



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización del fenotipo causado por la inhibición de
la traducción plastídica en el desarrollo de la hoja de
Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) y su relación con la
señal ACS1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ARIHEL DE JESÚS HERNÁNDEZ MUÑOZ



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PATRICIA LEÓN MEJÍA

CIUDAD DE MÉXICO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Hernández

Muñoz

Arihel de Jesús

(044) 228 195 19 89

Universidad Nacional Autónoma

de México

Facultad de Ciencias

414007990

2. Datos del tutor

Dra.

Patricia

León

Mejía

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Elizabeth

Cordoba

Martínez

4. Datos del sinodal 2

Q.

Viviana

Escobar

Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Javier Andrés

Juárez

Díaz

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Lina María del Mar

Escobar Tovar

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización del fenotipo causado por la inhibición de la traducción plastídica en el desarrollo de la hoja de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) y su relación con la señal

ACS1

89 p

2019

AGRADECIMIENTOS

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

A la Dra. Patricia León Mejía, mi tutora, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio.

A mis padres, María de Lourdes Muñoz Nieto y José Ariel Hernández Méndez, por su constante apoyo y comprensión durante este periodo.

A mis sinodales, Dra. Elizabeth Cordoba Martínez, Q. Viviana Escobar Sánchez, Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, Dra. Lina María del Mar Escobar Tovar; por sus valiosas aportaciones y comentarios.

A la Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla por su experiencia y apoyo técnico en la parte de Microscopía Electrónica.

Al M. en C. Julio Salvador Sierra Camarena, por sus consejos.

A mis compañeros del laboratorio de la Dra. Patricia León Mejía; por sus comentarios enriquecedores.

A la Dra. Nidia Luz Sánchez León, por su apoyo técnico.

RESUMEN

clb5-1 es una mutante de *Arabidopsis thaliana* en la enzima ζ -CAROTENO DESATURASA de la vía de síntesis de carotenoides. Esta mutante es albina, y en ella, el desarrollo foliar está seriamente alterado; sus hojas tienen una morfología acicular y carecen de diferenciación entre la lámina y el peciolo. La alteración en el desarrollo foliar de esta mutante se ha asociado a la modulación de este proceso por una señal retrógrada de naturaleza apocarotenoide que recibe el nombre de ACS1. Asimismo, se ha reportado en la literatura que la inhibición de la síntesis de proteínas en el plástido también altera el desarrollo foliar y genera un fenotipo semejante al de *clb5-1*; de ahí que resulte interesante dilucidar si existe alguna relación entre ambos fenotipos y si la modulación del desarrollo deriva de una misma señal retrógrada. Los análisis realizados en este trabajo permitieron encontrar que la expresión de diferentes marcadores moleculares del desarrollo foliar es muy similar en ambos casos, salvo por la nula expresión del factor transcripcional *FILAMENTOUS FLOWER* en *clb5-1*, el cual sí se expresa en las plantas cuya traducción plastídica se ha inhibido. Asimismo, la inhibición de la síntesis de carotenos en *clb5-1* revierte el fenotipo de hoja acicular a una hoja laminar, mientras que, al reprimir tanto la traducción plastídica como la síntesis de carotenos, no se observa tal reversión. Se analizó también la participación de la luz en la formación de las señales retrógradas encontrándose que es importante sólo para la formación y/o actividad de ACS1, no así en aquella derivada de la represión de la traducción plastídica. Por último, se corroboró que GUN1 está involucrado en la transducción de la señal que parte de la inhibición de la traducción plastídica pero no en el fenotipo de *clb5-1*. Interesantemente, se observó que la señal que deriva de la inhibición de la traducción plastídica modula el desarrollo foliar sólo en estadios tempranos del desarrollo de la planta, disminuyendo el efecto que tiene sobre la morfología foliar conforme transcurre el tiempo, causado probablemente por el arresto temprano en el desarrollo del cloroplasto, como se observó en micrografías de plástidos de estas plantas.

ABSTRACT

clb5-1 is an *Arabidopsis thaliana* mutant in ζ -CAROTENE DESATURASE, an enzyme which participates in carotenoids biosynthesis. This mutant exhibits an albino phenotype and aberrant leaf development: its leaves are radially shaped, lacking distinction between blade and petiole. Impaired leaf phenotype in this mutant has been associated with an apocarotenoid-derived retrograde signal named ACS1. It has been reported that inhibition of plastid translation also impairs leaf development, and results in a phenotype that closely resembles that of *clb5-1*. This work was developed in order to elucidate if both phenotypes are related, and ultimately derive from a common retrograde signalling pathway. The analyses of leaf development defects in both phenotypes revealed many similarities between them, except for the defect exhibited in *FILAMENTOUS FLOWER* expression; this transcription factor is not expressed in *clb5-1*, but it expresses when plastid translation is repressed. Carotene biosynthesis impairment reverts *clb5-1* leaf phenotype, unlike in plastid translation inhibition-derived phenotype. Light is involved in the ACS1 production, but that is not the case for the chloroplast translation inhibition-derived signal. GUN1 partakes a role in plastid translation-inhibition signal transduction but is not involved in *clb5-1* phenotype occurrence. Interestingly, the plastids of plants where plastid translation is repressed lack internal membranes, meaning they are arrested in early developmental stages. This could explain why when translation is inhibited in plants where chloroplasts are already assembled, the effect on plant development is less severe.

ABREVIATURAS

°C: grados centígrados.

A: aminoacil.

aa-tRNA: aminoacil tRNA.

ABA: del inglés *Abscic Acid*.

ACCS: ACETIL COENZIMA A CARBOXILASA.

ACS1: del inglés, *APOCAROTENOID SIGNAL 1*.

ARF: del inglés, *ETTIN/AUXIN RESPONSE FACTOR*.

CCD: del inglés, *CAROTENE CLEAVAGE DIOXYGENASE*.

CDP-ME: 4-difosfocitdil-2C-metil-D-eritritol.

CDP-ME2P: 4-difosfocitdil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato.

clb5-1: del inglés, *chloroplast biogenesis 5*.

CMK: del inglés, 4-(CYTIDINE 5'-DIPHOSPHO)-2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL KINASE

CRTISO: del inglés, *CAROTENOID ISOMERASE*.

Cyc: cicloheximida.

CYCB1: del inglés, *CYCLYN B1*

DAG: del inglés *Days After Germination*.

DMAPP: dimetilalil pirofosfato.

DNA: del inglés, *Desoxirribonucleic Acid*.

DXP: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato.

DXR: del inglés, 1-DEOXY-D-XYLULOSE 5-PHOSPHATE REDUCTOISOMERASE.

DXS: del inglés, 1-DEOXY-D-XYLULOSE 5-PHOSPHATE SYNTHASE.

E: del inglés, *exit*.

Ery: eritromicina.

FIL: del inglés, *FILAMENTOUS FLOWER*.

GA-3P: D-gliceraldehido 3-fosfato.

GGPP: geranilgeranil-pirofosfato.

GGPPS: GERANILGERANIL PIROFOSFATO SINTASA.

GUN: del inglés, *GENOMES UNCOUPLED*.

GUS: β -glucoronidasa.

h: horas.

hAS: del inglés, *hours After Sowing*.

HDR: del inglés, 4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL DIPHOSPHATE REDUCTASE.

HDS: del inglés, 4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL-DIPHOSPHATE SYNTHASE.

HMBPP: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato.

IPP: Isopentenil pirofosfato.

IPPI: del inglés, ISOPENTENYL DIPHOSPHATE Δ -ISOMERASE.

ITP: inhibición de la traducción plástica.

KAN: *KANADI*.

kDa: kilodaltones.

LHC: del inglés, *LIGHT HARVESTING COMPLEX*.

Lin: lincomicina.

LYC: LICOPENO CICLASA

m: metro

M: molar.

MCT: del inglés, 2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL 4-PHOSPHATE CYTIDYLYLTRANSFERASE.

MDS: del inglés, 2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL 2,4-CYCLODIPHOSPHATE SYNTHASE.

MEcPP: 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato.

MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato.

miRNA: del inglés, *micro RNA*.

mRNA: del inglés, *messenger RNA*.

NCED: del inglés, NINE-CIS-EPOXY-CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE.

NEP: del inglés, *Nuclear-Encoded Polymerase*.

NF: norflurazona.

nm: nanómetros.

P: peptidil.

PDS: del inglés, PHYTOENE DESATURASE.

PEP: del inglés, *Plastid-Encoded Polymerase*.

PhANGs: del inglés, *Photosynthesis Associated Nuclear Genes*.

PHB: *PHABULOSA*.

PHV: *PHAVOLUTA*.

PPR: del inglés, PENTATRICOPEPTIDE REPEAT.

PRANGs: del inglés, *Plastid Redox Associated Nuclear Genes*.

PSY: del inglés, PHYTOENE SYNTHASE.

pTAC: del inglés, *Plastid Transcriptionally Active Chromosome*.

PTC: del inglés, *Peptidyl Transferase Centre*.

Pur: puromicina.

RBCS: del inglés, *RUBISCO SMALL SUBUNIT*.

REV: *REVOLUTA*.

RNA: del inglés, *Ribonucleic Acid*

RNAi: del inglés, *interference RNA*.

rps5: proteína ribosomal S5.

RRF: del inglés, *RIBOSOMAL RECYCLING FACTOR*.

rRNAs: del inglés, *Ribosomal RNA*.

s: segundo

SAM: del inglés, *Shoot Apical Meristem*.

SMR: del inglés, *Small MutS Related domain*.

SORGs: del inglés, *Singlet Oxygen Response Genes*.

Sp: espectinomomicina.

spc1-2: del inglés, *spontaneous cell death 1*.

sRNAP: del inglés, *Soluble RNA Polymerase*.

Str: estreptomicina.

T-DNA: del inglés, *transfer DNA*.

tRNA: del inglés, *transfer RNA*.

UPR: *Unfolded Protein Response*.

YAB: *YABBY*

ZDS: del inglés, ζ -CAROTENE DESATURASE.

Z-ISO: del inglés, ζ -CAROTENE ISOMERASE.

μm : micrómetros, micras.

μM : micromolar.

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$: micromoles por metro cuadrado por segundo.

σ : factores sigma de la PEP.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	4
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Biogénesis del cloroplasto.....	11
1.1.2. Desarrollo de los cloroplastos	14
1.2. Señalización Retrógrada	16
1.2.1. Señalización retrógrada biogénica	17
1.3. Síntesis de carotenoides y sus precursores	21
1.3.1. Mutantes en la vía de síntesis de carotenoides.....	23
1.3.2. Mutante <i>clb5</i>	24
1.3.3. Mutante <i>spc1-2</i>	25
1.3.4. Síntesis de apocarotenoides	26
1.4. Desarrollo de la hoja.....	27
1.4.1. Los defectos en la hoja de <i>clb5-1</i>	30
1.5. La traducción del genoma plastídico	31
1.5.1. La inhibición de la traducción plastídica	32
2. JUSTIFICACIÓN	37
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	37
4.1. Objetivo general	37
4.2. Objetivos particulares	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	39
5.2. Crecimiento bajo condiciones de inhibición de la traducción del cloroplasto..	39
5.3. Tratamientos con norflurazona.....	40
5.4. Análisis estadístico de los tratamientos con NF	41
5.5. Análisis del efecto de la luz sobre el fenotipo producto de la inhibición de la traducción plastídica y <i>clb5-1</i>	41
5.6. Líneas marcadoras para el desarrollo de la hoja.....	41
5.7. Análisis histoquímico de la β -glucoronidasa (GUS).....	42
5.8. Desteñido de las plántulas de las líneas marcadoras para el desarrollo de la hoja	42
5.9. Adquisición de las imágenes	43
5.10. Cinética de transferencia de semillas a medio GM 1X con inhibidores de la traducción plastídica	43
5.11. Microscopía de hojas de plantas bajo ITP y mutantes en <i>ZDS</i>	44
6. RESULTADOS	45
6.1. Optimización de las condiciones para la inhibición de la traducción plastídica	45
6.2. La señal derivada de la ITP, al igual que la señal ACS1, afecta el desarrollo del mesófilo en las hojas.....	55
6.3. Los plástidos de las hojas de plantas bajo tratamiento de ITP arrestan su desarrollo en un estadio temprano, al igual que <i>clb5-1</i> o <i>spc1-2</i>	50
6.4. La polaridad abaxial/adaxial está alterada en plantas inhibidas en su traducción plastídica	56

6.5. La proliferación celular y la respuesta a auxinas están afectadas en plantas inhibidas en la traducción plastídica.....	53
6.6. La inhibición de la síntesis de carotenoides no recupera el fenotipo foliar derivado de la ITP	58
6.7. Participación de GUN1 en el fenotipo derivado de la ITP	60
6.8. Papel de la luz en el fenotipo de la ITP y en ACS1	61
6.9. Existe una ventana temporal en la cual se produce una señal proveniente de la ITP que incide en el desarrollo foliar	63
7. DISCUSIÓN	68
7.1. El ecotipo Ler-0 es más sensible a la inhibición de la traducción plastídica que el ecotipo Col-0	68
7.2. La homogeneidad fenotípica es mayor en espectinomicina que en lincomicina en el ecotipo Col-0, no así en el ecotipo Ler-0.....	69
7.3. El fenotipo foliar de clb5-1 y de plantas inhibidas en su traducción plastídica comparten algunos defectos en el programa de desarrollo foliar.....	70
7.4. La afectación en el desarrollo del mesófilo foliar deriva del arresto del desarrollo del cloroplasto a consecuencia de la ITP, o de ACS1	71
7.5. La inhibición de la síntesis de carotenoides favorece que las plantas con ITP desarrollen un primer par de hojas.....	72
7.6. La luz no influye en la producción de la señal derivada de la inhibición de la traducción plastídica	73
7.7. gun1-1 es resistente a la inhibición de la traducción plastídica y parece estar involucrada en la señalización retrógrada que parte de ésta	74
7.8. La señal derivada de la ITP actúa sobre el desarrollo temprano de la hoja ...	75
7.9. Modelo propuesto.....	77
8. CONCLUSIONES.....	80
9. PERSPECTIVAS	81
10. BIBLIOGRAFÍA	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Diversidad de plástidos en plantas.....	11
Fig. 2. Origen del plástido en el clado Archaeplastida	12
Fig. 3. Transiciones en el desarrollo de los plástidos durante el ciclo de vida de las plantas.....	14
Fig. 4. Señalización retrógrada.....	16
Fig. 5. Mutantes en NEP y PEP presentan alteraciones en el desarrollo del plástido y de la hoja ...	18
Fig. 6. Mutantes en la vía MEP y la vía de síntesis de carotenos	20
Fig. 7. Esquema simplificado de la vía de síntesis de carotenoides.....	22
Fig. 8. Anatomía de la hoja de <i>clb5-1</i> respecto de una planta silvestre (WT).....	24
Fig. 9. La doble mutante <i>ccd4 clb5-1</i> recupera la morfología de la hoja de <i>clb5-1</i> a una hoja normal	27
Fig. 10. Iniciación del promordio foliar y determinación de la polaridad abaxial/adaxial.....	29
Fig. 11. Modo de acción de la espectinomicina (Sp).....	34
Fig. 12. Efecto de diversos antibióticos en la síntesis de proteínas en el citoplasma (a) y la mitocondria (b) en hojas de plantas de <i>Pisum sativum</i> y soja.....	35
Fig. 13. Morfología foliar de plantas de <i>A. thaliana</i> a las que se ha inhibido la traducción del cloroplasto con Lin y Sp, y hoja de <i>clb5-1</i>	35
Fig. 14. Estadios de desarrollo de <i>A. thaliana</i> crecida en medio sin antibiótico.....	45
Fig. 15. Fenotipos foliares producto de la inhibición de la traducción del plástido con espectinomicina (Sp) y lincomicina (Lin).....	46
Fig. 16. Optimización de las concentraciones de Sp en los ecotipos Col-0 y Ler-0.....	47
Fig. 17. Optimización de las concentraciones de Lin en los ecotipos Col-0 y Ler-0.....	49
Fig. 18. Anatomía foliar de las plantas bajo ITP y mutantes en ZDS.....	51
Fig. 19. El desarrollo del cloroplasto en las hojas se arresta en un estadio temprano como consecuencia de la ITP y la mutación en ZDS.....	54
Fig. 20. La ITP altera el establecimiento de la polaridad adaxial/abaxial en plantas en estadio de desarrollo 1.02, de manera distinta a lo que ocurre en <i>clb5-1</i>	56
Fig. 21. La ITP impide el establecimiento de un frente de arresto a la proliferación celular y altera la respuesta a auxinas, como ocurre en <i>clb5-1</i>	57
Fig. 22. El fenotipo producto de la ITP (con Sp y Lin) en Col-0 no se revierte con NF.	58
Fig. 23. Marcadores de la transición de proliferación a expansión celular (CYCB1) y de la respuesta a auxinas (DR5) en plantas a las que se ha inhibido la síntesis de carotenos y la síntesis de proteínas en el plástido.....	60
Fig. 24. <i>gun1-1</i> es más resistente que Col-0 ante la inhibición de la traducción plastídica por Lin 300µM	61
Fig. 25. La señal retrógrada derivada de la inhibición de la traducción plastídica no depende de la intensidad lumínica	63
Fig. 26. La ITP actúa en una ventana de tiempo definida entre las 0 y las 60 h post-siembra (hAS)..	65
Fig. 27. La inhibición de la síntesis de carotenos con NF no cambia la tendencia en que aparece el fenotipo laminar al transferir la población a medio con inhibidores de la traducción plastídica. ...	67
Fig. 28. Modelo de estudio: ACS1 y la señal producto de la ITP podrían ser dos señales independientes o actúan en diferentes niveles de una misma vía de señalización retrógrada	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones analizadas de los inhibidores de la traducción plastídica en los ecotipos Col-0 y Ler-0 de <i>A. thaliana</i>	40
---	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biogénesis del cloroplasto

El cloroplasto es un organelo propio de los organismos fotosintéticos que corresponde filogenéticamente al miembro más basal de los plástidos. En las angiospermas se puede distinguir diversidad de plástidos, entre los que pueden enumerarse los cromoplastos (plástidos que almacenan pigmentos), elaioplastos (plástidos que almacenan aceites), proteinoplastos (plástidos que almacenan proteínas) y los amiloplastos (plástidos que almacenan almidón), entre otros (Jarvis & López-Juez, 2013) (Fig. 1).

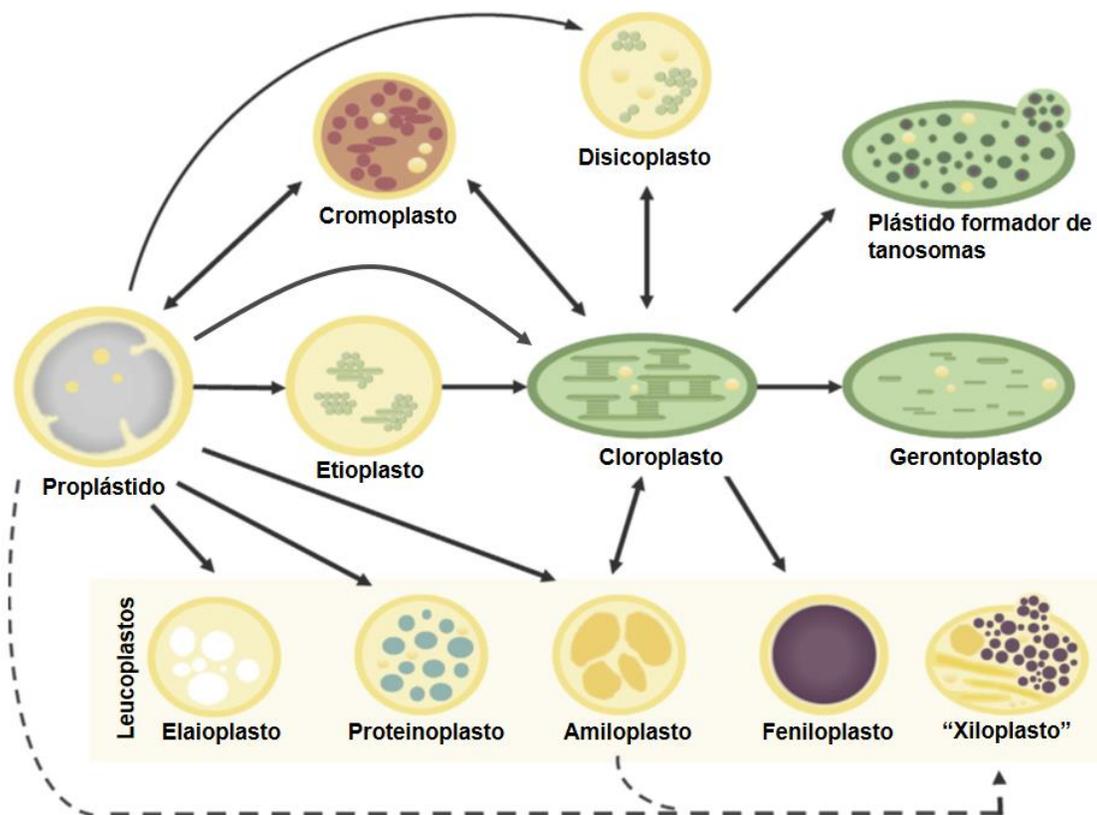


Fig. 1. Diversidad de plástidos en plantas. En embriofitas se ha documentado la presencia de otros plástidos aparte del cloroplasto asociados a otros procesos; entre éstos puede mencionarse a los cromoplastos, que acumulan pigmentos como los carotenos, los etioplastos, que se generan en crecimiento bajo condiciones de oscuridad, los proteinoplastos, que acumulan proteínas, los elaioplastos, que funcionan como reservorio de lípidos, o los amiloplastos, que almacenan almidón; entre otros. Modificado de Pinard & Mizrahi, (2018).

Como en el caso de las mitocondrias, los plástidos entraron al linaje eucariota después de un evento de endosimbiosis, en el cual una cianobacteria fue engullida

y retenida por una célula eucariota (Fig. 2), ancestro del clado Archaeplastida (Reyes-Prieto *et al.*, 2007). Esto explica que el plástido conserve su propio genoma (plastoma) que contiene alrededor de 120 genes en *Arabidopsis thaliana*, el cual es transcrito y traducido a través de una maquinaria de transcripción/traducción propia del organelo (Börner *et al.*, 2015).

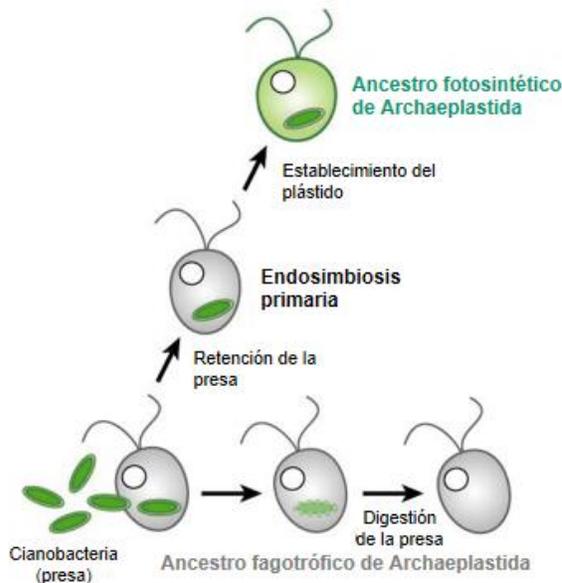


Fig. 2. Origen del plástido en el clado Archaeplastida. Derivado de un evento de endosimbiosis, una cianobacteria fue engullida y retenida por una célula eucariota ancestral fagotrófica; esto permitió el establecimiento del metabolismo fotosintético en el ancestro del clado Archaeplastida al incorporar a dicha cianobacteria como un organelo, dando origen al cloroplasto. Modificado de Reyes-Prieto *et al.*, 2007.

El éxito de la relación endosimbiótica entre el plástido ancestral y el ancestro del clado Archaeplastida tuvo que ser precedido por el establecimiento de un sistema de intercambio eficiente de metabolitos entre la célula hospedera y el plástido ancestral, la transferencia de genes del simbiote al hospedero (así como la pérdida de genes con funciones redundantes contenidos en el genoma del simbiote) y por el desarrollo de un sistema de transporte de proteínas citosólicas al organelo (Keeling, 2013; Reyes-Prieto *et al.*, 2007). Ésto se refleja en que,

de las alrededor de 2000 a 3000 proteínas que requiere el plástido para funcionar, la gran mayoría estén codificadas en el núcleo celular. Estas proteínas se traducen en el citosol y se transportan al organelo por medio de proteínas de importe ubicadas en la envoltura organelar que reconocen la presencia aquéllas de un péptido de tránsito (Jarvis & López-Juez, 2013).

El cloroplasto es un organelo que cumple muchas funciones dentro de la célula vegetal; además de su papel en la fotosíntesis, dentro del cloroplasto se lleva a cabo la síntesis de aminoácidos, metabolitos secundarios como los terpenoides, pigmentos, síntesis de ácidos grasos y hormonas, entre otros, de modo que puede

decirse que éste organelo funge como un nodo metabólico dentro de la célula vegetal (Jarvis & López-Juez, 2013).

La maquinaria de transcripción del cloroplasto está compuesta por dos tipos de polimerasas: la NEP (del inglés, *Nuclear-Encoded Polymerase*) y la PEP (del inglés, *Plastid-Encoded Polymerase*) (Fig. 3) y, con base en cuál de las dos polimerasas transcriben sus genes, se pueden distinguir tres subgrupos dentro del plastoma. El reconocimiento por parte de una u otra polimerasa está dado por la presencia de determinados motivos en sus promotores. Los genes de la clase I son transcritos mayormente por PEP y están asociados principalmente a la actividad fotosintética, como es el caso del operón *psbB*, codificante para *psbB*, *psbT*, *psbH*, *petB* y *petD*. Por otro lado, los genes de la clase II corresponden a genes de expresión constitutiva y pueden ser transcritos tanto por NEP como por PEP. La clase III está compuesta por aquellos genes que sólo son transcritos por la NEP, como el operón *rpoB* o *accD*. En un primer momento, y como parte del control que ejerce el núcleo sobre el desarrollo del cloroplasto, la NEP activa la transcripción de *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* y *rpoC2*, que codifican para las subunidades de la PEP, así como a los genes de los rRNAs (del inglés *ribosomal RNAs*) que conformarán el ribosoma plastídico, algunas de las proteínas ribosomales plastídicas y los genes *accD*, *clpP1*, *atpB*, *atpl*, *ycf1* y *ycf2*, entre otros. Posteriormente, la PEP transcribe los genes de la clase I y toma control de la transcripción de la mayoría de los genes plastídicos, a excepción de aquellos pertenecientes a la clase III (Börner *et al.*, 2015; Sakamoto *et al.*, 2008; Yagi & Shiina, 2014).

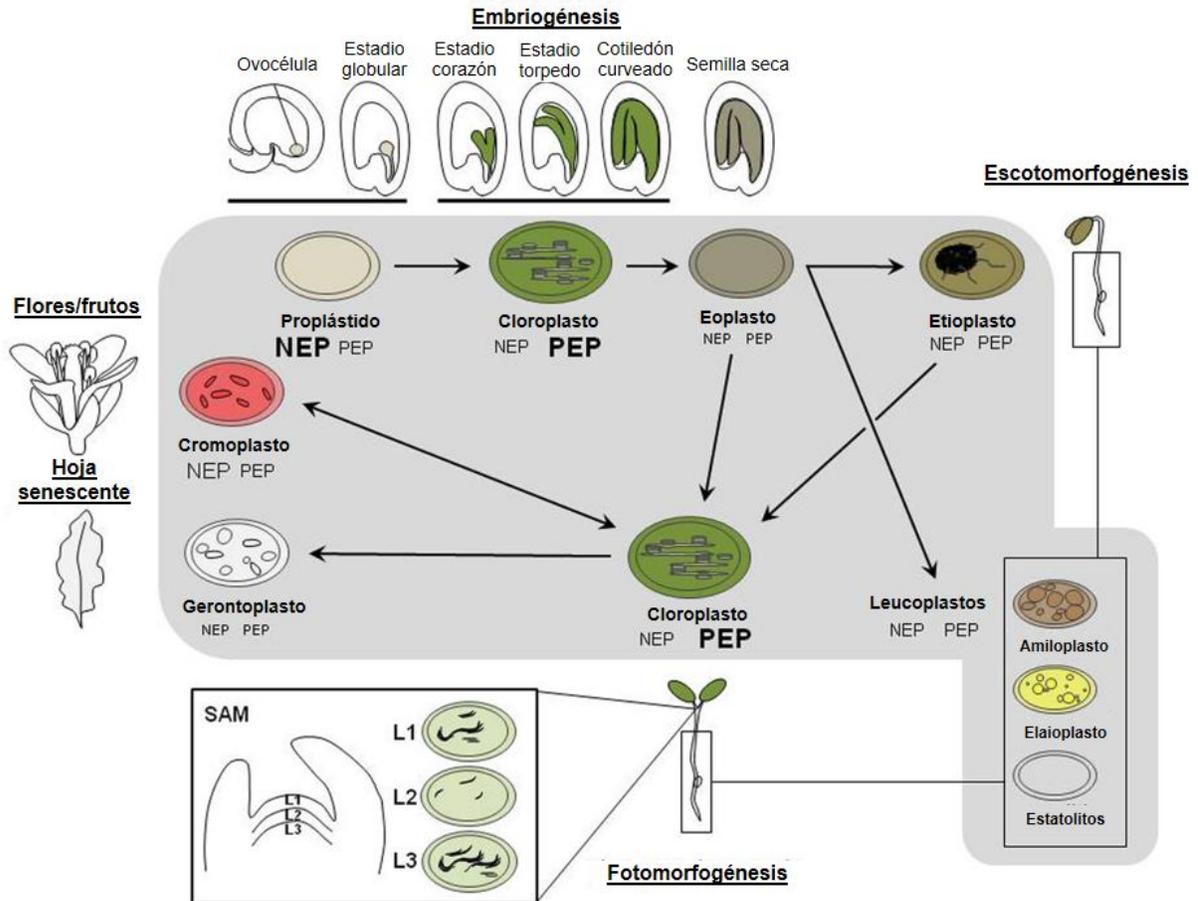


Fig. 3. Transiciones en el desarrollo de los plástidos durante el ciclo de vida de las plantas. El desarrollo de los plástidos está relacionado con el estadio de desarrollo de la planta y el tejido en el que se encuentren. Estas transiciones están relacionadas a su vez con cambios en la actividad transcripcional (representados por las polimerasas plásticas NEP o PEP). En los proplástidos, a diferencia de lo que ocurre en los cloroplastos maduros, predomina la actividad de la NEP, que funge como señal anterógrada favoreciendo la transición hacia cloroplasto al activar la transcripción de genes como la PEP, que es la polimerasa cuya actividad predomina en el cloroplasto maduro. Durante la embriogénesis, en la planta existen proplástidos (ovocélula hasta estadio globular), cloroplastos (comienzan a diferenciarse a partir del estadio globular) y eoplastos; éstos últimos son plástidos desdiferenciados que se generan durante la desecación de la semilla. Durante la germinación, se sigue un programa de desarrollo en oscuridad (escotomorfogénesis), mismo que coincide con la formación de un intermediario entre el eoplasto y el cloroplasto: el etioplasto, caracterizado por la presencia de PEP en forma inactiva y la presencia de cuerpos prolamelares (PLB). En las hojas verdaderas, y bajo un programa de desarrollo en luz (fotomorfogénesis) la biogénesis del cloroplasto parte de proplástidos, localizados en la capa 2 del meristemo apical de brote (SAM); esta capa da origen al mesófilo de la hoja. Modificado de Liebers *et al.*, (2017).

1.1.2. Desarrollo de los cloroplastos

El desarrollo del cloroplasto en plantas inicia a partir de un proplástido, que es un plástido indiferenciado que presenta vesículas y un sistema de doble membrana, pero que carece de estructuras tales como granas y tilacoides (Fig. 1; Fig. 3). Es un proceso muy complejo que involucra tanto señales nucleares (o anterógradas) como señales derivadas del propio plástido en desarrollo (retrógradas). El

desarrollo del cloroplasto en *A. thaliana* es dependiente de la luz y se encuentra asociado al desarrollo de la planta. Durante la embriogénesis, los proplástidos se diferencian en cloroplastos a partir del estadio globular; posteriormente, durante la desecación de la semilla, se desdiferencian nuevamente, dando origen a los eoplastos. Durante la germinación y en oscuridad, la planta sigue un programa de desarrollo escotomorfogénico (desarrollo en oscuridad), en el cual, el plástido transita hacia un estadio intermedio en que se forma un etioplasto que es un plástido definido a partir de la presencia de cuerpos prolamelares; y, partiendo de éste, al iluminarse, y acoplado a un programa de desarrollo en luz (fotomorfogénesis), procede la diferenciación hacia un cloroplasto maduro. Durante el desarrollo foliar, los cloroplastos se desarrollan a partir de proplástidos que se encuentran en el meristemo apical de brote o SAM (del inglés, *Shoot Apical Meristem*), y, posteriormente, los cloroplastos ya diferenciados se replican por medio de división (Liebers *et al.*, 2017; Pogson *et al.*, 2015) (Fig. 3). La articulación de la biogénesis del cloroplasto requiere de tres procesos generales: la coordinación de la expresión nuclear y del plástido, tanto a nivel transcripcional como traduccional, el importe de proteínas de localización cloroplástica desde el citosol hacia el organelo y su ensamblaje, y la síntesis o importe de numerosos metabolitos como las clorofilas, los carotenos u otros lípidos; algunos de éstos, necesarios para la formación de los tilacoides (Pogson *et al.*, 2015).

La coordinación de la expresión de los genes plastídicos y nucleares requiere de un sistema de señalización entre el cloroplasto y el núcleo. Como se mencionó previamente, la transcripción de los genes plastídicos requiere de la expresión de algunos genes nucleares, entre los cuales se pueden mencionar a la NEP o a los factores sigma (σ) de la PEP; que en conjunto con ella y otras proteínas conforman el pTAC (del inglés *Plastid Transcriptionally Activated Chromosome*); es decir, la forma activa de la PEP. La PEP transita de un estadio inactivo en los etioplastos (sRNAP; del inglés *Soluble RNA Polymerase*) a uno activo en los plástidos en maduración (Fig. 3) y es un indicador del estadio de desarrollo del cloroplasto (Yagi & Shiina, 2014). A su vez, en lo que respecta al aparato traduccional del plástido, no todos los genes que codifican para las proteínas

ribosomales plásticas se encuentran en el cloroplasto, sino que muchos de éstos son nucleares (Tiller & Bock, 2014).

1.2. Señalización Retrógrada

Por señalización retrógrada se entiende aquel proceso que deriva de la percepción de un estímulo (ambiental, bioquímico o de desarrollo) por el plástido y que da origen a una o más señales que inciden en el núcleo, modificando la expresión génica (Chan *et al.*, 2016). Tradicionalmente la señalización retrógrada se ha dividido en señalización biogénica, correspondiente a aquellas señales que son producidas en el plástido durante su desarrollo de proplástido a cloroplasto maduro; y señalización operacional, que son señales producidas en cloroplastos funcionales (Chan *et al.*, 2016; Jarvis & López-Juez, 2013).

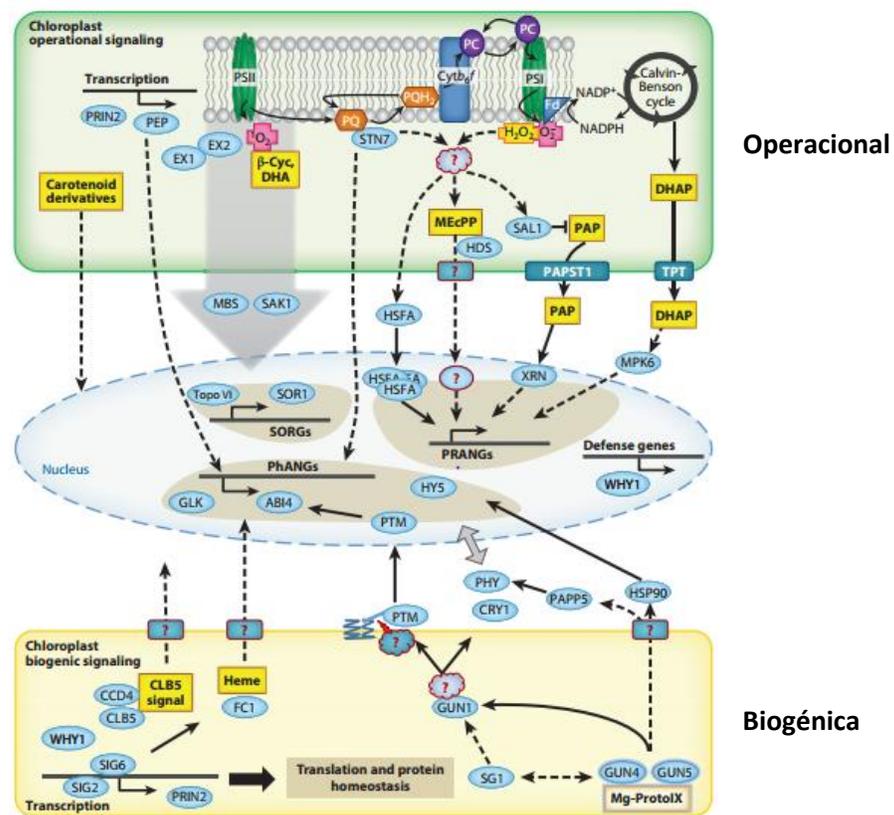


Fig. 4. Señalización retrógrada. La señalización retrógrada se suele subdividir para su estudio en señalización retrógrada biogénica y señalización retrógrada operacional. La señalización retrógrada biogénica refiere a aquellas señales que se ha identificado que provienen de plástidos en formación o arrestados en su desarrollo. La señalización retrógrada operacional hace referencia a las señales que se han descrito como provenientes de cloroplastos maduros. Los cuadros amarillos corresponden a señales propuestas, los círculos azules, a proteínas que participan de alguna manera en la señalización retrógrada. PhANGs (genes nucleares asociados a la fotosíntesis), SORGs (genes de respuesta a singletes de

oxígeno) y PRANGs (genes nucleares asociados al estado redox del plástido) son conjuntos de genes cuya expresión es regulada a través de señales retrógradas. Recuperado de Chan *et al.*, (2016).

La señalización retrógrada es esencial para el desarrollo de la planta desde etapas tempranas hasta tardías (Barajas-López *et al.*, 2013; Jarvis & López-Juez, 2013) y comprende una red muy compleja donde la mayoría de sus componentes aún se desconocen (Chan *et al.*, 2016).

1.2.1. Señalización retrógrada biogénica

La existencia de señales retrógradas biogénicas que regulan la transcripción nuclear ha sido evidenciada a través de la inhibición de dos procesos que se desarrollan en el cloroplasto y cuya alteración produce cloroplastos arrestados en su desarrollo: la síntesis de carotenoides y el aparato transcripcional/traducciona del plástido (Chan *et al.*, 2016). Numerosos estudios han demostrado que la presencia de cloroplastos disfuncionales, afectados en estadios temprano de su desarrollo, tiene efectos en la expresión de diversos genes nucleares, muchos relacionados con la funcionalidad del plástido y con el desarrollo normal de la planta. Esto ha permitido caracterizar algunas vías de señalización retrógrada y los genes blancos de dicha señalización. En la mayoría de las mutantes en que se presenta arresto en el desarrollo del plástido, se observan defectos en la expresión de los genes cloroplásticos, incluyendo genes relacionados con la fotosíntesis (o PhANGs, del inglés *Photosynthesis-Associated Nuclear Genes*). De manera interesante, muchas de estas mutantes también presentan diversos defectos en su desarrollo incluyendo la reducción de la dominancia apical, afectación en la formación de órganos aéreos, cambios en la expresión de genes ligados a la polaridad de la hoja, así como hojas con peciolo cortos y/o formas anormales (redondas, onduladas, con defectos en la vasculatura y en el mesófilo) (Larkin, 2014).

Como ejemplo de esto son las mutantes de *A. thaliana* y *Nicotiana tabaccum* en elementos que afectan el aparato transcripcional o traducciona plastídico (NEP, PEP, σ de las PEP, proteínas ribosomales del plástido), la síntesis de isoprenoides, así como el transporte de proteínas hacia el cloroplasto, que exhiben cloroplastos disfuncionales o arrestados en su desarrollo a la par que presentan

desregulación en la expresión de los genes cloroplásticos (Barajas-López *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2016; Jarvis & López-Juez, 2013; Pogson *et al.*, 2015).

Las plantas mutantes nulas para *RPOTp* y *RPOTmp*, que son genes que codifican para NEP en *A. thaliana*, presentan un fenotipo albino, alteraciones en el desarrollo del mesófilo y, como era de esperar, defectos en la transcripción de genes de desarrollo temprano del plástido. Igualmente, mutantes nulas para PEP o cualquier otra proteína que conforme el pTAC (como PRIN2), generan un fenotipo albino, así como defectos en el desarrollo temprano del plástido (Fig. 5) y, en lo que respecta a la transcripción de genes, se observa disminución en la expresión de aquellos relacionados con la actividad fotosintética (Allison *et al.*, 1996; Börner *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2018; Hricova *et al.*, 2006), pues la activación de PEP bajo condiciones de luz funge como una señal retrógrada que promueve la expresión del LHC (del inglés *LIGHT HARVESTING COMPLEX*) y RBCS (del inglés *RUBISCO SMALL SUBUNIT*) (Díaz *et al.*, 2018).

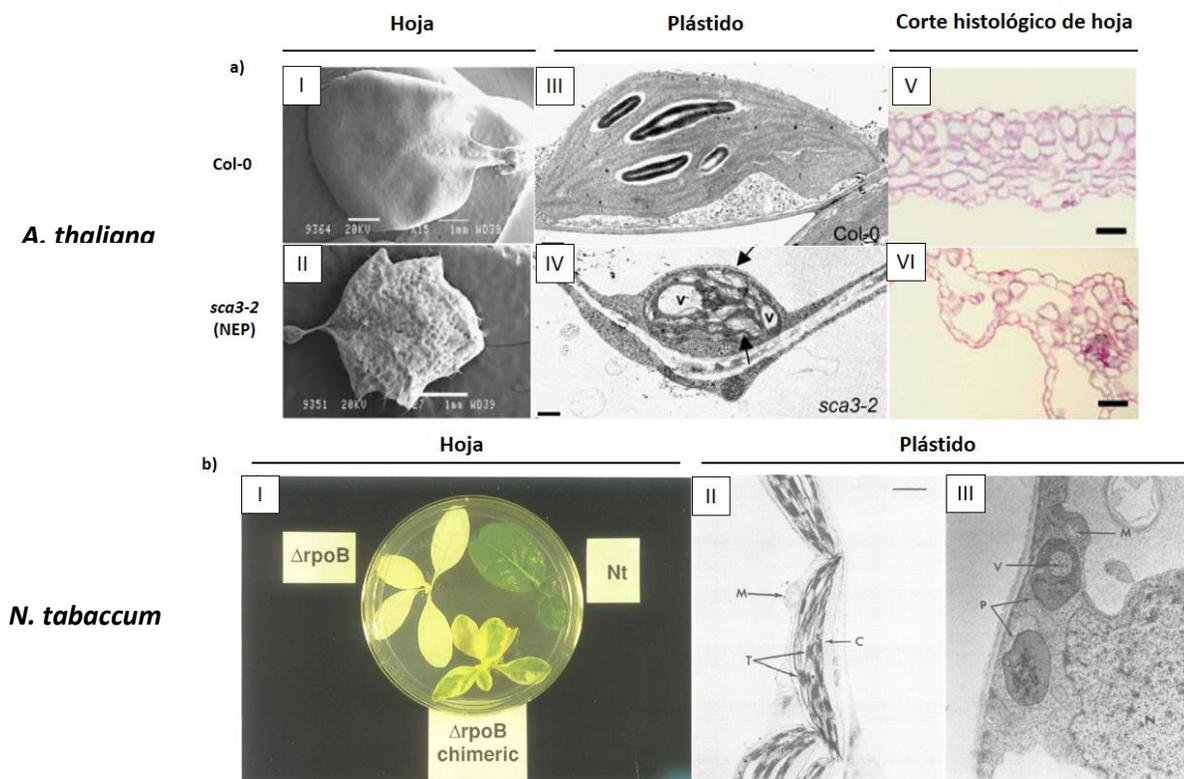


Fig. 5. Mutantes en NEP y PEP presentan alteraciones en el desarrollo del plástido y de la hoja. a) La mutante en *A. thaliana* para *RPOTp*, *sca3-2*, presenta hojas alteradas en su morfología y su desarrollo [bordes aserrados] (II) y carencia

de mesófilo con grandes espacios aéreos en su lugar (VI); caso que no ocurre en una planta silvestre, cuyas hojas no presentan aserraciones (I) y que carece de estos espacios aéreos (V); a su vez, el arreglo de los tilacoides de los plástidos de *sca3-2* es simple (IV) comparado con lo que ocurre en cloroplastos silvestres (Col-0) (III) (Hricova *et al.*, 2006). **b)** Mutantes para *rpoB* en *Nicotiana tabacum* (Nt) ($\Delta rpoB$) registran un fenotipo albino (I) y sus cloroplastos se encuentran arrestados en un estadio temprano (III); véase en comparación con la estructura de los cloroplastos en una planta silvestre (II) (Allison *et al.*, 1996).

Las células vegetales presentan poliplastidia; es decir, numerosos plástidos por célula; de modo que al generar mutantes en genes plastídicos, pueden presentarse células en que no todos sus plástidos contengan la mutación (heteroplásticas) y células donde la mutación está presente en todos los plástidos (homoplásticas). Las mutantes homoplásticas para el gen *rps18* (esencial para el ribosoma plastídico y de localización plastídica) presentan un fenotipo letal a nivel celular; sin embargo, en plantas heteroplásticas, el fenotipo no es letal y el desarrollo de la planta prosigue; no obstante, con importantes afectaciones en su programa de desarrollo, lo cual se evidencia con la presencia de hojas aberrantes (Tiller & Bock, 2014).

Otras mutantes que afectan la biogénesis del cloroplasto y que alteran señales retrógradas están relacionadas con la síntesis de isoprenoides. Estos compuestos cumplen numerosas funciones dentro de la célula vegetal, siendo componentes esenciales de la membrana, así como precursores de pigmentos que participan en el proceso fotosintético (tales como tetrapirroles, carotenoides, etc.), de fitohormonas y otras moléculas señalizadoras (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012; Stange, 2016; Vranová, *et al.*, 2013).

Los isoprenoides se sintetizan a partir de la condensación de dos bloques estructurales de IPP (isopentenil pirofosfato) y DMAPP (dimetilalil pirofosfato). En las plantas existen dos vías para la síntesis de IPP y DMAPP, una citosólica y otra cloroplástica; esta última es la vía conocida como 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (vía MEP) (Stange, 2016). Se ha reportado que mutantes en la vía MEP como *cla1*, *clb4* o *clb6* presentan en sus hojas plástidos arrestados en un estadio temprano del desarrollo. Dichos plástidos carecen de grana y tilacoides, tienen fenotipo albino y están afectadas en la expresión de genes nucleares que codifican tanto para algunas proteínas relacionadas con la fotosíntesis como aquellas codificantes

para otras proteínas de la vía MEP (Fig. 6) (Guevara-García *et al.*, 2005; Gutierrez-Nava *et al.*, 2004; Mandel *et al.*, 1996).

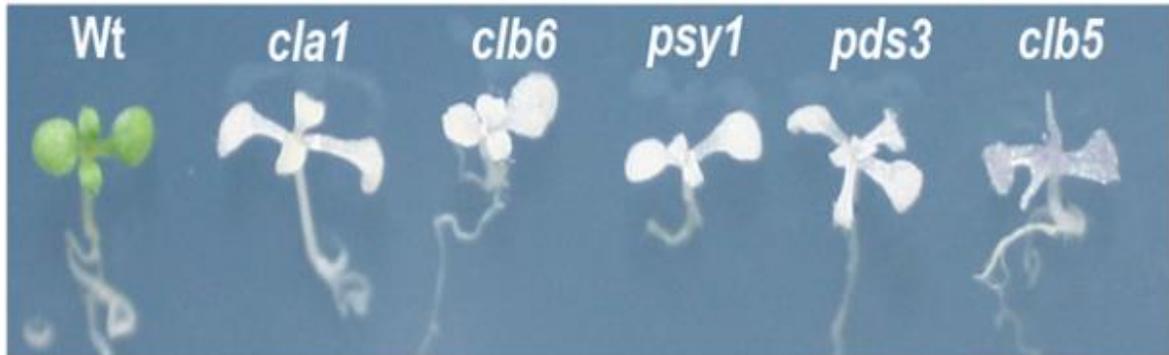


Fig. 6. Mutantes en la vía MEP y la vía de síntesis de carotenos. *cla1* corresponde a una mutante en el gen que codifica para la enzima DXS (1-Deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa), *clb6* es una mutante en HDR (4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa); ambas de la vía MEP. *psy1* es una mutante en la fitoeno sintasa (PSY), *pds3*, en la fitoeno desaturasa (PDS) y *clb5* en la ζ -caroteno desaturasa (ZDS). Tomado de Avendaño-Vázquez *et al.*, (2014).

Los tetrapirroles, moléculas precursoras de la clorofila, también cumplen funciones de regulación de la expresión nuclear. Mutantes para genes codificantes para enzimas cruciales en su síntesis, como CHLH (GUN5) o GUN4, expresan los PhANGs en condiciones en las que en las plantas silvestres éstos se encuentran reprimidos, como al aplicar herbicidas que afectan la síntesis de carotenoides o al crecer en glucosa. De este hecho deriva que a éstas mutantes se les haya denominado mutantes *gun* (del inglés, *GENOMES UNCOUPLED*) (Chan *et al.*, 2016; Larkin, 2014).

gun1, a diferencia de las demás mutantes *gun*, corresponde a una mutante nula para una proteína tipo PPR (del inglés *PENTATRICOPEPTIDE REPEAT*); no obstante, también se conoce un rol para GUN1 dentro de la vía de señalización retrógrada derivada de la biosíntesis de tetrapirroles (Chan *et al.*, 2016; Larkin, 2014). Las PPR son proteínas de repetición de motivos de pentatricopéptidos, capaces de unirse a RNA y que pueden incidir en el procesamiento de los transcritos, su estabilización, así como en la edición de los mismos (cambio de algunos de sus nucleótidos) en los organelos (pueden tener localización tanto cloroplástica como mitocondrial). La proteína GUN1 presenta un dominio pequeño relacionado con MutS (SMR, del inglés *Small MutS related domain*) en su C-

terminal y un péptido señal de localización plastídica en su N-terminal. El dominio SMR se encuentra en proteínas que median procesos de reparación y recombinación de DNA (Colombo *et al.*, 2016; Tadini *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018).

1.3. Síntesis de carotenoides y sus precursores

Como se explicó previamente, los isoprenoides se sintetizan dentro del cloroplasto por medio de la vía MEP; ésta comienza con la condensación de hidroxietil tiamina (derivado del piruvato) y un grupo aldehído derivado del D-gliceraldehído 3-fosfato (GA-3P), con lo que se sintetiza 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP). Este paso es catalizado por la enzima DXS/CLA1 (del inglés, 1-DEOXY-D-XYLULOSE 5-PHOSPHATE SYNTHASE); posteriormente, la enzima DXR (del inglés 1-DEOXY-D-XYLULOSE 5-PHOSPHATE REDUCTOISOMERASE) reduce el DXP a 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) que, a su vez, es transformado en 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol (CDP-ME) por la MCT (del inglés, 2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL 4-PHOSPHATE CYTIDYLYLTRANSFERASE). Después, el CDP-ME es fosforilado por la cinasa CMK [del inglés, 4-(CYTIDINE 5'-DIPHOSPHO)-2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL KINASE], produciendo 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato (CDP-ME2P). Enseguida, el CDP-ME2P se transforma en 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP) por medio de la MDS (del inglés, 2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL 2,4-CYCLODIPHOSPHATE SYNTHASE), para que así, el MEcPP sea reducido por la HDS (del inglés, 4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL-DIPHOSPHATE SYNTHASE), produciendo 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP). Finalmente, la HDR (del inglés, 4-HYDROXY-3-METHYLBUT-2-ENYL DIPHOSPHATE REDUCTASE) cataliza la conversión de HMBPP en IPP y DMAPP. La IPPI (del inglés, ISOPENTENYL DIPHOSPHATE Δ -ISOMERASE), una isomerasa, permite que exista balance entre la cantidad de IPP y DMAPP en el cloroplasto (Vranová *et al.*, 2013).

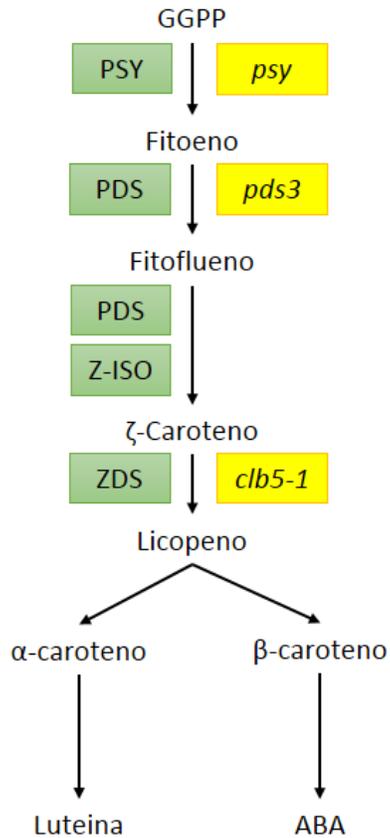


Fig. 7. Esquema simplificado de la vía de síntesis de carotenoides. La condensación de dos moléculas de GGPP por la PSY determina el inicio de la síntesis de carotenos. La PDS (fitoeno desaturasa) realiza la desaturación del fitoflueno, convirtiéndolo en ζ-caroteno; éste a su vez es isomerizado por la Z-ISO (ζ-caroteno desaturasa) para que pueda ser tomado por la ZDS (ζ-caroteno desaturasa) como sustrato. La ZDS cataliza el paso de ζ-caroteno a licopeno. *clb5-1* es una mutante nula para ZDS; por lo tanto, acumula fitoflueno y ζ-carotenos.

Los carotenoides o tetraterpenoides son isoprenoides conformados por esqueletos de 40 carbonos formados por ocho unidades de isopreno (C₅H₈). Su síntesis comienza con la condensación de dos unidades de geranilgeranil-pirofosfato (GGPP, C₂₀) por la enzima PSY (del inglés, PHYTOENE SYNTHASE). Posteriormente, la enzima PDS (del inglés, PHYTOENE DESATURASE) transforma el fitoeno a fitoflueno y después, el fitoflueno en ζ-caroteno. La enzima Z-ISO (del inglés ζ-CAROTENE ISOMERASE), cataliza la transformación de *cis* a *trans* del producto de PDS para que así la enzima ZDS (del inglés ζ-CAROTENE DESATURASE) pueda tomarla como sustrato. ZDS participa en dos reacciones de desaturación; primero de ζ-caroteno a neurosporeno y, posteriormente, de neurosporeno a poli *cis*-licopeno. La enzima CRTISO (del inglés *CAROTENOID ISOMERASE*) cataliza el último paso de esta vía, convirtiendo el poli *cis*-licopeno en *trans*-licopeno (Stange, 2016).

Los carotenos participan dentro del proceso fotosintético a través de la captación de luz (en un rango de 450 a 570 nm) y protegiendo ante el daño foto-oxidativo causado por subproductos del metabolismo fotosintético. Aunado a esto, también de los carotenos se derivan las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y estrigolactonas, mismas que inciden de manera importante en el desarrollo

vegetal, así como en las respuestas de la planta ante estímulos externos (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012).

1.3.1. Mutantes en la vía de síntesis de carotenoides

La síntesis de los productos de PDS y PSY o su propia expresión parece estar involucrada en la señalización retrógrada biogénica. En el caso de la mutante *pds3*, afectada en la enzima PDS (Fig. 6; Fig. 7), fenotípicamente se tiene una planta enana (*dwarf*), albina e infértil, cuyos plástidos están arrestados en un estadio temprano del desarrollo, careciendo éste de membranas internas. En lo que respecta a la transcripción de genes nucleares, muchos relacionados con la biosíntesis de carotenoides, como *PSY*, *LYC* (*LICOPENO CICLASA*) o *ZDS* se encuentran regulados hacia abajo; esto es cierto también para los genes de la vía MEP, como *DXS/CLA1*; para *GGPPS* (*GERANILGERANIL PIROFOSFATO SINTASA*), misma que sintetiza GGPP, precursor del fitoeno, a partir de DMAPP; y para genes de la vía de síntesis de giberelinas (fitohormonas derivadas de isoprenoides) y de clorofilas (Qin *et al.*, 2007). Para *psy1*, mutante nula para *PSY* en *A. thaliana*, se tiene, al igual que en *pds3*, plantas con fenotipo albino. Está reportado que sobre-expresoras de este gen, en tomate, tienen un fenotipo de enanismo (*dwarf*), así como regulación hacia abajo en la síntesis de giberelinas debido al secuestro de GGPP hacia la síntesis de carotenos (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012; Stange, 2016). Interessantemente, datos derivados de ensayos de silenciamiento por RNAi (del inglés *interference RNA*) de *PSY* en *Oncidium*, revelaron que de manera semejante a lo que ocurre con *pds3* en *A. thaliana*, el *knockdown* de *PSY* afecta la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de giberelinas, de clorofilas, y de otras enzimas que forman parte de la vía de síntesis de carotenoides y, a nivel fenotípico, causa que las plantas presenten defectos en el desarrollo, siendo estas, plantas enanas y con cloroplastos arrestados en el desarrollo con defectos en el arreglo de las granas (Liu *et al.*, 2014). Sin embargo, en ambos casos, tanto en la mutante *psy* como en *pds3*; no se afecta el desarrollo foliar (Fig. 6), a

diferencia de lo que ocurre con la mutante *clb5-1*, también mutante en la vía de síntesis de carotenoides.

1.3.2. Mutante *clb5*

La mutante *clb5-1* (*chloroplast biogenesis 5*) también presenta plástidos arrestados en estadios tempranos del desarrollo y un fenotipo albino (Fig. 6) (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004); sin embargo, a diferencia de las mutantes mencionadas anteriormente, tanto de la vía MEP como de la biosíntesis de carotenoides, la mutante *clb5-1* tiene un fenotipo particular de la hoja, con una forma radializada o acicular y sin una diferenciación definida entre peciolo y lámina. A nivel tisular, presenta casi exclusivamente un cilindro de tejido vascular rodeado de una única capa de células epidérmicas, entre los cuales existen espacios aéreos donde deberían hallarse las células del mesófilo (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014) (Figs. 6 y 8).

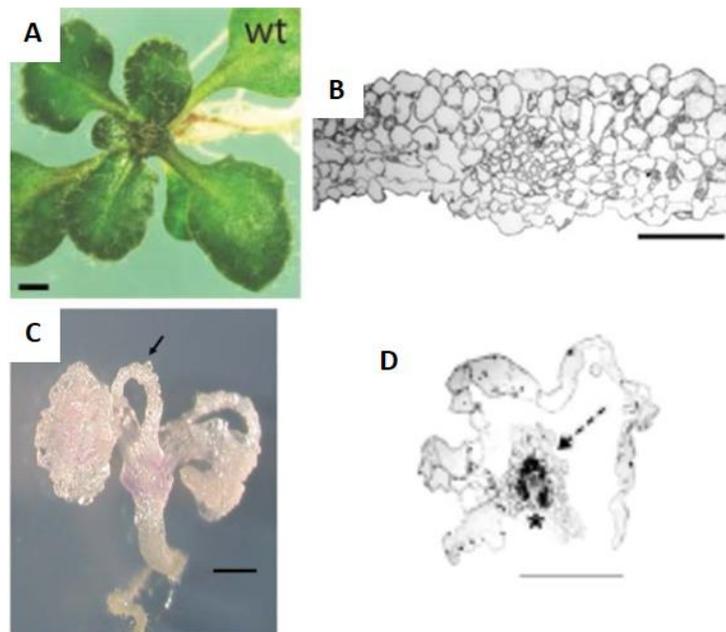


Fig. 8. Anatomía de la hoja de *clb5-1* respecto de una planta silvestre (WT). (A) Morfología de la hoja de una planta silvestre de *A. thaliana*, como puede verse, se distingue entre peciolo y lámina foliar. (B) Corte transversal que muestra la anatomía de la hoja de una planta silvestre, se distinguen distintas capas celulares; de la superficie adaxial a la superficie abaxial, epidermis adaxial, mesófilo en empalizada, tejido vascular, mesófilo esponjoso y epidermis abaxial. (C) Morfología de la hoja de *clb5-1*. La mutante presenta hojas radializadas, sin distinción entre lámina y peciolo. (D) Corte transversal que muestra la anatomía de una hoja de *clb5-1*. La hoja presenta una capa de epidermis, espacios aéreos donde debería encontrarse el mesófilo (flecha); y el tejido vascular. Modificado de Avendaño-Vázquez *et al.*, (2014).

clb5-1 consiste en una mutación puntual en el nucleótido 693 del gen que codifica para la enzima ZDS, causando la transición de una guanina a una adenina, lo que genera un codón de paro y produce una proteína trunca de 230 aminoácidos.

En esta mutante, la expresión abatida de los genes plastídicos *clpP1*, *rpoC*, *rpoA*, *accd1* y *rrn16S* demuestra que el cloroplasto se arresta tempranamente en su desarrollo y que el aparato traduccional plastídico se encuentra comprometido (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Gutierrez-Nava *et al.*, 2004).

La mutante *clb5-1* presentar afectada la ZDS, acumula fitoflueno y ζ -carotenos (Fig. 7). Posteriormente se corroboró que la acumulación de estos metabolitos está implicada en el fenotipo de *clb5-1*; pues, al inhibir la actividad de la enzima PDS por medio del herbicida fluoridona, y, por ende, evitar la acumulación de estos carotenoides lineales, el fenotipo de la hoja revierte a una hoja con lámina y peciolo; paralelamente se recupera la expresión de numerosos genes nucleares y plastídicos. Esta reversión también se observa en una doble mutante *clb5-1 pds3*, la cual presenta un fenotipo foliar normal (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014). Por lo tanto, de la acumulación de estos carotenoides lineales debe derivarse una señal retrógrada que deviene en última instancia en la modificación del programa de desarrollo foliar.

1.3.3 La Mutante *spc1-2*

spc1-2 (*spontaneous cell death 1*) es una mutante en el gen que codifica para la enzima ZDS, al igual que *clb5-1*. Es una mutación por inserción de T-DNA (del inglés *transfer DNA*) en el segundo exón de la región codificante para ZDS. Para esta mutante no se ha caracterizado en qué estadio del desarrollo están arrestados sus plástidos ni la anatomía interna de la hoja, sin embargo, Dong *et al.*, (2007) reportaron que esta mutante, al igual que otras en la vía de síntesis de carotenoides, es albina, y que, a diferencia de la mayoría de éstas, y a semejanza de *clb5-1*, presenta alteración en el desarrollo foliar, así como en la señalización retrógrada, no obstante, su fenotipo es menos severo.

De acuerdo a Dong *et al.*, (2007), *spc1-2* podría no ser un alelo nulo para *ZDS*, pues, mediante análisis de tipo *Northern blot*, se revelan dos bandas con transcrito que podrían corresponder al transcrito de *ZDS*. Esto podría ser el causante de que su fenotipo sea menos severo que el reportado para *clb5-1*, en conjunto con el hecho de que *spc1-2* se encuentra en un fondo genético diferente a *clb5-1* (ecotipos Col-0 y Ler-0, respectivamente).

1.3.4. Síntesis de apocarotenoides

Los carotenoides pueden experimentar diversas modificaciones produciendo compuestos conocidos como apocarotenoides. Se ha reportado que estos metabolitos pueden tener función de moléculas señalizadoras; como es el caso de ABA y estrigolactonas y de otros más como ACS2 o ACS3, que son señales propuestas cuya naturaleza se desconoce aún pero que se hipotetiza son apocarotenoides (Hou *et al.*, 2016).

La síntesis de apocarotenoides puede ser no enzimática, por rompimiento oxidativo, o enzimática, a través de la acción de una familia conservada de enzimas conocida como dioxigenasas de corte de carotenos (CCDs, del inglés CAROTENE CLEAVAGE DIOXYGENASES), las cuales incorporan átomos de oxígeno a lo largo del esqueleto carbonado de los carotenoides.

Esta familia puede a su vez subdividirse en dos subfamilias: la NCED (del inglés NINE-CIS-EPOXY-CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE) y la CCD. En *A. thaliana* se han descrito cinco miembros de la subfamilia NCED, los cuales están involucrados en la síntesis de ABA, y cuatro miembros de la subfamilia CCD, CCD8 y CCD7 involucradas posiblemente en la síntesis de estrigolactonas, y CCD1, CCD4, de los cuales se han descrito numerosos sustratos (Hou *et al.*, 2016).

Avendaño-Vázquez *et al.*, (2014) propusieron que la señal retrógrada que se deriva de la acumulación de fitoflueno y ζ -carotenos tendría una naturaleza apocarotenoides; esta señal se denominó como ACS1 (del inglés *Apocarotenoid signal 1*) (Hou *et al.*, 2016). Como parte de la confirmación de la naturaleza de

esta señal, se comprobó que una doble mutante *ccd4 clb5-1* recupera el fenotipo de hoja acicular de *clb5-1* hacia un fenotipo de hoja normal (Fig. 9). Esto permitió posicionar a la enzima CCD4 dentro de la vía de señalización retrógrada derivada de la acumulación de fitoflueno y ζ-carotenos, como la CCD que podría realizar el corte de los carotenos lineales que se acumulan en *clb5-1* y de los que se deriva esta señal apocarotenoide (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2016).

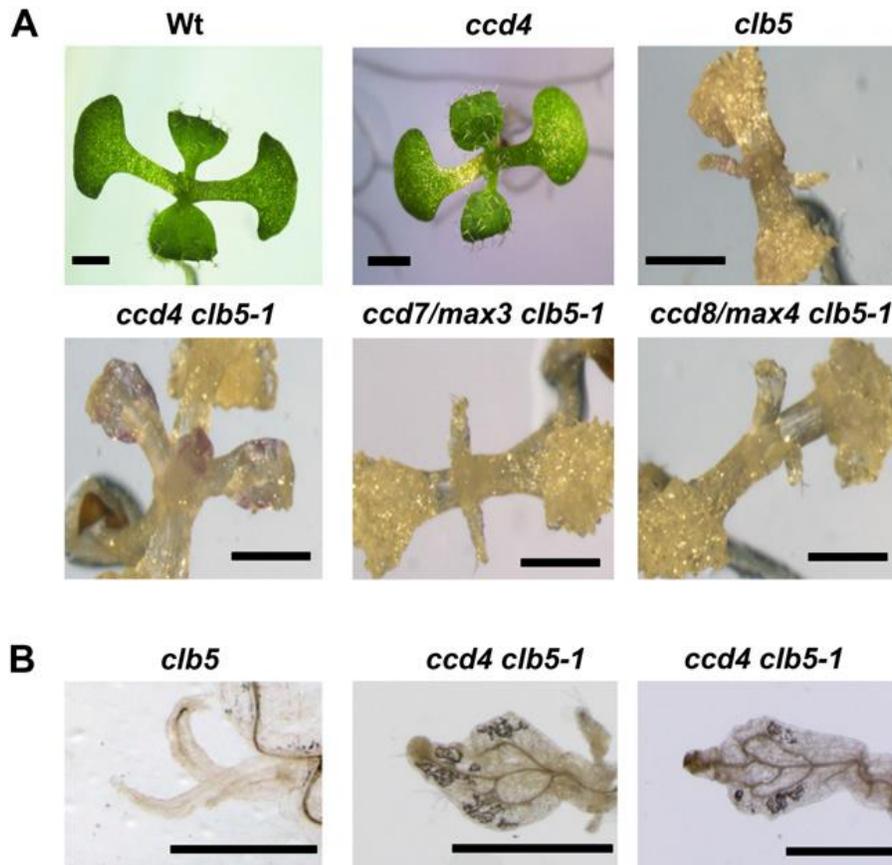


Fig. 9. La doble mutante *ccd4 clb5-1* recupera la morfología de la hoja de *clb5-1* a una hoja normal. (A) Dobles mutantes *ccd4*, *ccd7* y *ccd8* con *clb5-1*; únicamente la doble mutante *ccd4 clb5-1* exhibe una recuperación del fenotipo foliar. (B) Comparación de la hoja de *clb5-1* y de la doble mutante *ccd4 clb5-1*. Avendaño-Vázquez *et al.*, (2014).

1.4. Desarrollo de la hoja

Las hojas son órganos laterales que se originan en el SAM, con una morfología plana y asimétrica y que crecen en torno a tres ejes dimensionales: proximal-distal, medio-lateral, y adaxial-abaxial (Bar & Ori, 2014; Yamaguchi *et al.*, 2012). El

eje adaxial-abaxial se define a partir de la posición relativa del SAM; de tal modo que las células localizadas en las inmediaciones del SAM, darán origen al dominio adaxial, mientras que aquellas localizadas lejos de la periferia del SAM, originarán el dominio abaxial (Fukushima & Hasebe, 2014).

A nivel celular, el dominio adaxial está compuesto por células epidérmicas con una cutícula gruesa, así como por una capa de células de mesófilo en empalizada, densamente empaquetadas (esto último, para favorecer la actividad fotosintética). Por otro lado, el dominio abaxial consta de una epidermis con numerosas células estomáticas embebidas y de una capa de células de mesófilo esponjoso. La hoja presenta invasión del tejido vascular, y éste también se encuentra asociado a la dorsiventralidad del órgano, teniendo así identidad abaxial el floema y adaxial el xilema (Yamaguchi *et al.*, 2012).

El desarrollo foliar temprano es complejo y responde a tres procesos principales: la iniciación del primordio foliar, el establecimiento de la dorsiventralidad (polaridad adaxial/abaxial) en un plano transversal y de las regiones distal y proximal en un plano longitudinal, y el desarrollo de un meristemo marginal (Tsukaya, 2013). Dentro de estas regiones ocurren distintos mecanismos de regulación del desarrollo, desprendiéndose dominios de proliferación celular (dando origen así al meristemo foliar), de diferenciación y de expansión celular. La comunicación intercelular influye en la determinación de estos dominios (Tsukaya, 2013).

En la región distal o apical se encuentran zonas de expansión celular y, en la región basal, de proliferación. Dentro de la zona de proliferación el marcador *CYCB1* (*CYCLYN B1*), específico de las fases G2/M del ciclo celular, permite evaluar la división y crecimiento de las células del primordio foliar desde su inicio hasta que la hoja se puede considerar madura (Tsukaya, 2013). El factor conocido como *ANGUSTIFOLIA3* es un co-activador transcripcional importante para el desarrollo foliar visto desde el plano transversal. Éste se acumula en células del mesófilo y funge como regulador positivo de la proliferación celular desde las células del interior del tejido hacia la epidermis (Kawade *et al.*, 2013); de este modo, coordinando la formación de las distintas capas celulares.

Partiendo de la región meristemática (misma que se establece entre la lámina de la hoja y el peciolo) y a través de los márgenes foliares, se transportan auxinas de manera continua. Este proceso se ha postulado que está ligado a máximos de concentración de auxinas, los cuales están controlados por la actividad del transportador de auxinas PIN1, de manera análoga a lo que ocurre en el meristemo apical. Dado que el suministro puede presentar variaciones, en los márgenes foliares puede ocurrir la formación de aserraciones (Tsukaya, 2013). Dentro del SAM, PIN1 contribuye a la iniciación del primordio foliar a través de un influjo de auxinas en dirección hacia un primordio incipiente; posteriormente, PIN1 reorganiza el flujo de auxinas desde el primordio hacia el SAM una vez se ha iniciado el desarrollo foliar. Esto se ve reflejado dentro del dominio adaxial al establecerse en éste una zona transitoria de bajo flujo de auxinas (Fig. 10). En plantas mutantes para PIN1 (*pin1-1*) se registran defectos en la determinación de la polaridad de la hoja, teniéndose dos fenotipos en alrededor de un cuarto de las hojas: en forma de trompeta y *rod-like*; ambos con una vasculatura abaxializada (Qi et al., 2014). Al hacer dobles mutantes entre PIN1 y REV (un factor de transcripción tipo HD-ZIPIII con importancia en el dominio adaxial), el fenotipo *rod-like* se presenta en alrededor del 50% de las hojas. No obstante, en mutantes sólo para REV no se presenta este fenotipo.

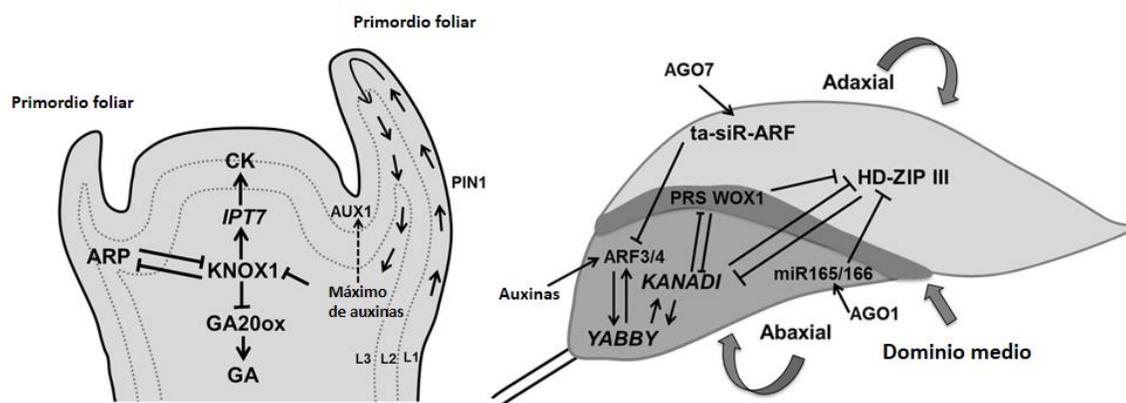


Fig. 10. Iniciación del primordio foliar y determinación de la polaridad abaxial/adaxial. Para la iniciación del primordio foliar se requieren máximos de concentraciones de auxinas. PIN1 media este proceso. En la determinación de la polaridad abaxial/adaxial se reconocen tres familias de factores transcripcionales que dotan de identidad a uno u otro dominio, los *KANADI* y *YABBY* se expresan en el dominio abaxial, mientras que los *HD-ZIP III*, lo hacen en el dominio adaxial. La expresión de aquellos factores transcripcionales del dominio abaxial reprime la expresión de los propios del dominio adaxial y viceversa. Aunado a esto, gradientes de auxinas también controlan la determinación de la identidad

de un dominio u otro, en el caso del dominio adaxial, éste se depleta transitoriamente de auxinas durante este proceso. Esquema modificado de Kalve et al., (2014).

La polaridad del eje dorsiventral de la hoja está influida tanto por reguladores genéticos en el primordio foliar dentro de cada dominio, como por el transporte de auxinas desde y hacia el primordio por parte del SAM (Qi *et al.*, 2014; Yamaguchi *et al.*, 2012). Los reguladores del dominio adaxial incluyen a los miembros de las familias HD-ZIPIII, como *REVOLUTA (REV)*, *PHABULOSA (PHB)* y *PHAVOLUTA (PHV)*; mientras que para el caso del dominio abaxial, incluyen a los *KANADI (KAN)*, *ETTIN/AUXIN RESPONSE TRANSCRIPTION FACTOR (ARF3)* y *ARF4*; todos éstos siendo factores de transcripción (Fig. 10) (Tsukaya, 2013).

El establecimiento final del programa de desarrollo foliar está relacionado a la expresión de los genes *YABBY (FILAMENTOUS FLOWER [FIL/YAB1], YAB2, YAB3 y YAB4)* (Fig. 10); éstos son factores de transcripción de localización abaxial y regulan el cambio desde el programa de desarrollo del SAM hacia la expresión de un programa específico de la hoja, partiendo de la polaridad adaxial/abaxial para activar el programa de desarrollo de la lámina foliar (Tsukaya, 2013).

1.4.1. Los defectos en la hoja de *clb5-1*

Los defectos en la hoja de *clb5-1* se evaluaron por medio del uso de marcadores para el desarrollo de la hoja fusionados a la β -Glucoronidasa (GUS) como gen reportero. Los genes seleccionados como marcadores fueron *FIL*, *REV*, *PHB*, y *CYCB1*; así como el marcador DR5, para documentar la acumulación de auxinas. Este análisis demostró que no hay transición a crecimiento expansivo en *clb5-1* ya que existe expresión de *CYCB1* a lo largo de toda la hoja verdadera y no se establece un frente de arresto de la proliferación celular. La polaridad abaxial/adaxial de la hoja de *clb5-1* está afectada ya que no existe expresión de *FIL* en el dominio abaxial de la hoja verdadera, sino sólo expresión del mismo en torno al dominio abaxial de los cotiledones y la expresión de *PHB* está deslocalizada, pues en éstas plantas se observa en tejido vascular y no en el dominio adaxial, así como que en *clb5-1* no existe ramificación del eje vascular (la expresión de *REV* se limita en torno a un único eje vascular central). Asimismo,

se demostró que en la hoja de *clb5-1* no existe respuesta a auxinas, pues se observó una nula expresión de DR5 (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014).

1.5. La traducción del genoma plastídico

Inducir defectos en el aparato traduccional del plástido, ya sea por medio de compuestos químicos o de mutaciones, genera alteraciones en el desarrollo normal de la planta. Particularmente, si se afecta mediante mutaciones a componentes esenciales del aparato de traducción plastídica, se generan fenotipos aberrantes en hoja caracterizados por el arresto de la proliferación celular en *N. tabaccum* (Tiller & Bock, 2014). De manera similar, las mutantes en *A. thaliana sca3* (en el gen *RpoTp*) y *hfp-108-1* (mutante para *RRF*, del inglés *Ribosomal Recycling Factor*) presentan hojas con aserraciones, y *sca1* (en el gen *rps5*) que exacerba el fenotipo (hojas aserradas) de *as1 as2*, dos factores de transcripción involucrados en el desarrollo foliar (Mateo-Bonmatí *et al.*, 2015; Tiller & Bock, 2014).

En *A. thaliana*, el genoma del cloroplasto codifica para 54 proteínas centrales que están principalmente asociadas a la actividad fotosintética de este organelo, 31 proteínas participan en la regulación de la expresión del DNA plastídico y 45 genes que transcriben para rRNAs o tRNAs (del inglés *transfer RNA*) (Jarvis & López-Juez, 2013).

La expresión génica del plastoma y el genoma bacteriano es muy similar. El DNA dentro del cloroplasto se agrupa en nucleoides, y su transcripción depende de σ y de una polimerasa de tipo bacteriano (PEP). La síntesis de proteínas requiere de ribosomas 70S de tipo bacteriano y la transcripción y la traducción están acopladas, tal y como ocurre en procariontes (Jarvis & López-Juez, 2013). No obstante, a pesar de las similitudes que existen entre el genoma bacteriano y el plastídico, la regulación de la expresión del plastoma es más compleja, puesto que requiere de una polimerasa adicional para la transcripción de algunos de los genes plastídicos, la NEP (Börner *et al.*, 2015; Jarvis & López-Juez, 2013; Tiller & Bock, 2014). También incluye procesamiento post-transcripcional de los mRNAs (del

inglés *messenger RNA*) por diversas proteínas como las PPR (Manna, 2015; Shikanai, 2015).

El aparato traduccional del cloroplasto está compuesto por proteínas ribosomales, rRNAs y tRNAs. Estos componentes se encuentran codificados tanto en el plastoma como en el genoma nuclear (Tiller & Bock, 2014). El ribosoma plastídico está conformado por dos subunidades; una subunidad pequeña 30S y la subunidad grande 50S, que a su vez están compuestas por los rRNAs 16S; y 23S, 5S y 4.5S, respectivamente; todos codificados en el genoma del plástido (operón *rrn*). El rRNA 4.5S no existe en bacterias, sino solamente en plantas y la evidencia apunta a que deriva de un evento de fragmentación del rRNA 23S, siendo así una de las diferencias importantes entre el clororibosoma (ribosoma del cloroplasto) y el ribosoma bacteriano (Tiller & Bock, 2014).

En lo que respecta a las proteínas ribosomales, cinco de éstas son exclusivas del cloroplasto, mientras que las 52 restantes tienen proteínas ortólogas en *Escherichia coli*. Del total de proteínas que se asocian a las dos subunidades del clororibosoma, 36 se encuentran codificadas en el genoma nuclear y las 21 restantes, en el plastoma.

Dentro del plastoma de *N. tabaccum*, 30 genes codifican para los tRNAs necesarios para que el aparato traduccional plástidico sea funcional; no obstante, se ha encontrado que puede existir traducción en el plástido con un conjunto mínimo de 25 tRNAs. Mutantes *knockout* para tRNAs plastídicos no esenciales exhiben fenotipos caracterizados por un crecimiento lento y actividad fotosintética reducida, asociada a una traducción plastídica comprometida (Alkatib *et al.*, 2012).

1.5.1. La inhibición de la traducción plastídica

El uso de antibióticos como inhibidores de la traducción plastídica genera alteraciones en el desarrollo de la hoja. Tal es el caso de la lincomicina (Lin) y la espectinomycin (Sp), los cuales inhiben la formación de la lámina foliar (Parker *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2016; Tameshige *et al.*, 2013); para Lin se ha reportado que incluso se afecta la polaridad de la hoja, incidiendo en la expresión de *FIL* y

miRNAs (del inglés *micro RNAs*) como miR165. Estos defectos también parecen estar relacionados a un proceso de señalización retrógrada, dado que ninguno de los genes que se codifican dentro del plástido están directamente involucrados en el desarrollo foliar (Tiller & Bock, 2014).

En las subunidades mayor (50S) y menor (30S) de los ribosomas plastídicos se encuentran tres sitios donde se unen los tRNAs: el sitio A (aminoacil), el P (peptidil) y el E (del inglés *exit*; salida) (Joseph, 2003). La subunidad 30S contiene los sitios para la decodificación del transcrito, en los cuales, la interacción entre los codones del mRNA y los anticodones del tRNA determinan la selección de uno u otro aminoacil tRNA (aa-tRNA). La síntesis proteica requiere que se transloquen sucesivamente los tRNAs del sitio A al sitio P; y de éste, al sitio E, para que así, puedan seguir traducándose los codones restantes del mRNA (Beringer & Rodnina, 2007; Frank *et al.*, 2007; Ling & Ermolenko, 2016). La Sp inhibe estéricamente la rotación de la cabeza de la subunidad 30S por medio de su unión a la hélice 34 del rRNA 16S (Fig. 11) (Borovinskaya *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha reportado que este antibiótico interacciona con la proteína ribosomal S5 (rps5) en la lisina 25 (Lys25). Por lo tanto, mutaciones para rps5 y rrn16 generan insensibilidad ante la acción de la Sp (Borovinskaya *et al.*, 2007; Wirmer & Westhof, 2006). La formación del enlace peptídico es dependiente de la acción del centro peptidil transferasa (PTC), mismo que está presente en la subunidad 50S. Su actividad se adscribe dentro del proceso de translocación. La Lin inhibe la actividad del PTC al unirse a su sitio A, con lo cual interfiere en la formación del enlace peptídico (Wilson, 2009). El PTC está formado por una asa derivada del rRNA 23S de la subunidad 50S ribosomal; por consiguiente, mutaciones para este gen derivan en resistencia a este antibiótico (Douthwaite, 1992; Matzov *et al.*, 2017).

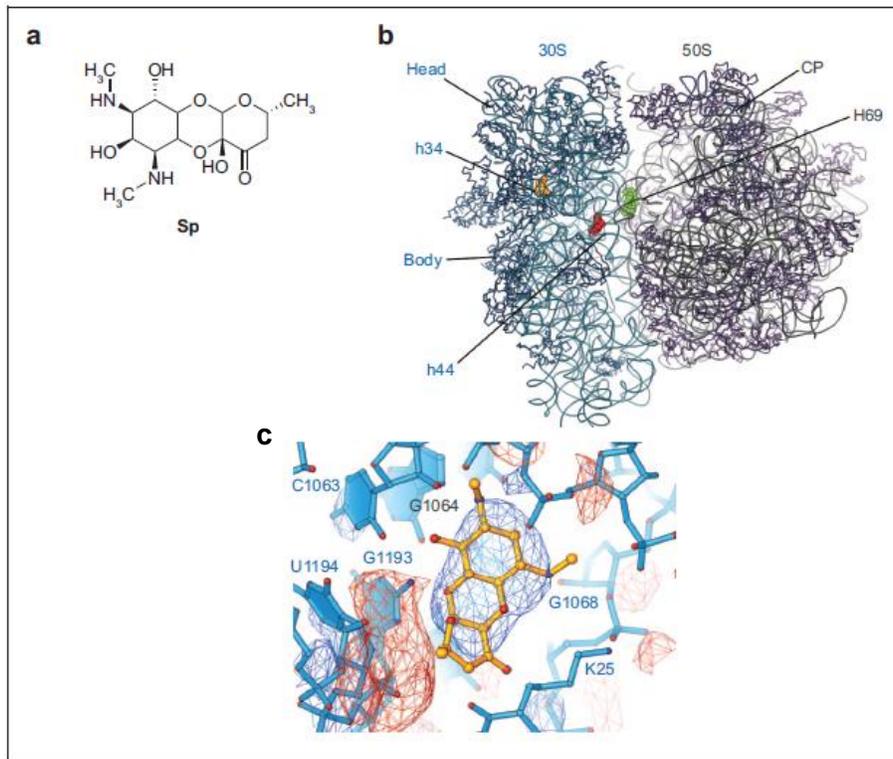


Fig. 11. Modo de acción de la espectinomicina (Sp). a) Estructura química de la Sp. b) Estructura del ribosoma de *Escherichia coli*, en naranja se indica la hélice 34 del rRNA 16S (h34), sitio de unión de la Sp en el ribosoma; CP indica el centro peptidil transferasa del rRNA23S, h44 corresponde a la hélice 44 del rRNA23S y H69, a la hélice 69 del rRNA5S. c) Mapa de densidad de electrones de la Sp unida al ribosoma; G1064, G1068, y G1193 son los nucleótidos del surco menor de la h34 con los que interacciona la Sp. K25 (Lys25), es el aminoácido de la proteína ribosomal rp55 con el cual contacta la Sp para interactuar con esta proteína. Modificado de Borovinskaya *et al.* (2007).

Mulo *et al.* (2003) reportaron que la Lin y la Sp afectan la traducción plastídica sin tener efectos importantes en la traducción nuclear, mediante el análisis de extractos de hojas de *Pisum sativum* que fueron previamente incubadas con dichos antibióticos (Fig. 12a). Asimismo, los autores constataron que en hojas de *Glycina max*, la síntesis de proteínas mitocondriales tampoco se ve afectada por la Lin (Fig. 12b).

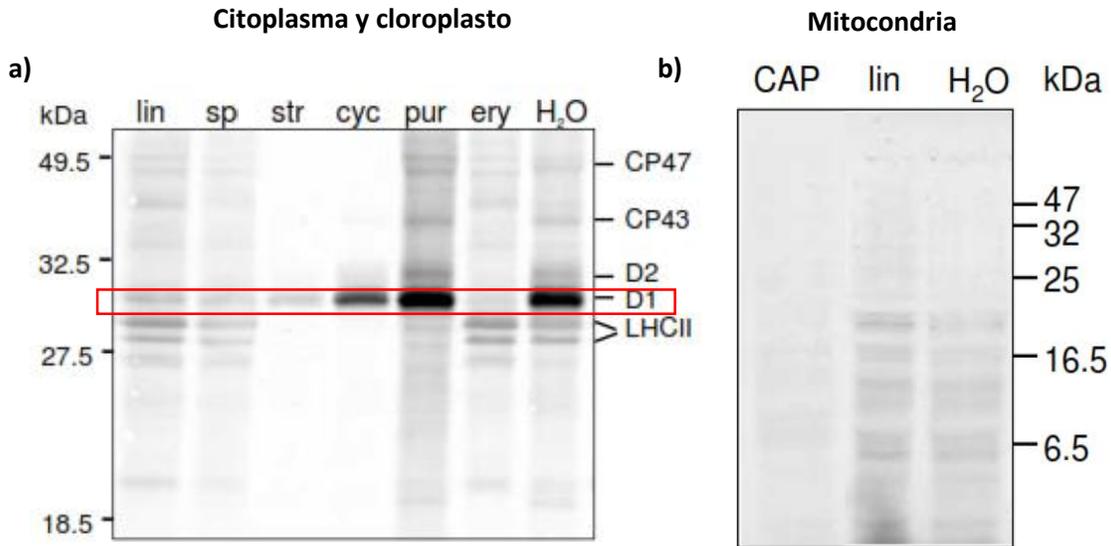


Fig. 12. Efecto de diversos antibióticos en la síntesis de proteínas en el citoplasma (a) y la mitocondria (b) en hojas de plantas de *Pisum sativum* y *Glycina max*. a) Acumulación de CP47, CP43, D1, D2 y LHCII en hojas tratadas con lincomicina (lin) espectinomicina (sp), estreptomycin (str), cicloheximida (cyc), puromicina (pur) y eritromicina (ery). El decrecimiento en la acumulación de LHCII evidencia afectación a la síntesis de proteínas en el citosol, mientras que, el de D1, en el cloroplasto. Los antibióticos lin y sp no afectan la acumulación de LHCII, pero sí la de D1 (encerrada en rojo), por lo que puede decirse que sólo afectan la síntesis de proteínas en el cloroplasto y no en el citoplasma. b) lin no afecta la expresión de proteínas mitocondriales, contrariamente a lo que ocurre con el cloranfenicol (CAP). Mulo *et al.*, 2003.

El defecto en el desarrollo foliar causado por la inhibición de la traducción plastídica (ITP) con Lin o Sp en *A. thaliana*, fenocopia al presente en *clb5-1*; pues en ambos casos, la planta desarrolla una hoja en la cual no se puede distinguir entre lámina y peciolo, presentando únicamente una estructura de tipo radial; y son plantas albinas (Fig. 13), en las cuales no parece haber clorofilas o carotenoides.

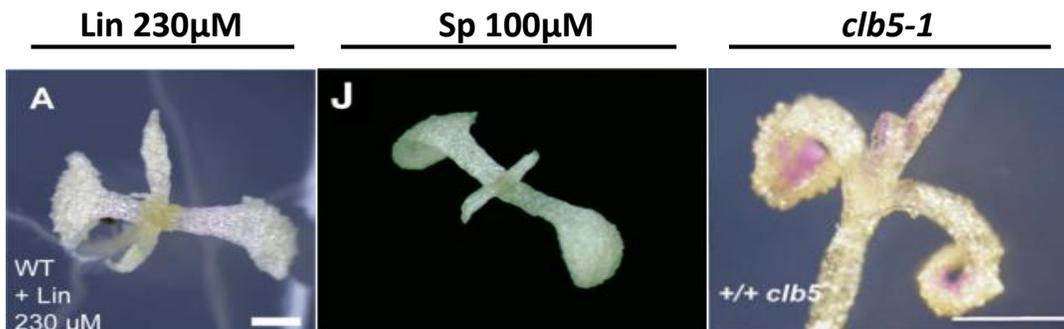


Fig. 13. Morfología foliar de plantas de *A. thaliana* a las que se ha inhibido la traducción del cloroplasto con Lin y Sp, y hoja de *clb5-1*. Modificado de Tameshige *et al.*, (2013); Parker *et al.*, (2016); Avendaño-Vázquez *et al.*, (2014).

Dada esta semejanza fenotípica, la pregunta que surge es si la modulación del desarrollo foliar en ambos casos es a consecuencia de un mismo proceso de señalización retrógrada, esto permitiría sugerir que la vía derivada de la acumulación de fitoflueno y ζ -carotenos y la vía derivada de la inhibición de la traducción plástidica son parte de una misma vía.

2. JUSTIFICACIÓN

Los estudios iniciales de la mutante *clb5-1* permitieron sustentar que existe una señal retrógrada de origen apocarotenoide (ACS1), capaz de afectar el proceso de morfogénesis de la hoja. Dada la similitud morfológica entre el fenotipo de la hoja de *clb5-1* y el fenotipo foliar de plantas con inhibición de la traducción plastídica, es posible que ambos fenotipos sean el resultado de la afectación de una misma vía de señalización retrógrada durante el desarrollo foliar. Para determinar lo anterior, es necesario realizar un análisis detallado a nivel fenotípico y molecular de plantas a las que se les inhiba la traducción plastídica en contraste con la mutante *clb5-1*.

3. HIPÓTESIS

La acumulación de los intermediarios fitoflueno y ζ -carotenos, debido a la falta de la enzima ZDS, así como la inhibición de la traducción plastídica, afectan el mismo mecanismo de señalización retrógrada durante el desarrollo de la hoja.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar el efecto de la ITP en el desarrollo de la hoja y su relación con la señal ACS1.

4.2. Objetivos particulares

1. Optimizar las condiciones para llevar a cabo la inhibición de la traducción plastídica en plantas de *A. thaliana* con los antibióticos Sp y Lin y evaluar su efecto en el desarrollo de la hoja.
2. Realizar una caracterización histológica y morfológica de las plantas inhibidas en la traducción plastídica y compararla con la caracterización reportada para *clb5-1*.

3. Caracterizar morfológicamente los plástidos de plantas con inhibición de la traducción plastídica para posteriormente compararlos con los reportados para *clb5-1*.
4. Analizar la participación de fitoflueno y ζ -carotenos en el fenotipo producto de la inhibición de la traducción del cloroplasto.
5. Analizar la participación de otros elementos relacionados con la señalización retrógrada en *A. thaliana* en el mecanismo de señalización derivado de la ITP y en el derivado de ACS1.
6. Determinar si existe una temporalidad definida dentro de la cual, la inhibición de la traducción plastídica puede afectar el desarrollo de la hoja.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para este estudio se emplearon los ecotipos Columbia (Col-0) y Landsberg erecta (Ler-0) de *A. thaliana*, así como las mutantes *clb5-1* (fondo Ler-0), *spc1-2* (fondo Col-0) y *gun1-1* (fondo Col-0). Para el cultivo de las semillas en esterilidad, éstas se desinfectaron con etanol absoluto y una solución de hipoclorito de sodio (Clorox™) al 20% en agua destilada. Inicialmente, se colocaron las semillas en microtubos de 1,5 mL y se les adicionó 1 mL de etanol absoluto durante un minuto; una vez pasado dicho periodo, se eliminó el etanol y se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio al 20% por cinco minutos. Luego, se procedió a realizar cinco lavados con agua destilada estéril. Terminada la desinfección, las semillas se estratificaron en los tubos con agua destilada durante cuatro días en oscuridad y después se sembraron en medio GM 1X [Murashige & Skoog suplementado con vitaminas de Gamborg (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS., USA), sacarosa 1% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), MES 0.05% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), agar para micropropagación 0.8% (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), pH 5,7] en cajas Petri. Las semillas germinaron en cámaras de crecimiento *in vitro* (Percival, CU41L4) con un fotoperiodo largo (16 h luz / 8 h oscuridad), a 22°C y una intensidad lumínica de aproximadamente 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para el crecimiento en sustrato de las plantas se empleó una mezcla consistente en 4.5 L de Peat moos (mezcla 3) (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Agawam, MA., USA), 3 L vermiculita (Sun Gro Horticulture, Agawam, MA., USA), 2 L de perlita (Agrolita; Tlalnepantla, Estado de México, México) y 15.8 g de osmocote (Everris, Geldermalsen, The Netherlands). Las plantas en sustrato se crecieron en cuartos de crecimiento a 22°C con fotoperiodo de día largo (16 h luz / 8 h oscuridad) a 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica.

5.2. Crecimiento bajo condiciones de inhibición de la traducción del cloroplasto

Dado que existe una sensibilidad distinta ante los antibióticos que inhiben la traducción plastídica entre los ecotipos Col-0 y Ler-0 de *A. thaliana* (Parker *et al.*,

2014; Parker *et al.*, 2016), se analizaron diferentes concentraciones de Lin y Sp en medio GM 1X donde se germinaron y crecieron dichos ecotipos (Tabla 1). Para el experimento se sembraron un total de 878 semillas del ecotipo Col-0 y 1728 del ecotipo Ler-0, abarcando tres réplicas biológicas en cada caso en todos los tratamientos con distintas concentraciones de los inhibidores. Se analizó el fenotipo del primer par de hojas, aproximadamente al día 18 post-germinación, momento en el cual emergía el primer par de hojas en las plantas bajo tratamiento. La mutante *clb5-1* fue crecida a la par que las plantas bajo los tratamientos de ITP en medio GM1X, a manera de fenotipo control para realizar la comparación entre los dos fenotipos foliares.

Tabla 1. Concentraciones analizadas de los inhibidores de la traducción plastídica en los ecotipos Col-0 y Ler-0 de *A. thaliana*.

Col-0		Ler-0	
<i>Lin</i>	<i>Sp</i>	<i>Lin</i>	<i>Sp</i>
300 μ M	50 μ M	250 μ M	35 μ M
	70 μ M	275 μ M	50 μ M
	100 μ M	300 μ M	60 μ M
		325 μ M	70 μ M
			100 μ M
			125 μ M

5.3. Tratamientos con norflurazona

Para evaluar qué sucede al impedir la síntesis de carotenos en plantas donde se inhibe la traducción plastídica, se adicionó, a medios de cultivo GM 1X suplementados con Sp 70 μ M o Lin 300 μ M para la germinación y crecimiento de plantas Col-0 y Sp 60 μ M o Lin 250 μ M para la germinación y crecimiento de plantas Ler-0, el herbicida norflurazona (NF) a una concentración de 5 μ M. Se realizaron tres réplicas con un total de 418 plantas para los tratamientos con Sp y Sp+NF, y 364 para los tratamientos Lin y Lin+NF. El análisis se realizó al momento de la aparición del primer par de hojas, dado que éste estadio de desarrollo era el

de interés para la evaluación del fenotipo foliar de las plantas (18 días aproximadamente).

A manera de control se empleó a la mutante *clb5-1*, que se sabe, responde a la inhibición de la síntesis de carotenos (Avendaño-Vásquez *et al.*, 2014), de ésta se sembraron en tres réplicas, un total de 300 semillas provenientes de plantas heterocigotas para la mutación en medio sin herbicida. De éstas, sólo 62 correspondieron a plantas homocigotas para la mutación; éstas se transfirieron a medio con el herbicida a los 3-4 días post germinación y se evaluó el fenotipo foliar aproximadamente a los 18 días.

5.4. Análisis estadístico de los tratamientos con NF

Para el análisis de la distribución de los fenotipos en los tratamientos de ITP y de ITP+NF se empleó una prueba de t de Student de dos colas, con un valor de $\alpha=0.05$, para la cual, se compararon las proporciones en que se presentaban los fenotipos en los tratamientos de ITP+NF, respecto de los tratamientos de ITP. Este análisis se realizó con el paquete estadístico Statistica (v7).

5.5. Análisis del efecto de la luz sobre el fenotipo producto de la inhibición de la traducción plastídica y *clb5-1*

Para evaluar el papel que podría jugar la luz en el fenotipo de la hoja producido por la inhibición de la traducción plastídica, se procedió a crecer plantas Col-0 tratadas con Sp 70 μM , así como plantas de *clb5-1* bajo dos condiciones de irradiancia lumínica: 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aproximadamente. La temperatura y el fotoperiodo usados fueron los mismos que para los experimentos anteriores; se evaluó el fenotipo del primer par de hojas, aproximadamente a los 21 días post-germinación.

5.6. Líneas marcadoras para el desarrollo de la hoja

Se emplearon cuatro líneas marcadoras para el desarrollo de la hoja que corresponden a los promotores de los genes *CYCB1*, *FIL*, *REV* y el promotor artificial DR5 con elementos de respuesta a auxinas, fusionados al gen reportero GUS. Las líneas *pCYCB1::GUS* (donada por el Dr. Inzé de la Universidad de

Gante) y *DR5::GUS* se encuentran en el fondo Col-0, mientras que las líneas *pFIL::GUS* y *pREV::GUS* (donadas por el Dr. Bowman de la Universidad Monash) se encuentran en el fondo Ler-0.

Para evaluar los defectos en el desarrollo de la hoja derivados de la ITP, se crecieron plantas de las cuatro líneas marcadoras en medio GM1X adicionado con Sp 70µM y Lin 300µM (fondo Col-0) o Sp 60µM y Lin 250µM (fondo Ler-0) a las que posteriormente se realizaron pruebas histoquímicas para revelar el patrón de expresión de GUS en las mismas. Para la comparación con *clb5-1* se utilizaron cruza de los marcadores con *clb5-1*, crecidas en medio GM1X sin antibióticos. Se evaluaron sólo las plantas que fuesen homocigotas para el marcador y la mutación.

5.7. Análisis histoquímico de la β-glucoronidasa (GUS)

Para la detección de la actividad de GUS en la mutante *clb5-1* así como también en las diferentes líneas marcadoras para el desarrollo de la hoja, en condiciones de inhibición de la traducción plastídica, las plantas fueron incubadas en una solución de tinción [X-Gluc 1mg/mL (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), ferrocianuro de potasio 5mM (Sigma Aldrich, Saint Louis MO., USA), ferricianuro de potasio 5mM (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), EDTA 500mM (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA), Tritón X-100 1% (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA., USA) y Buffer de fosfatos 1M, pH 7 (J.T. Baker, Center Valley, PA., USA)]. Para asegurar la penetración de esta solución en el tejido vegetal, se aplicó vacío por cuatro minutos y, posteriormente se incubaron a 37°C durante toda la noche (en el caso de las reporteras de CYCB1 y DR5 y sus cruza con *clb5-1*) o por cuatro horas (en el caso de las reporteras de FIL y REV y sus cruza con *clb5-1*).

5.8. Desteñido de las plántulas de las líneas marcadoras para el desarrollo de la hoja

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el buffer con la solución de tinción. Para eliminar la clorofila de las plantas, se procedió a colocarlas en 1 mL de una solución de acetona-metanol 3:1 durante una hora. Pasada la hora, se

decantó la solución y se adicionó 1 mL de etanol al 70%, realizando entre cuatro y cinco lavados con éste con intervalos de una hora entre cada uno. Las plantas se conservaron en etanol al 70% para su posterior observación en el microscopio estereoscópico. Cabe mencionar que en el caso de las plantas albinas (aquellas que fueron sometidas a los tratamientos de ITP o tratadas con NF, así como las reporteras de *clb5-1*) únicamente se realizaron dos lavados con etanol al 70% después de retirar el acetona-metanol 3:1.

5.9. Adquisición de las imágenes

Para la toma de las fotografías de las plantas se empleó una cámara Nikon Digital Sight DS-Fi1c acoplada a un microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500; este sistema se encuentra conectado al computador mediante un controlador Nikon Digital Sight DS-U3 que, a su vez, para funcionar, requiere del software NIS-Elements F (v4.0).

5.10. Cinética de transferencia de semillas a medio GM 1X con inhibidores de la traducción plastídica

Con el objeto de determinar si existe una temporalidad definida en la cual la ITP actúa sobre el desarrollo foliar se realizó una cinética de transferencia de semillas. En esta se partió de un conjunto de 270 plantas Col-0 crecidas en medio GM 1X sin inhibidores de la traducción plastídica, de entre las cuales, cada 12 horas se transfirieron 30 plantas a medio en presencia de Sp 70 μ M durante cuatro días (96 h). Posteriormente, éstas se revisaron al alcanzar el estadio 1.02 de desarrollo, correspondiente a la aparición del primer par de hojas (Boyes *et al.*, 2001) y se contabilizó la proporción en que se encontraban representados los fenotipos foliares; es decir, plantas arrestadas en su desarrollo (plantas sin hoja), con hoja afectada (hojas con defectos en su desarrollo y carentes de peciolo) o con hoja laminar (hojas con peciolo y lámina).

5.11. Microscopía de hojas de plantas bajo ITP y mutantes en ZDS

Con el objetivo de hacer una comparación entre la anatomía de la hoja causada por la inhibición de la traducción plastídica y la hoja de *clb5-1*, así como para comparar la morfología de sus plástidos, se emplearon plantas de 18 días crecidas bajo tratamientos de inhibición de la traducción plastídica (Lin 300µM o Sp 70µM), así como en fondo *clb5-1* y *spc1-2* (mutante en ZDS alélica a *clb5-1*), mismas que, posteriormente fueron fijadas por una hora con glutaraldehído al 2.5% en un buffer de cacodilatos de sodio 0.16 M a pH 7.2 y embebidas en resina London White (LR White, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA) y, subsecuentemente, se sometieron a una cámara de vacío por una hora. Después se procedió a cortar las hojas de las plantas fijadas y embebidas, en plano transversal por medio de un ultramicrotomo (Leica Ultracut). Se realizaron cortes finos (60 nm) y semifinos (3 µm), los primeros se montaron en rejillas y los últimos en laminillas para observación en campo claro. Los cortes transversales semifinos se tiñeron con azul de toluidina 0.5% durante un minuto y, posteriormente se observaron en microscopio óptico para así analizar la anatomía de la hoja tanto de las mutantes como de las plantas bajo tratamientos de ITP. Las rejillas de los cortes ultrafinos se destinaron para microscopía electrónica de transmisión, para lo cual se tiñeron con uranilo (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO., USA) al 3% (por diez minutos) y acetato de plomo al 0.3% (por tres minutos). En el microscopio electrónico (Carl Zeiss, LIBRA 120) se trabajó a 80 KV. Para el caso de los cortes longitudinales, todas las laminillas que se obtuvieron se emplearon para observación en microscopía electrónica.

6. RESULTADOS

6.1. Optimización de las condiciones para la inhibición de la traducción plastídica

En la literatura se ha reportado que la ITP mediante el uso de los antibióticos Lin y Sp afecta el desarrollo de la hoja (Parker *et al.*, 2014; Tameshige *et al.*, 2013). Dada la similitud del fenotipo de hoja acicular de *clb5-1* y el reportado para plantas inhibidas en su traducción plastídica, surge la pregunta de si el fenotipo ocurre por una misma señal retrógrada en ambos casos. Puesto que las plantas tratadas con los antibióticos Sp y Lin, como la mutante *clb5-1*, tienen un desarrollo considerablemente más lento que las silvestres que no están en tratamiento, se utilizó la clasificación 1.02 de estadio de desarrollo de *A. thaliana* reportado por Boyes *et al.*, (2001), que hace referencia a la presencia de un primer par de hojas (Fig. 14), para realizar una evaluación comparativa fenotípica de las plantas silvestres, la mutante *clb5-1* y aquellas crecidas en inhibidores de la traducción plastídica.

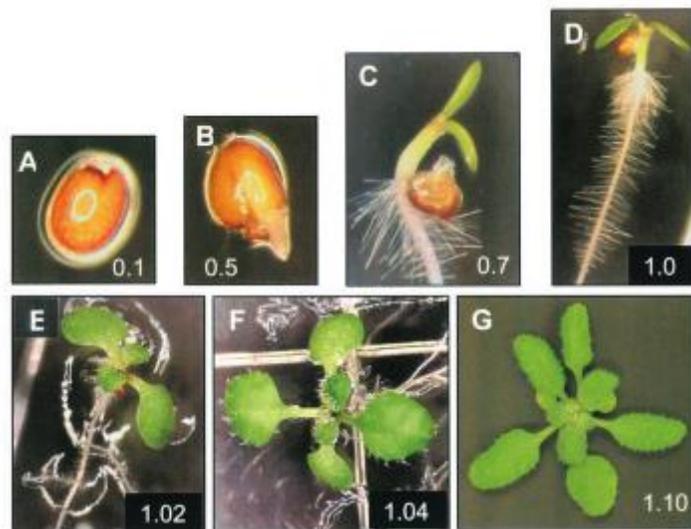


Fig. 14. Estadios de desarrollo de *A. thaliana* crecida en medio sin antibiótico. Imbibición (A), emergencia de la radícula (B), emergencia del hipocotilo y los cotiledones (C), apertura total de los cotiledones (D), aparición del primer par de hojas (E), aparición del segundo par de hojas (F), diez hojas de roseta (G). Tomada de Boyes *et al.*, 2001.

Inicialmente se realizó una caracterización general del efecto causado por concentraciones crecientes de los antibióticos de interés. Como se observa en la Fig. 15, en todas las concentraciones utilizadas de Lin y Sp se generaron diversos fenotipos foliares. Estos incluyen desde plantas con una lámina incipiente y con una región proximal más amplia que la región distal (hojas lanceoladas), hasta plantas con hojas radializadas que recuerdan a las hojas de la mutante *clb5-1* (hojas aciculares); finalmente también se observaron plantas que se arrestan en su desarrollo en el estadio 0.7 o 1.0; es decir, que no desarrollaron hojas verdaderas (plantas arrestadas).

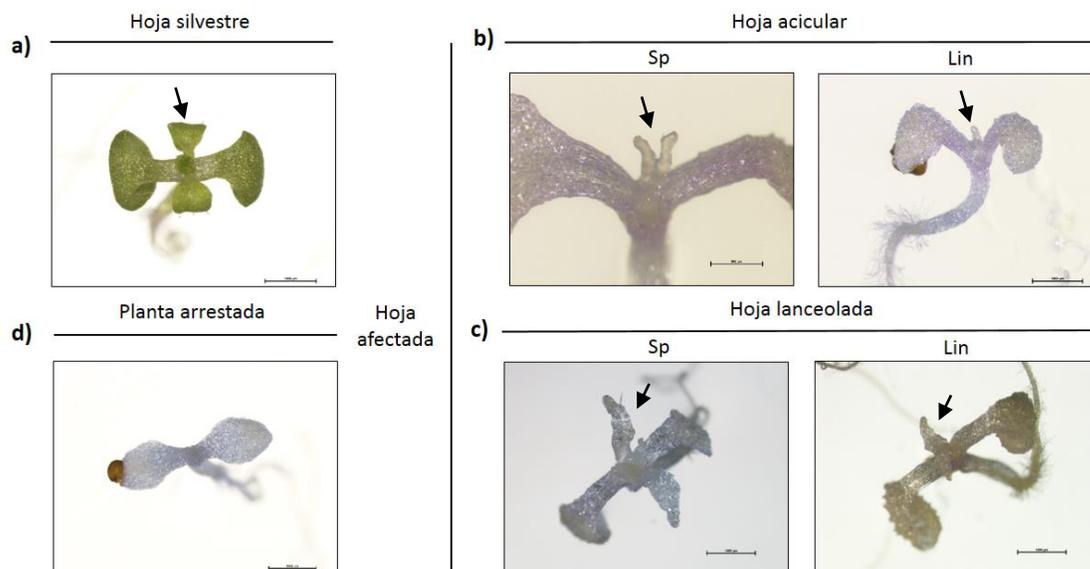


Fig. 15. Fenotipos foliares producto de la inhibición de la traducción del plástido con espectinomicina (Sp) y lincomicina (Lin). La inhibición de la traducción del plástido afecta el desarrollo de la hoja, y en una población de plantas tratadas con los inhibidores Li y Sp se observa un gradiente de fenotipos. En la figura se representan los fenotipos que se emplearon como categorías para este estudio (acicular, lanceolado y arrestado). Las hojas verdaderas se indican con flechas. **a)** Planta silvestre de 15 días crecida en medio sin inhibidores. **b), c) y d)** Plantas silvestres en estadio 1.02 crecidas en medio con Sp o Lin.

Para fines prácticos, en este estudio se decidió agrupar a los fenotipos lanceolado y acicular en uno solo que recibe el nombre de “hojas afectadas”. No obstante, para algunos de los análisis posteriores dentro de este trabajo se tomó en cuenta de manera exclusiva a las plantas cuyas hojas eran similares al fenotipo foliar de *clb5-1*; es decir, con fenotipo acicular. Está bien establecido que los inhibidores Sp y Lin afectan predominantemente la traducción del plástidica (Liao *et al*, 2016;

Mulo *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2016; Smith-Johansen *et al.*, 1980); de modo que el fenotipo observado de la hoja es sólo atribuible a defectos en este organelo y no a la afectación de manera directa de la traducción citoplásmica o mitocondrial.

El primer objetivo en este trabajo fue determinar la concentración mínima necesaria para que los inhibidores de la traducción del plástido impidan eficientemente la traducción plastídica y en consecuencia exista en la población de estudio, un fenotipo foliar más homogéneo, tanto a nivel de la forma como por la ausencia de pigmentación (albinismo), pero sin que la afectación llegue a ser tal que inhiba el desarrollo de las plantas (plantas arrestadas) como resultado de posibles efectos secundarios no caracterizados. Puesto que se ha reportado previamente diferente sensibilidad de varios ecotipos silvestres de *A. thaliana* a los inhibidores de la traducción plastídica (Parker *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2016) y dado que las plantas utilizadas en este trabajo pertenecen a dos ecotipos, se decidió optimizar las concentraciones para Sp y Lin (Figs. 16 y 17).

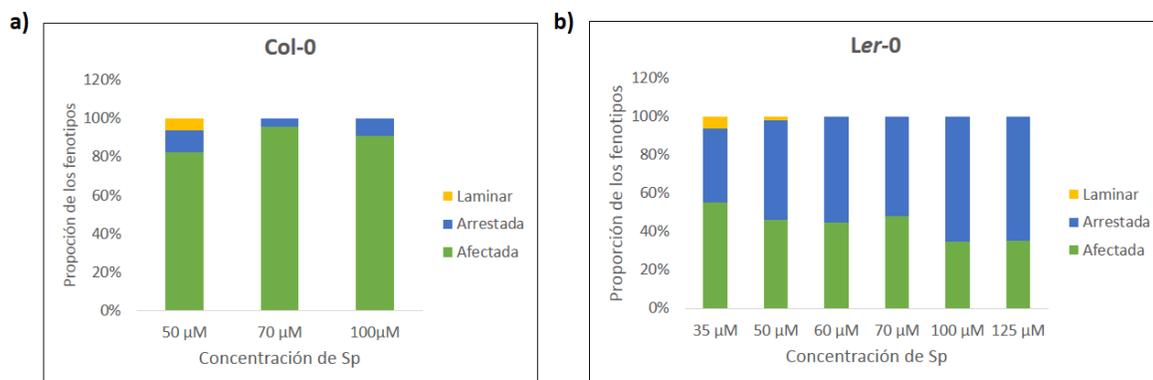


Fig. 16. Optimización de las concentraciones de Sp en los ecotipos Col-0 y Ler-0. Para el ecotipo Col-0 (a) se probaron tres concentraciones de Sp (50, 70 y 100 µM); la concentración 70 µM presentó el porcentaje de arresto más bajo y una alta representación de hojas afectadas (96%). Para el caso del ecotipo Ler-0 (b), se probaron seis concentraciones (35, 50, 60, 70, 100 y 125 µM); la concentración 60 µM se consideró como óptima, dado que en esta concentración, la población de plantas con hoja afectada se incrementó hasta corresponder a poco menos del 50% y a que, en concentraciones menores, se registraban plantas de coloración verde pálido o amarillentas, indicando que quizá no estaba inhibiéndose la traducción del plástido totalmente; así como plantas con un fenotipo más semejante al silvestre (laminar) (aunque en baja representación).

En lo que respecta al inhibidor Sp para el ecotipo Col-0, se probaron concentraciones de 50, 70 y 100 µM (Fig. 16a). La concentración 70 µM permitió obtener plantas albinas representadas principalmente por el fenotipo de hoja

afectada (96%) y una menor tasa de arresto en el desarrollo foliar (0.4%). Por lo tanto, 70 μM Sp fue la concentración que se decidió utilizar para realizar los análisis posteriores. Cabe aclarar que disminuyendo la concentración a 50 μM , se detectó dentro de la población plantas con un fenotipo más semejante al silvestre en la morfología de sus hojas, a este se le denominó “laminar”; en éste, las hojas presentaron distinción clara entre lámina y peciolo; estas plantas fueron albinas o de color verde pálido o amarillento. Finalmente, con una concentración mayor (100 μM), se presentó mayor porcentaje de plantas arrestadas en el desarrollo.

Para el caso del ecotipo *Ler-0*, se analizaron seis concentraciones de Sp desde 35 μM hasta 125 μM (Fig. 16b), ya que se desconocía si éste ecotipo es más o menos sensible ante el tratamiento de ITP que *Col-0*. El análisis mostró que altas concentraciones del antibiótico (100 y 125 μM) generaron en este ecotipo el arresto en el desarrollo de más del 64% de la (estadios 0.7 y 1.0). En contraste, concentraciones entre 60 μM y 70 μM , generaron en la población entre un 45 a 48% de hojas afectadas, mientras el resto de la población (más del 50%) arrestó su desarrollo. Finalmente, concentraciones menores del inhibidor (35 y 50 μM) indujeron más heterogeneidad en la población, pues se presentaron plantas con fenotipo foliar laminar (albinas, amarillentas o verduzcas). Por consiguiente, y con el objetivo de emplear una concentración con la menor cantidad de efectos secundarios, como el arresto o un incremento en la letalidad sobre la población pero que generara el fenotipo de interés, se decidió utilizar la concentración de 60 μM como óptima para el ecotipo *Ler-0*, pues permitía observar el fenotipo de interés en una proporción de entre el 40-45%. Con base en este análisis podemos concluir que el ecotipo *Col-0* es más resistente que el ecotipo *Ler-0* a la ITP mediada por Sp.

Para el caso de Lin con el ecotipo *Col-0*, se utilizó una única concentración de 300 μM , dado que la concentración óptima para éste inhibidor había sido optimizada previamente en del laboratorio. *Col-0*, en presencia de Lin genera una baja proporción de plantas con hojas arrestadas (11%) y un 89% de individuos con fenotipo de hoja afectada (Fig. 17a). En este tratamiento la totalidad de las plantas

fueron albinas, con lo cual se abarcaron los dos criterios de evaluación de los fenotipos: albinismo y presencia de un gradiente de afectación en el desarrollo foliar sin prevalencia del fenotipo arrestado. Para el ecotipo *Ler-0*, se analizaron cinco concentraciones de Lin, 250, 275, 300, 325 y 350 μM (Fig. 17b). El porcentaje de plantas con fenotipo arrestado en *Ler-0* fue considerable (41%), aun utilizando la concentración más baja del inhibidor (250 μM), donde se observó un 59% de individuos con alteración en el desarrollo foliar. Con una concentración de 275 μM de Lin, un 48% de los individuos sufrieron arresto en el desarrollo y un 52% presentan un fenotipo de hoja alterada. A una concentración de 300 μM (óptima para inhibir la traducción plastídica en plantas *Col-0*), existe una porcentaje de arresto del 52% y el 48% restante tiene hojas alteradas. Por último, en presencia de las concentraciones más altas (325 y 350 μM), el arresto en el desarrollo foliar aumenta a 54% y 63%, respectivamente. Por lo tanto, considerando la proporción de plantas arrestadas, la homogeneidad fenotípica en la población y para minimizar efectos secundarios, se decidió seleccionar la concentración de Lin de 250 μM como óptima para los estudios subsecuentes para el ecotipo *Ler-0*.

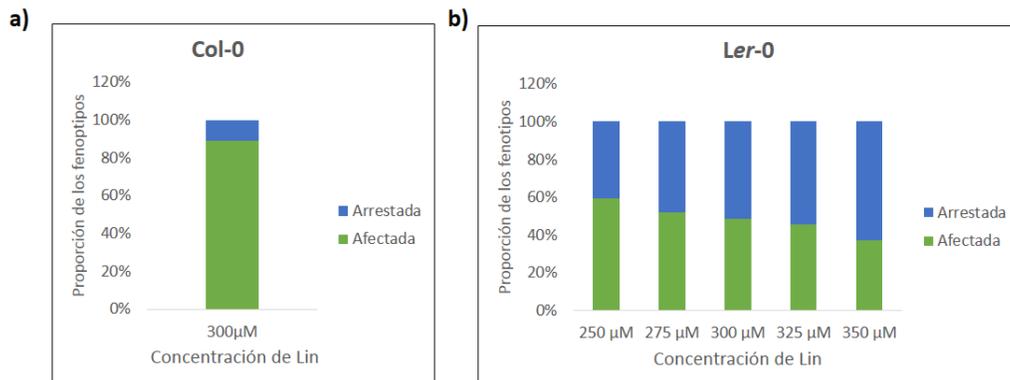


Fig. 17. Optimización de las concentraciones de Lin en los ecotipos *Col-0* y *Ler-0*. Para *Col-0* (a), la concentración 300 μM se consideró como óptima dado el alto porcentaje de plantas afectadas y pocas arrestadas. En lo que respecta al ecotipo *Ler-0*, se emplearon cinco concentraciones, dos arriba (250 y 275 μM) y dos debajo (325 y 350 μM) de la concentración encontrada como óptima para el ecotipo *Col-0*, de éstas, 250 μM fue la que reportó el menor porcentaje de plantas arrestadas en el desarrollo (48%), con 52% de la población presentando el fenotipo de hoja afectada.

La elevada proporción de plantas arrestadas encontradas en el ecotipo *Ler-0* al inhibirse la traducción plastídica con Lin, comparada con el ecotipo Col-0 (Fig. 17), es similar a lo que ocurre con Sp (Fig. 16) y refuerza la idea de que *Ler-0* es más sensible a la ITP que Col-0. Asimismo con ambos inhibidores, mientras mayor es su concentración, existe un mayor arresto en la población en ambos ecotipos aunque, dependiendo del ecotipo, fue más o menos pronunciada.

Con base en nuestro análisis podemos concluir, que la inhibición de la traducción es un insulto fisiológico al que responden de manera diferente los ecotipos de *A. thaliana* y que, el ecotipo Col-0 es menos sensible que el ecotipo *Ler-0* ante este mismo para ser inhibido. Por lo tanto, para estudios de este tipo es importante optimizar las condiciones de los inhibidores y así asegurar la menor cantidad de efectos secundarios derivados de los tratamientos. Para los fines de este trabajo, y como resultado de la prospección de distintas concentraciones de inhibidores, se consideraron óptimas Sp 70 μM y Lin 300 μM para Col-0 y Sp 60 μM y Lin 250 μM para *Ler-0*.

6.2. La señal derivada de la ITP, al igual que la señal ACS1, afecta el desarrollo del mesófilo en las hojas

El análisis de los cortes transversales de las hojas de las plantas inhibidas en su traducción plastídica con Lin y Sp revela afectación en el desarrollo del mesófilo. En ambos casos se presentan hojas de tipo acicular con una única capa de epidermis, espacios aéreos, tejido vascular, y unas pocas células que podrían corresponder a células de mesófilo, adyacentes al tejido vascular. En estas hojas no fue posible hacer una diferenciación clara entre los dominios abaxial y adaxial (como en *clb5-1*), dada la morfología acicular de las mismas, y que la disposición de los tejidos no es la canónica (Fig. 18b-c), como puede observarse en las hojas de plantas silvestres sin tratamiento; en las cuales, se distinguen epidermis adaxial, mesófilo en empalizada, xilema, floema, mesófilo esponjoso, y, finalmente, epidermis abaxial. No obstante, en el caso de las hojas de las plantas tratadas con Lin puede observarse una concentración mayor cantidad de células

de probable mesófilo en torno a una región de la acícula (observación cualitativa) (Fig. 18C).

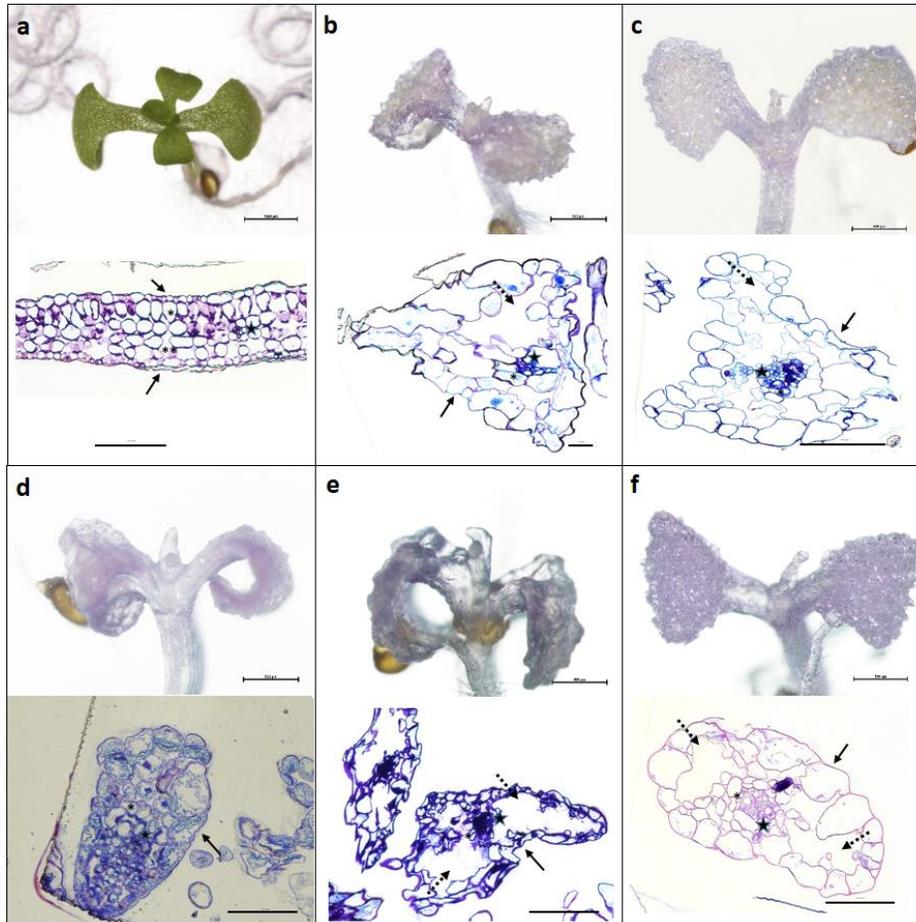


Fig. 18. Anatomía foliar de las plantas bajo ITP y mutantes en ZDS. (a) Morfología y anatomía de una hoja de una planta silvestre de 10 días. En el corte se distinguen, epidermis adaxial (flecha superior), mesófilo en empalizada (células inmediatamente debajo de la epidermis adaxial, marcadas con un asterisco), tejido vascular (dispuesto en un arreglo circular, marcado con una estrella), mesófilo esponjoso (células debajo del mesófilo en empalizada, marcadas por dos asteriscos) y, por último, epidermis abaxial (flecha inferior). **(b) y (c)** Morfología y anatomía foliar de plantas de 18 días cuya traducción plástica ha sido reprimida (Sp 70 μ M y Lin 300 μ M, respectivamente). Las acículas de las plantas bajo ITP (Sp o Lin), presentan epidermis (flecha) y tejido vascular, espacios aéreos (flechas discontinuas) y unas pocas células adyacentes al tejido vascular que podrían corresponder a mesófilo. **(d) y (e)** Morfología y anatomía foliar a los 18 días de la mutante *spc1-2*. En *spc1-2* se reconoce un gradiente morfológico foliar, desde hojas lanceoladas (d), hasta hojas aciculares (e). A nivel anatómico difieren en los tejidos que presentan; en el primer caso, reconociéndose la presencia de epidermis, mesófilo y tejido vascular, sin espacios aéreos; mientras que en el segundo, se presentan epidermis, tejido vascular y espacios aéreos y pocas células adyacentes al tejido vascular que podrían ser remanentes de mesófilo. **(f)** Morfología y anatomía de la hoja de *clb5-1*. Las acículas de *clb5-1* presentan epidermis, espacios aéreos, tejido vascular, y pocas células adyacentes al tejido vascular que pueden corresponder a mesófilo. De b a f, existe afectación en el desarrollo del mesófilo, revelado por la presencia de espacios aéreos (b, c, e y f), y porque, en las plantas en que logra desarrollarse mesófilo, éste no logra diferenciarse en los dos tipos de mesófilo que existen en una hoja silvestre (a).

Con el objetivo de comparar la morfología foliar generada por la ITP con aquella que deriva de la modulación del desarrollo foliar por la señal ACS1, se incluyó a las mutantes *clb5-1* y *spc1-2* (Avendaño-Vásquez et al., 2014; Dong et al., 2007) en este análisis; ambas mutantes son deficientes para la enzima ZDS. Las acículas de *clb5-1* presentan una única capa de epidermis, espacios aéreos, tejido vascular y unas pocas células adyacentes al tejido vascular que podrían corresponder a células de mesófilo (Fig. 18f). En la mutante *spc1-2* existe un gradiente de afectación en el desarrollo foliar, de manera semejante a lo que ocurre con la ITP, de modo que, en esta mutante se tienen plantas con morfología foliar acicular y plantas con morfología foliar lanceolada (Fig. 18d-e). Debido a esto, se optó analizar por separado ejemplares con hojas aciculares y con hojas lanceoladas. En el caso de las plantas con hoja acicular, se observó una disposición de tejidos similar a lo que ocurre con las hojas de *clb5-1* y aquellas de las plantas bajo tratamiento de ITP: una única capa de epidermis, espacios aéreos, tejido vascular, y, adyacente a este, células que podrían ser de mesófilo; con la diferencia de que, las hojas de *spc1-2* son más ovaladas que aquellas de *clb5-1* (que son prácticamente radiales). En el caso de las plantas de *spc1-2* que presentan una morfología foliar lanceolada, los cortes demuestran que en estas plantas no existen espacios aéreos. Los tejidos se disponen de la siguiente manera: epidermis (una única capa), células redondeadas que podrían corresponder a mesófilo y, tejido vascular. Si bien, aunque existan células que presumiblemente sean de mesófilo, igualmente puede decirse que existe afectación en el desarrollo de este tejido en estas plantas, pues no se diferencian en los dos tipos de mesófilo que existen en las hojas de las plantas silvestres. De este análisis se puede concluir que la afectación en el mesófilo es un factor en común entre el fenotipo foliar producido por la ITP y aquél derivado de ACS1, aunado a la morfología foliar.

6.3. Los plástidos de las hojas de plantas bajo tratamiento de ITP arrestan su desarrollo en un estadio temprano, al igual que *clb5-1* o *spc1-2*

Se analizaron cortes ultrafinos de las plantas crecidas bajo tratamiento de ITP con Sp o Lin mediante microscopía electrónica de transmisión. A partir de estos cortes, se detectaron organelos que probablemente corresponden a los plástidos de las células de estas plantas; éstos se localizaron en el citoplasmas de las células adyacentes al tejido vascular y, debido a su tamaño ($\sim 1 \mu\text{M}$), la frecuencia con que se encontraron en las células (estas mismas estructuras se encontraron al analizar distintas células de diferentes plantas en el mismo tratamiento) y a que eran distintos de otros organelos que podían reconocerse (como las mitocondrias), se les considera como tales. La caracterización de la ultraestructura de estos organelos permitió concluir que el desarrollo del cloroplasto se arresta muy tempranamente como consecuencia de inhibir la traducción del plástido (Fig. 19). Un cloroplasto maduro posee envoltura (conformada por la membrana interna y la externa), tilacoides (que se arreglan en granas), gránulos de almidón, y plastoglóbulos, que son partículas lipoprotéicas rodeadas por una monocapa de lípidos y que se asocian a los tilacoides. Los plástidos de las muestras crecidas en el antibiótico Sp carecen de estructuras membranosas internas y presentan vesículas en altas cantidades. Los plástidos de las plantas crecidas con Lin, igualmente, carecen de membranas internas, si bien, a diferencia de lo que ocurre con Sp, no contienen vesículas pequeñas. Los proplástidos se ha caracterizado que son organelos pequeños ($\sim 1 \mu\text{M}$) sin estructuras diferenciadas en su interior (Wise & Hooper, 2006). Tanto los plástidos de Sp como los de Lin, cumplen dichas características, por lo cual puede inferirse que corresponden a plástidos arrestados tempranamente en su desarrollo, cercanos al estadio de proplástido.

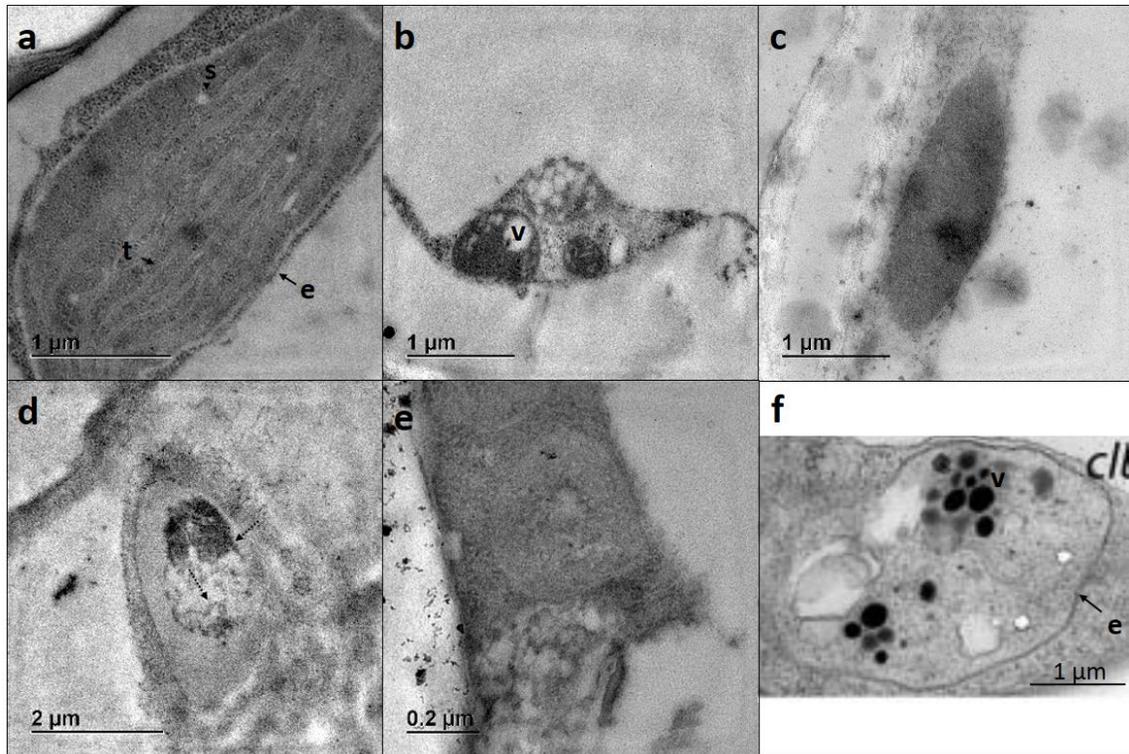


Fig. 19. El desarrollo del cloroplasto en las hojas se arresta en un estadio temprano como consecuencia de la ITP y la mutación en ZDS. (A) Cloroplasto de una planta silvestre. Se reconocen la envoltura del plástido (e) (membrana interna y externa del organelo), los tilacoides (t) y algunos gránulos de almidón (s). **(B)** Plástidos de las plantas tratadas con Sp 70µM. Son organelos pequeños de alrededor de 1 µm, en cuyo interior se observan vesículas (v) y que carecen de membranas internas. **(C)** Plástido de plantas bajo tratamiento con Lin 300µM. Son organelos de menor tamaño que un cloroplasto maduro, en cuyo interior no se reconoce la presencia de estructuras membranosas internas. **(D)** Plástido de *spc1-2* (hoja lanceolada). Carecen de vesículas, si bien presentan estructuras indefinidas en su interior de naturaleza desconocida (?). **(E)** Plástido de *spc1-2* (hoja acicular). Son organelos pequeños sin vesículas y sin estructuras membranosas definidas dentro. **(F)** Plástido de *clb5-1*. Se reconocen, la envoltura del plástido y vesículas de contenido desconocido. Dado que de B a F, en ninguno de los casos se desarrollan los sistemas membranosos internos propios de un cloroplasto (como los tilacoides), se afirma que el desarrollo del cloroplasto en estas plantas está arrestado tempranamente. Plástido de *clb5-1* tomado de Avendaño *et al.*, (2014).

Los plástidos de *clb5-1* se han reportado previamente por el laboratorio (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004). En este reporte, se observa que los plástidos de las hojas de *clb5-1* están arrestados en el desarrollo, pueden en ellos identificarse vesículas (electronegativamente densas) de contenido desconocido (que podrían ser plastoglobulos) y, como en el caso de las plantas bajo tratamiento de ITP, carecen de estructuras membranosas internas. Para *spc1-2*, se evaluaron dos casos: los plástidos de las plantas con hojas lanceoladas y, los plástidos de las plantas con hojas aciculares. En el primer caso, se encontraron plástidos sin vesículas y con estructuras indefinidas que no se observaron ni en las plantas bajo ITP, ni en *clb5-1*. En el segundo caso, se observaron plástidos carentes de estructura interna

reconocible alguna, más parecido a lo que se observa con *clb5-1*, empero, a diferencia de los plástidos de dicha mutante, no existen vesículas identificables electronegativamente densas.

6.4. La polaridad abaxial/adaxial está alterada en plantas inhibidas en su traducción plastídica

Para evaluar con más detalle los defectos morfológicos causados por la ITP y compararlos con las alteraciones morfológicas observadas en la hoja de *clb5-1*, se analizaron diferentes marcadores del desarrollo de la hoja en presencia de las concentraciones previamente establecidas de los antibióticos Lin y Sp, dependiendo del fondo genético para cada marcador.

Para el caso de la expresión del marcador FIL (marcador del dominio abaxial) en las plantas a las cuales se les inhibió la traducción plastídica con Sp y Lin, reveló un patrón de expresión diferente del observado en *clb5-1*. En la mutante no se detectó expresión de dicho marcador en hojas verdaderas, mientras que sí se presentó expresión de FIL a lo largo de la hoja acicular en plantas en las cuales se reprime la traducción plastídica. Por el contrario, la expresión de GUS bajo el promotor de *FIL* se limitó al dominio abaxial en plantas silvestres. Por lo que respecta a REV (marcador del dominio adaxial), quien en plantas silvestres se localiza en los haces vasculares; en las plantas tratadas con los antibióticos Sp y Lin, se observó expresión de GUS en haces vasculares de los cotiledones y el hipocótilo; sin embargo, la expresión del marcador en las hojas verdaderas no pareció restringirse al eje vascular o ser más intensa en torno a éste sino más fue bien difusa en todo el tejido de la hoja. En *clb5-1*, la expresión de REV se presentó igualmente a lo largo de la hoja, siendo más intensa en el haz vascular (Fig. 20).

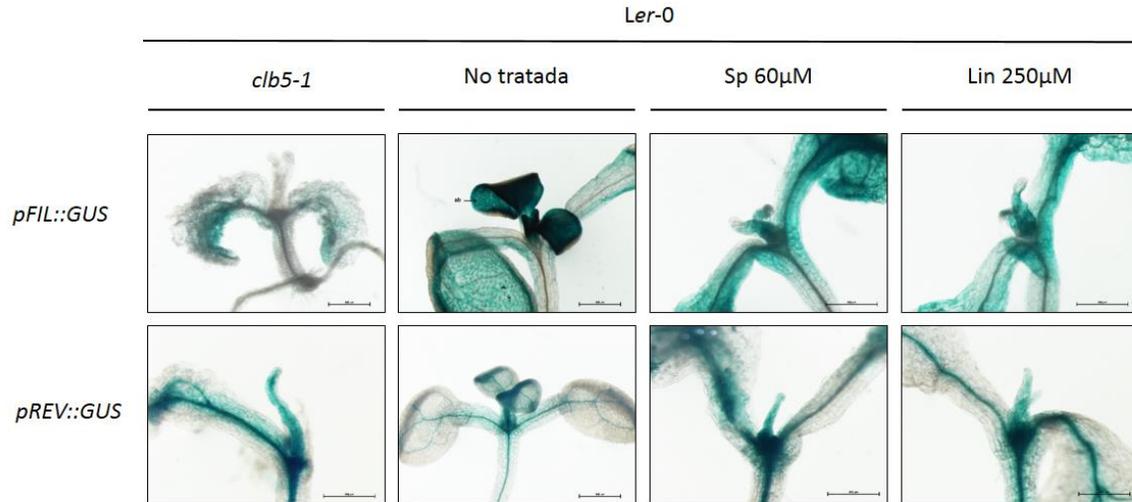


Fig. 20. La ITP altera el establecimiento de la polaridad adaxial/abaxial en plantas en estadio de desarrollo 1.02, de manera distinta a lo que ocurre en *clb5-1*. FIL es utilizado como marcador del dominio abaxial, mientras que REV, es un marcador del desarrollo del sistema vascular (ver *no tratadas*). La expresión de *pFIL::GUS* es inexistente en la hoja verdadera de *clb5-1*, mientras que al inhibir la traducción plastídica en Ler-0, con Sp 60 μM y Lin 250μM, se registró expresión del marcador en la hoja. En *clb5-1* y en plantas inhibidas en su traducción plastídica, *pREV::GUS* se expresa fuertemente en torno al eje vascular de la hoja, el hipocótilo y los cotiledones, al igual que en la silvestre sin tratamiento.

De tal modo que el patrón de expresión de estos marcadores de identidad adaxial/abaxial en plantas inhibidas en su traducción plastídica muestra diferencias importantes respecto a *clb5-1*, sugiriendo que aunque la morfología de la hoja verdadera sea semejante, exista la posibilidad de que el fenotipo foliar no derive de la misma señal que en *clb5-1*.

6.5. La proliferación celular y la respuesta a auxinas están afectadas en plantas inhibidas en la traducción plastídica

El desarrollo de la hoja está caracterizado por la presencia de una división activa durante la emergencia del primordio foliar y, conforme la lámina de la hoja crece, se genera un frente de arresto de dicha proliferación, limitándose a la región proximal de la lámina foliar (Tsukaya, 2013). Para seguir esta transición, se empleó el marcador *pCYCB1::GUS*. El análisis mostró que en el caso las plantas con la inhibición de la traducción del plástido con Sp y Lin, el patrón de expresión de este marcador es muy similar al observado en *clb5-1*, con una expresión de

CYCB1 a lo largo de toda la hoja, indicando así que no hay un frente de arresto de la proliferación celular y que, por lo tanto, hay división celular a lo largo de las hojas verdaderas (Fig. 21).

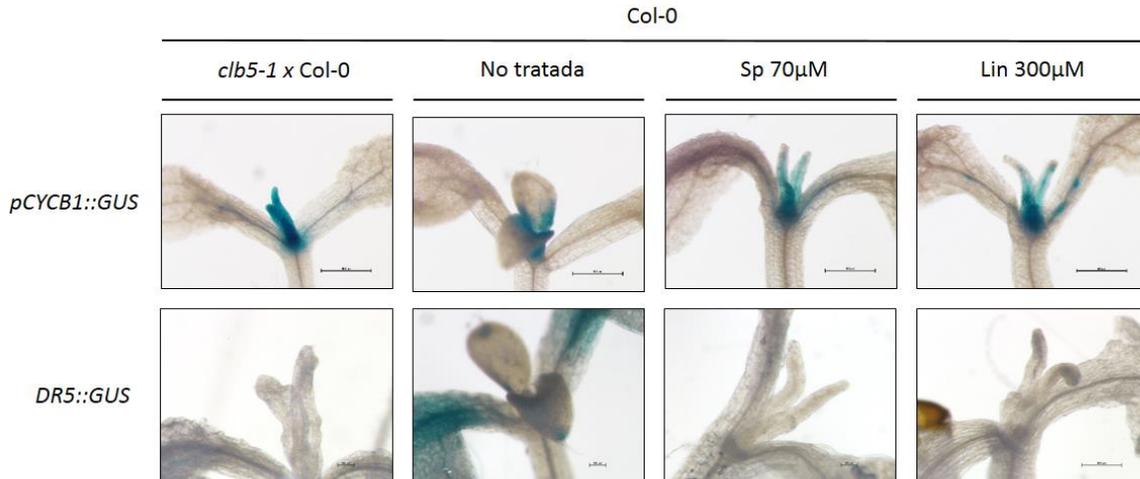


Fig. 21. La ITP impide el establecimiento de un frente de arresto a la proliferación celular y altera la respuesta a auxinas, como ocurre en *clb5-1*. La expresión espacial del marcador *pCYCB1::GUS* en plantas bajo tratamiento de represión de la traducción plástica y en *clb5-1*, es diferente a lo observado en plantas sin tratamiento, puesto que se observa GUS a lo largo de las hojas, indicando proliferación celular. Tampoco existe respuesta a auxinas (evaluadas con el marcador *DR5::GUS*) en tratamientos con Sp y Lin, ni en *clb5-1*, al contrario de lo observado en plantas sin tratamiento.

Las auxinas son de suma importancia para la determinación de la polaridad de la hoja, la formación del meristemo marginal, la emergencia del primordio foliar, entre otras funciones (Qi et al., 2014; Tsukaya, 2013); por lo tanto, es esencial evaluar su respuesta al tratar de analizar los defectos en el desarrollo de la hoja. Usando el marcador *DR5::GUS*, se observó que en *clb5-1* y en plantas crecidas bajo tratamiento con Sp y Lin, la respuesta a auxinas está afectada, ya que no se detectó expresión de GUS en las hojas verdaderas. Por el contrario, en plantas silvestres, el reportero *DR5::GUS* muestra su máxima expresión en la punta de las hojas en desarrollo (Fig. 21).

6.6. La inhibición de la síntesis de carotenoides no recupera el fenotipo foliar derivado de la ITP

Como se reportó por Avendaño-Vázquez *et al.* (2014), la morfología foliar de *clb5-1* se restaura parcialmente al fenotipo silvestre al crecer a la mutante en presencia de fluoridona. La fluoridona, al igual que la NF son herbicidas que inhiben específicamente a la enzima PDS (Fig. 22a). Este hecho demuestra que la acumulación de los carotenoides lineales fitoflueno y ζ -carotenos en *clb5-1*, es el causante de los defectos del desarrollo de la hoja, posiblemente por un mecanismo de señalización retrógrada, mediante la señal ACS1 (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2016).

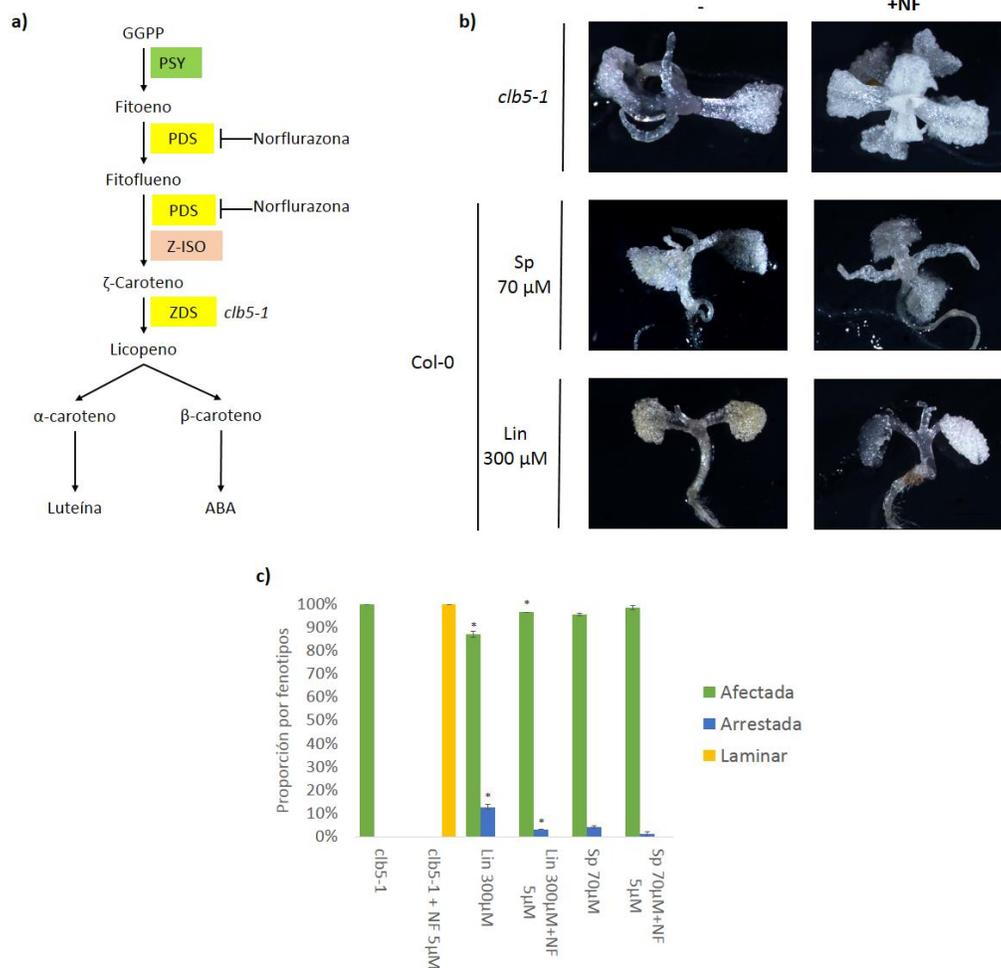


Fig. 22. El fenotipo producto de la ITP (con Sp y Lin) en Col-0 no se revierte con NF. a) La NF inhibe la PDS, por lo que no se acumula fitoflueno ni ζ -carotenos. **b)** El fenotipo de *clb5-1* se revierte hacia una hoja laminar al inhibir la actividad de

PDS con NF (n=62, estadio de desarrollo 1.02), mientras que en plantas bajo ITP con Sp y Lin, el fenotipo de hoja afectada persiste. **c**) y **d**) Proporción de los fenotipos observados en plantas bajo ITP con los distintos inhibidores, sin y con NF.

Con la idea de conocer si la acumulación de los carotenoides lineales fitoflueno y ζ -carotenos también median en el fenotipo foliar que se observa cuando se inhibe la traducción del plástido, se realizó un experimento similar creciendo plantas del ecotipo Col-0 en presencia de los inhibidores Lin o Sp, y NF (tratamientos Sp+NF y Lin+NF). Las plantas fueron crecidas por 18 a 20 días, momento hasta el cual alcanzaron el estadio 1.02 de desarrollo para efectuar así el análisis de la morfología de la hoja. Contrariamente a lo que ocurre en *clb5-1*, en las plantas a las cuales se inhibió la traducción plastídica tratadas con NF, el fenotipo de hoja no revirtió a un fenotipo laminar con la adición de NF (Fig. 22b). De hecho, como puede observarse en la gráfica de la Fig. 22c, la inhibición de la síntesis de carotenoides pareciera disminuir ligeramente la cantidad de plantas con el fenotipo más extremo producto de la ITP mediado por Sp o Lin: el arresto en el desarrollo. No obstante, un análisis estadístico demostró que esta reducción no es significativa para el caso de Sp ($p=0.058595$; $\alpha=0.05$), aunque sí para el caso del tratamiento con Lin ($p=0.001658$; $\alpha=0.05$). Derivado de este hecho, se presentó una mayor proporción de plantas con hoja afectada en los tratamientos de los antibióticos más NF que en los tratamientos con los antibióticos solamente.

Para profundizar en el efecto que podría tener inhibir la acumulación de carotenos lineales sobre el fenotipo de las plantas a las que se inhibió la traducción plastídica, se evaluaron también los marcadores del desarrollo de la hoja previamente caracterizados, en los tratamientos con NF en presencia de Sp y Lin. Como se muestra en la Fig. 23, *pCYCB1::GUS* se expresó lo largo de las hojas verdaderas y *DR5::GUS* presentó una nula expresión, por lo que no exhibieron ningún cambio respecto a las plantas que sólo fueron tratadas con los inhibidores Sp y Lin en ausencia de NF.

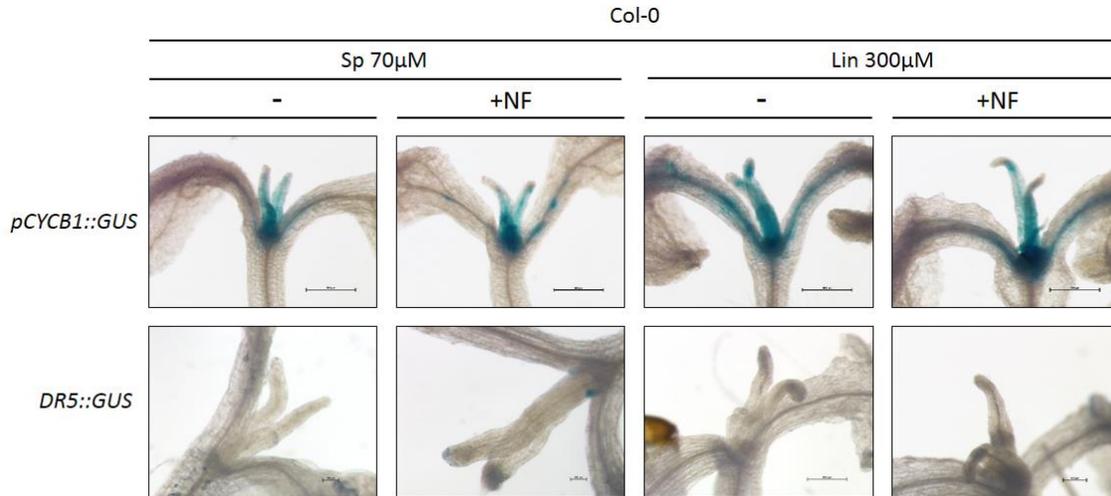


Fig. 23. Marcadores de la transición de proliferación a expansión celular (CYCB1) y de la respuesta a auxinas (DR5) en plantas a las que se ha inhibido la síntesis de carotenos y la síntesis de proteínas en el plástido. La expresión de *pCYCB1::GUS* en plantas (estadio 1.02 de desarrollo) a las cuales se ha inhibido la traducción plastídica con Sp y Lin es a lo largo de toda la hoja. En plantas inhibidas en la síntesis de carotenos y en la síntesis de proteínas plastídicas, se observa que este patrón persiste, pues la expresión de *GUS* es igualmente a lo largo de la hoja. En lo que respecta a *DR5::GUS*, plantas inhibidas en su traducción plastídica no expresan el reportero en las hojas verdaderas. Lo mismo sucede cuando además se inhibe la síntesis de carotenos con NF. Plantas en estadio 1.02 de desarrollo.

6.7. Participación de *GUN1* en el fenotipo derivado de la ITP

GUN1 se ha propuesto como un elemento muy importante de la señalización retrógrada biogénica (Colombo *et al.*, 2016). Tameshige *et al.*, (2013) reportaron que la mutante *gun1-1* es insensible a la inhibición de la traducción plastídica con Lin 230 µM y por tanto no exhibe defectos en el desarrollo de la hoja. Se decidió analizar la respuesta de *gun1-1* en presencia de una concentración de Lin de 300 µM; y, en concordancia con lo reportado por Tameshige *et al.*, (2013), se observa que *gun1-1* no presentó un fenotipo foliar acicular o lanceolado (Fig. 24). Sin embargo, la hoja que se observó no es completamente silvestre, puesto que carece de peciolo y su lámina es más estrecha que la que se observó en plantas silvestres. Con este resultado puede afirmarse que *gun1-1* es más resistente a la inhibición de la traducción plastídica, aunque no es completamente insensible a ésta, bajo las condiciones de estudio.

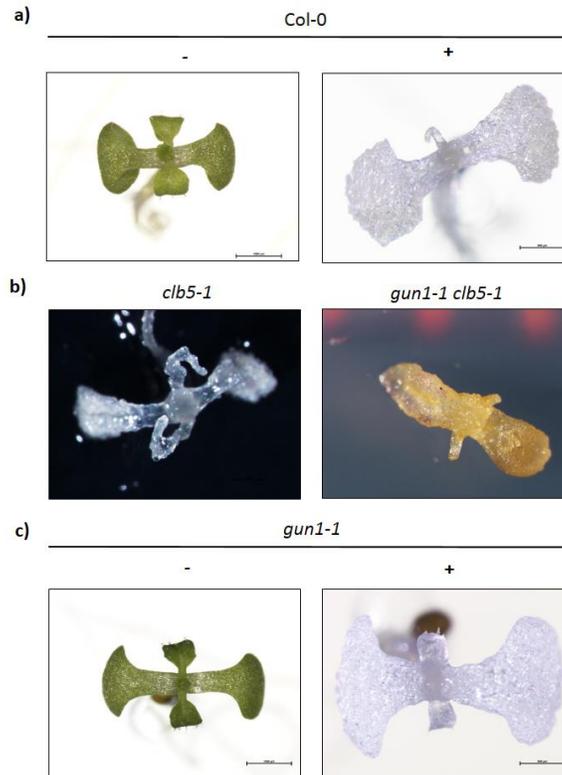


Fig. 24. *gun1-1* es más resistente que Col-0 ante la inhibición de la traducción plastídica por Lin 300μM. a) Fenotipo de Col-0 sin tratamiento (-) y fenotipo de Col-0 con Lin 300 μM (+). La represión de la traducción plastídica en la planta silvestre produce defectos en el desarrollo foliar, generando plantas con hojas aciculares. b) Fenotipo de la mutante *clb5-1* y de la doble mutante *gun1-1 clb5-1*. *gun1-1 clb5-1* no revierte el fenotipo foliar característico de *clb5-1*, por lo cual parece no estar involucrado en la vía de ACS1. c) Fenotipo de la mutante *gun1-1* sin Lin 300μM (-) y con Lin 300μM (+). En *gun1-1*, la inhibición de la síntesis de proteínas en el plástido no deviene en un fenotipo de hoja aberrante como el observado en plantas silvestres crecidas en medio de cultivo con este antibiótico.

6.8. Papel de la luz en el fenotipo de la ITP y en ACS1

Numerosos procesos de señalización retrógrada involucran a la luz; por ejemplo, la propia biosíntesis de carotenoides es dependiente de ella, ya que la expresión de varios de los genes biosintéticos de esta vía son inducidos por luz y diversos carotenos sufren oxidación al entrar en contacto con la luz generando apocarotenoides (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012). Ya que ACS1 es un apocarotenoide, es importante determinar si esta señal que altera el desarrollo foliar en *clb5-1* es la misma que la proveniente de la inhibición de la traducción del plástido. Experimentos previos llevados a cabo en el laboratorio demostraron que el fenotipo de *clb5-1* depende de la luz, pues, al crecer a la mutante en

condiciones de baja irradiancia lumínica ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se recupera la lámina foliar y la presencia de peciolo, mientras que cuando se crece a más de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se observa la presencia de una hoja acicular.

Respecto a plantas Col-0 con ITP, éstas se crecieron en medio GM 1X suplementado con Sp $70\mu\text{M}$, en dos intensidades lumínicas diferentes ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El análisis se realizó en cuanto las plantas alcanzaron el estadio 1.02 de desarrollo. Como puede observarse en la Fig. 25b, los resultados muestran que la intensidad lumínica no revirtió el fenotipo de la hoja de la misma manera que en el caso de *clb5-1*; puesto que, las plantas que fueron crecidas a $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ continuaron presentando hojas con un fenotipo acicular, sin recuperación de lámina ni presencia de peciolo, muy semejantes a las plantas crecidas a $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas silvestres sin tratamiento crecidas a $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentaron, como se esperaba, un fenotipo etiolado pero no hay afectación en el desarrollo de lámina y peciolo. Estos resultados permiten decir que el fenotipo producido por la ITP no depende de la intensidad lumínica.

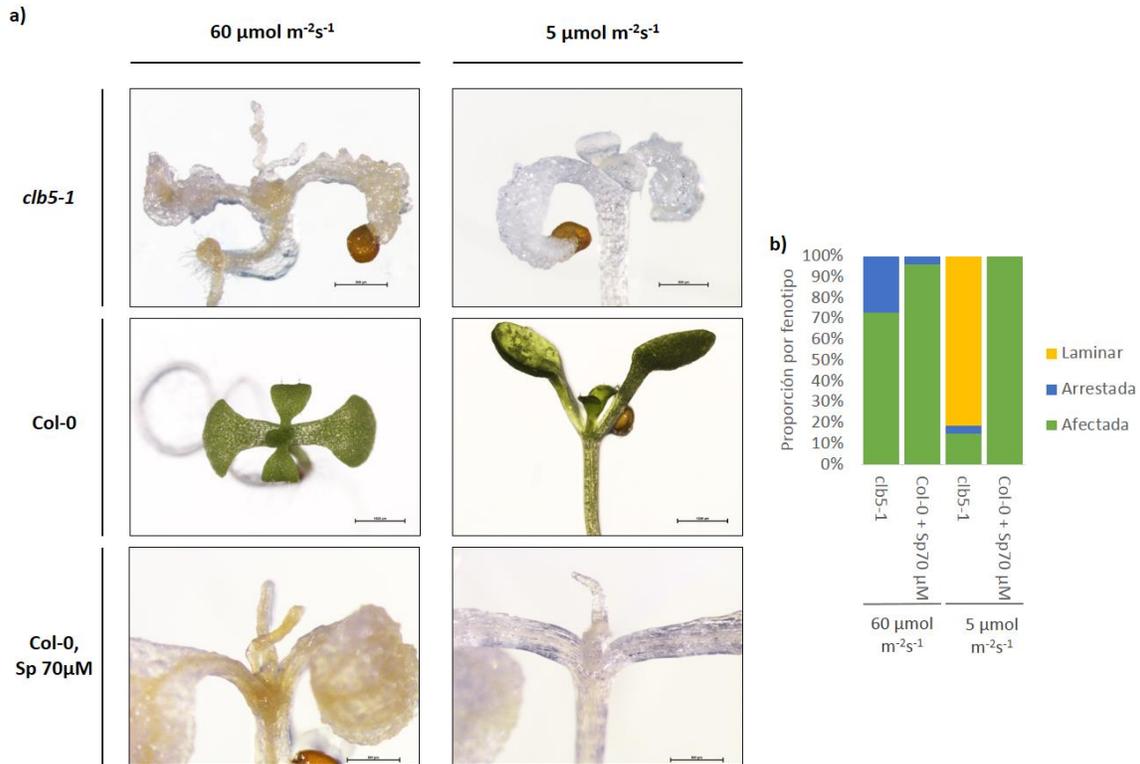


Fig. 25. La señal retrógrada derivada de la inhibición de la traducción plastídica no depende de la intensidad lumínica. En *clb5-1* la luz juega un papel importante en la determinación de la generación de la ACS1; a una intensidad lumínica baja (5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), el fenotipo foliar se revierte hacia una hoja con desarrollo normal (n=72), contrariamente de lo que ocurre a 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, condición en la que continúa presentándose el fenotipo de hoja acicular (n=60). b) Col-0 inhibidas en su traducción plastídica con Sp 70 μM , presenta un fenotipo acicular a 5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (n=169 y n=143, respectivamente).

6.9. Existe una ventana temporal en la cual se produce una señal proveniente de la ITP que incide en el desarrollo foliar

La ITP incide en la biogénesis del cloroplasto, arrojando su desarrollo en un estadio temprano (Liao *et al.*, 2016). Cuando se reprime la traducción plastídica desde el inicio de la germinación, se observa que se altera el desarrollo foliar (Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17 y Fig. 18); sin embargo, se desconoce la naturaleza de la señal que se genera por este proceso. Se decidió determinar si existe un tiempo definido en el cual se genera dicha señal durante el desarrollo de la planta. Por consiguiente, se analizó el fenotipo de la hoja que causa la ITP en diferentes momentos del desarrollo de la planta. Inicialmente, plantas Col-0 se germinaron en medio GM 1X partiendo de un grupo de 270 plantas. Cada 12 h se transfirió a medio GM 1X con Sp 70 μM un conjunto de 30 plántulas hasta completar 96 h; una

vez transferidas, las plantas se incubaron por un periodo entre 18 a 20 días hasta que se encontrasen en el estadio de desarrollo 1.02 en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad, temperatura 22° C en el medio al que fueron transferidas. Esto se realizó en tres réplicas biológicas. En cada caso, el fenotipo del primer par de hojas verdaderas se analizó por microscopio estereoscópico.

El análisis realizado a los 18 a 20 DAG (del inglés, *Days After Germination*) de las plantas de Col-0 transferidas a los distintos tiempos de la cinética se desglosa de la siguiente manera: las plantas que fueron transferidas a medio GM 1X con Sp 70µM a las 12 y 24 h post siembra (hAS, del inglés *hours After Sowing*), presentan en un 100% el fenotipo foliar de hoja afectada, similarmente a lo que ocurre al germinar las plantas desde el inicio en medio con Sp70µM. Esta proporción se modificó cuando la transferencia se realizó a las 36 hAS, pues, en este punto ya se detectó la presencia de individuos con morfología foliar “laminar” (distinción de peciolo y lámina), aunque sus hojas verdaderas carecen de pigmentación; no obstante, representan sólo el 2% de la población. A las 48 hAS, individuos con morfología foliar laminar representaron el 4% de la población, y hacia las 60 hAS, conformaron el 13%. A las 72 hAS ya representan el 18% de la población, a las 84 hAS el 31% y por último, a las 96 hAS constituyeron el 34% de la población (Fig. 26a). El fenotipo de hoja afectada no desapareció de la población ni aun cuando la transferencia se realizó a las 96 hAS (66%); sin embargo, sí puede considerarse que la disminución progresiva de su representatividad en la población fue considerable desde las 60 hAS. De modo que, las 60 hAS parecen representar un umbral en el cual la respuesta a la señal derivada de la ITP disminuye; lo cual sugiere que esta señal sólo actúa en una etapa temprana del desarrollo de la planta y que, su capacidad de modular el desarrollo foliar disminuye conforme pasa el tiempo. Esta temporalidad, a su vez, parece indicar que para que la señal pueda inducir cambios en el programa de desarrollo de la planta, el plástido tiene que estar en un estadio de desarrollo determinado y que, una vez el plástido se encuentra en un estadio más avanzado de desarrollo, o si éste ya es un cloroplasto maduro, la señal no se genera o la planta se hace más resistente a ésta.

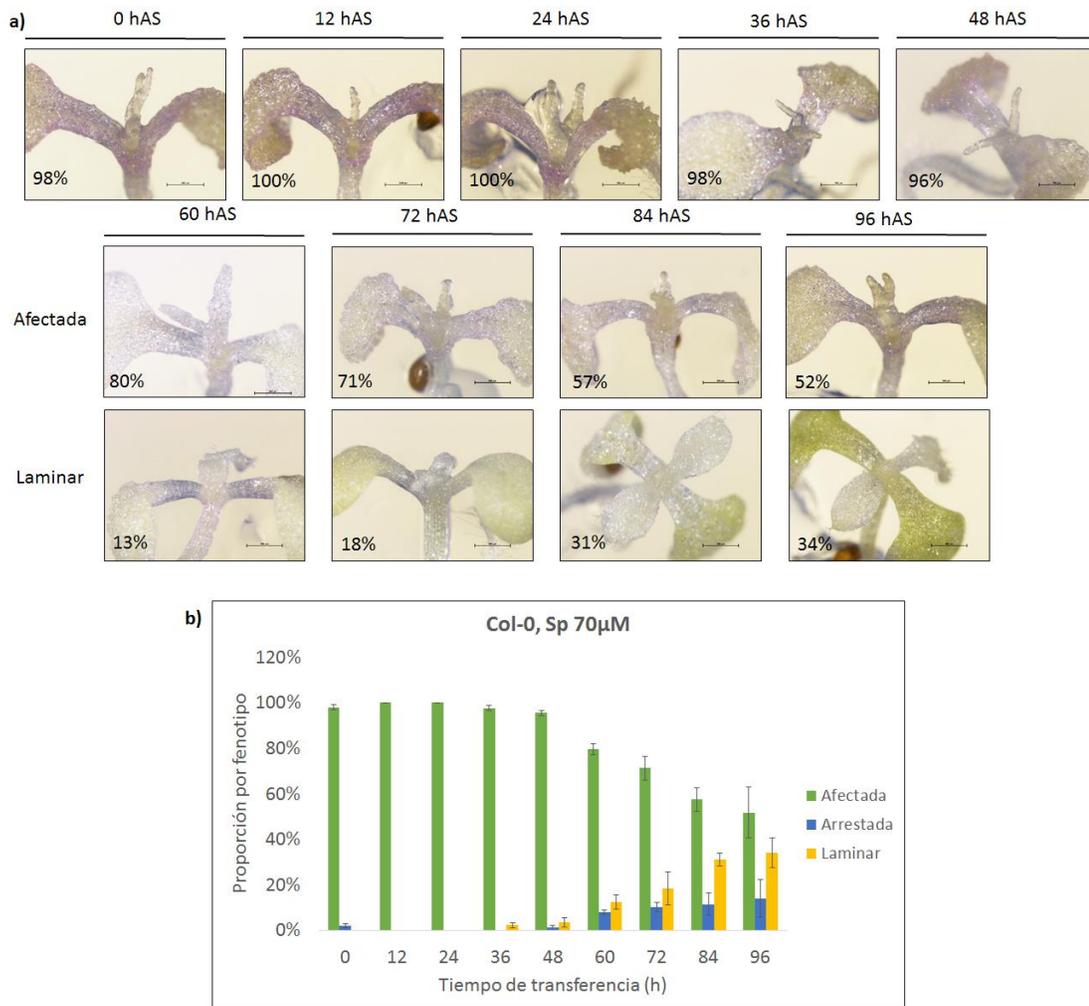


Fig. 26. La ITP actúa en una ventana de tiempo definida entre las 0 y las 60 h post-siembra (hAS). **a)** Fenotipos foliares y porcentaje de representatividad (plantas en estadio 1.02 de desarrollo) dentro de la población, obtenidos al transferir las plantas germinadas en medio sin inhibidores a medio con inhibidores de la traducción (Sp 70µM) cada 12 horas por cuatro días (96 h). A las 36 hAS comienza a aparecer el fenotipo de hoja laminar (2%); no obstante, esta proporción aumenta considerablemente a partir de las 60 hAS. **b)** Proporción de fenotipos foliares durante la cinética de transferencia a medio GM 1X con inhibidor de la traducción plastídica.

El retraso de la transferencia a medio de cultivo con inhibidores de la traducción plastídica no sólo derivó en la detección de plantas con fenotipo foliar laminar, sino que, también produjo un incremento en el número de plantas arrestadas en su desarrollo en el estadio 0.7 ó 1.0. A las 60 hAS se registró dentro de la población un 7% de los individuos con fenotipo arrestado. Esta proporción continuó incrementándose conforme se pospuso la transferencia, de modo que, a las 72

hAS, ya representaron el 11% de la población, a las 84 hAS, el 12% y, finalmente, a las 96 hAS correspondieron al 14% (Fig. 26b). Esto puede significar que, si bien, la ITP ya no incide en el programa de desarrollo foliar en estadios de germinación más tardíos; sí afecta el desarrollo de las plantas y que, mientras mayor es el tiempo en el que permanecen las plantas en medio sin inhibidor, más representativa es la proporción de individuos con fenotipo laminar dentro de la población.

Igualmente, se analizaron plántulas transferidas a medio GM 1X con Sp 70 μ M y NF 5 μ M, con el fin de inhibir la traducción del plástido y la síntesis de carotenos al mismo tiempo. Esto sería equivalente a inhibir la traducción plastídica en la mutante *pds3* en distintos tiempos de la siembra. Esta cinética se llevó a cabo partiendo de plantas germinadas en medio con NF, mismas que fueron transferidas cada 12 horas como se describió anteriormente a medio con inhibidor de la traducción plastídica (Sp 70 μ M) y NF (5 μ M) durante 96 hrs. Resultados anteriores demostraron que inhibir la síntesis de carotenos (con NF) y la traducción plastídica (ya sea con Lin o Sp) a la vez, reduce considerablemente el arresto en el desarrollo derivado de la ITP (Fig. 22).

Así pues, se observó que a las 48 hAS surgieron las primeras plantas con fenotipo laminar en el 1% de la población. En las plantas transferidas a las 60, 72, 84 y 96 hAS, se observó que el 3%, 17%, 31% y 40% de sus poblaciones respectivas presentaron hojas laminares (Fig. 25a). Por lo tanto, la inhibición de la síntesis de carotenos con NF no cambió la tendencia en que aparece el fenotipo laminar al transferir la población a medio con inhibidores de la traducción plastídica. No obstante, existen diferencias en la proporción, ya que al transferir Col-0 a las 60 hAS a medio con Sp, el 13% de la población exhibe un fenotipo laminar mientras que en medio con Sp y NF, sólo lo exhibió el 3%. En consonancia con los resultados de experimentos previos en los que se inhibió la síntesis de carotenos y la traducción plastídica (Fig. 22), la cantidad de plantas arrestadas en su desarrollo es menor en cada uno de los tiempos de transferencia evaluados en esta cinética (Fig. 27b).

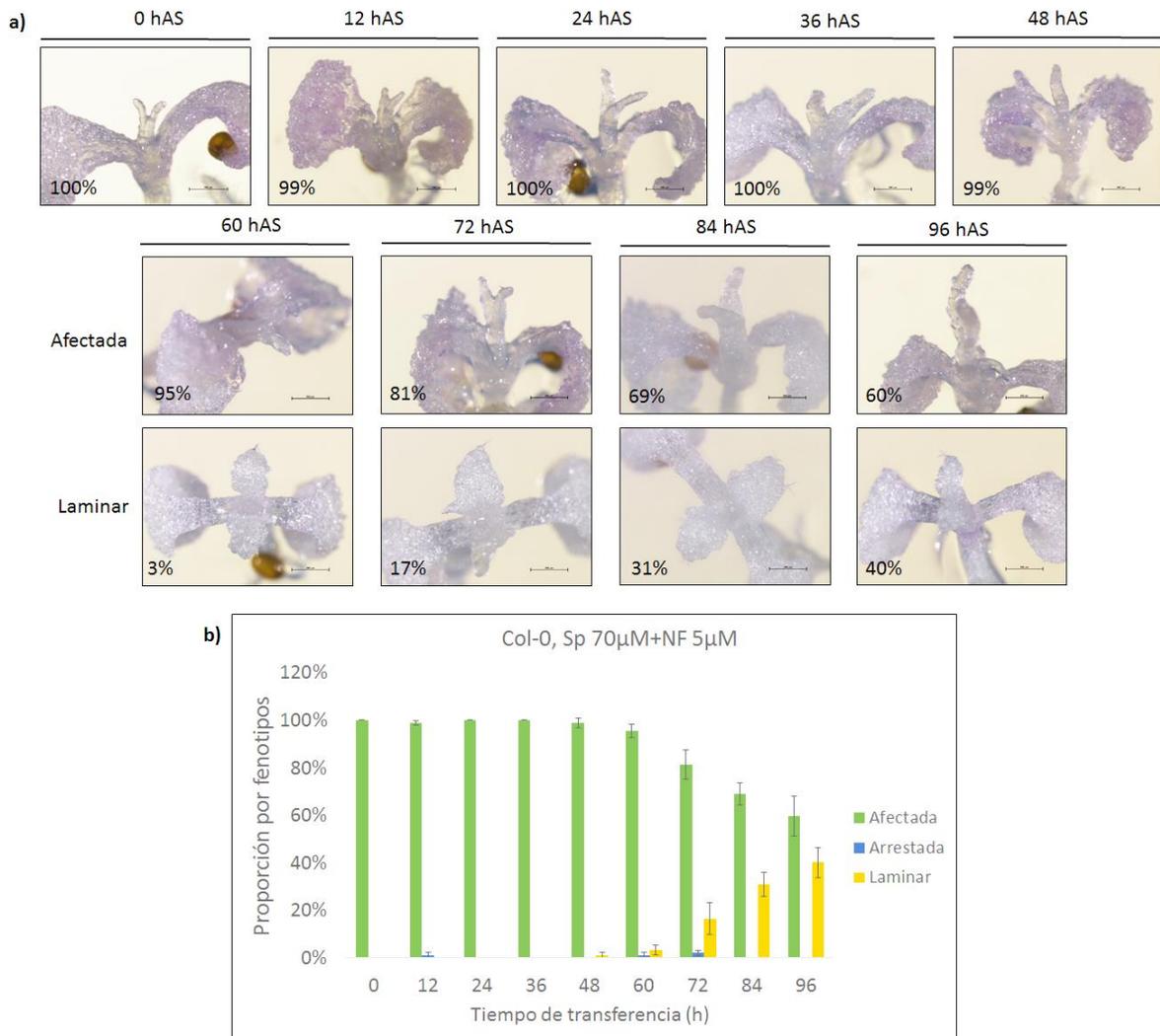


Fig. 27. La inhibición de la síntesis de carotenos con NF no cambia la tendencia en que aparece el fenotipo laminar al transferir la población a medio con inhibidores de la traducción plastídica. a) Fenotipos foliares y porcentaje de representatividad (plantas en estadio 1.02) dentro de la población al transferir plantas a distintos tiempos a medio con Sp 70 μ M y NF 5 μ M. El 1% de plantas transferidas a las 48 h presentaron fenotipo foliar laminar, el cual se consolidó a partir de las 72 h de transferencia (17%) hasta alcanzar un 40% de la población transferida a las 96 h. **b)** Proporción de fenotipos foliares durante la cinética de transferencia a medio GM 1X con Sp 70 μ M y NF 5 μ M. La tendencia de aparición del fenotipo laminar se conservó al inhibir la síntesis de carotenos, pues, a mayor tiempo de transferencia, tiende a ser más representativa en la población la presencia de plantas con dicho fenotipo, representado por un 1% a las 48 horas hasta un 40% a las 96 h.

7. DISCUSIÓN

7.1. El ecotipo *Ler-0* es más sensible a la inhibición de la traducción plástica que el ecotipo *Col-0*

Inhibir la traducción del plástido con Sp y Lin afectó el desarrollo foliar, generando hojas del tipo acicular que carecen de lámina. En el presente trabajo se definieron diferentes fenotipos bajo los tratamientos con estos antibióticos que incluyen plantas arrestadas, plantas con hoja afectada y plantas con hoja tipo laminar. Esta clasificación nos permitió explorar la sensibilidad de las plantas ante los antibióticos, así como seleccionar una concentración óptima de éstos para realizar los demás análisis del presente trabajo.

Parker *et al.*, (2014) y Parker *et al.*, (2016) reportaron previamente que diversos ecotipos de *A. thaliana* presentan una sensibilidad diferente a los antibióticos que afectan la traducción plástica, entre los que se encuentra la Lin y la Sp; sin embargo, se desconoce la sensibilidad del ecotipo *Ler-0* a dichos antibióticos. Por lo tanto, se prosiguió a evaluar la sensibilidad de éste ante la ITP, para lo cual se emplearon Lin y Sp a diferentes concentraciones. Para el caso del ecotipo *Ler-0*, nuestros datos mostraron una mayor sensibilidad en ambos tratamientos que en el ecotipo *Col-0*, lo cual resultó en mayor heterogeneidad en la distribución de las categorías fenotípicas dentro de la población. Parker *et al.*, (2014), atribuyeron a mutaciones naturales en el gen de la acetil coenzima A carboxilasa (*ACC2*), las diferencias de sensibilidad entre los diferentes ecotipos de *A. thaliana* con respecto a la respuesta a la ITP. Existen ecotipos resistentes a la ITP como son *Tsu-0*, *Jl-3* o *Be-1*, que registraron varios pares de hojas después de cinco semanas de ser tratadas con Sp $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($100 \mu\text{M}$) o Lin $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($451.5 \mu\text{M}$). En contraste, ecotipos como *Oy-0*, *Nie1-2* y “Nossen”, arrestaron su desarrollo en el estadio 1.0, como ocurrió en la mayoría de las plantas para el ecotipo *Ler-0* en los tratamientos a diferentes concentraciones de los antibióticos, de tal manera que se puede concluir que *Ler-0* es un ecotipo altamente sensible a la ITP. Los autores clasificaron al ecotipo *Col-0* como de resistencia media ante la ITP ya que presentaron plantas que rebasan el estadio 1.0 y prosiguen hasta el

1.02 o 1.04 (primer par de hojas o segundo par de hojas) bajo tratamiento con Sp 100 μM . Estos resultados son semejantes a los obtenidos en este trabajo utilizando Sp y Lin a concentraciones más bajas (70 μM y 300 μM , respectivamente).

7.2. La homogeneidad fenotípica es mayor en espectinomicina que en lincomicina en el ecotipo Col-0, no así en el ecotipo Ler-0

La representatividad de las categorías establecidas para distinguir los grados de alteración en el desarrollo foliar permite estimar cuán homogéneas fueron las poblaciones sometidas a los diferentes tratamientos. En el tratamiento con Sp el ecotipo Col-0 a la concentración óptima seleccionada (70 μM), registró una respuesta homogénea con alrededor de un 96% de plantas con el mismo fenotipo de hojas afectada y tan sólo 4% arrestadas en su desarrollo (carentes de hoja); en contraste, en el tratamiento con Lin 300 μM , el 89% de plantas tienen hoja afectadas y el 11% estuvieron arrestadas en su desarrollo. La diferencia en la homogeneidad fenotípica entre plantas crecidas en los diferentes antibióticos puede deberse a la efectividad del mismo a la hora de inhibir la traducción plastídica o a que afectan procesos diferentes dentro de la traducción. Ellis (1970) reportó que la inhibición de la síntesis de proteínas en el plástido depende de la concentración del antibiótico utilizado. Después de evaluar los antibióticos Sp, Lin y eritromicina, concluyó que entre éstos la Sp es el más efectivo para inhibir la traducción plastídica, ya que a concentraciones menores, se observó una menor incorporación del aminoácido leucina en las proteínas de los plástidos de las hojas, que lo obtenido con los otros dos antibióticos. Nuestros datos son congruentes con este trabajo, pues a concentraciones menores de Sp, en contraste con la Lin, fue posible obtener plantas albinas con un fenotipo foliar afectado en la gran mayoría de la población evaluada, sugiriendo que en ellas sí se inhibió la traducción del plástido.

7.3. El fenotipo foliar de *clb5-1* y de plantas inhibidas en su traducción plastídica comparten algunos defectos en el programa de desarrollo foliar

Tanto la mutante *clb5-1* como las plantas con ITP desde la germinación, presentan plástidos arrestados en su biogénesis (en estadios tempranos) (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2016). Se ha reportado que afectar la biogénesis del cloroplasto induce defectos en el desarrollo foliar (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Gutierrez-Nava *et al.*, 2004; Larkin, 2014; Liao *et al.*, 2016) y de forma congruente, en los procesos analizados en este trabajo existe una afectación clara en el desarrollo de éste organelo. Con el objetivo de evaluar las semejanzas o diferencias que pudieran existir en estas señales, se analizaron varios genes marcadores del desarrollo de la hoja. Los defectos encontrados tanto para la respuesta a auxinas como en la transición de crecimiento celular proliferativo a expansivo en *clb5-1* y en plantas con ITP, sugieren que la señal que altera el desarrollo foliar en ambos casos, pueda ser la misma. El hecho de que en ambos casos esté comprometida la expansión celular podría estar relacionado con la nula respuesta a auxinas, pues se sabe que estas fitohormonas participan activamente en dicho proceso (Perrot-Rechenmann, 2010).

Ahora bien, el análisis de expresión de *FIL*, involucrado en la determinación de la polaridad abaxial de la hoja, sugiere que la señal de *clb5-1* y la derivada de la ITP son diferentes. El marcador *pFIL::GUS* no se expresó en las hojas de *clb5-1* mientras que este marcador sí se detectó en las hojas de las plantas con ITP. Este resultado concuerda con lo reportado por Tameshige *et al.*, (2013), quienes observaron que el patrón de expresión de *FIL* en plantas inhibidas en la traducción con Lin 230 μM se alteró espacialmente respecto al observado en la planta silvestre y las hojas se abaxializaron parcialmente. No obstante, en nuestro caso, es difícil concluir si la expresión de *FIL* está presente en toda la hoja verdadera, pues en este trabajo no se realizaron cortes que permitieran determinar si existe o no una expresión preponderante en uno u otro dominio. Esto es un aspecto que queda para ser analizado en el futuro, adicionalmente se podría incluir otro marcador, como *PHB*, para la determinación del dominio adaxial. El hecho de que

en la hoja de *clb5-1* no se detecte expresión de *FIL* permite sugerir que quizá esta hoja se encuentra adaxializada; sin embargo, el hecho que la expresión de *PHB* está deslocalizada hacia el eje vascular (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014) impide concluir totalmente esto.

Además de la deslocalización de la expresión de *FIL* en las hojas de las plantas con ITP, también *REV* se expresó espacialmente de manera diferente en relación a la expresión observada de este marcador en las hojas de las plantas silvestres. Dicha expresión se detectó a lo largo de toda la hoja contrastando con la expresión limitada al eje vascular en plantas silvestres. En la mutante *clb5-1* el marcador *REV* también se expresó a lo largo de la hoja aunque más intensamente en torno al eje vascular. Esta disfunción en la identidad de los dominios foliares también podría ser una consecuencia de defectos en el transporte de auxinas desde el meristemo hacia los primordios foliares; pues, se sabe que esta hormona está involucrada en la determinación de la identidad de los dominios (Qi *et al.*, 2014).

7.4. La afectación en el desarrollo del mesófilo foliar deriva del arresto del desarrollo del cloroplasto a consecuencia de la ITP, o de ACS1

Como consecuencia de la ITP o de la mutación en ZDS, los plástidos se arrestan en un estadio de desarrollo muy temprano (Fig. 19). El estudio de algunas mutantes, como aquellas que presentan variegación, ha permitido constatar que existe una relación entre la afectación en la homeostasis y el funcionamiento del cloroplasto, y el desarrollo foliar. Particularmente, inducir defectos en las enzimas que participan en procesos metabólicos que ocurren en el cloroplasto, o en la translocación de éstas desde el citoplasma hacia el organelo, causa defectos mesófilo. El estudio de estas mutantes ha permitido postular dos hipótesis sobre cómo el cloroplasto dirige el desarrollo del mesófilo; y ambas involucran al haz vascular, mismo que precede en su conformación a la diferenciación del mesófilo. La hipótesis del suministro, señala que, de las células del haz vascular provienen metabolitos primarios (sintetizados o transportados por él) que se dosifican a las células de mesófilo incipientes. Estos metabolitos se encontrarían en alta

abundancia en el haz vascular y su suministro a las células que darán origen al mesófilo, cesaría una vez se ha diferenciado ya el tejido. La segunda hipótesis señala que, partiendo del haz vascular, se envían señales moleculares que tienen como blanco a las células que darán origen al mesófilo y estimulan su desarrollo y diferenciación; por lo cual, defectos en la transmisión de esta señal, impactarían directamente en el desarrollo anormal de este tejido (Lundquist *et al.*, 2014). Cabe recordar que el cloroplasto es un nodo metabólico, y en este se sintetizan desde aminoácidos y ácidos grasos, hasta fitohormonas y que, en las células del haz vascular, existen cloroplastos que podrían ser los que sintetizan los metabolitos que se suministran a las células que originan el mesófilo. Al impedir que se desarrolle el cloroplasto tanto en las plantas bajo ITP como en *clb5-1* o *spc1-2*, muchos de estos metabolitos no se están produciendo en ningún tejido de la hoja. Siguiendo lo que postula la hipótesis del suministro, esto sugeriría que en todos los casos mencionados, el abastecimiento de metabolitos hacia las células que originan el mesófilo, es inadecuado esto conlleva a que, o sólo se desarrolle un tipo de mesófilo, de los dos que presenta una hoja normal (como en el caso de *spc1-2* con hojas lanceoladas) o que, se detenga la proliferación y la diferenciación de las células que darán origen al mesófilo maduro; considerando lo anterior, esto podría ser causa de que en las hojas de las plantas bajo ITP (con Lin o Sp), o en las mutantes en ZDS (*spc1-2* con hojas aciculares o *clb5-1*), existan espacios aéreos grandes y carezcan de un mesófilo desarrollado.

7.5. La inhibición de la síntesis de carotenoides favorece que las plantas con ITP desarrollen un primer par de hojas

La NF inhibe específicamente a la enzima PDS, con lo cual se detiene el flujo de metabolitos río abajo de la vía de síntesis de carotenoides y se acumula el fitoeno, sintetizado por la PSY. Por lo tanto, la inhibición de PDS evita que se acumulen fitoflueno y ζ -carotenos, sustratos hipotéticos de CCD4, y a partir de los cuales se sintetiza un apocarotenoide que podría funcionar como una señal retrograda (ACS1) capaz de modular el desarrollo foliar en la mutante *clb5-1* de *A. thaliana* (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2016).

En este trabajo, el inhibir la síntesis de carotenos con NF, en plantas Col-0 crecidas en medio GM 1X con Sp o Lin, no se tradujo en una disminución de la proporción de plantas con afectaciones en la hoja, mientras que *clb5-1* recuperó un fenotipo foliar con lámina y peciolo en presencia de NF. Este resultado plantea dos posibilidades: que la señal derivada de la represión de la traducción plastídica se encuentra río abajo de ACS1 o, que ambas señales participan en vías retrógradas paralelas que impactan el desarrollo foliar en *A. thaliana*.

Por otra parte, resulta interesante que inhibir la síntesis de carotenos a la par que la traducción plastídica, implicó una reducción pequeña pero significativa en la cantidad de plantas que arrestaron su desarrollo en el estadio 1.0. Esto parece sugerir que la síntesis de carotenos influye en el fenotipo derivado de la ITP, reduciendo el fenotipo de arresto del desarrollo. No obstante, que el fenotipo “hoja afectada” no revierta, podría indicar que existen otros factores que participan dentro de este mecanismo.

7.6. La luz no influye en la producción de la señal derivada de la inhibición de la traducción plastídica

Para la síntesis de carotenos así como para numerosos procesos relacionados con la biogénesis del cloroplasto, la luz es un factor crucial (Larkin, 2014; Llorente, *et al.*, 2017; Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012). Tal y como puede observarse en este trabajo, el fenotipo de *clb5-1* respondió ante distintas intensidades de luz, revirtiendo el fenotipo de la hoja en condiciones de baja luz (Fig. 27). Es interesante que esta reversión del fenotipo foliar no ocurre en las plantas con ITP, lo que muestra que esta respuesta es independiente de la intensidad de luz, por lo menos en las condiciones analizadas. Estos resultados también apoyan la idea de que quizás las señales generadas tanto en *clb5-1* como en las plantas con ITP, actúan independientemente. Es posible que la señal retrógrada que se genera de la ITP sea causada por los cambios que el organelo detecta, por ejemplo, derivados de la acumulación de mRNAs sin traducir en el plástido o de la agregación de proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo, mal plegadas. Llamas *et al.* (2017) sugirieron que dentro del plástido existe un

sistema denominado UPR (del inglés *Unfolded Protein Response*) que percibe la presencia de proteínas mal plegadas, análogo a aquél que existe en la mitocondria, en el cual se promueve la transcripción de proteasas y chaperonas de localización plastídica. Dicho sistema se activa al afectarse la expresión de genes del plástido (PGE; del inglés *Plastid Gene Expression*), pues alterar la síntesis de proteínas en éste, reduce la actividad proteolítica del complejo Clp que se encarga, junto con otras chaperonas, de procesar numerosas proteínas plastídicas. Con el objetivo de analizar estas posibilidades, podría llevarse a cabo un análisis de la expresión de algunos genes codificados en el plástido; así como de la acumulación de algunas proteínas plastídicas codificadas en el núcleo, provenientes de plantas crecidas bajo diferentes intensidades lumínicas. Llamas *et al.* (2017) realizaron algo similar al cotejar la acumulación de proteínas que forman parte del complejo Clp, como es el caso de ClpB3, y otras proteínas relacionadas con la UPR en los plástidos de las plantas sometidas a tratamiento con Lin.

7.7. *gun1-1* es resistente a la ITP y parece estar involucrada en la señalización retrógrada que parte de ésta

GUN1 está codificada en el genoma nuclear, y se ha propuesto como un factor central para la comunicación entre el plástido y el núcleo (Colombo *et al.*, 2016; Larkin, 2014; Llamas *et al.*, 2017; Tadini *et al.*, 2016). Existen otras cinco mutantes *gun*, que al igual que *gun1*, presentan un fenotipo de desregulación de la expresión de PhANGs, en condiciones en que la fotosíntesis se encuentra afectada, ya sea por la inhibición de la actividad fotosintética del plástido o defectos en la biogénesis del mismo. Estas mutantes *gun* corresponden a enzimas que participan en la vía de síntesis de tetrapirroles, lo que ha apoyado que estos compuestos participan en la regulación de la PGE (Tadini *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018). Entre las proteínas con las que GUN1 interacciona se encuentran algunas del ribosoma plastídico, como PRPS1 (PLASTID RIBOSOMAL PROTEIN S1) (Tadini *et al.*, 2016). Consecuentemente, se ha propuesto que GUN1 participa en la transcripción/traducción del plástido. Dado que GUN1 interacciona de manera directa con algunas proteínas ribosomales del plástido, la transducción de la señal

que deriva de la ITP bien puede proceder de la percepción por GUN1 de la ausencia de estas proteínas, y que al no poder interactuar con aquéllas envíe una señal al núcleo que modifica el programa de desarrollo de la planta. Que la mutante *gun1-1* sea menos sensible a la ITP, como lo avalan nuestros resultados, con una disminución considerable de hojas con fenotipo afectado en plantas crecidas en medio con Lin 300µM, y los de Tameshige *et al.* (2013); soporta el papel que parece tener GUN1 en la percepción de la señal retrógrada producida por la ITP. Cabe recordar que en el trabajo de Tameshige *et al.* (2013) se utilizó una concentración menor de Lin (230 µM). Sin embargo, resulta interesante que a una concentración mayor del antibiótico, existan diferencias respecto al fenotipo foliar que observan Tameshige *et al.*; (2013).

En cambio, experimentos realizados previamente en el laboratorio con la doble mutante *clb5-1 gun1*, demuestran que GUN1 no revierte el fenotipo foliar derivado de ACS1 en *clb5-1* (datos no publicados). Este resultado se traduce en una clara diferencia entre la señal derivada de la inhibición de la síntesis de proteínas en el plástido y la derivada de la acumulación de fitoflueno y zeta-carotenos, sugiriendo que ambas señales son independientes que convergen en torno a un mismo proceso, o siguen siendo parte de una misma vía de señalización en la cual, actúan a distintos niveles.

7.8. La señal derivada de la ITP actúa sobre el desarrollo temprano de la hoja

Nuestros datos mostraron que los defectos en el desarrollo de las hojas, a causa de la ITP, se observaron primordialmente cuando la traducción se inhibió durante las primeras horas del desarrollo de la planta. A partir de las 60 horas post-siembra (hAS) observamos la presencia de una proporción significativa (13%) de plantas que presentan un fenotipo foliar básicamente silvestre (fenotipo laminar). Este resultado permite sugerir la existencia de una ventana de tiempo, en donde la ITP es capaz de generar una señal específica que modula el desarrollo de la hoja. No obstante, el por qué existe heterogeneidad en el fenotipo foliar podría atribuirse a que el antibiótico no es capaz de actuar sobre los ribosomas de los cloroplastos (fotosintéticamente activos). No obstante, existen referencias en la literatura que

no apoyan esta posibilidad (Ellis, 1970; Mulo *et al.*, 2003; Smith-Johansen *et al.*, 1980; Sullivan & Gray, 1999). En estos trabajos, a partir de individuos con cloroplastos fotosintéticamente activos se observó que después de aplicar tratamientos que inhiben la síntesis de proteínas plastídicas, existe una clara disminución en la producción de éstas, de modo que la traducción plastídica es efectivamente reprimida aún en cloroplastos maduros.

Otra posibilidad es que el plástido es capaz de enviar la señal sólo mientras se encuentra en un estadio de desarrollo temprano. La percepción de este estadio de desarrollo bien puede deberse a la acumulación de ciertas proteínas plastídicas (o en su defecto, su ausencia), que en algún modo modifiquen la homeostasis del plástido y esto sea detonante de una señal que se transduzca al núcleo para alterar o, por el contrario, seguir el correcto desarrollo de la hoja. Esta transducción podría involucrar a metabolitos que se transloquen al núcleo y que sean quienes modifican el programa de desarrollo de la hoja directamente. Quizás una manera de discernir entre ambas posibilidades sea caracterizar el estado de desarrollo de los plástidos en el estadio 1.02 de los individuos que germinaron en medio sin antibióticos y que fueron posteriormente transferidos a medio con inhibidores de la traducción plastídica. También por medio de ensayos de tipo *western blot* podría determinarse si existe acumulación de algunas proteínas plastídicas en las plantas en las que se reprimió la traducción del plástido en estadios más tardíos (60, 72, 84 y 96 hAS), pues se parte del supuesto de que al inhibir la traducción plastídica en estadios más tempranos, se abate totalmente la producción de las mismas mientras prosiga desarrollándose la planta en medio con los inhibidores de la traducción del plástido.

7.9. Modelo propuesto

Con lo expuesto previamente, queda claro que la señalización retrógrada biogénica es un proceso altamente complejo, el cual no se comprende del todo, pero que influye en el desarrollo de la planta. Existen distintas señales generadas en los plástidos por los cuales se regula el desarrollo foliar; incluyendo la traducción plastídica y la síntesis de carotenoides. Derivado de la primera, se obtiene una señal que requiere de GUN1 y así posiblemente, altera la expresión génica nuclear, cuya consecuencia ulterior es la modificación del programa de desarrollo foliar. La segunda, ACS1, producto del corte enzimático de fitoflueno y/o ζ -carotenos por CCD4 en la mutante *clb5-1*, modula probablemente la expresión génica nuclear produciendo un fenotipo foliar aberrante.

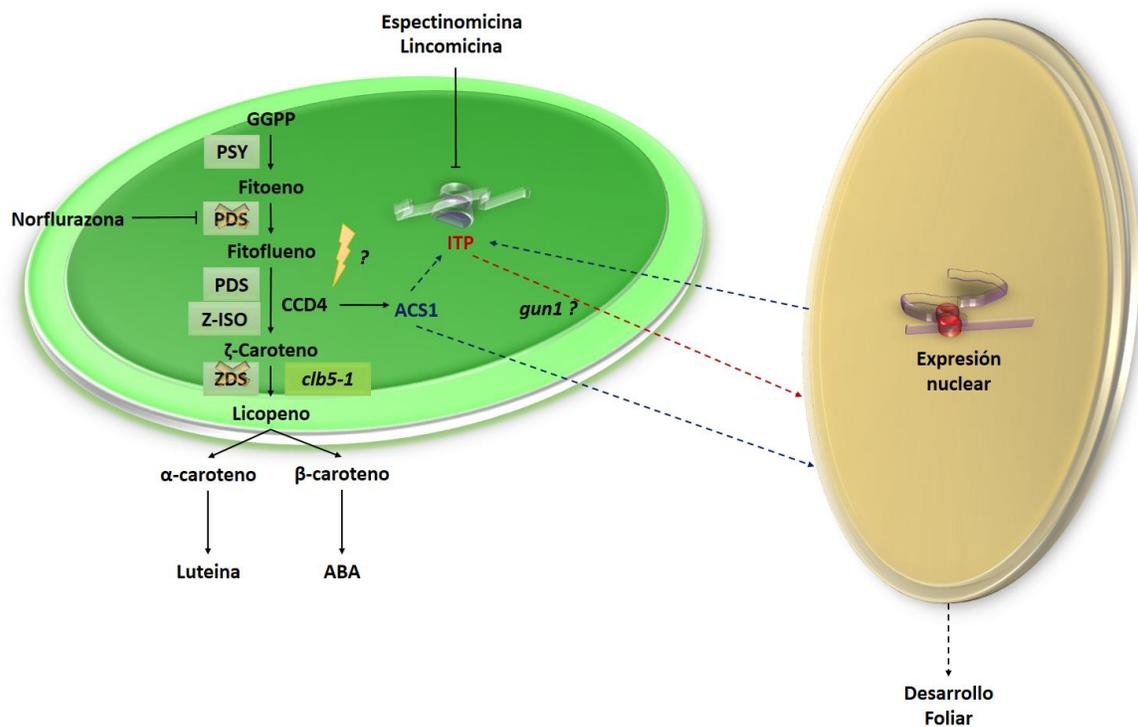


Fig. 28. Modelo de estudio: ACS1 y la señal producto de la ITP podrían ser dos señales independientes o actúan en diferentes niveles de una misma vía de señalización retrógrada. La mutación en ZDS produce la acumulación de fitoflueno y ζ -carotenos, que podrían ser cortados enzimáticamente por CCD4, generando a ACS1 (cuya producción es mediada por la luz), capaz de alterar la expresión génica nuclear y, como consecuencia, el desarrollo foliar. La NF inhibe la actividad de PDS y a su vez la acumulación de fitoflueno y ζ -carotenos. La ITP por medio de Sp y Lin afecta la expresión

génica nuclear y así, el desarrollo foliar. GUN1 media en la transducción de la señal hacia el núcleo, pero no participa en la señalización por ACS1. ACS1 podría actuar río arriba de la inhibición de la traducción o ser independiente de la señal derivada de la inhibición de la traducción plastídica.

El hecho de que no se revierta el fenotipo de *clb5-1* en la doble mutante *clb5-1 gun1-1*, pero que la mutante *gun1-1* aunque se someta a tratamiento de ITP no desarrolle un fenotipo de alteración en el desarrollo foliar, sugiere una diferencia importante entre ambas señales en la regulación de éste proceso. ACS1 podría actuar en dos niveles, sobre la traducción plastídica y activar la señal derivada de la ITP o, por el contrario, actuar directamente sobre la expresión génica nuclear, independiente de GUN1. El primer caso parece sugerirlo la elevada similitud entre los dos fenotipos foliares (el producto de ACS1 y aquél de la ITP) y que, NF parcialmente parece restaurar al menos el fenotipo más extremo derivado de la traducción plastídica.

Interesantemente, la luz, que es un factor importante para la morfogénesis de la planta, no parece ser trascendental para la generación de la señal derivada de la ITP, pero sí para ACS1, constituyendo así otra diferencia en la generación de las señales que afectan el desarrollo de la hoja, aunada al papel de GUN1, la expresión de *FIL* y la respuesta a la inhibición de la síntesis de carotenos con NF. Que existan estas diferencias permite sugerir que se trata de señales distintas que generan fenotipos similares en el desarrollo de la hoja; no obstante, dado que las hojas de *clb5-1* y las de las plantas inhibidas en su traducción plastídica no expresan el marcador de respuesta a auxinas DR5 y la expresión de *CYCB1* está desregulada, no descarta la posibilidad de que la señal que deriva de la ITP podría localizarse río debajo de ACS1. Consecuentemente, para continuar elucidando si las dos señales convergen en la misma vía de señalización retrógrada que dirige el desarrollo foliar, se sugiere realizar un análisis global de la expresión en las plantas bajo tratamiento de ITP y compararlo con uno proveniente de una planta silvestre y con aquél de *clb5-1* ó *spc1-2*. Este análisis permitiría conocer qué genes se expresan diferencialmente y qué procesos podrían estar afectados, facilitando a su vez la búsqueda de candidatos que se ubiquen río abajo de ambas señales.

A su vez, para identificar si la ITP genera plástidos arrestados en estadios más tempranos que *clb5-1* (o viceversa), sería necesario analizar cómo se encuentran las proteínas o los transcritos de éstas, que se acumulan en estadios tempranos del plástido en plantas bajo tratamientos con Sp y compararlo con el caso de *clb5-1* para comparar cuál de los procesos arresta más pronto la biogénesis del cloroplasto.

8. CONCLUSIONES

La ITP y *clb5-1* presentaron fenotipos foliares muy similares; esto se corroboró mediante el análisis de diversos marcadores para desarrollo foliar. El único marcador que exhibió un comportamiento diferente entre *clb5-1* y la ITP, fue FIL; este marcador carece por completo de expresión en *clb5-1* en hoja verdadera, mientras que en plantas cuya traducción plastídica fue reprimida, se expresa a lo largo de la hoja.

Por otro lado, la inhibición de la síntesis de carotenos por NF, en *clb5-1* revirtió el fenotipo foliar acicular característico de esta planta hacia uno más semejante al silvestre; no obstante, si se inhibe la traducción plastídica y la síntesis de carotenos al mismo tiempo, no presentó una reversión del fenotipo foliar afectado.

La luz participa dentro de la generación de la señal de ACS1, debido a que *clb5-1* revirtió su fenotipo foliar en condiciones de baja irradiancia lumínica, empero, en las plantas inhibidas en su traducción plastídica, parece no desempeñar un rol importante en el fenotipo foliar que de ésta se deriva.

Se confirmó que GUN1 es resistente a la ITP, pues su fenotipo foliar es laminar -si bien no completamente silvestre-; mientras que, la doble mutante *gun1-1 clb5-1* presenta hojas aciculares como *clb5-1*. Este conjunto de evidencias permite hipotetizar que la ITP puede localizarse río debajo de la señal de *clb5-1* o ser independiente y coincidir en algún punto en el mismo proceso que ACS1, y así generar el fenotipo foliar acicular que deriva de ambas señales.

Y, por último, la ITP modula la morfogénesis de la hoja durante un estadio temprano del desarrollo de la planta, pues mientras más tardíamente se reprima la síntesis de proteínas en el plástido, menor es el efecto observado en el desarrollo foliar; esta tendencia se conserva aun cuando se inhibe a la par la síntesis de carotenoides. El arresto temprano en el desarrollo del plástido (careciendo éste de membranas internas) a consecuencia de la ITP puede estar relacionado con la producción de esta señal; la cual partiría de la percepción del arresto por parte del plástido en desarrollo e induciría la modificación del desarrollo foliar.

9. PERSPECTIVAS

Realizar un ensayo global de la expresión de plantas inhibidas en la traducción con Sp 70µM y compararlo con las mutantes *clb5-1* y *spc1-2* y plantas silvestres crecidas en medio sin antibiótico. *spc1-2* es también mutante en ZDS y presenta afectación en el desarrollo foliar y podría ser incluso un mejor candidato que *clb5-1* debido a que está en fondo Col-0, y es en este ecotipo en el que se realizó la mayoría del trabajo presente.

Analizar las líneas reporteras para el desarrollo de la hoja bajo fondo *spc1-2* tal y como se hizo en *clb5-1* para determinar los procesos involucrados en el desarrollo foliar que están afectados en esta mutante, y realizar una comparación con los encontrados para *clb5-1* y las plantas inhibidas en la traducción plastídica.

Analizar la doble mutante *gun1-1 spc1-2*, previamente ya generada en el laboratorio y observar si en ésta el comportamiento es similar al de la doble mutante *gun1-1 clb5-1*, de modo que se pueda afirmar que en el ecotipo Col-0 ocurre lo mismo que en el ecotipo Ler-0; asimismo, repetir los experimentos a diferentes irradiancias lumínicas incluyendo a *spc1-2* y determinar si la luz es también importante para la ocurrencia del fenotipo de esta mutante, como lo es en *clb5-1*.

Estudiar en otros modelos vegetales mutantes simples y dobles en ZDS o CCD4 con el objeto de dilucidar si ACS1 es una señal retrógrada conservada que modula el desarrollo también en éstos, y así documentar la aparición de esta señal durante la evolución de las plantas terrestres.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alkatib, S., Scharff, L. B., Rogalski, M., Fleischmann, T. T., Matthes, A., Seeger, S., ... Bock, R. (2012). The Contributions of Wobbling and Superwobbling to the Reading of the Genetic Code. *PLoS Genetics*, 8(11), e1003076. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003076>
- Allison, L. A., Simon, L. D., & Maligal, P. (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO Journal* 15(11), 2802-2809.
- Avendano-Vazquez, A.-O., Cordoba, E., Llamas, E., San Roman, C., Nisar, N., De la Torre, S., ... Leon, P. (2014). An Uncharacterized Apocarotenoid-Derived Signal Generated in -Carotene Desaturase Mutants Regulates Leaf Development and the Expression of Chloroplast and Nuclear Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(6), 2524-2537. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123349>
- Bar, M., & Ori, N. (2014). Leaf development and morphogenesis. *Development*, 141(22), 4219-4230. <https://doi.org/10.1242/dev.106195>
- Barajas-López, J. de D., Blanco, N. E., & Strand, Å. (2013). Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(2), 425-437. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.020>
- Beringer, M., & Rodnina, M. V. (2007). The Ribosomal Peptidyl Transferase. *Molecular Cell*, 26(3), 311-321. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.015>
- Börner, T., Aleynikova, A. Y., Zubo, Y. O., & Kusnetsov, V. V. (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(9), 761-769. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.004>
- Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Holton, J. M., Fredrick, K., & Cate, J. H. D. (2007). A steric block in translation caused by the antibiotic spectinomycin. *ACS Chemical Biology*, 2(8), 545-552. <https://doi.org/10.1021/cb700100n>
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants, 13, 1499-1510.
- Chan, K. X., Phua, S. Y., Crisp, P., McQuinn, R., & Pogson, B. J. (2016). Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 25-53. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111854>

- Colombo, M., Tadini, L., Peracchio, C., Ferrari, R., & Pesaresi, P. (2016). GUN1, a Jack-Of-All-Trades in Chloroplast Protein Homeostasis and Signaling. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01427>
- Díaz, M. G., Hernández-Verdeja, T., Kremnev, D., Crawford, T., Dubreuil, C., & Strand, Å. (2018). Redox regulation of PEP activity during seedling establishment in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02468-2>
- Dong, H., Deng, Y., Mu, J., Lu, Q., Wang, Y., Xu, Y., ... Zuo, J. (2007). The *Arabidopsis* Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a z-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Research*, 13, 458-470.
- Douthwaite, S. (1992). Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 20(18), 4717-4720. <https://doi.org/10.1093/nar/20.18.4717>
- Ellis, R. J. (1970). Further similarities between chloroplast and bacterial ribosomes. *Planta*, 91, 329-335
- Frank, J., Gao, H., Sengupta, J., Gao, N., & Taylor, D. J. (2007). The process of mRNA-tRNA translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19671-19678. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708517104>
- Fukushima, K., & Hasebe, M. (2014). Adaxial-abaxial polarity: The developmental basis of leaf shape diversity: development and evolution of leaf types. *Genesis*, 52(1), 1-18. <https://doi.org/10.1002/dvg.22728>
- Guevara-Garcia, A., San Román, C., Arroyo, A., Cortés, M. E., Gutiérrez-Nava, M. d. I. L. & León, P. (2005). Characterization of the *Arabidopsis* clb6 Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *The Plant Cell*, 17(2), 628-643. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028860>
- Gutierrez-Nava, M. d. I. L., Gillmor, C. S., Jiménez, L. F., Guevara-García, A. & León, P. (2004). CHLOROPLAST BIOGENESIS Genes Act Cell and Noncell Autonomously in Early Chloroplast Development. *Plant Physiology*, 135(1), 471-482. <https://doi.org/10.1104/pp.103.036996>
- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P., & Pogson, B. J. (2016). Synthesis and Function of Apocarotenoid Signals in Plants. *Trends in Plant Science*, 21(9), 792-803. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.001>
- Hricová, A., Quesada, V., & Micol, J. L. (2006). The SCABRA3 Nuclear Gene Encodes the Plastid RpoTp RNA Polymerase, Which Is Required for

- Chloroplast Biogenesis and Mesophyll Cell Proliferation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 141(3), 942-956. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080069>
- Jarvis, P., & López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), 787-802. <https://doi.org/10.1038/nrm3702>
- Joseph, S. (2003). After the ribosome structure: How does translocation work? *RNA*, 9(2), 160-164. <https://doi.org/10.1261/rna.2163103>
- Kalve, S., De Vos, D., & Beemster, G. T. S. (2014). Leaf development: a cellular perspective. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00362>
- Kawade, K., Horiguchi, G., Usami, T., Hirai, M. Y., & Tsukaya, H. (2013). ANGUSTIFOLIA3 Signaling Coordinates Proliferation between Clonally Distinct Cells in Leaves. *Current Biology*, 23(9), 788-792. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.044>
- Keeling, P. J. (2013). The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 583-607. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120144>
- Larkin, R. M. (2014). Influence of plastids on light signalling and development. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1640), 20130232. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0232>
- Liao, J.-C., Hsieh, W.-Y., Tseng, C.-C., & Hsieh, M.-H. (2016). Dysfunctional chloroplasts up-regulate the expression of mitochondrial genes in Arabidopsis seedlings. *Photosynthesis Research*, 127(2), 151-159. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0161-6>
- Liebers, M., Grübler, B., Chevalier, F., Lerbs-Mache, S., Merendino, L., Blanvillain, R., & Pfannschmidt, T. (2017). Regulatory Shifts in Plastid Transcription Play a Key Role in Morphological Conversions of Plastids during Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00023>
- Ling, C., & Ermolenko, D. N. (2016). Structural insights into ribosome translocation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 7(5), 620-636. <https://doi.org/10.1002/wrna.1354>
- Liu, J.-X., Chiou, C.-Y., Shen, C.-H., Chen, P.-J., Liu, Y.-C., Jian, C.-D., ... Yeh, K.-W. (2014). RNA interference-based gene silencing of phytoene synthase impairs growth, carotenoids, and plastid phenotype in *Oncidium* hybrid orchid. *SpringerPlus*, 3(1), 478. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-478>

- Llamas, E., Pulido, P., & Rodríguez-Concepción, M. (2017). Interference with plastome gene expression and Clp protease activity in *Arabidopsis* triggers a chloroplast unfolded protein response to restore protein homeostasis. *PLOS Genetics*, *13*(9), e1007022. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007022>
- Llorente, B., Martínez-García, J. F., Stange, C., & Rodríguez-Concepción, M. (2017). Illuminating colors: regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light. *Current Opinion in Plant Biology*, *37*, 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.011>
- Lundquist, P. K., Rosar, C., Bräutigam, A., & Weber, A. P. M. (2014). Plastid Signals and the Bundle Sheath: Mesophyll Development in Reticulate Mutants. *Molecular Plant*, *7*(1), 14-29. <https://doi.org/10.1093/mp/sst133>
- Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M., & León, P. (1996). *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *The Plant Journal*, *9*(5), 649-658. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9050649.x>
- Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., Quesada, V., Hricová, A., Candela, H., & Micol, J. L. (2015). Plastid control of abaxial-adaxial patterning. *Scientific Reports*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/srep15975>
- Matzov, D., Eyal, Z., Benhamou, R. I., Shalev-Benami, M., Halfon, Y., Krupkin, M., ... Yonath, A. (2017). Structural insights of lincosamides targeting the ribosome of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*, *45*(17), 10284-10292. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx658>
- Mulo, P., Pursiheimo, S., Hou, C.-X., Tyystjärvi, T., & Aro, E.-M. (2003). Multiple effects of antibiotics on chloroplast and nuclear gene expression. *Functional Plant Biology*, *30*(11), 1097-1103. <https://doi.org/10.1071/FP03149>
- Parker, N., Wang, Y., & Meinke, D. (2014). Natural Variation in Sensitivity to a Loss of Chloroplast Translation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *166*(4), 2013-2027. <https://doi.org/10.1104/pp.114.249052>
- Parker, N., Wang, Y., & Meinke, D. (2016). Analysis of *Arabidopsis* Accessions Hypersensitive to a Loss of Chloroplast Translation. *Plant Physiology*, *172*(3), 1862-1875. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01291>
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(5), a001446. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001446>
- Pinard, D., & Mizrahi, E. (2018). Unsung and understudied: plastids involved in secondary growth. *Current Opinion in Plant Biology*, *42*, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.01.011>

- Pogson, B. J., Ganguly, D., & Albrecht-Borth, V. (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(9), 1017-1024.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.003>
- Qi, J., Wang, Y., Yu, T., Cunha, A., Wu, B., Vernoux, T., ... Jiao, Y. (2014). Auxin depletion from leaf primordia contributes to organ patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(52), 18769-18774.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1421878112>
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X. W., Chen, Z., & Qu, L.-J. (2007). Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in Arabidopsis by impairing chlorophyll, carotenoid and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*, 17, 471-482.
<https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>
- Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. M., & Bhattacharya, D. (2007). The Origin and Establishment of the Plastid in Algae and Plants. *Annual Review of Genetics*, 41(1), 147-168.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130134>
- Ruiz-Sola, M. Á., & Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *The Arabidopsis Book*, 10, e0158.
<https://doi.org/10.1199/tab.0158>
- Sakamoto, W., Miyagishima, S., & Jarvis, P. (2008). Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance. *The Arabidopsis Book*, 6, e0110. <https://doi.org/10.1199/tab.0110>
- Smith-Johansen, H., Fromson, D., & Gibbs, S. P. (1980). The Effects of Spectinomycin and Ethidium Bromide on the Synthesis of Organelle rRNA and on Ultrastructure in *Ochromonas Danica*. *Journal of Cell Science*, 43, 119-136.
- Stange, C. (2016). *Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg.
- Sullivan, J. A., & Gray, J. C. (1999). Plastid Translation Is Required for the Expression of Nuclear Photosynthesis Genes in the Dark and in Roots of the Pea *lip1* Mutant. *The Plant Cell*, 11, 901-910.
- Tadini, L., Pesaresi, P., Kleine, T., Rossi, F., Guljamow, A., Sommer, F., ... Leister, D. (2016). GUN1 Controls Accumulation of the Plastid Ribosomal Protein S1 at the Protein Level and Interacts with Proteins Involved in Plastid Protein Homeostasis1. *Plant Physiology* 170, 1817-1830.
- Tameshige, T., Fujita, H., Watanabe, K., Toyokura, K., Kondo, M., Tatematsu, K., ... Okada, K. (2013). Pattern Dynamics in Adaxial-Abaxial Specific Gene

- Expression Are Modulated by a Plastid Retrograde Signal during Arabidopsis thaliana Leaf Development. *PLoS Genetics*, 9(7), e1003655. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003655>
- Tiller, N., & Bock, R. (2014). The Translational Apparatus of Plastids and Its Role in Plant Development. *Molecular Plant*, 7(7), 1105-1120. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu022>
- Tsukaya, H. (2013). Leaf Development. *The Arabidopsis Book*, 11, e0163. <https://doi.org/10.1199/tab.0163>
- Vranová, E., Coman, D., & Grussem, W. (2013). Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 665-700. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116>
- Wilson, D. N. (2009). The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(6), 393-433. <https://doi.org/10.3109/10409230903307311>
- Wirmer, J., & Westhof, E. (2006). Molecular Contacts Between Antibiotics and the 30S Ribosomal Particle. *Methods in Enzymology*, 415(06), 180-202. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)15012-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)15012-0)
- Wise, R. R. & Hooper, J. K. (2006). *The Structure and Function of Plastids*. New York, NY: Springer Netherlands.
- Wu, G.-Z., Chalvin, C., Hoelscher, M., Meyer, E. H., Wu, X. N., & Bock, R. (2018). Control of Retrograde Signaling by Rapid Turnover of GENOMES UNCOUPLED1. *Plant Physiology*, 176(3), 2472-2495. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00009>
- Yagi, Y., & Shiina, T. (2014). Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00061>
- Yamaguchi, T., Nukazuka, A., & Tsukaya, H. (2012). Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant and Cell Physiology*, 53(7), 1180-1194. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs074>