia positiva en el primer componente (Figura 32b). Pero debido a que el segundo componente contribuye muy poco a la variación (5.6%), comparado con el primer componente (47.8%), las variables no forman más de un grupo. Por otro lado; si se sobrepone la estructura de las UE sobre la tendencia de las variables, en una gráfica con los primeros dos componentes como ejes (Figura 32.c), las UE distribuidas en los cuadrantes I y IV no forman un grupo entorno a las variables. Aunado a lo anterior, la tendencia de las variables no nos permite concluir sobre asociaciones que estas puedan tener con las UE. Por lo tanto, a través de este análisis no podemos concluir que los datos poseen una estructura que nos permita inferir grupos o asociaciones de los individuos Col-0 o *ccd4* hacia determinado carácter (variable) medido.



a)



b)



c)

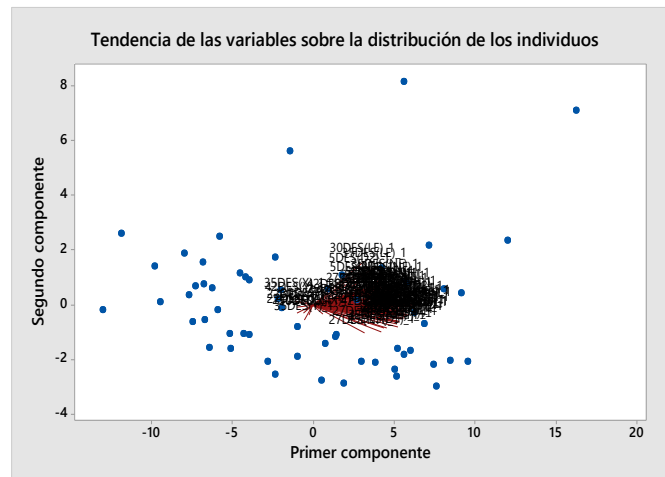
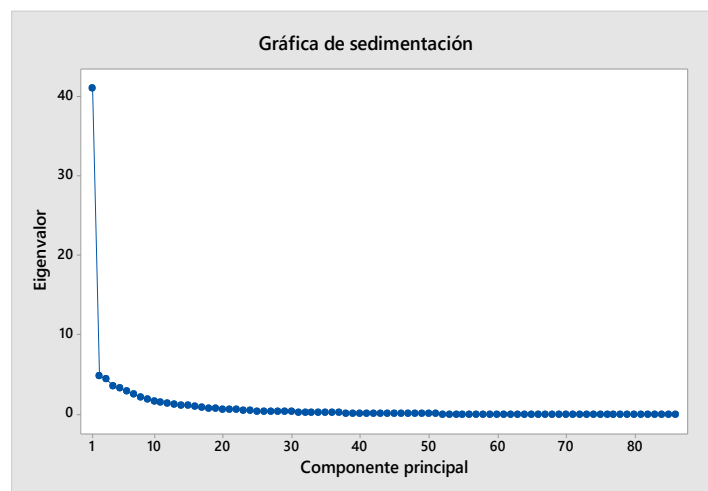


Figura 32. Análisis de componentes principales para la morfología y desarrollo de *ccd4* y *Col-0*.

La grafica a) muestra la estructura de los individuos cuando se grafican contra los primeros dos componentes, dichos componentes explican el 59.8% de la variación de los datos. b) muestra la tendencia de las variables analizadas, la gran mayoría presenta una tendencia positiva sobre el primer componente. La sobreposición de la tendencia de las variables sobre la estructura de los datos se muestra en el grafico c).

Los puntos en el extremo superior derecho del cuadrante I (Figura 32a) podrían indicar que se trata de valores extremos, pero tras calcular las distancias de *Mahalanobis* (Mahalanobis 1936); lo cual consiste en obtener las distancias entre cada punto de los datos y el centroide de un espacio multivariable (media general), donde los valores son 0 para los puntos en la media e incrementan conforme cada punto se aleja del centroide, nos permite concluir que no existen valores atípicos. Por lo tanto, para estudiar la asociación entre los genotipos, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento, transformando los valores de la matriz original a valores-Z. Esta transformación se obtiene restando el valor de la media para cada variable y dividiendo entre la desviación estándar, como resultado obtenemos valores adimensionales que nos indican cuantas desviaciones estándar se encuentra en cada dato respecto a la media. Para generar los grupos se usó la distancia euclidiana como medida de distancia entre las observaciones y el acoplamiento promedio como medida de distancia dentro del grupo. El análisis de agrupamiento nos indica que existen 5 grupos y uno de ellos incluye a la mayor parte de los individuos (Figura 34), pero la variación dentro de cada grupo es alta. Al igual que en el PCA, el número 1 corresponde al genotipo Col-0 y el número 2 a *ccd4*. Como podemos apreciar, los grupos no están constituidos exclusivamente por un genotipo, de esto resulta claro que la estructura observada en el PCA consta predominantemente de dos grupos, pero estos grupos no están constituidos de un genotipo.



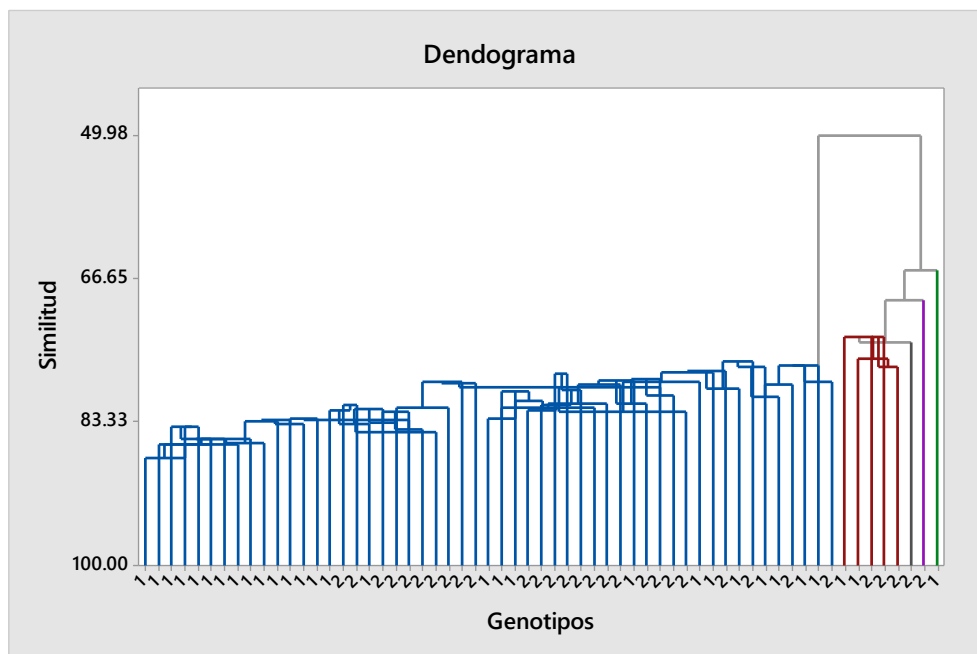
<b>Eigenvalor</b>	<b>41.071</b>	<b>4.853</b>	<b>3.572</b>	<b>3.284</b>	<b>2.878</b>
<b>Proporción</b>	0.478	0.056	0.052	0.042	0.038
<b>Acumulación</b>	0.478	0.534	0.586	0.627	0.666

Figura 33. Gráfica de eigenvalores.

Se muestra el número de componente contra el eigenvalor. Los eigenvalores de la matriz de correlación corresponden a la variación que explica cada componente. Para el presente análisis,

los primeros tres componentes apenas explican el 58.6% de la variación. El 80 % de la variación es explicada por los primeros 11 componentes.

En resumen, el análisis de componentes principales nos muestra que Col-0 y *ccd4* no tienen diferencias fenotípicas significativas que puedan ser claras en las condiciones analizadas. Debido a que las variables consideradas en el análisis fueron medidas a través del tiempo, podemos concluir que en estas condiciones de crecimiento Col-0 y *ccd4* se comportan de manera muy parecida y no hay un carácter distintivo de la mutante en ninguno de los tiempos analizados bajo las condiciones utilizadas. Sin embargo, es importante mencionar que estos resultados no descartan la existencia de variables de carácter no morfológico que pudiesen ser características de cada fenotipo.



Grupo	Numero de individuos por grupo	Suma de cuadrados dentro del grupo	Distancia respecto al centroide	Distancia respecto al centroide
Grupo 1 (azul)	53	3874.19	8.31333	13.5509
Grupo 2 (rojo)	5	233.63	6.76804	8.4088
Grupo 3 (negro)	1	0.0	0.0	0.0
Grupo 4 (morado)	1	0.0	0.0	0.0
Grupo 5 (verde)	1	0.0	0.0	0.0

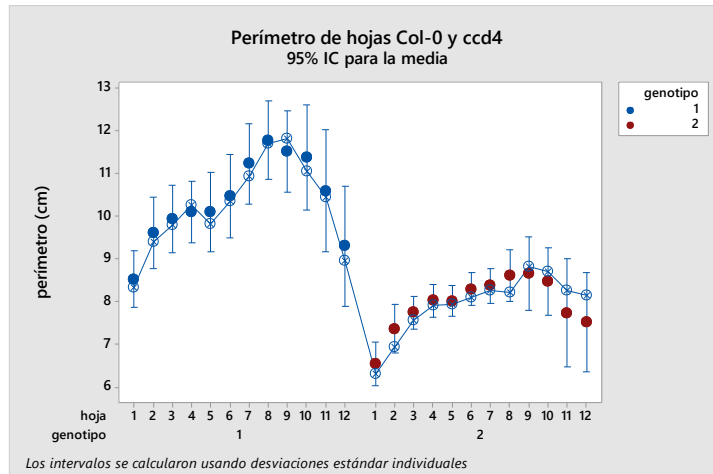
Figura 34. Dendrograma para el análisis de agrupamiento de individuos *ccd4* y Col-0.

Análisis de agrupamiento de los individuos, para realizar el dendrograma se empleó a la distancia euclidiana como medida de distancia entre los individuos y el acoplamiento promedio como medida de distancia dentro de los grupos. Dos grupos suman la mayor cantidad de individuos, pero la variación interna es grande. 1=Col-0, 2=*ccd4*.

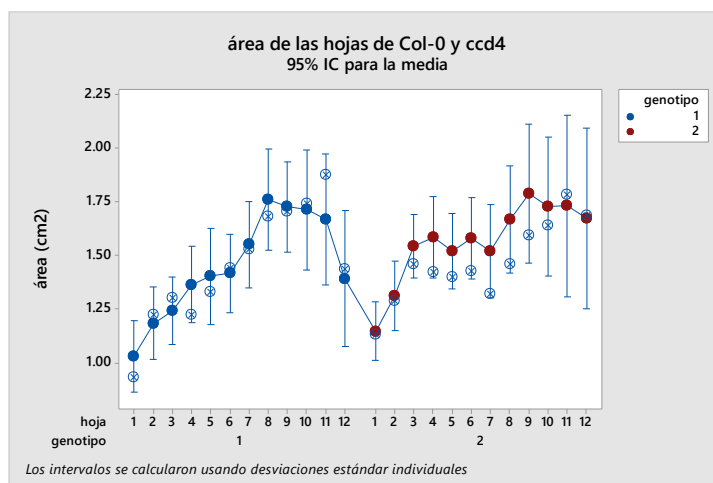
### *Análisis morfológico de la hoja*

El análisis morfológico en plantas Col-0 y *ccd4* crecidas a  $70 \mu\text{mol/ m}^2 \text{ s}$  reveló diferencias significativas en el perímetro de las hojas de la mutante con respecto a su ecotipo silvestre Col-0, cuando se contrastan hojas de roseta del tercer hasta el octavo par (denominadas aquí 1 a 12). Este análisis consiste en escanear cada una de las hojas de las plantas de interés en un momento. Ya que este análisis involucra la destrucción del material biológico para realizar las respectivas mediciones, resulta imposible llevarlo a cabo a través del tiempo. Como se observa en la Figura 35a, la mutante mostró hojas con un perímetro menor comparado con las hojas de Col-0. Interesantemente, cuando se comparan el área de estas hojas, no se observan diferencias significativas entre cada una de las plantas (Figura 35b). Pero cuando se calcula la circularidad (el valor oscila entre 0 para objetos nada circulares y 1 para aquellos completamente circulares y es definida como  $\text{Circularidad} = 4\pi (\text{área}/\text{perímetro}^2)$ ) de cada hoja, nos podemos percatar de que las hojas de *ccd4* son más circulares que las de la planta silvestre (Figura 35c y d). Este resultado es interesante, ya que nos revela diferencias morfológicas en las hojas de la mutante *ccd4* y es un fenotipo que no se había reportado previamente para la mutante. Más aún, este fenotipo correlaciona con la hipótesis de que la mutante *clb5* produce niveles aumentados una señal (generada a través de CCD4) que afecta el fenotipo de la hoja y es característico de *ccd4*.

a)



b)



c)

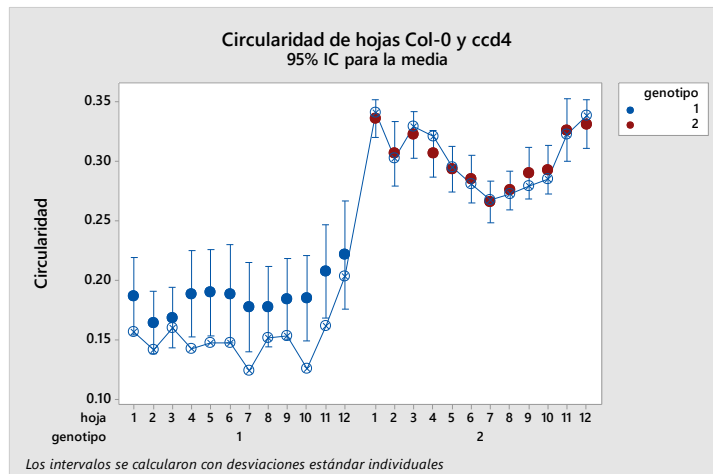


Figura 35. Análisis morfológico de hojas de ccd4 y Col-0.

Los genotipos corresponden a Col-0=1 (puntos azules) y ccd4=2 (puntos rojos). La comparación entre hojas debe hacerse por edad, siendo la más joven la hoja 12. No existen diferencias entre las áreas (panel a) pero si en el perímetro (b), lo cual se explica por qué las hojas de ccd4 son más circulares como lo muestra el panel c.

### *Análisis de la senescencia de la hoja*

Otro aspecto que se analizó fue la senescencia en plantas adultas tras 30 DES, para ello se partió de las mismas plantas del apartado anterior y como una medida de senescencia se analizó la coloración de las hojas de las plantas silvestre y mutante, ya que es claro que en las hojas senescentes existe una pérdida importante de clorofila y por lo tanto el color de dichas hojas cambia de verde a amarillo/café. Con el propósito de obtener un dato cuantitativo de dicha coloración se cuantificó la intensidad de grises en los diferentes canales (rojo, verde y azul). La razón por la cual se hizo de esta manera es que los tonos de amarillo y café de las hojas senescentes constan de píxeles con valores altos, en una imagen con valores de píxeles de 0 a 255 en intensidad de gris, y conforme más verde es la hoja los píxeles tienen valores más bajos.

La distribución de los píxeles en hojas de Col-0 comparado con la distribución en *ccd4* (Figura 36a y b) nos indica que hay mayor frecuencia de píxeles con valores bajos para tonos amarillos y cafés en Col-0 (Figura 36a líneas continuas) que en *ccd4* (Figura 36a líneas punteadas). Esto también queda claro cuando tomamos la distribución de los tres canales en conjunto (Figura 36b líneas punteadas para *ccd4* y continuas para Col-0). Sin embargo, las diferencias que se observan no son drásticas y en general el aspecto de Col-0 y *ccd4* en lo que respecta a la senescencia, si tomamos en cuenta el tono de verde de la planta como un indicador, no es claramente diferente entre ambos genotipos. Sin embargo, cabe mencionar que se ha reportado anteriormente que la mutante *ccd4* senesce más rápido en condiciones de oscuridad (Rottet *et al.*, 2016), por lo que este análisis tuvo como fin encontrar diferencias en el tono de verde entre *ccd4* y Col-0 que no fueran del todo obvias. Un análisis más profundo involucrará la cuantificación de clorofila y carotenos en hojas y queda pendiente para un futuro.

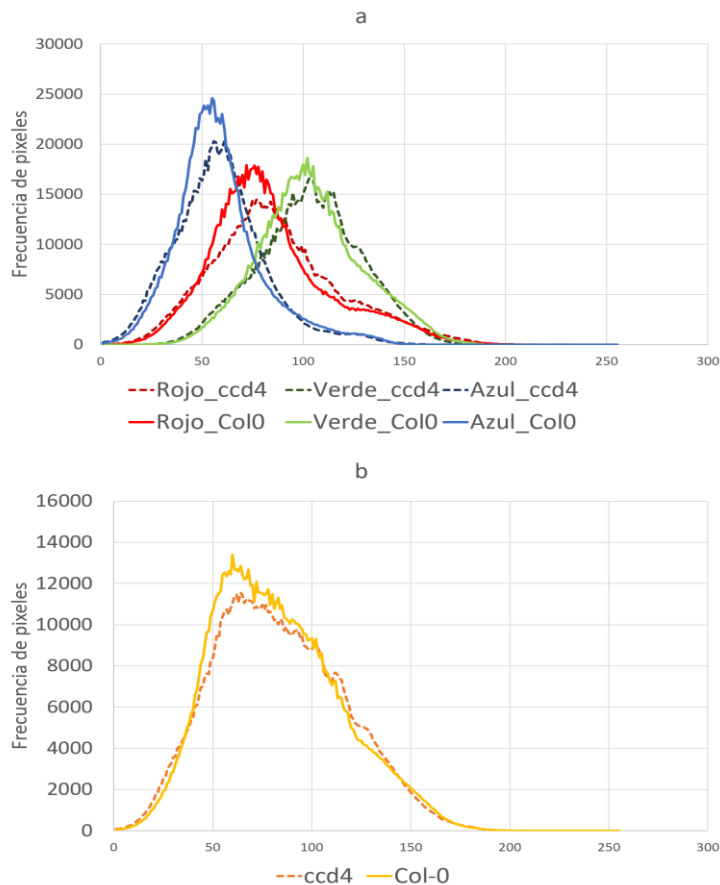


Figura 36. Histogramas de frecuencia de pixeles en intensidades de grises en imágenes de 0 a 255 pixeles.

Se obtuvieron los valores para *ccd4* en los canales rojo, verde y azul (a y b) así como en conjunto para los tres canales (c). Lo mismo se hizo para *Col-0* (d, e y f). Los histogramas para los tres canales correspondientes a cada genotipo se superpusieron (g) para evidenciar las diferencias, lo mismo se hizo para el histograma de intensidades de los tres canales (h). Las plantas *ccd4* presentan una menor frecuencia de pixeles de baja intensidad comparado con *Col-0*.

En resumen, la mutante *ccd4* no tiene diferencias en el desarrollo ni morfológicas con respecto al ecotipo silvestre *Col-0*, ya que el análisis de la progresión del desarrollo *in vitro*, así como morfológico en sustrato, no reveló alguna variable morfológica que indique alguna diferencia en desarrollo y dimensiones. Sin embargo, este escenario es diferente cuando se analizan de manera aislada las hojas de estas plantas, ya que se observa que las hojas de *ccd4* tienen un índice de circularidad mayor que las de *Col-0*, indicándonos que son menos alargadas (Figura 37).

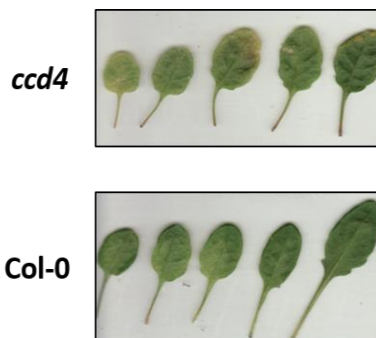
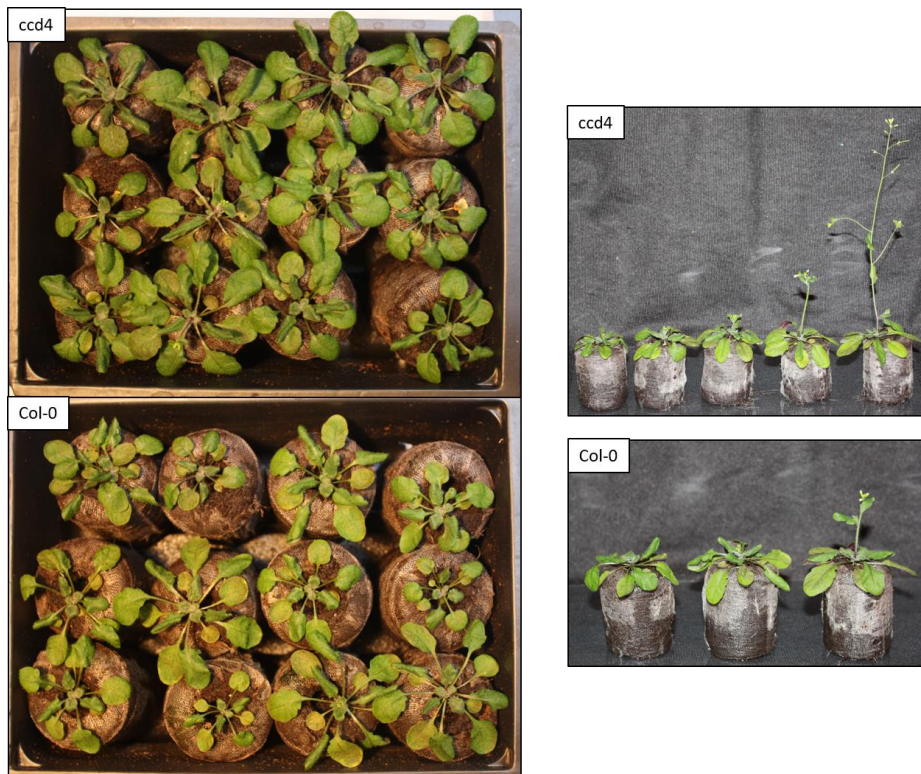


Figura 37. Diferencias morfológicas en plantas maduras de *ccd4* y *Col-0*.

La mutante *ccd4* parece no tener un fenotipo diferente al de *Col-0*, ya que al analizar el desarrollo en sustrato no se encontró alguna variable morfológica que indicara alguna diferencia en el desarrollo y dimensiones. Por otro lado, cuando se analizó cada hoja por separado, las hojas de *ccd4* tuvieron un índice de circularidad mayor que *Col-0*.

### *Efecto de la inhibición de la traducción en el cloroplasto sobre la morfología de la hoja en Col-0 y ccd4.*

Debido a que se ha reportado que la inhibición de la traducción en el cloroplasto, por antibióticos como: lincomicina y espectinomicina causa además de albinismo en plantas hojas con simetría radial (acicular), similar a la que se observa en la mutante *clb-5* (Meinke *et al.*, 2014), se decidió a hacer un análisis más detallado de dicho fenotipo usando el inhibidor lincomicina tanto en *Col-0* y compararlo con la mutante *ccd4*. La idea en general es que si dicho fenotipo está relacionado al que se observa en *clb5* entonces la falta de *CCD4*



podría revertir esta respuesta de manera semejante a lo que se observó para *clb5* (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014).

Estudios previos han reportado que plantas en presencia de lincomicina (300  $\mu\text{M}$ ) presentan un fenotipo de hoja parecido al de *clb5* (Meinke *et al.*, 2014; Tameshige *et al.*, 2013).

Inicialmente se decidió realizar un análisis de los fenotipos de plantas silvestres Col-0 en presencia de concentraciones crecientes de lincomicina, que van desde 50  $\mu\text{M}$  hasta 600  $\mu\text{M}$ , con la idea de definir la concentración mínima necesaria para generar dicho fenotipo. Cuando se analizaron los fenotipos de plantas Col-0 de 20 días crecidas *in vitro* observamos que conforme incrementó la concentración de lincomicina, también lo hace el porcentaje de plantas amarillas. A concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  predominan las plantas verdes, que bajo luz azul se observan rojas a consecuencia de la autofluorescencia de la clorofila (Figura 38). Por otro lado, el fenotipo de hojas aciculares o tipo dedo, aparece a partir de concentraciones de 200  $\mu\text{M}$ . En esta concentración también podemos encontrar plantas que no presentan el primer par de hojas en ningún momento tras los 20 días de observación *in vitro*, y que en este trabajo se denominan arrestadas. Otro fenotipo evidente fue el de aquellas plantas con hojas lanceoladas; es decir, con hojas angostas y alargadas. Resulta evidente que conforme se incrementa la concentración de lincomicina, también lo hace la proporción de plantas con hojas aciculares (simetría radial). Pero a las concentraciones de lincomicina ensayadas (hasta 300  $\mu\text{M}$ ) nunca es el fenotipo predominante (Figura 39).

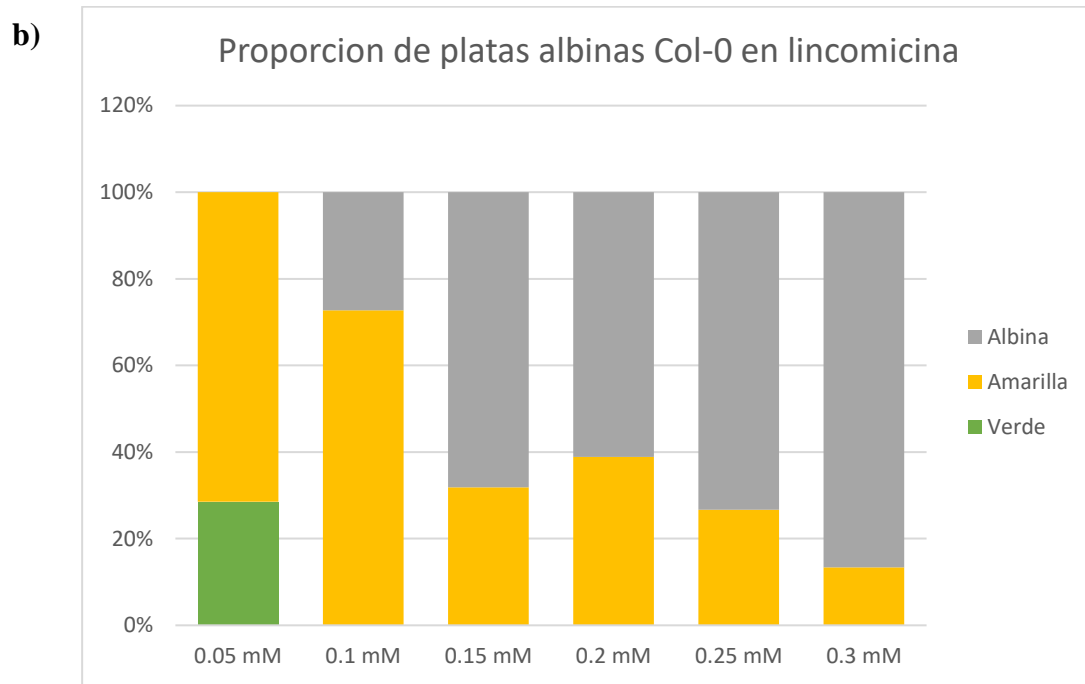
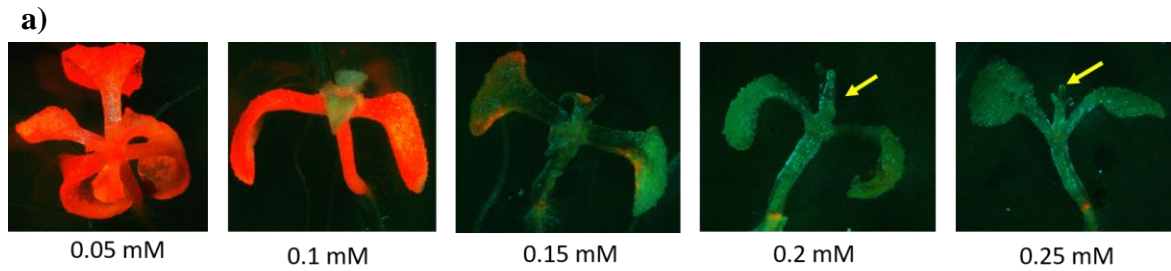


Figura 38. Fenotipos observados en plantas crecidas en lincomicina.

Fenotipos observados en plantas crecidas en lincomicina en las concentraciones: 0.05 mM, 0.1 mM, 0.15 mM, 0.2 mM, 0.25 mM y 0.3 mM (panel b). Conforme se incrementa la concentración también lo hace la proporción de plantas albinas, como lo evidencian las imágenes de autofluorescencia de la clorofila en rojo (panel a). Los ensayos se realizaron en plantas del ecotipo Columbia-0.

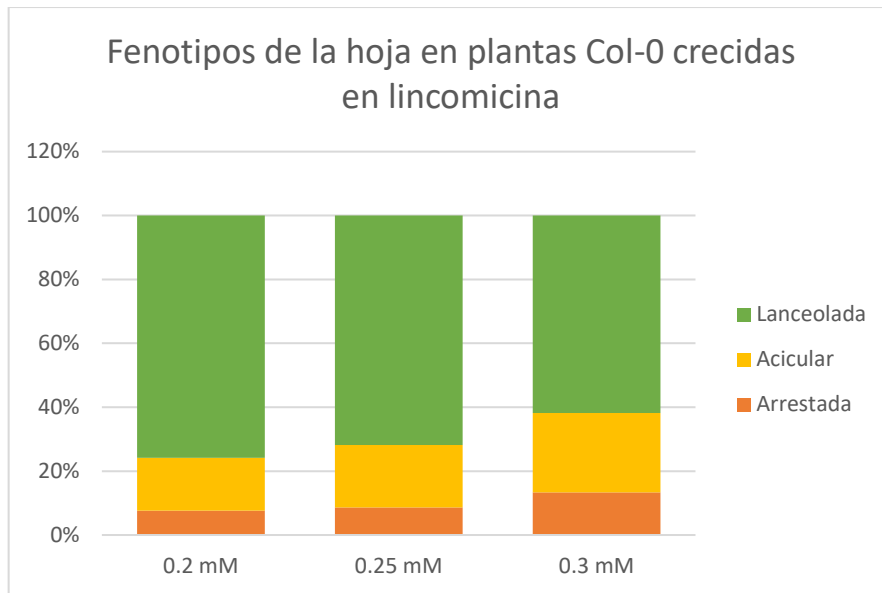


Figura 39. Proporción de fenotipos de hoja en plantas crecidas en lincomicina.

El fenotipo similar a *clb-5* aparece a partir de 0.2 mM y la proporción de individuos con tal fenotipo incrementa hasta la máxima concentración ensayada de 0.3 mM. Sin embargo, la presencia de hojas aciculares no es el fenotipo predominante cuando se usa este inhibidor.

De este análisis resulta evidente que la inhibición de la traducción en el cloroplasto genera fenotipos similares a *clb-5*, pero ello no implica que se trate del mismo mecanismo molecular. Debido al papel que CCD4 tiene en la generación de una señal que module el desarrollo de la hoja en la mutante *clb-5* (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014), se procedió a analizar si la ausencia de CCD4 afecta, de alguna manera, el fenotipo de la hoja que se observa cuando la traducción del cloroplasto es inhibida. En este análisis también se incluyó otro inhibidor (que al igual que la lincomicina bloquea la traducción plastídica), la espectinomomicina, que se usó a concentraciones de 100  $\mu$ M. Se analizó el fenotipo de la mutante *ccd4* comparado al fenotipo de su ecotipo silvestre (Meinke *et al.*, 2014). Los fenotipos en la hoja observados en Col-0 en presencia de los inhibidores lincomicina 300  $\mu$ M y espectinomomicina a 100  $\mu$ M (Meinke *et al.* 2014) también se observaron en la mutante *ccd4*. Con base en la cuantificación realizada con 811 plantas de *ccd4* y 114 de Col-0, no observamos diferencias en las proporciones de cada uno de los fenotipos entre los dos genotipos analizados (Figura 40).

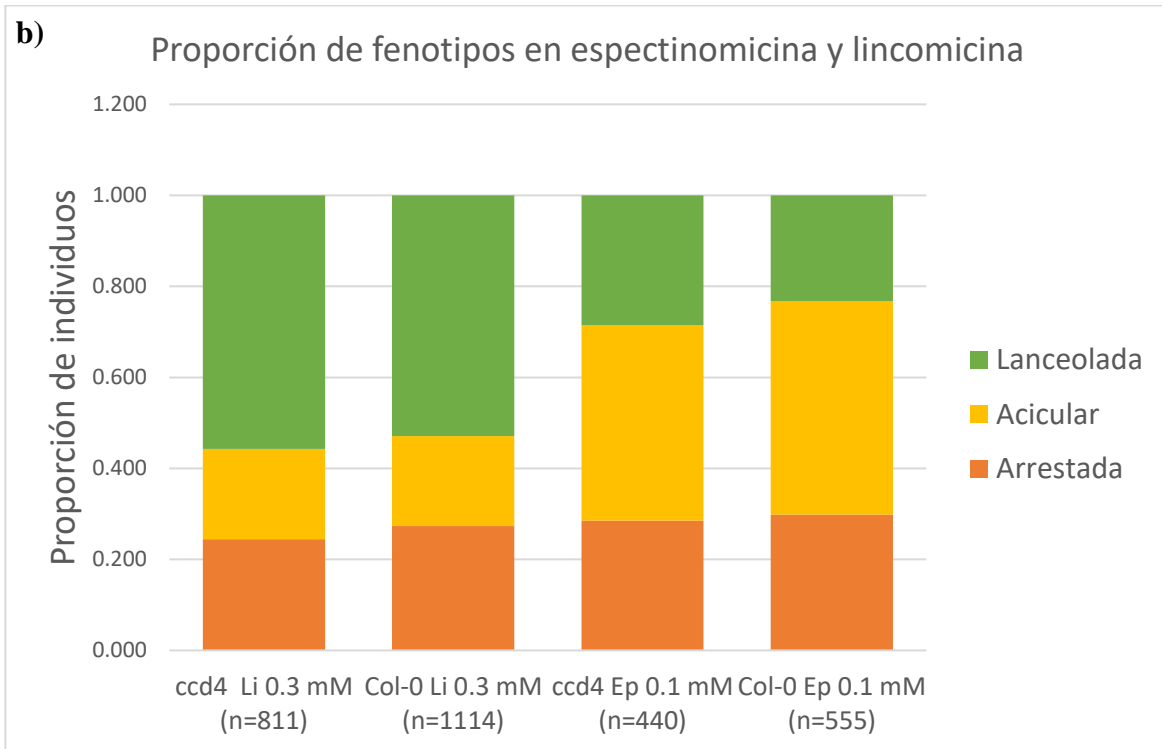
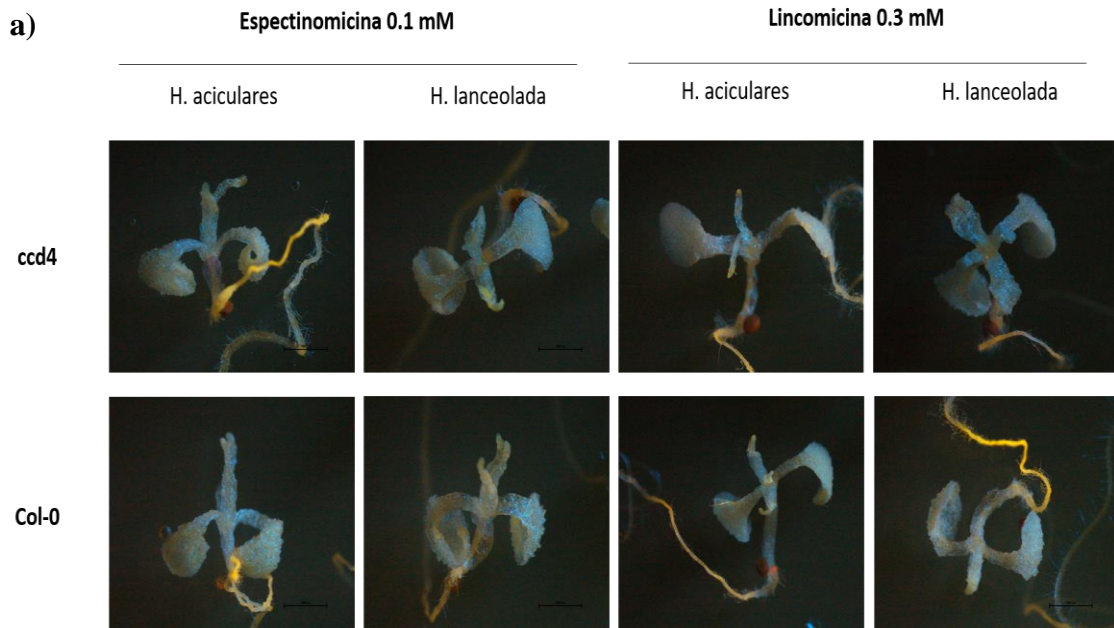
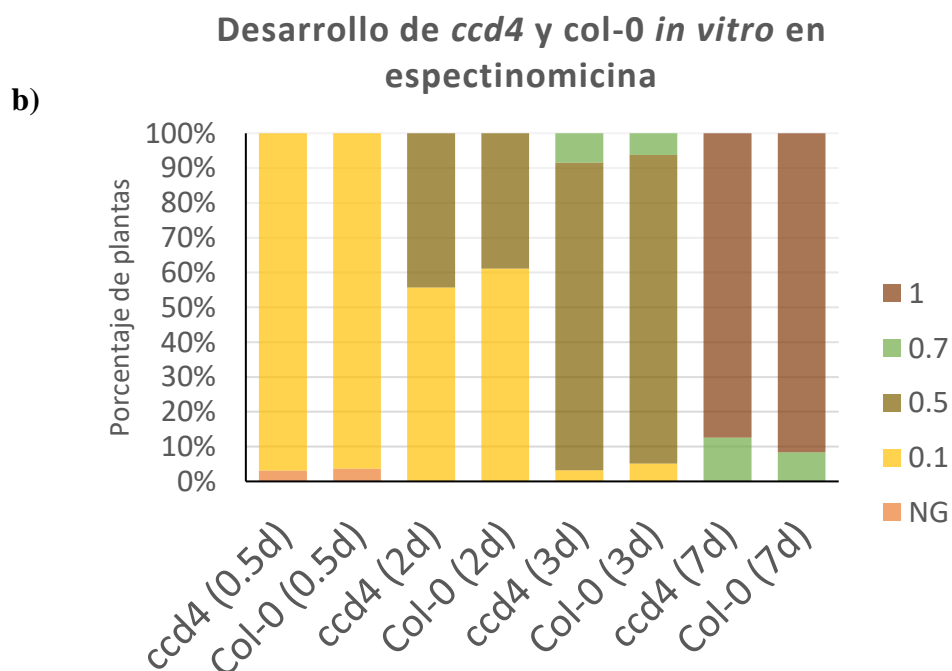
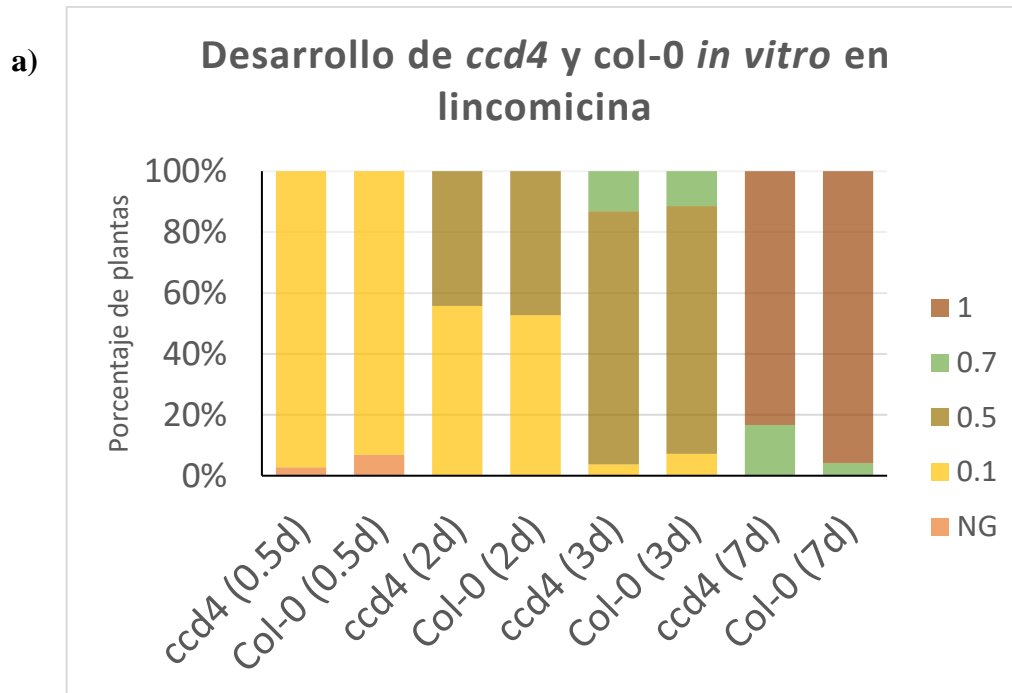


Figura 40. Proporción de fenotipos de la hoja de *ccd4* y *Col-0* en inhibidores de la traducción del cloroplasto.

Proporción de fenotipos de la hoja en los genotipos *ccd4* y *col-0* crecidas en espectinomicina 0.1 mM y lincomicina 0.3 mM. Las imágenes del panel a) muestran a plántulas con hojas aciculares o lanceoladas. Se puede apreciar, por la autofluorescencia de la clorofila, que se trata de plántulas casi albinas. El gráfico del panel b) muestra las diferencias en las proporciones de los fenotipos entre la mutante *ccd4* y *Col-0*. Podemos apreciar que no hay diferencias en las proporciones tanto en espectinomicina como en lincomicina.

Por otro lado, la progresión del desarrollo en presencia de Li 300  $\mu$ M y Ep 100  $\mu$ M se ve afectada de la misma manera tanto en Col-0 como en *ccd4*. Cuando se analiza la proporción de semillas en el estado de desarrollo 0.1 a las 12 horas de germinación en estos inhibidores, las diferencias no son significativas entre la mutante *ccd4* y las plantas silvestres con los dos inhibidores. La misma situación se puede observar a los 2, 3 y 7 días en los diferentes estados de desarrollo (Figura 41).



*Figura 41. Progresión del desarrollo de ccd4 y Col-0 en inhibidores de la traducción del cloroplasto.*

Se muestra la proporción de individuos en diferentes estados de desarrollo germinados en medio GM + Li0.3 (panel a)/ Ep 0.1(panel b). Los días de observación se encuentran en paréntesis, los estados de desarrollo van de NG (no germinación) a 1.0 (colores).

Sin embargo, el crecimiento de la mutante en los inhibidores de la traducción del cloroplasto: lincomicina y espectinomomicina, no muestra diferencias en la progresión del desarrollo para ambos genotipos y los fenotipos en ambas plantas se observan en las mismas proporciones.

## ***Sobreexpresión de CCD4***

La mutante *clb-5* presenta un fenotipo albino y acumulación de los carotenos  $\zeta$ -caroteno y fitoflueno. Adicionalmente al fenotipo albino, que también se observa en otras mutantes de la vía de biosíntesis de carotenos, *clb5* presenta hojas con simetría radial. De forma interesante la doble mutante *clb5 ccd4* restablece de manera parcial el fenotipo de la hoja al de plantas silvestres, indicando la participación de CCD4 en la generación de una señal (ACS1) responsable de modular el desarrollo de la hoja. Se ha hipotetizado que ACS1 es un apocaroteno que funciona como una señal retrograda (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Xin *et al.*, 2016). Debido a que las diferencias morfológicas entre la mutante *ccd4* y Col-0 no son muy conspicuas como se ha descrito, decidimos analizar los efectos causados por la expresión constitutiva de CCD4 como una manera adicional de explorar la relevancia biológica de ACS1. Con este fin se generaron plantas transgénicas con la construcción P<sub>35S</sub>::CCD4:FLAG para sobreexpresar CCD4, que contiene a la región codificante de CCD4 expresado a partir del promotor del virus de mosaico de la coliflor CaMV 35S y abanderada con el epitope FLAG (Figura suplementaria 2). Con este fin se clonó un fragmento correspondiente a CCD4 a partir de DNA genómico de *A. thaliana*, el cual fue recombinado al vector pDONR zeo. Esta construcción fue verificada tanto a través de PCR utilizando los oligonucleótidos M13 Fw y M13 Rv, así como por secuenciación. La construcción fue recombinada al plásmido binario pGWB11 y se usó para transformar a plantas *A. thaliana* Col-0, por infiltración de primordios foliares mediante *A. tumefaciens*. Se seleccionaron 35 líneas resistentes a higromicina de las cuales se obtuvo semilla correspondiente a la generación T1. Se analizó la segregación en las semillas de la generación T2 de doce de

dichas líneas (Tabla 3). Como puede observarse, corroboramos que 6 de dichas líneas presentaron una segregación que se ajusta a la presencia de un solo transgen (3:1), mientras que otras 3 tienen una segregación que se ajusta a 2 transgenes. Así mismo con el propósito de corroborar que dichas líneas fuesen sobreexpresoras de *CCD4*, se extrajo RNA total de las mismas 12 plántulas a los 15 DDE y los niveles de expresión del gen *CCD4* se analizaron mediante hibridación tipo *Northern blot*. Como se puede apreciar en la figura 42, de las 12 líneas analizadas, 11 presentan niveles aumentados de *CCD4* en comparación con los niveles que se observan en plantas silvestres, por lo que son sobreexpresoras. En este análisis también se observó la ausencia de transcrito de *CCD4* en la mutante *ccd4*, aún después de 36 horas de exposición, confirmando que se trata de una mutante *knockout*.

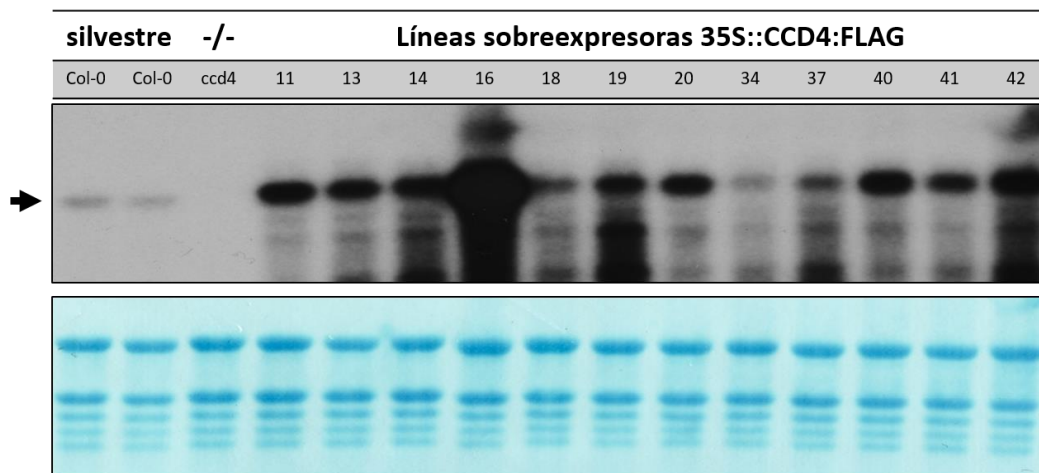


Figura 42. Northern blot para confirmar la sobreexpresión de *CCD4* en 12 líneas.

La señal en el genotipo silvestre (Col-0) es débil tras 36 horas de exposición comparada con la de las líneas sobreexpresoras. La mutante *ccd4* no presenta transcrito por lo que se trata de una mutante *knockout*.

Tabla 3. Segregación para una o dos inserciones de las líneas sobreexpresoras analizadas.

Línea	Observado		Esperado 3:1		valor P	Esperado 15:1		valor P
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente		Sensible	Resistente	
L20	34	85	29.75	89.25	0.3683	7.438	111.563	0.0000
L34	21	180	50.25	150.75	0.0000	12.563	188.438	0.0139
L11	17	220	59.25	177.75	0.0000	14.813	222.188	0.5572
L13	14	177	47.75	143.25	0.0000	11.938	179.063	0.5375
L14	117	88	51.25	153.75	0.0000	12.813	192.188	0.0000
L16	39	142	45.25	135.75	0.2833	11.313	169.688	0.0000
L18	51	159	52.5	157.5	0.8111	13.125	196.875	0.0000
L19	50	147	49.25	147.75	0.9018	12.313	184.688	0.0000
L37	46	166	53	159	0.2669	13.250	198.750	0.0000
L40	74	68	35.5	106.5	0.0000	8.875	133.125	0.0000
L41	44	118	40.5	121.5	0.5254	10.125	151.875	0.0000
L42	24	321	86.25	258.75	0.0000	21.563	323.438	0.5877

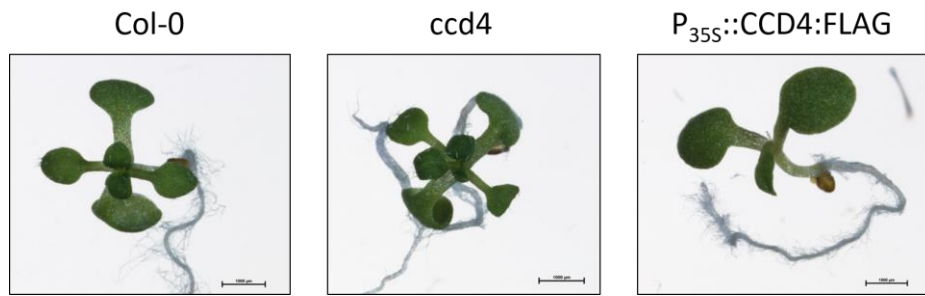
Las líneas que presentan una inserción se marcan en amarillo.  $P > 0.05$ .

### Fenotipo de las líneas sobreexpresoras de CCD4

Al analizar el fenotipo de las plantas sobreexpresoras se encontró que en varias de estas líneas se presentan afectaciones morfológicas evidentes, que incluyen defectos en los cotiledones y en las hojas de roseta de plantas crecidas *in vitro*. En todo caso, no se trata de un fenotipo único si no que observamos diferentes grados de afectación (Figura 43). Cuando estas líneas son crecidas en sustrato las plantas presentan un mayor número de hojas de roseta en comparación con plantas Col-0 silvestres; así mismo, los brotes florales aparecen en mayor número y se observan muy temprano en el desarrollo (Figura 44).



a)



b)

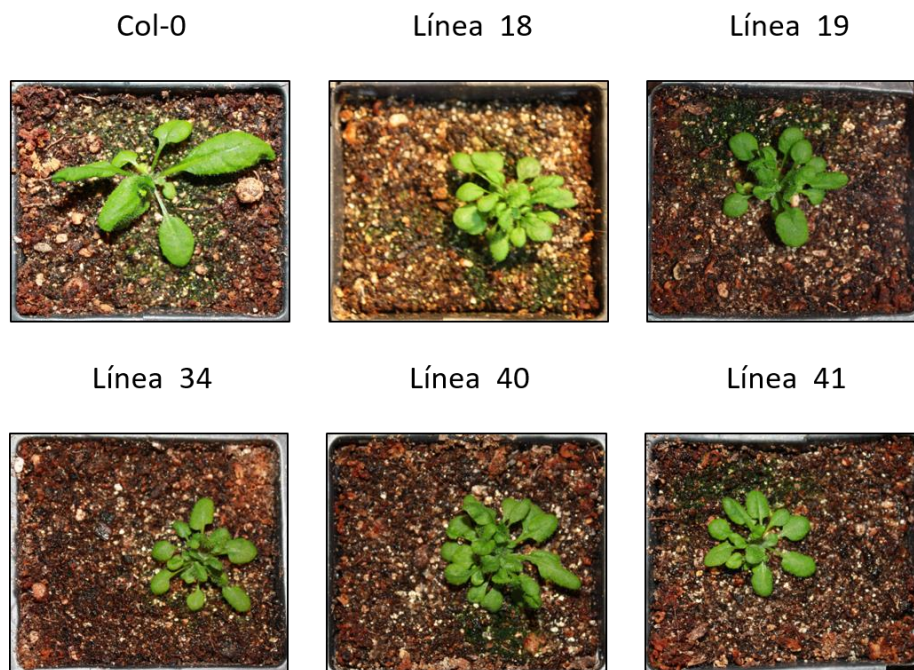


Figura 43. Fenotipo de las líneas sobreexpresoras de CCD4.

El panel a) muestra a plantas *in vitro* correspondientes a Col-0, *ccd4* y una de las líneas sobreexpresoras, la morfología es característica y se pueden apreciar los defectos en la morfología de la hoja. El panel b) muestra la morfología de línea sobreexpresoras en sustrato que en todos los casos poseen un mayor número de hojas de roseta, mismas que son más pequeñas.

Conforme estas líneas transgénicas progresan en su desarrollo, puede observarse la presencia de un mayor número de brotes florales comparado con plantas Col-0 silvestres, también es claro que estas líneas presentan un desarrollo más lento que Col-0 (Figura 44). Este desarrollo más lento no implica que las plantas sobreexpresoras no alcanzan las dimensiones de Col-0, aunque en los casos más afectados suelen permanecer con una roseta pequeña y brotes florales cortos.

EL presente análisis morfológico dista de ser completo, pero arroja resultados interesantes sobre la participación de CCD4 en la generación de una señal que modula el desarrollo de la hoja.

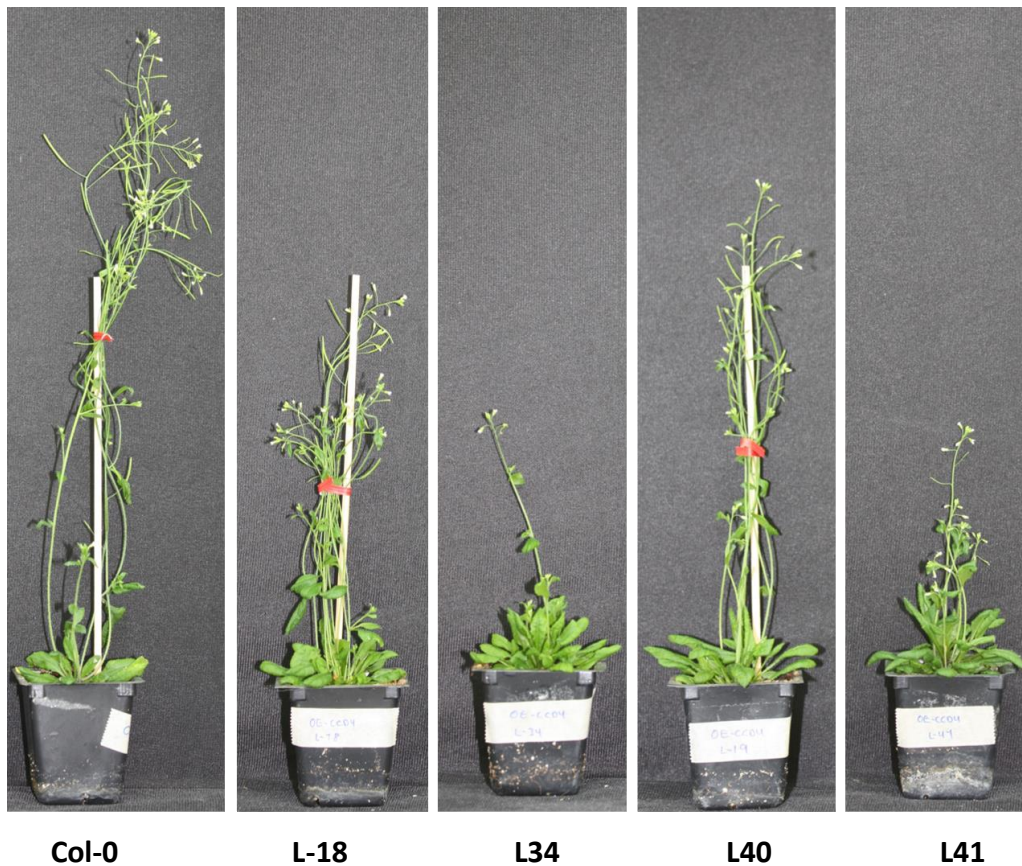


Figura 44. líneas sobreexpresoras de CCD4 en etapa reproductiva.

Las líneas sobreexpresoras de CCD4 presentan un fenotipo característico. En contraste con Col-0, el número de hojas de roseta es mayor y presentan más brotes florales. Aunque su desarrollo es más lento que Col-0, en los casos menos afectados alcanzan las dimensiones de una planta silvestre.

## Discusión

Los carotenos son isoprenoides lipofílicos que constituyen una gran variedad de pigmentos, sus capacidades de absorción de luz proveen de los colores amarillo, naranja y rojo que observamos en las plantas. En los tejidos fotosintéticos la acumulación de carotenos es de gran importancia para la absorción del exceso de luz y para hacer frente a las especies reactivas de oxígeno que se generan. Estos compuestos también son precursores de hormonas y moléculas señalizadoras como los apocarotenos. A pesar de que en años

recientes la identificación de apocarotenos con funciones señalizadoras se ha incrementado de manera importante, aún faltan múltiples señales por descubrir que permitirán entender tanto aspectos de desarrollo como de respuestas medio ambientales centrales para las plantas (McQuinn *et al.*, 2015).

Los apocarotenos son moléculas más solubles y volátiles que los carotenos y su formación puede ocurrir por vía enzimática y no enzimática (Havaux 2014). Los apocarotenos participan en la regulación de la carotenogénesis (Cazzonelli y Pogson 2010), desarrollo de la planta y respuestas ambientales mediante señalización retrograda (Pogson *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2015; Chan *et al.*, 2015). La producción de apocarotenos por vía enzimática requiere de una clase de enzimas denominadas Dioxigenasas de Escisión de Carotenos (CCDs). En *A. thaliana* existen nueve de dichas enzimas y se dividen en: NCEDs, que consta de cinco miembros, son específicas para la producción de ABA y tienen un sustrato específico (Walter *et al.*, 2010). El resto, denominadas simplemente CCDs, son más inespecíficas, lo que ha complicado el estudio de los apocarotenos generados por estas, así como el momento durante el desarrollo en el que actúan. Tal vez el ejemplo más reciente es el papel que CCD7 y CCD8 tienen en la biosíntesis de estrigolactona, el cual llevó más de 10 años para poderse entender (Booker *et al.*, 2004; Auldridge *et al.*, 2006).

Los datos acumulados a partir del estudio de la mutante *clb5* por nuestro grupo apoyan la existencia de una señal retrógrada novedosa, que se ha denominado ACS1 (Hou *et al.*, 2016) y es generada a partir de carotenos lineales (fitoflueno y  $\zeta$ -caroteno). La señal ACS1 tiene una función durante el desarrollo de estructuras foliares en plantas. Tanto identificar dicha señal y su mecanismo de acción como entender su función durante el desarrollo normal de la planta, son preguntas centrales y de interés. Análisis genéticos han implicado la participación de la dioxigenasa CCD4 en la generación de dicha señal, demostrando que ACS1 es un apocaroteno (Avenidaño-Vázquez *et al.*, 2014). El hecho de que la doble mutante *clb-5 ccd4* presente una recuperación del fenotipo de la hoja; nos hace cuestionarnos, en primera instancia, ¿cuándo y en qué momento del desarrollo se produce ACS1 en un fondo genético silvestre y en condiciones normales de crecimiento?

Debido a que ha resultado complicado detectar, por nuestro grupo y colaboradores, la identidad de ACS1 (datos no publicados), otra estrategia es estudiar el patrón de expresión

de los genes que codifican a proteínas involucradas en su síntesis, para así poner en contexto la relevancia funcional y fisiológica que podría tener ACS1 en un momento del desarrollo y/o en un tejido específico. Por lo tanto, el análisis del patrón de expresión de *CCD4* realizado en el presente trabajo nos permite explorar cuándo y en qué momento del desarrollo se expresa *CCD4* a nivel de órgano y tejidos, y compararlo con aquel de las enzimas de la vía de carotenos *PDS3* y *ZDS*, que son las directamente responsables de su síntesis. De esta manera podemos poner en contexto a *CCD4* y explorar la relación que existe entre estas enzimas, en términos de disponibilidad de sustrato, en los diferentes órganos y momentos del desarrollo. Hipotéticamente la señal ACS1 se generaría en lugares donde existiera una baja o nula expresión de *ZDS* y donde se expresarían tanto *PDS3* como *CCD4*.

Con este trabajo confirmamos que *CCD4* se expresa en los estados tempranos de desarrollo y particularmente en el primordio foliar, pero un aspecto que resulta interesante es que su expresión no es de forma homogénea. La expresión de *CCD4* en hojas jóvenes inicia en el extremo distal y conforme la hoja madura su expresión avanza hacia la base de la lámina foliar. Este patrón de expresión es similar al que se observa para los genes *ZDS* y *PDS3*, que codifican a enzimas involucradas en la síntesis de carotenos. Sin embargo, una diferencia importante es que *CCD4* se expresa mayoritariamente en los haces vasculares al igual que *PDS3*. Por lo tanto, durante el desarrollo de la hoja existen claros gradientes en los niveles de expresión de *CCD4* y *ZDS*. Aunque hasta ahora el patrón de expresión de *PDS3*, *ZDS* y *CCD4* resulta similar, tanto espacial como temporalmente, aún falta explorar los estados más tempranos del desarrollo de la hoja en el SAM, este es un aspecto que está pendiente de analizar en el futuro. En hojas maduras y caulinares la expresión de *CCD4* parece inducirse a consecuencia de daño físico, pero resulta interesante la ausencia de su expresión en hojas maduras. En contraste la expresión de *ZDS* y *PDS3* en hojas caulinares es mayor comparada con *CCD4*, aunque también parece ser inducida por daño. En este estudio quizás como consecuencia de la manipulación.

Por otro lado, la expresión de *CCD4* como *ZDS* y *PDS3* en los órganos florales es clara. Estas enzimas presentan un patrón similar de expresión en los sépalos al observado en las hojas jóvenes, con *CCD4* predominantemente expresado en los haces vasculares. Sin embargo y

de manera interesante, *CCD4* también se expresa en los haces vasculares de los pétalos y en el haz vascular de los estambres, donde no se observa la expresión de *ZDS*. El estudio preliminar del patrón de expresión de *CCD4* en plantas transgénicas con una fusión traduccional, que además de la región regulatoria incluye a la proteína *CCD4* ( $P_{CCD4}::CCD4:GUS$ ). Llama la atención que el patrón de expresión en pétalos es claramente diferente, ya que existe una reducción de los niveles de expresión, en contraste con el observado con la fusión transcripcional  $P_{CCD4}::GUS$ . Este resultado concuerda con el hecho de que se ha reportado que la proteína *CCD4* tiene una alta tasa de recambio durante el crecimiento de la hoja (Li *et al.*, 2017). El patrón de expresión reportado en el presente trabajo está basado primordialmente en la región regulatoria del gen de *CCD4*, pero no de la acumulación de la enzima correspondiente. Las diferencias observadas en el patrón de expresión en los pétalos, de las construcciones mencionadas, nos llevan a cuestionarnos si, a pesar de las similitudes en los patrones con *ZDS* y *PDS3* existen lugares que podrían ser sitios para la síntesis de ACS1 debido a diferencias en la acumulación de la proteína de *CCD4*. Por lo tanto, explorar con más detenimiento el proceso de morfogénesis foliar y floral tomando en cuenta la acumulación de la proteína es otro aspecto de interés para el futuro.

Basados en el patrón de expresión observado para *CCD4*, *ZDS* y *PDS3*, podemos plantear nuevos experimentos para seguir explorando la participación de *CCD4* en la modulación del desarrollo de la hoja o de otras estructuras foliares. También es importante resaltar que las construcciones con las que contamos hasta el momento para *PDS3* y *ZDS*, corresponden a fusiones traduccionales que incluyen a la región codificante ( $P_{PDS3}::PDS3:GUS$ ,  $P_{ZDS}::ZDS:GUS$ ). Desafortunadamente una fusión equivalente para *CCD4* no se logró obtener durante el tiempo que comprendió el presente estudio y nuestros análisis corresponden a una fusión transcripcional del promotor de *CCD4* a *GUS* ( $P_{CCD4}::GUS$ ), creemos que llevar a cabo un análisis detallado de la expresión de *CCD4* con una fusión traduccional es importante para poder asegurar que el patrón de expresión observado realmente corresponda a la acumulación de la proteína endógena. Por otro lado, hasta ahora nuestro análisis se ha limitado a usar el reportero *GUS*, pero el utilizar reporteros como *GFP* podría permitir un análisis más fino a nivel de diferentes capas celulares. Más aún, la localización subcelular no se puede explorar con *GUS*, por lo que generar fusiones traduccionales con el gen reportero de la proteína verde fluorescente (*GFP*) también resulta importante en este

sentido. En este trabajo se generó la fusión traduccional de *CCD4* y GFP ( $P_{CCD4}::CCD4:GFP$ ) y pudimos corroborar su localización en los plástidos, pero usando un sistema transitorio heterólogo en tabaco. Aunque dicha localización ya se había reportado (Rottet *et al.*, 2016), la relevancia de contar con plantas transgénicas que contienen esta construcción radica en que se podrá explorar dicha localización en diversas condiciones y tejidos, por ejemplo, con el uso de inhibidores de la traducción del plástido. Lo anterior se podrá comparar con el de *PDS3* y *ZDS* para explorar si la disponibilidad de metabolitos es consecuencia de cambios en la localización de *ZDS*, *PDS3* y *CCD4* a raíz de la inhibición de la traducción en el cloroplasto, pues es bastante interesante cómo al afectar este proceso se generan fenotipos similares a *clb5*.

Otro de los aspectos relevantes de este trabajo fue un análisis detallado del fenotipo de la mutante *ccd4*, el cual estuvo particularmente enfocado a aspectos morfológicos de las hojas y aspectos generales del desarrollo. Los parámetros analizados demuestran que no existe un fenotipo característico evidente en la progresión del desarrollo, en condiciones estándar de crecimiento tanto *in vitro* como en invernadero, para esta mutante. Sin embargo, existen diferencias claras en la morfología de la hoja de la mutante, ya que estas son más circulares en comparación con las plantas silvestres. Previamente se ha reportado que *CCD4* es un regulador negativo del contenido de  $\beta$ -carotenos durante la etapa de desecación de la semilla, así como en el catabolismo de carotenos durante la senescencia inducida por oscuridad en *A. thaliana* (González-Jorge *et al.*, 2013; Rottet *et al.*, 2016; Bhuiyan *et al.*, 2017). Pero hasta este trabajo no se había reportado un fenotipo a nivel de morfología de la hoja. Este fenotipo, aunque sutil, es claro, y es consistente con la hipótesis de que *CCD4* participa en aspectos relacionados con el desarrollo de estructuras foliares. En el futuro resultará bastante interesante analizar este fenotipo en diversas condiciones de crecimiento y contrastarlo con un análisis detallado de plantas sobreexpresoras de *CCD4*.

Resulta importante considerar que, debido a que las CCDs son promiscuas en cuanto a su afinidad por un sustrato, una redundancia parcial de funciones entre las CCDs pudiese ser causa de la falta de un fenotipo más evidente en la mutante *ccd4* y tal vez el análisis de dobles mutantes con algunas otras CCDs como *CCD7* o *CCD8* podría ser interesante en un futuro. Otro aspecto que también pudiera influir en contar con un fenotipo más claro en la

mutante *ccd4*, es que en algunos casos la escisión de carotenos puede ser realizada por luz u  $^1\text{O}_2$ , aunque en general de manera mucho menos eficiente que por las CCDs. Hasta el momento las condiciones analizadas corresponden predominantemente a la progresión del desarrollo en condiciones estándar, pero aún hace falta ampliar otros aspectos tanto de la morfología de las hojas, como por ejemplo la estructura de la red de haces vasculares, así como crecer a la mutante en condiciones diferentes y ver si el fenotipo detectado es exacerbado por algún tipo de estrés tales como: osmótico, cantidad de luz y fotoperiodo, que nos pudieran revelar fenotipos adicionales.

Este estudio también mostró que plantas sobreexpresoras de *CCD4* presentan diversos defectos en el desarrollo, incluyendo las hojas. De especial interés se encuentran diversos defectos en la forma de las hojas, muchas de ellas sumamente alargadas o deformes. Estos resultados también apoyan la participación de esta enzima en el desarrollo. El hecho de que observemos defectos morfológicos semejantes en líneas independientes apoya el papel que *CCD4* pudiera tener en la generación de ACS1 y este a su vez en la modulación del desarrollo de la planta. Tal fenotipo no se ha reportado antes para líneas sobreexpresoras de *CCD4* (Rottet *et al.*, 2016). Cabe mencionar que algunos de los fenotipos que hemos observado en éstas sobreexpresoras como un mayor número de hojas y escapos, recuerdan al fenotipo de la mutante *max3 (ccd7)*, involucrada en la biosíntesis de estrigolactonas y que participa en la ramificación en plantas (Booker *et al.*, 2004; Auldridge *et al.*, 2006). Estos resultados podrían ser explicados por una posible competencia por el sustrato entre *CCD4* y *CCD7* que pudiere dar como resultado bajos niveles de estrigolactona y en consecuencia un fenotipo similar a la mutante *max3*. Para descartar esta posibilidad serán necesarios experimentos que involucren tratamientos con estrigolactona. Sin embargo, cabe remarcar una vez más que el fenotipo de las líneas sobreexpresoras de *CCD4* no es exactamente el mismo que *max3* ya que ésta última no afecta la morfología de la hoja.

Como ya se ha mencionado, estudios previos han mostrado que la afectación en la expresión de genes plastídicos en diferentes niveles conduce a defectos en la morfología de la hoja y la identidad abaxial/adaxial (Tiller y Bock 2014). En particular se sabe que la inhibición de la traducción del plástido, con lincomicina o espectinomycin, genera plantas albinas y con hojas aciculares, afectadas en la polaridad abaxial/adaxial; semejantes a las que se observan con *clb5* (Tameshige *et al.*, 2013). Por lo tanto, era de interés determinar si

el patrón de expresión de *CCD4*, *ZDS* o *PDS3* se afecta en respuesta a la inhibición de la traducción del plástido. Hemos observado que en plantas tratadas con lincomicina o espectinomicina, ocurre expresión alterada de *CCD4*, *PDS3* y *ZDS* localizándose desde la base hasta la punta de las hojas aciculares observadas en tratamiento, aunque el nivel de la expresión de los diferentes genes aún no ha sido cuantificado. Se ha reportado que la modulación de la traducción en el cloroplasto tiene efectos en el establecimiento de la polaridad abaxial/adaxial y mutantes en proteínas del ribosoma del cloroplasto muestran defectos en la morfología de la hoja (Tiller y Bock 2014) e incrementan aquellos observados en mutantes del desarrollo de la hoja como *asymmetric leaves1 (AS1)* y *AS2* (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2015). También se sabe que esta inhibición de la traducción y mutantes en proteínas de ribosoma causan expresión ectópica de diversos genes y afectan a la respuesta a auxinas (Zheng *et al.*, 2016). Todos estos ejemplos apoyan una vez más el papel central que tiene el cloroplasto en el desarrollo de órganos foliares y abren un campo de interés para futuros análisis. Por lo tanto, realizar estudios más detallados de la posible similitud o diferencias entre este fenómeno y ACS1 es un aspecto que requerirá sin duda estudios más detallados que podrán realizarse tomando varios de los materiales generados en este trabajo.

En el presente trabajo también se analizó la relación entre el fenotipo de la mutante *clb5* y el generado por la inhibición de la traducción plastídica. A este respecto, basados en el crecimiento y los fenotipos de la hoja de la mutante *ccd4* en presencia de los inhibidores de la traducción (lincomicina o espectinomicina), concluimos que *CCD4* no media en dicha respuesta y apoya que la inhibición de la traducción en el cloroplasto, y la señal ACS1, parecen ser diferentes o bien, que existe una relación compleja entre estas vías de señalización retrograda. Algunos posibles escenarios que nos podríamos plantear para explicar los resultados son: si la señal generada por *CCD4* y la inhibición de la traducción en el cloroplasto impactan el mismo aspecto del desarrollo de la hoja, entonces la producción de esta señal por *CCD4* debe de estar río-arriba en la vía de señalización que afectaría la expresión de genes plastídicos (Figura 45). Por lo tanto, ACS1 podría causar la inhibición de la traducción en el cloroplasto y esto desencadenaría otra señal que afectara la expresión nuclear de genes del desarrollo de la hoja. En otro escenario, la señal de *clb-5* podría inhibir a la traducción en el cloroplasto a través de la modulación de genes nucleares involucrados



en este proceso. En un tercer escenario, ambas vías podrían no estar relacionadas, pero afectar el mismo proceso.

Los estudios sobre CCD4 han demostrado que se trata de una enzima con diferente afinidad por diversos carotenos, dependiendo de la especie. Así, por ejemplo, *CitCCD4* en cítricos contribuye a la biosíntesis de  $\beta$ -citraurina, con especificidad por  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina en los dobles enlaces C7, C8 o C7', C8' (Ma G. *et al.*, 2013). En crisantemo *CmCCD4* y *BnCCD4* contribuyen al color blanco de la flor al metabolizar a diversos carotenos en compuestos sin color (Ohmiya *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015). También se ha reportado que *CsCCD4*, *CmCCD4* y *MdCCD4* pueden tener como sustrato al  $\beta$ -caroteno para producir  $\beta$ -ionona al cortar en C9, C10 y C9', C10' (Rubio *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009). Pero en otras especies cataboliza al licopeno cortando en los dobles enlaces C5, C6 y C5', C6 (Lashbrooke *et al.*, 2013). Lo anterior solo refleja la promiscuidad de las CCDs y en particular de *CCD4*. Cabe mencionar que en ninguno de estos casos se ha reportado que los productos de *CCD4* en planta tengan algún efecto en el desarrollo, por lo que éste trabajo contribuye a revelar una función novedosa para esta enzima.

Trabajos previos han reportado que *CCD4* no tiene como sustrato al  $\zeta$ -caroteno, tanto en bacterias (Huang *et al.*, 2009) como *in vitro* (Bruno *et al.*, 2016). Mediante modelado dinámico y análisis *in vitro*, se ha especulado que *CCD4* posee una afinidad estricta de corte por los dobles enlaces C9-C10 en carotenos C40 monocíclicos o bicíclicos, requiriendo de al menos un anillo de ionona y siendo específica para todo-*trans*-carotenos, lo que descarta su participación en la biosíntesis de ABA o SL (Bruno *et al.*, 2014; 2016). *CCD4* es capaz de producir todo-*trans*- $\beta$ -apo-10'-carotenal y -3-OH- $\beta$ -apo-10'-carotenal a partir de carotenos bicíclicos. El todo-*trans*- $\beta$ -apo-10'-carotenal es precursor de  $\beta$ -apo-13-carotenona, la cual tiene una función regulatoria afectando el crecimiento de raíces en *A. thaliana* y desencadena la síntesis de IAA en *Tricholoma vaccinum* (Wagner *et al.*, 2016). Si este es el caso, el fenotipo observado podría ser consecuencia de la alteración en los niveles de auxinas. Sin embargo, nuestros datos *in vivo* apoyan la idea de que *CCD4* toma como sustratos carotenos lineales como el  $\zeta$ -caroteno. Sin duda estudios adicionales se requieren para poder esclarecer esta aparente contradicción.

Se ha demostrado que CCD4 se localiza en los plastoglóbulos, estructuras de monocapa lipídicas presentes en todos los plástidos (Ytterberg *et al.*, 2006), donde participa en el catabolismo de carotenos, particularmente de  $\beta$ -caroteno durante la senescencia. En los plastoglóbulos los carotenos están accesibles a CCD4 gracias a la degradación de los complejos fotosintéticos; a los cuales los carotenos se encuentran normalmente asociados (Rottet *et al.*, 2016). También se ha correlacionado a CCD4 con la formación de apocarotenos C13 glicosilados producidos en plantas sobreexpresoras de PSY (Lätari *et al.*, 2015) y como hemos dicho en la generación de un apocaroteno (ACS1) responsable de modular el desarrollo de la hoja (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014).

Resulta evidente que CCD4 tiene un papel importante en el catabolismo de carotenos y que su actividad podría concentrarse en los plastoglóbulos en condiciones normales. Los defectos observados en las líneas sobreexpresoras aquí analizadas podrían ser reflejo de la producción de compuestos por CCD4 en momentos del desarrollo en el que naturalmente no ocurren, o están presentes en concentraciones muy pequeñas o incluso en lugares diferentes a plastoglóbulos. Si tomamos en cuenta que *CCD4* no se expresa en la hoja joven, y está fuertemente expresado en los haces vasculares, una expresión constitutiva podría tener como consecuencia la generación de apocarotenos con funciones señalizadoras como se especula para ACS1, y esto afectaría el SAM produciendo alteraciones como las aquí observadas. Sin embargo, aún es necesario hacer un análisis morfológico y molecular más detallado de las líneas sobreexpresoras para entender las verdaderas razones por las que se produce la diversidad de los fenotipos observados.

## Modelo

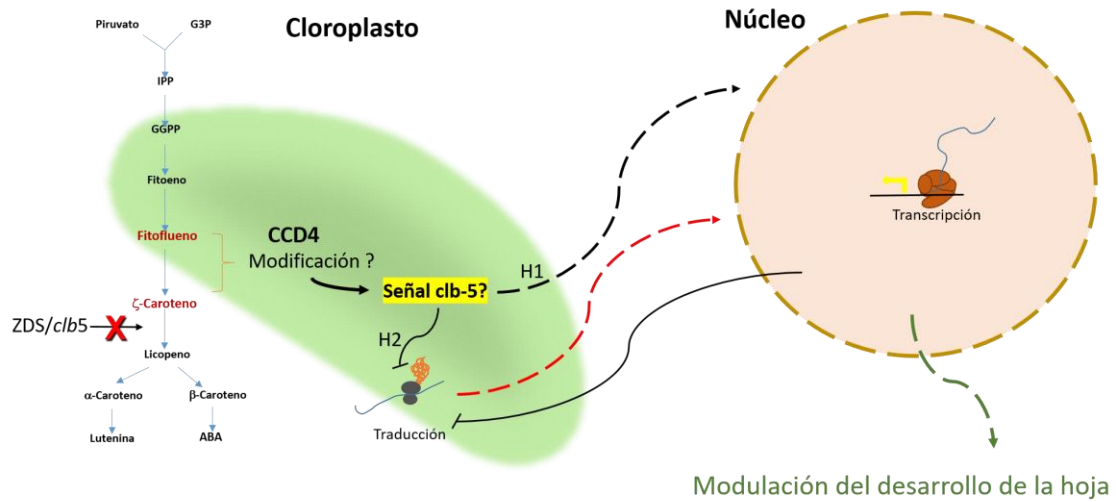


Figura 45. Modelo propuesto en este trabajo.

La inhibición de la traducción en el cloroplasto y la señal producida en la mutante *clb-5* (denominada ACS1) afectan el desarrollo de la hoja. Sin embargo, los procesos podrían no estar relacionados. Si las vías se relacionan de alguna forma, CCD4 está río-arriba en la vía y la señal producida podría afectar a traducción en el cloroplasto, ya sea directamente o a través de la modulación de la expresión de genes nucleares.

## Conclusiones y perspectivas

Del presente trabajo se puede concluir que el patrón de expresión de *CCD4* es similar a aquel de los genes de la vía de biosíntesis de carotenos: *PDS3* y *ZDS*, pues su expresión comienza en el extremo distal y conforme la hoja crece, la expresión se extiende hacia la zona proximal. Sin embargo, el patrón de *CCD4* es característico ya que se concentra en los haces vasculares, situación que no ocurre en el caso de *PDS3* y *ZDS*, pues en estos casos la expresión es uniforme en haces vasculares y areolas. En el futuro es importante analizar el patrón de expresión de estos genes en el SAM y primordios foliares. En los órganos florales, la expresión de *CCD4* es marcadamente diferente a la de *ZDS*, especialmente en los pétalos, donde *CCD4* se expresa en los haces vasculares, no así *ZDS*. Al igual que en el SAM, se debe realizar un estudio detallado del meristemo floral y estados tempranos del desarrollo de la hoja.

De manera interesante, el patrón de *CCD4* observado en plantas transgénicas con  $P_{CCD4}::GUS$  es muy diferente al de plantas con la construcción  $P_{CCD4}::CCD4:GUS$  en órganos florales, pues la tinción de GUS indica menor actividad en aquellas plantas transgénicas con la fusión  $P_{CCD4}::CCD4:GUS$ . Por lo anterior, será muy importante una analizar del patrón en el SAM y hojas jóvenes de plantas transgénicas con la fusión  $P_{CCD4}::CCD4:GUS$ .

Otro aspecto relevante de este estudio fue la caracterización morfológica de la mutante *ccd4*, para la cual no se había reportado fenotipo. Dicha mutante es morfológicamente similar a la planta silvestre con excepción de que el índice de circularidad de las hojas es mayor al observado en la planta silvestre, lo que significa que sus hojas son más circulares, por lo que *CCD4* si tiene un papel en el desarrollo de la hoja en plantas silvestres. Por otro lado, aún es necesario explorar los efectos morfológicos y metabólicos que tiene la mutación de *ccd4* en plantas en estado reproductivo, particularmente en órganos florales. También es necesario extender el análisis a plantas senescentes para estudiar los efectos en la degradación de carotenos, papel en el que se ha involucrado a *CCD4*.

El fenotipo observado de las plantas sobreexpresoras de *CCD4* está ligado a defectos en el desarrollo, los defectos morfológicos en cotiledones y hojas nos reafirman el papel de *CCD4* en la generación de ACS1, pero aún es necesario confirmar los niveles de proteína en estas

líneas sobreexpresoras. Así mismo, es importante generar líneas homocigotas sobreexpresoras y llevar a cabo un análisis morfológico detallado de la hoja y del SAM comparado con el de la mutante y silvestre. También es necesario crecer a estas plantas en diferentes condiciones de luz y temperatura para analizar los fenotipos si tal es el caso. Será importante analizar el patrón de expresión de genes involucrados en el mantenimiento de SAM y desarrollo de la hoja, aunado a genes expresados ectópicamente en la mutante *clb5*.

# Referencias

- Abdi H., Williams L.J. (2010). *Computational Statistics*. 2(4): 433-459.
- Adhikari N.D., Froehlich J.E., Strand D.D., Buck S.M., Kramer D.M., Larkin R.M., (2011). *Plant Cell* 23:1449–67.
- Ahrazem O., Trapero A., Dolores-Gómez M., Rubio-Moraga A., Gómez-Gómez L. (2010). *Genomics*. 96:239-250.
- Alder A., Jamil M., Marzorati M., Bruno M., Vermathen M., Bigler P., Ghisla S., Bouwmeester H., Beyer P., Al-Babili S. (2012). *Science*. 335(6074):1348-1351.
- Andriankaja M.E., Danisman S., Mignolet-Spruyt L.F., Claeys H., Kochanke I., Vermeersch M., De Milde L., De Bodt S., Storme V., Skiryzc A., Maurer F., Bauer P., Mühlenbock P., Van Breusegem F., Angenent G.C., Immink R.G., Inzé D. (2014). *Plant Molecular Biology*. 85(3):233-245.
- Arango J., Wüst F., Beyer P., Welsch R. (2014). *Planta*. 232:1251-1262.
- Auldridge M.E., McCarty D.R., Klee H.J. (2006). *Current Opinion in Plant Biology*. 9:315-321.
- Avendaño-Vázquez A.O., Córdoba E., Llamas E., San Román C., Nisar N., De la Torre S., Ramos-Vega M., Gutiérrez-Nava M., Cazzonelli C. I., Pogson B.J., León P. (2014). *The Plant Cell*. 26:2524-2537.
- Barkoulas M., Galinha C., Grigg S.P., Tsiantis M. (2007). *Current Opinion in Plant Biology*. 10:660-666.
- Baylis T., Cierlik I., Sundberg E., Mattsson J. (2013). *New Phytologist*. 197(3):737-750.
- Bennett T. (2015). *Trends in Plant Science*. 20(8):498-505.
- Blanco N.E., Guinea-Díaz M., Whelan J., Strand A. (2014). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biological Sciences*. 369(1640): 20130220.
- Booker J., Auldridge M., Wills S., McCarty D., Klee H., Leyser O. (2006). *Current Biology*. 14(14):1232-1238.
- Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R., Görlach J. (2001) *The Plant Cell*. 13(7):1499-1510.
- Bradford M.M. (1976). *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Brandi F., Bar E., Mourgues F., Hovath G., Turcsi E., Giuliano G., Liverani A., Tariani S., Lewinsohn E., Rosati C. (2011). *BMC Plant Biology*. 11:24.
- Bruno M., Hofmann M., Vermathen m., Alder A., Beyer P., Al-Babili S. (2014). *Federation of European Biochemical Societies*. 588:1802-1807.
- Bruno M., Koschmieder J., Wuest F., Schaub P., Fehling-Kaschek M., Timmer J., Beyer P., Al-Babili S. (2016). *Journal of Experimental Botany*. 67(21):5993-6005.
- Budzisewski G.J., Lewis S.P., Glover L.W., Reineke J., Jones G., Ziemnik L.S., Lonowski J., Nyefeler B., Aux G., Zhou Q., McElver J., Patton D.A., Martienssen R., Grossniklaus U., Ma H., Law M., Levin J.Z. (2006). *Genetics*. 159(4):1765-1778.
- Calderón-Villalobos L.I.A., Lee S., De Oliveira C., Ivetac A., Brandt W., Armitage L., Sheard L.B., Tan X., Parry G., Mao H., Zheng N., Napier R., Kepinski S., Estelle M. (2012). *Nature Chemical Biology* 8, 477–485.
- Cazzonelli C., Cuttriss A., Cossetto S., Pye W., Crisp P., Whelan J. et al. (2009). *The Plant Cell*. 21:39-53.
- Cazzonelli C.I. y Pogson B.J. (2010). *Trends in Plant Science*. 15(5):266-274.
- Chan K.X., Phua S.Y., Crisp P., McQuinn R., Pogson B.J. (2016). *Annual Review of Plant Biology*. 67:25-53.
- Chi W., Sun X., Zhang L. (2013). *Annual Review of Plant Biology*. 64:559-582.

- Circelli P., Nonini M., Villani M.E., Benvenuto E., Marusic C. (2010). *Bioeng. Bugs.* 1(3):221-224.
- Curtis M.D., Grassniklaus U. (2003). *Plant Physiology.* 133:462-469.
- Davis A.M., Hall A., Millar A.J., Darrah C., Davis S.J. (2009). *Plant Methods.* 5(3).
- Edgar R.C (2004). *Nucleic Acids Research.* 32(5):1792-1797.
- Emami S., Yee M., Dinney J.R. (2013). *Frontiers in Plant Science.* 4:1-6.
- Estavillo G.M., Crisp P.A., Pornsiriwong W., Wirtz M., Collinge D., et al. (2011). *The Plant Cell* 23:3992–4012.
- Frusciate S., Diretto G., Bruno M., Ferrate P., Pietrella M., Prado-Cabrero A., Rubio-Moraga A., Gomez-Gomez L., Al-Babili S., Giuliano G. (2014). *PNAS.* 111(33):12246-12251.
- Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil J.K. (1976). *In vitro.* 12(7):473-478.
- González N., Pauwels L., Baekelandt A., De Milde L., Van Leene J., Besbrugge N., Heyndrickx K.S., Cuéllar-Pérez A., Nagels-Durand A., De Clercq R., Van De Slijke E., Vanden Bossche R., Eeckhout D., Gevaert K., Vandepoele K., De Jaeger G., Goossens A., Inzé D., (2015). *The Plant Cell.* 27:2273-2287.
- González-Jorge S., Ha S.H., Magallanes-Lundback M., Gilliland L.U., Zhou A., Lipka A.E., Nguyen Y.N., Angelovici R., Lin H., Cepela J., Little H., Buell C.R., Gore M.A., DellaPenna D. (2013). *The Plant Cell.* 25:4812-4826.
- Gutiérrez-Nava M.L., Gillmor C.S., Jiménez L.F., Guevara-García A., León P. (2004). *Plant Physiology.* 135: 471-482.
- Hake S, Smith HM, Holtan H, Magnani E, Mele G, Ramirez J. (2004). *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 20, 125-51.
- Hannoufa A., Hossain Z. (2012). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 1:198-202.
- Havaux M. (2014). *Plant Journal.* 79:597-606.
- Hiltscher H., Rudnik R., Shaikhali J., Heiber I., Mellenthin M., et al. (2014). *Frontiers in Plant Science.* 5:475.
- Hou X., Rivers J., León P., McQuinn R.P., Pogson B.J. (2016). *Trends in Plant Science.* 21(9):792-803.
- Howitt C.A., Pogson B.J. (2006). *Plant, Cell and Environment.* 29:435-445.
- Huang F.C., Molnár F., Schwab W. (2009). *Journal of Experimental Botany.* 60(11):3011-3022.
- Jach G. (2005). Humana press inc., Totowa NY.
- Jarvis P. y López-Juez E. (2013). *Nature Reviews.* 14:787-802.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W., (1987). *The EMBO Journal.* 6(13):3901-3907.
- Jung H.S., Crisp P.A., Estavillo G.M., Cole B., Hong F., et al. (2013). *PNAS* 110:14474–79.
- Kalve S., De Vos D., Beemster G.T.S. (2014). *Frontiers in Plant Science.* 5(362):1-25.
- Keeling P.J., (2010). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences.* 365(1541): 729–748.
- Kim C., Apel K. (2013). *Photosynthesis Research.* 116:455-64.
- Kim K.W., Franseschi V.R., Davin L.B., Lewis L.G. (2005) In Salinas J., Sanchez-Serrano J.J. (eds). *Methods in molecular biology*, Humana press inc., Totowa NY.
- Kirby J., Keasling J.D. (2009). *Annual Review of Plant Biology.* 60:335-355.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lashbrooke J.G., Young P.R., Dockrall S.J., Vasanth K., Vivier M.A. (2013). *BMC Plant Biology.* 13:156.
- Lätari K., Wust F., Hubner M., Schaub P., Beisel K. G., Matsubara S. et al. (2015). *Plant Physiology.* 168 1550–1562.

- Lepistö A., Toivola J., Nikkanen L., Rintamäki E. (2012). *Frontiers in Plant Science*. 3:1-9.
- Li L., Nelson C.L., Trösch J., Castleden I., Huang S., Millar A.H. (2017). *The Plant Cell*. DOI:10.1105/tpc.16.00768.
- Littlejohn G.R., Love J. (2012). *Journal of Visual Experiments*. (59) e3394.
- Liu T., Reinhart B.J., Magnani E., Huang T., Kerstetter R., Barton M.K. (2012). *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Vol.77.
- López-Juez E. y Hills A. (2011). En Jarvis RP. (ed.) *Chloroplast Research in Arabidopsis: Methods and Protocols Vol I*.
- Lopez-Juez E. y Pyke K.A. (2005). *The International Journal of Developmental Biology*. 49:557-577.
- Ma G., Zhang L., Matsuta A., Matsutani K., Yamawaki K., Yahata M., Wahyudi A., Motohashi R., Kato M. (2013). *Plant Physiology*. 163:682-695.
- Ma G., Zhang L., Matsuta L., Matsutani A., Yamawaki K., Yahata M., Wahyudi A., Motohashi R., Kato M. (2013). *Plant Physiology*. 163:682-695.
- Ma J., Li J., Zhao J., Zhou H., Ren F., Wang L., Gu C., Liao L., Han Y. (2014). *Plant Molecular Biology Reports*. 32:246-257.
- Maloof J.N., Nozue K., Mumbach M.R., Palmer C.M. (2013). *Journal of Visualized Experiments*. (71), e50028, doi:10.3791/50028.
- McQuinn R., Giovannoni J.J., Pogson B.J. (2015). *Current Opinion in Plant Biology*. 27:172-179.
- Nisar N., Li L., Lu S., Khin N. C., Pogson B.J. (2015). *Molecular Plant*. 8:68-82.
- Ohmiya A., Kishimoto S., Aida R., Yoshioka S., Sumitomo K. (2006). *Plant Physiology*. 142:1193-1201.
- Park H., Kreunen S., Cuttriss A.J., DellaPenna D., Pogson B.J. (2002). *The Plant Cell*. 14:321-332.
- Pekker I., Alvarez J-P., Eshed Y. (2005). *The Plant Cell*. 17:2899-2910.
- Pierre-Jerome E., Moss B.L., Nemhauser J.L. (2013). *Journal of Experimental Botany*. 64(9):2557-2563. PNAS 109:5535-40.
- Prescott A.G. (1995). *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 47:245-271.
- Prigge M.J., Otsuga D., Alonso J.M., Ecker J.R., Drews G.N., Clark S.E. (2005) *The Plant Cell*. 17:61-76.
- Qi J., Wang Y., Yu T., Cunha A., Wu B., Vernoux T., Meyerowitz E., Jiao Y. (2014). *PNAS*. 111(52):18769-18779.
- Ramel F., Birtic S., Ginies C., Soubigou-Taconnat L., Triantaphylides C., Havaux M. (2012). *PNAS* 109:5535-40.
- Rossel J.B., Walter P.B., Hendrickson L., Chow W.S., Poole A., et al. (2006). *Plant Cell Environment*. 29:269-81.
- Rossel J.B., Wilson P.B., Hussain D., Woo N.S., Gordon M.J., et al. (2007). *The Plant Cell*. 19:4091-110.
- Rottet S., Devillers J., Glauser G., Douet V., Besagni C., Kessler F. (2016). *Frontiers in Plant Science*. 7-1855.
- Roy A., Kucukural A., Zhang Y. (2010). *Nature Protocols*. 5:725-738.
- Rubio-Moraga A., Luis-Rambla J., Fernández de Carmen A., Trapero-Mozos A., Ahrazem O., Orzáez D., Granell A., Gómez-Gómez L. (2014). *Plant Molecular Biology*. 86:555-569.



- Ruiz-Solá M.A. y Rodríguez-Concepción M. (2012). The Arabidopsis Book. *American Society of Plant Biologists*.
- Scapella E., Barkoulas M., Tsiantis M. (2010). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001511.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E. et al. (2012). *Nature Methods*. 9(7): 676-682.
- Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C. et al. (2015). *Molecular Reproduction and Development*. PMID 26153368 (on Google Scholar).
- Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. (2012). *Nature methods*. 9(7): 671-675.
- Sergeant M.J., Li J.J., Fox C., Brookbank N., Rea D., Bugg T.D.H., Thompson A.J. (2009). *Journal of Biological Chemistry* 284:5257-5264.
- Sewelam N., Jaspert N., Van Der Kelen K., Tognetti V.B., Schmitz J. et al. (2014). *Molecular Plant*. 7:1191–210.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibon T.J., Karplus K., Li W., López R., McWilliam H., Remmert M., Soding J., Thompson J.D., Higgins D.G. (2011). *Molecular Systems Biology*. 7:539.
- Sluis A., Hake S. (2015). *Trends in Genetics*. 31(6):300-304.
- Staehelin L.A., Newcomb E.H. (2001). En: Buchanan R.B., Gruissem W., Jones R.L. (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. *American Society of Plant Biology*, Rockville, MD, pp 2–50.
- Tameshige T., Fujita H., Watanabe K., Toyokura K., Kondo M., Tatematsu K., et al. (2013). *Plos Genetics*. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003655>.
- Tanaka K. y Hanaoka M. (2012). *Frontiers in Plant Science*. 3:1-5.
- Tian L. (2015). *Frontiers in Plant Science*. 6-790.
- Tiller N. y Bock R. (2014). *Molecular Plant*. 7(7):1105-1120.
- Toledo-Ortiz G., Huq E., Rodríguez-Concepción M. (2010). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:11626-11631.
- Tsukaya H., (2013). Leaf development. Arabidopsis Book 11, e0163.
- Van Norman J.M., Sieburth L.E. (2007). *Plant Journal* 49:619-628.
- Van Norman J.M., Zhang J., Cazzonelli C.I., Pogson B.J., Harrison P.J., Bugg T.D.H. et al. (2014). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A. 111: E1300-E1309.
- Vanhaeren H., González N., Inzé D. (2015). The Arabidopsis book e0181.
- Vanneste S., Friml J., (2012). *Cell*. 136:871-932.
- Verna C., Sawchuk M. G., Manh Linh N., Scapella E. (2015). *MBC Biology*. 13:94.
- Vidhyasekaran P., (2015). Auxin signaling system in plant innate immunity capítulo 6. Springer Science, Business Media Dordrecht. Pp: 311-321.
- Vranová E., Coman D., Gruissem W. (2013). *Annual Review of Plant Biology*. 64:665-700.
- Walter M.H., Floss D.S., Strack D. (2010). *Planta*. 232:1-17.
- Walter M.H., Stauder R., Tissier A. (2015). *Plant Science*. 233:1-10.
- Waters M.T. y Langdale J.A. (2009). *The EMBO journal*. 28:2861-2873.
- White D.W., (2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 103, 13238-13243.
- Wilson P.B., Estavillo G.M., Field K.J., Pornsiriwong W., Carroll A.J., et al. (2009). *Plant Journal* 58: 299–317.
- Xiao Y., Savchenko T., Baidoo E.E.K., Chehab W.E., Hayden D.M. et al. (2012). *Cell*. 149:1525–35.
- Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. (2015). *Nature Methods*. 12:7-8.
- Ytterberg A.J., Peltier J.B., va Wijk K.J (2006) *Plant Physiology*. 140:984-997.
- Zhang Y. (2008). *BMC Bioinformatics*. 9:40.

Zhao L., Chang W., Xiao Y., Liu H., Liu P. (2013). *Annual Review of Biochemistry*. 82:497-530.  
Zhao Y. (2010). *Annual Review of Plant Biology*. 2: 61: 49–64.

# Información suplementaria de protocolos y soluciones.

## Protocolo general de PCR

### Condiciones de reacción estándar para las enzimas usadas

Paso	KAPA HiFi			Taq Fermentas			Taq Casera		
	T °C	Duración	Ciclos	T °C	Duración	Ciclos	T °C	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1	95°C	3 min	1	95°C	3 min	1
Desnaturalización	98°C	20 s	34	95°C	30 s	34	95°C	30 s	34
Alineamiento	60°C	15 s		55°C	30 s		55°C	30 s	
Extensión	72°C	15 s/Kb		68°C	1-3 min		68°C	2 min	
Extensión final	72°C	1 min/Kb	1	68°C	5 min	1	68°C	5 min	1

### Protocolo de PCR KAPA HiFi

Componente	Volumen (50µL)	Concentración final
Agua grado biología molecular	Llevar a 50 µl	N/A
KAPA HiFi Amortiguador 5X	10.0 µl	1X
KAPA dNTPs 10 mM	1.5 µl	0.3 mM
Oligonucleotido forward 10 mM	1.5 µl	0.3 µM
Oligonucleotido reverse 10 mM	1.5 µl	0.3 µM
DNA	Según lo requerido	
KAPA HiFi 1U/mL	1.0 µl	1 U

## Soluciones

### Medio de crecimiento GM 1X

### Solución enzimática para obtener protoplastos de *N. benthamiana*

Componente	Concentración final	Cantidad para X mL de sln (Xn <sub>i</sub> )
Manitol	0.5M	$Xn_1=(X)(0.5)/0.8 \text{ mL}=31.25 \text{ mL}$
Celulasa	1%	$Xn_2=(X)(0.01)g=0.5g$
Macerozima	0.05%	$Xn_3=(X)(0.0005)g=0.025g$

## H<sub>2</sub>O

Filtrar y después 10 minutos a 55°C en baño maría, posteriormente congelar para mayor actividad de las enzimas.

## Solución de tinción de GUS

Solución	Stock	Concentración final	Vol. Para 40 mL
<b>Amortiguador de fosfato de sodio pH 7.0</b>	1 M	0.1 M	4 ml
<b>EDTA</b>	0.5 M	0.01 M	0.8 ml 4 ml
<b>Ferricianuro de K</b>	5 mM	0.5 mM	40 µl
<b>Ferrocianuro de K</b>	5 mM	0.5 mM	40 µl
<b>Tritón X-100</b>	10%	0.1%	400 µl
<b>X-Gluc en DMSO</b>	Depende de vol final	1 mg/ml	Todo (suspendido en 30 µl por 5 mg)

El X-GLUC de debe suspender en DMSO; empleando 30 µl por cada 5 mg de X-GLUC.

La solución de tinción se almacena a 4°C.

## Amortiguador de hibridación para *Northern blot*

	100 ml	50 ml
<b>Buffer de fosfatos 1M pH7.2</b>	52 ml	26 ml
<b>SDS 20% (al final)</b>	35 ml	17.5 ml
<b>EDTA 0.5 M</b>	102.5 µl	51.25 µl
<b>H2O (tibia)</b>	12.9 ml	6.45 ml
<b>Albumina bovina fracción V (1%)</b>	1 g	0.5 g

## Hibridación de RNA

Buffer MOPS (10X): 200 mM de MOPS, 50 mM acetato de sodio, 20 mM EDTA, ajustar pH 7.0.

Buffer SSC (20X): 3M NaCl, 300 mM citrato de sodio, pH 7.0.

Buffer de baja astringencia: 2X SSC, con 0.1% de SDS.

Buffer de alta astringencia: 0.1X SSC, con 0.1% de SDS.

## Mezcla de reacción para marcar la sonda con [ $\alpha^{32}p$ ] dCTP para *Northern blot*

Componente	Volumen
DNA	25-50 ng totales en la reacción
Primer (KIT)	5 $\mu$ l
Agua MiliQ	Para reacción de 50 $\mu$ l
Buffer	10 $\mu$ l
dCTP	5 $\mu$ l (dependiendo de la vida media) 50 $\mu$ Ci
Enzima	2 $\mu$ l

## Medio de infiltración para transformar *A. thaliana*

componentes

½ medio MS (2.22g/l)

5% sacarosa (50 g/l)

Antes de usar agregar 0.02% Silwet (500 ml/l) y mezclar perfectamente.

## Mezcla de crecimiento en sustrato

Metromix (Sungro) xl totales

Osmocote (Cassic 14-14-14 Evertis) 25g por xl

Nitrogeno total -----14.00%

8.20% nitrogeno amoniacal

5.80% nitrato

Fosfato disponible (P2O5) -----14.00%

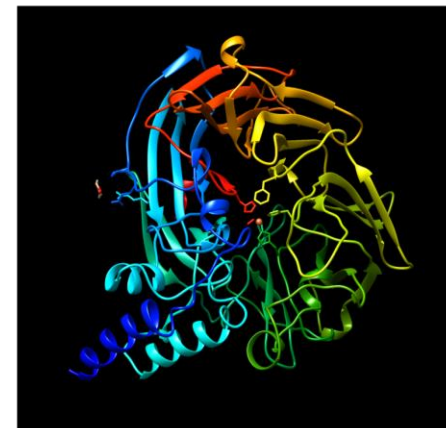
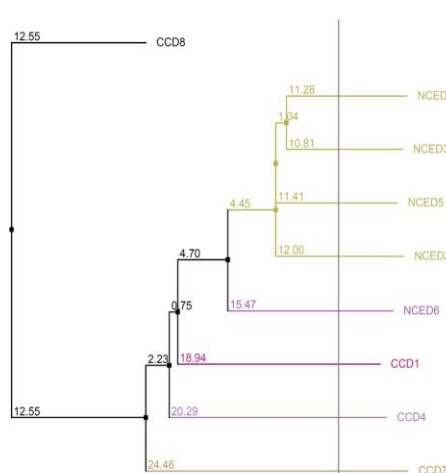
Potasio soluble (K2O) -----14.00%

Tabla 4. Suplementaria 1, construcciones realizadas en este trabajo

Vector	Fragmento	Construcción	Promotor/ Reportero	Resistencia Bacteria	Resistencia Planta	Oligonucleótidos PCR
pDONR zeo	Entrada CCD4 nStop	pENTR:CCD4	-	Zeo 50 µg/mL	-	M13 Fw/ CCD4 nStp Rv
pDONR zeo	Entrada CCD4 stop	pENTR:CCD4Stp	-	Zeo 50 µg/ml	-	M13 Fw/M13 Rv
pDONR zeo	Entrada P <sub>CCD4</sub>	pENTR: P <sub>CCD4</sub>	-	Zeo 50 µg/mL	-	M13 Fw/CCD4 ATG Rv BP
pDONR zeo	Entrada P <sub>ZDS</sub> ::ZDS	pENTR: P <sub>ZDS</sub> ::ZDS <sup>1</sup>	-	Zeo 50 µg/mL	-	SPC1B2 RV/M13 Rv
pDONR zeo	Entrada P <sub>CCD4</sub> ::CCD4	pENTR:P <sub>CCD4</sub> ::CCD4	-	Zeo 50 µg/mL	-	M13 Fw/CCD4 ATG Rv BP
pMDC7	Destino CCD4stp	P <sub>LexA-46 35S</sub> ::CCD4	P <sub>LexA-46 35S</sub>	Spec 100µg/mL	Hyg 50µg/mL	HPT II 5'/CCD4 ATG Rv
pMDC7	Destino ZDS	P <sub>LexA-46 35S</sub> ::ZDS	P <sub>LexA-46 35S</sub>	Spec 100µg/mL	Hyg 50µg/mL	HPT II 5'/4870 R
pK2GW7	Destino CCD4stp	P <sub>35S</sub> ::CCD4	P <sub>35S</sub>	Spec 100µg/mL	Kan 100µg/mL	35S up/CCD4 nStp RV BP
pEG302	Destino P <sub>CCD4</sub> ::CCD4	P <sub>CCD4</sub> ::CCD4:FLAG	P <sub>CCD4</sub>			
pGWB11	Destino CCD4	P <sub>35S</sub> ::CCD4:FLAG	P <sub>35S</sub>			
pHGY	Destino P <sub>ZDS</sub> ::ZDS	P <sub>ZDS</sub> ::ZDS:YFP	Proteína amarilla fluorescente	Spec 100µg/mL	Hyg 50µg/mL	48 70 exo11/GFP Rv Bal
pMDC204	Destino P <sub>CCD4</sub>	P <sub>CCD4</sub> ::GFP	Proteína verde fluorescente	Kan 100µg/mL	Hyg 50µg/mL	CCD4 F3 BP/GFP Rv Bal
pMDC204	Destino P <sub>CCD4</sub> ::CCD4	P <sub>CCD4</sub> :CCD4::GFP	Proteína verde fluorescente	Kan 100µg/mL	Hyg 50µg/mL	CCD4 ATG Fw BP/GFP Rv Bal
pMCD163	Destino P <sub>CCD4</sub> ::CCD4	P <sub>CCD4</sub> :CCD4::GUS	β- glucuronidasa	Kan 100µg/mL	Hyg 50µg/mL	CCD4 Fw/GUS 4R
pMDC163	Destino P <sub>CCD4</sub>	P <sub>CCD4</sub> ::GUS	β- glucuronidasa	Kan 100µg/mL	Hyg 50µg/mL	CCD4 Fw3 BP/GUS4R

## Figuras suplementarias

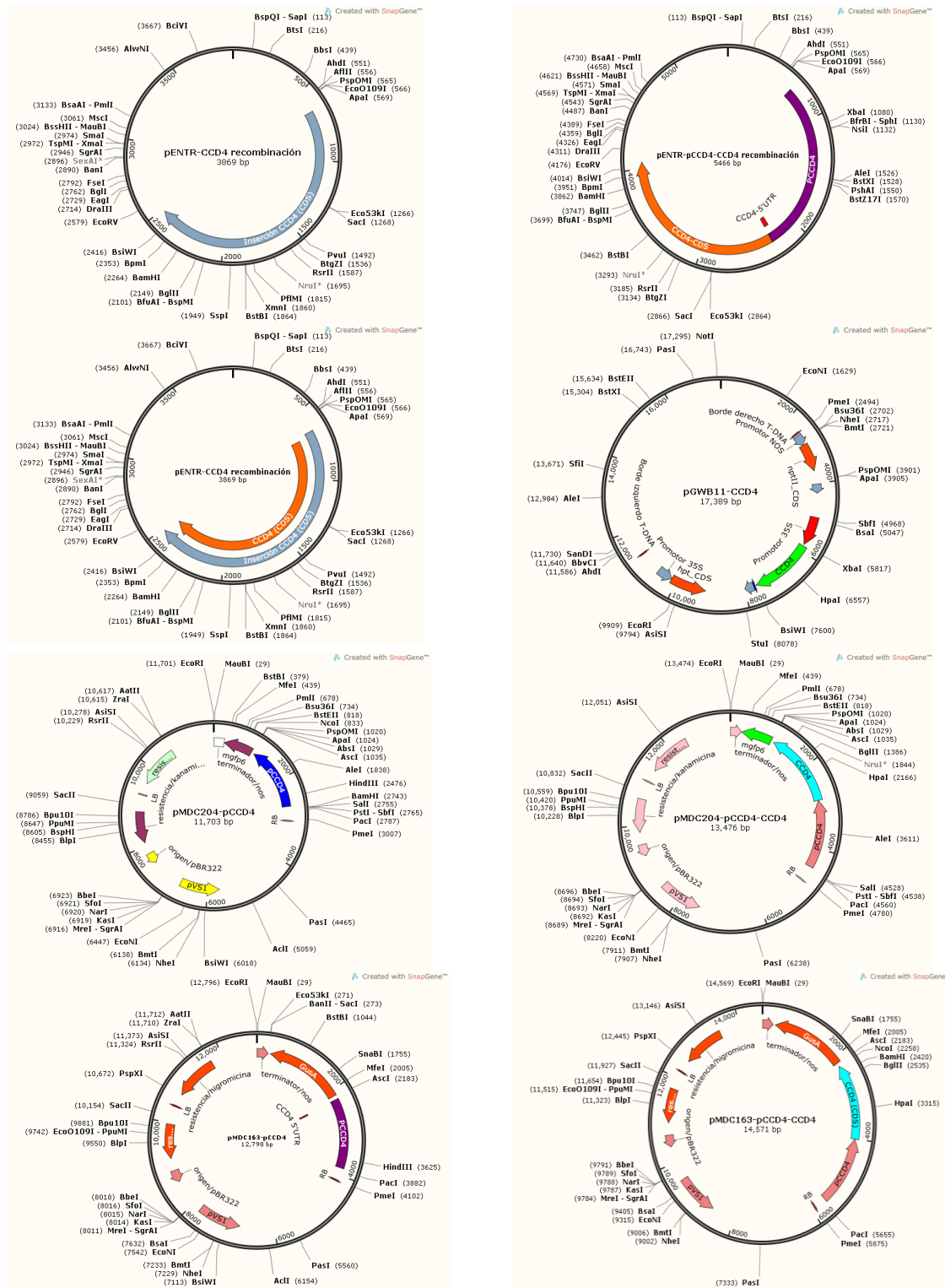
NCED9	164	ISHERRRHPKPT--ADPAVQIAGNFFPVV-EKPVNHLPTITTE-CLGVVIRMAN	219
NCED6	82	VIPHEQRNPKPK--TDPAVQLSGNFAPV-ECVQNGLEIVQVTS-CLGVVIRMAN	137
NCED5	95	LRRE-RSKPLPKT--VOPRHQISGNAPV-EGQVKSLSIDQKCP-CLGVVIRMAN	149
NCED2	88	ISHE-QSPLPKT--ADPAVQIAGNFFPVV-EKPVNHLPTITTE-CLGVVIRMAN	142
NCED3	105	VSHE-KLHPLPKT--ADPSVQIAGNFFAPV-EQVRRNLPVIVKPD-STGVVIRMAN	159
CCD7	51	DES--TSSAFRDY-QSLFVFSQSESTE-----PVVIXKPEESQVFNFFPTVYLAPG	100
CCD1	34	---VWLMNDA--SFLVLYGNAPRDRPDKPDKLPHFPE--CLGVEVIRMAN	85
CCD8	60	NSA--APSPLEKPEKVEGERRHVAMTSVQ-QEMEGELTQKQCT-MLGTVIRMAN	115
CCD4	94	NTF--IDPPSRPS--VDPKHLSDNFAPVLDLPPDCEITDHTLRL-SLUGAIVIRMAN	148
NCED9	220	PLHHP-VSGHLLREEDDMHAIKIDN--GSVYACIFTEINRLVQRECGRPVFK----	272
NCED6	138	PHFPP-LAGHLLREEDDMHAIKIDN--GSVYACIFTEINRLVQRECGRPVFK----	191
NCED5	150	PLFEP-VSGHLLREEDDMHAIKIDN--GDASVSCIFTEINRLVQREKQSSPFPK----	202
NCED2	143	PHFEP-TAGHLLREEDDMHAIKIDN--GDASVACIFTEINRLVQREKQSSPFPK----	195
NCED3	160	PLHEP-VTGHLLREEDDMHAIKIDN--GDASVACIFTEINRLVQREKQSSPFPK----	212
CCD7	101	LFDTHGSGTVPLDGHVYRAFHIDQNRKATFTAIYVTEAKKEHPDVTWRF--T	157
CCD1	86	PKFDA-VADYHLLREEDDMHAIKIDN--GKATVSYIVYLSRKLQEEFFGAARFK----	138
CCD8	116	LNKIQGNRPRLTISYVYKIDQDQ--GRFAHLLISQAYAAKRRMLCYEFSSET	173
CCD4	149	PQFLP-RGPYHLLREEDDMHAIKIDN--GKATLCSYIVYLYKYNVEKQTGAPVMPH----	201
NCED9	273	---ATIGELHGHLSIA---KLMFLNTRGLFGLVPTGGLVWNAQLVY-FNIRLLAASD	324
NCED6	192	---PTIGELHGHLSIA---RLALFARAGLGVGTROMVNAQLVY-FNIRLLAASD	243
NCED5	293	---ATIGELHGHLSIA---RLMLFYARGLGLLNNQGVVNAQLVY-FNIRLLAASD	354
NCED2	196	---ATIGELHGHLSIA---RLMLFYARGLGLLNNQGVVNAQLVY-FNIRLLAASD	247
NCED3	213	---ATIGELHGHLSIA---RLMLFYARGLGLLNNQGVVNAQLVY-FNIRLLAASD	264
CCD7	158	HRDFE-----SVALGGRRGDTKMKWNTSLK-HARGLLMSG	198
CCD1	139	---TGLDKGFGGLMWWQRLTKLKI---LIMTYGNITANTALVY-HRKLKALQIA	189
CCD8	174	PKSVLWNPSPSGELI-----VRLFQESLTLNMLDQKLDGKRNKLTIT	221
CCD4	202	---VPSFGNVGASVARGALLANRVLTTGGVPSWGLGSLG-----	254
NCED9	325	DLPHYVKTQDGLIETRYDFIGQLKSTHIA--HPIDPETRLEFALSIVVSKPVLYK	382
NCED6	244	DLPHYVKTQDGLIETRYDFIGQLKSTHIA--HPIDPETRLEFALSIVVSKPVLYK	301
NCED5	255	DLPHYVKTQDGLIETRYDFIGQLKSTHIA--HPIDPETRLEFALSIVVSKPVLYK	312
NCED2	248	DLPHYVKTQDGLIETRYDFIGQLKSTHIA--HPIDPETRLEFALSIVVSKPVLYK	305
NCED3	265	DLPHYVKTQDGLIETRYDFIGQLKSTHIA--HPIDPETRLEFALSIVVSKPVLYK	322
CCD7	199	SEPYE1--ESGSLVYRHWYHNGKESCDQDSDSISGHSITAAKLLPTLQGV	252
CCD1	190	DKPVVYKLEDGDLQTLIDYIKRLTHSFTA--HPVDPVTFMGFFYGSHT-PPVLY	246
CCD8	222	QKG--SILVHETLEITDKFEYDVLSDHMIQ--SAIPVITETWMLPLVKKPGVR-V	276
CCD4	255	DLPHYVLTESDGLIETRYDFIGQLKSTHIA--HPIDPETRLEFALSIVVSKPVLYK	311
NCED9	383	FRITS-----DGEKSPDVEI-----PLDQP	402
NCED6	302	LKINT-----CGKTRDVEI-----TLPEP	321
NCED5	313	FKISP-----EGEKSPDVEI-----PLASP	332
NCED2	306	FRISP-----DQKSPDEI-----PLETP	325
NCED3	323	FRISP-----DQKSPDVEI-----QLDQP	342
CCD7	256	FKHPKRFLLSHYVDGRRKRLTVTCNAEDMLLRSNFTFCEYDFSEFKLQTKFKIDDH	315
CCD1	297	QKHEA-----DQKSPDEI-----VRCSESP	305
CCD8	312	FRIDS-----AKKQRDPI-----F--SMTSP	332
NCED9	483	TMHDFATFNFIIVTDPQVVFKL---PEMIGSGSPVYDEKK---SRGLIPIINAK	454
NCED6	323	TMHDFATFNFIIVTDPQVVFKL---SEMIGSGSPVYDEKK---SRGLIPIINAK	373
NCED5	333	TMHDFATFNFIIVTDPQVVFKL---SDFMIGSGSPVYDEK1---SRGLIPIINAK	384
NCED2	326	TMHDFATFNFIIVTDPQVVFKL---GEMIGSGSPVYDEK1---SRGLIPIINAK	377
NCED3	343	TMHDFATFNFIIVTDPQVVFKL---PEMIGSGSPVYDEKK---SRGLIPIINAK	394
CCD7	316	MLHIDNATDTHYELFANRVLNLPVIGSIAANQSPVMSALSINPNESSPVIYFLSD	375
CCD1	267	IMPHDFATFNFIIVTDPQVVFKL---PEMIGSGSPVYDEKK---SRGLIPIINAK	319
CCD8	302	QKHEA-----DQKSPDEI-----VRCSESP	305
CCD4	333	SFLHDFATFNFIIVTDPQVVFKL---PEMIGSGSPVYDEKK---SRGLIPIINAK	387
NCED9	455	DAS--SIQH---TEVPDQCFCHLWHEEPEET---DEWVIGGSC-TPPDSI-----	497
NCED6	374	TGS--DINM---VDPDQCFCHLWHEEPEET---DEWVIGGSC-TPPDSI-----	419
NCED5	385	DAS--EMNK---VEVPGFNTLHHEEDQG---NSVLIAP---NMSI-----	427
NCED2	378	EAS--QIIN---VNSPTEFCHLWHEEPEET---EEIWIIGGSC-SPADS-----	420
NCED3	395	DSS--NINM---IDAPDQCFCHLWHEEPEET---DEWVIGGSC-TPPDSI-----	437
CCD7	374	KYSRGRDNRVPEVLSQALAAAEV---KMLKAEFTVYEWKPEQDQASVYRDFQNMDFD	435
CCD1	320	DEL--MIRN---FELNCFIHNNAHEEEDD---VVLITCRLEN-POLDWV-----	362
CCD8	356	TGE--VVAS---VEVPVYTFHIAVEEDKNGDGKATVLIADCEHDWTR-----	402
CCD4	385	DES--EMNK---FEVPGFNTLHHEEDQG---NSVLIAP---NMSI-----	427
NCED9	498	-----FNEHDETL-----GSV-----SEIRLNKIGEST-RPVUSE---GV	531
NCED6	420	-----FSEGEPT-----RVY-----SEIRLNKIRKESM-RVITV---GV	452
NCED5	428	-----FNECDQL-----NSV-----SEIRLNKIKGKST-RRTIIPGS-VQM	463
NCED2	421	-----FNERDSL-----RSV-----SEIRLNKIRKTT-RNSLLVN---EDV	455
NCED3	438	-----FNSDNL-----KSV-----SEIRLNKIGEST-RPDTINSDQDV	474
CCD7	436	IQSNKLDPSVMNLRGDKL-----LPH---VIVSHITDSTGNCSDEPLNGMKN	485
CCD1	363	-----SQKVKLENF-----QNE-----LYEIRNKNKTSAS-QWLSA---S	397
CCD8	403	-----ILDKRLRLLTIRKSGRVLPMQEGRIPIDQSSYKOLETAFARHR	452
CCD4	428	-----EHTLERMLV-----HAL-----VEIKVLDIVTGLVR-RHPISA---R	461
NCED9	532	NLEAGMIRNLRKRTFAVLALE-PMP-----KVSFAVDLSTGE-----	573
NCED6	453	NLEAGMIRNLRKRTFAVLALE-PMP-----KCSGIAVDLQMT-----	494
NCED5	464	NLEAGMIRNLRKRTFAVLALE-PMP-----KVSFAVDLSTGE-----	505
NCED2	456	NLEAGMIRNLRKRTFAVLALE-PMP-----KVSFAVDLSTGE-----	497
NCED3	475	NLEAGMIRNLRKRTFAVLALE-PMP-----KVSFAVDLSTGE-----	516
CCD7	486	PSFPTIESKSNKNEVPSAAGSSELSLPHFFVWVLDKNDK-----	532
CCD1	398	AVDFRTECYTKIKVIVGTLTD-SIA-----KVTGIIIDHAEATGKRMLEVGGN	451
CCD8	453	AMDMCSIFPLYSKRYVIVYACGAQRPCN-----FPNALSDVIVKX-----	495
CCD4	462	NLIFAFVAFVLSQALAAAEV---KMLKAEFTVYEWKPEQDQASVYRDFQNMDFD	508
NCED9	574	-IRKYVYEGKYG@PLFLPESDQ---EEEDRYVNFVDEEKVSELOLTHVAMKLL	627
NCED6	495	-VSEFVYSGRFG@PCHPPEGG---EEEDRYVNFVDEEKVSELOLTHVAMKLL	548
NCED5	506	-WNIHFYGGKYG@PFFPRGL--ESDQEDDYVSPVHDEESMEELHVAIVLLEL-	561
NCED2	498	-IRKYVYEGKYG@PFFPKSNGEEDDYVCHHREETSSELOLTHVAMKLL	555
NCED3	517	-VKHLVGDNRYG@PLFLPESDQ---EEEDRYVNFVDEEKVSELOLTHVAMKLL	570
CCD7	533	LVRTMSTGARRPV@PMPKNSVEEGEEDDYVVEVAVSVCYVLYLIDKIKIGES	592
CCD1	452	IKGELYDGEKYG@PFFPKSNGEEDDYVCHHREETSSELOLTHVAMKLL	507
CCD8	496	-V-KNHEH@PFFPRPG---ATHEDVIVISVSENGS-FAILLDSFEE-	548
CCD4	509	-VARMYSGCYG@PFFVARDGNPEAEDDYVTVHDEVTGESKFLVHAKSPELE	567
NCED9	628	---EATVLS--RVVPHGHTFISKEDLSKQALC	657
NCED6	549	---VAAVRLE--RVVPHGHTFVSENKLEQVIF	577
NCED5	562	---EATVLS--RVVPHGHTFVSENKLEQVIF	589
NCED2	556	---EATVLS--RVVPHGHTFVSDNELVQDL--	583
NCED3	571	---EATVLS--RVVPHGHTFVSDNELVQDL--	599
CCD7	593	DAWVRLER@RNLTR@KCLASD-----	618
CCD1	508	P--VAVVLEH--RVVPHGHTFVTEEQEQTLI	538
CCD8	549	---IARAKRY--GLVPHGHTFVSENKLEQVIF	578
CCD4	568	I--VAVVLEH--RVVPHGHTFVSENKLEQVIF	595



### Figura suplementaria 1.

Figura 46. Alineamiento múltiple de CCDs de *A. thaliana*.

Alineamiento múltiple de CCDs de *A. thaliana*, se muestran en amarillo los residuos de histidina que constituyen el sitio activo y los tonos de gris con los que están remarcadas las columnas está relacionado con la similitud, entre más oscuro es una columna es más conservada. El dendrograma deja más clara la similitud entre las diferentes CCDs, donde las NCEDs constituyen un grupo muy similar, el alineamiento múltiple se realizó con el algoritmo Clustal W.



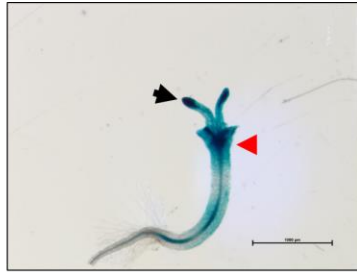
## Figura suplementaria 2

Figura 47. Mapa de construcciones elaboradas en este trabajo.

Mapa de las construcciones elaboradas en este trabajo, se muestran las diferentes entradas elaboradas y los vectores destino con los genes reporteros y los promotores.



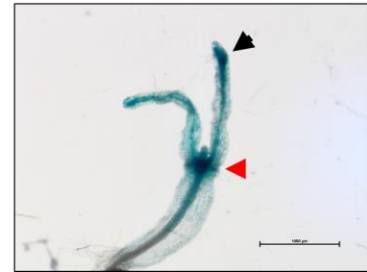
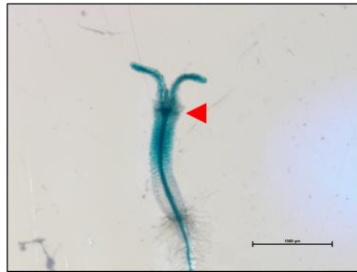
**PCCD4::GUS**



**PPDS3::PDS3:GUS**



**PZDS::ZDS:GUS**



**Figura suplementaria 3**

*Figura 48. Patrón de expresión de cCD4, PDS3 y ZDS en el inhibidor espectinomícina.*

. patrón de expresión de CCD4, PDS3 y ZDS en el inhibidor espectinomícina. Se muestran dos estados de desarrollo del primer par de hojas. En todos los casos observamos una expresión ectópica y un patrón de expresión similar.