

Tesis Doctoral

# Caracterización molecular de mutantes derivadas del genotipo mutador de cloroplastos de cebada

Colombo, Noemí

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Colombo, Noemí. (2008). Caracterización molecular de mutantes derivadas del genotipo mutador de cloroplastos de cebada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Colombo, Noemí. "Caracterización molecular de mutantes derivadas del genotipo mutador de cloroplastos de cebada". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MUTANTES  
DERIVADAS DEL GENOTIPO MUTADOR DE CLOROPLASTOS  
DE CEBADA**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Noemí Colombo**

**Directores de tesis: Ing. Agr. MSc. Alberto Raúl Prina**

**Dr. Horacio Esteban Hopp**

**Consejero de estudios: Dr. Horacio Esteban Hopp**

**Instituto de Genética “Ewald A. Favret”  
CICVyA – CNIA - INTA**

**Buenos Aires, Abril 2008**

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MUTANTES DERIVADAS DEL GENOTIPO MUTADOR DE CLOROPLASTOS DE CEBADA

## Resumen

La coordinación de la expresión génica entre los genomas nuclear, plastídico y mitocondrial es de importancia crucial para las células vegetales. Un caso particular de la interacción núcleo-plástido está dado por los genes nucleares mutadores de cloroplasto, que inducen un dramático aumento de la tasa de mutación espontánea del plastoma. En esta tesis se estudió molecularmente el plastoma de cuatro mutantes inducidas por el mutador de cloroplastos de cebada en las que no se observaron cambios mayores, ni en el tamaño, ni en el arreglo génico del plastoma. Sin embargo, no debe descartarse en las mismas la presencia de alteraciones menores, como pequeñas deleciones, duplicaciones o sustituciones. Por otro lado, se hicieron estudios de expresión génica en la lámina de la primera hoja de una de ellas, la línea citoplásmica 2 (LC2) caracterizada por presentar retraso en la traducción plastídica durante embriogénesis, afectando el desarrollo temprano de los cloroplastos. En la base y el ápice LC2 presentó: a) incremento en los transcritos de las ARN polimerasas plastídica (NEP) y mitocondrial; b) incremento en la acumulación de ARN mensajeros para genes transcritos por NEP; c) menor acumulación de ARN ribosomales plastídicos; d) menor acumulación de proteínas tilacoidales. La acumulación de la ARN polimerasa plastídica (PEP) fue similar al control, al igual que los patrones de sus transcritos. Se observó expresión diferencial de Rubisco entre células del mesófilo y de la vaina parenquimática del haz vascular en el ápice de LC2. Mediante parámetros de fluorescencia de clorofila se comprobó la alteración temprana y posterior recuperación de la fotosíntesis en LC2. Los resultados aportan nuevas evidencias sobre la relación entre la traducción plastídica y el desarrollo de los cloroplastos y muestran a LC2 como un material experimental útil para el estudio de la traducción plastídica y del efecto de ésta y de los plástidos sobre la expresión concertada de los distintos genomas de la célula vegetal.

Palabras clave: mutador de cloroplastos, plastoma, traducción plastídica, transcripción plastídica, señalización retrógrada.

# **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MUTANTS DERIVED FROM THE BARLEY CHLOROPLAST MUTATOR GENOTYPE**

## **Summary**

The coordination of gene expression between the nuclear, plastidic and mitochondrial genomes is crucial for plant cells. A particular case of the nuclear-plastid interaction is that of the chloroplast mutator nuclear genes, which dramatically increase the plastome spontaneous mutation rate. In this thesis, the plastome of four mutants induced by the barley chloroplast mutator was characterized at the molecular level. No major changes were observed, either in plastome size or in gene arrangement. However, minor changes like small deletions, duplications or substitutions should not be discarded. Additionally, studies on gene expression along the first leaf blade were carried out in one of the mutants, the cytoplasmic line 2 (CL2). CL2 presents a delay in plastid translation during embryogenesis, affecting early chloroplast development. In the basal and top sections CL2 showed: a) an increase in transcripts levels of plastid (NEP) and mitochondrial RNA polymerases; b) an increase in mRNA accumulation of NEP- transcribed genes; c) lower levels of plastid ribosomal RNAs; d) lower accumulation of thylakoid proteins. The accumulation of plastid RNA polymerase (PEP) in CL2 was similar to that of the control, as were its transcripts patterns. Differential expression of Rubisco was observed between mesophyll and parenchymatous bundle sheath cells in CL2 top. Early photosynthesis impairment and subsequent recovery was determined using chlorophyll fluorescence parameters. Results provide new evidences about the relationship between plastid translation and chloroplast development and show CL2 is a useful material for studying plastid translation and its effect on the concerted expression of different plant cell genomes.

Key words: chloroplast mutator; plastome; plastid translation; plastid transcription; retrograde signalling.



## **Agradecimientos:**

- A Alberto Prina y Esteban Hopp
- A Thomas Börner y Barbara Sears
- A Sara Maldonado
- A mis compañeros del Instituto de Genética del INTA
- A mis compañeros del Laboratorio de Anatomía y Embriología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA
- A mis médicos
- A mis amigas
- A mi familia

Para Melisa, nuestro rayo de sol.

Los contenidos de esta tesis fueron total o parcialmente incluidos en las siguientes publicaciones:

-Colombo N, Emanuel C, Lainez V, Maldonado S, Prina AR, Börner T (2007) The barley plastome mutant CL2 affects expression of nuclear and chloroplast housekeeping genes in a cell-age dependent manner. *Molecular Genetics and Genomics*. DOI 10.1007/s00438-008-0321-x

-Colombo N, Ríos RD, Prina AR (2006) Plastome analysis of barley chloroplast mutator-induced mutants. *Journal of Basic and Applied Genetics* 17:5-9

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL ADN CLOROPLÁSTICO DE MUTANTES DE CEBADA INDUCIDAS POR EL GENOTIPO MUTADOR DE CLOROPLASTOS</b>	<b>3</b>
<b>I.1) INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>El genoma cloroplástico</b>	<b>4</b>
<b>Variabilidad del plastota</b>	<b>8</b>
<b>El mutador de cloroplastos de cebada</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>I.2) MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
<b>Material vegetal</b>	<b>16</b>
<b>Métodos</b>	<b>16</b>
<b>Extracción y cuantificación de ADN genómico</b>	<b>16</b>
<b>Análisis de RFLP con sondas específicas de cloroplasto</b>	<b>16</b>
<b>Extracción de ADN cloroplástico y análisis de RFLP</b>	<b>18</b>
<b>Análisis de PCR-RFLP-SSCP</b>	<b>18</b>
<b>Análisis de Microsatélites</b>	<b>20</b>
<b>I.3) RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>Análisis de RFLPs con sondas específicas de cloroplasto</b>	<b>23</b>
<b>Análisis de RFLP de ADN cloroplástico</b>	<b>25</b>
<b>Análisis de PCR-RFLP-SSCP</b>	<b>27</b>
<b>Análisis de Microsatélites cloroplásticos</b>	<b>31</b>
<b>I.4) DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>

<b>I.5) CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN UNA MUTANTE DE PLASTOMA DE CEBADA DERIVADA DEL GENOTIPO MUTADOR DE CLOROPLASTOS QUE AFECTA EL DESARROLLO TEMPRANO DE LOS CLOROPLASTOS</b>	<b>42</b>
<b>II.1) INTRODUCCIÓN</b>	<b>43</b>
<b>La biogénesis del cloroplasto</b>	<b>43</b>
<b>El desarrollo de los plástidos y el desarrollo foliar en las Gramíneas</b>	<b>46</b>
<b>La transcripción plastídica durante el desarrollo del cloroplasto</b>	<b>48</b>
<b>La mutante de cebada LC2</b>	<b>49</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
<b>II.2) MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
<b>Material vegetal</b>	<b>55</b>
<b>Métodos</b>	<b>56</b>
<b>Extracción y purificación de ARN</b>	<b>56</b>
<b>Transferencia del ARN, obtención y marcado de sondas</b>	<b>56</b>
<b>Síntesis de ADNc</b>	<b>57</b>
<b>RT-PCR cuantitativa en Tiempo Real.</b>	<b>57</b>
<b>Inmunodetección de RpoB</b>	<b>58</b>
<b>Acumulación de proteínas tilacoidales</b>	<b>58</b>
<b>Inmunolocalización de la subunidad grande de la Ribulosa 1,5-bisphosphato carboxylasa/oxygenasa (Rubisco)</b>	<b>59</b>
<b>Caracterización ultraestructural</b>	<b>59</b>
<b>Determinación de la eficiencia de fotosíntesis</b>	<b>60</b>

<b>II.3) RESULTADOS</b>	<b>61</b>
<b>Acumulación de transcritos de las ARN polimerasas de organelas codificadas por el núcleo</b>	<b>61</b>
<b>Acumulación de transcritos de genes transcritos por NEP</b>	<b>64</b>
<b>Acumulación de transcritos de genes transcritos por PEP</b>	<b>66</b>
<b>Inmunodetección de RpoB</b>	<b>70</b>
<b>Acumulación de proteínas tilacoidales</b>	<b>72</b>
<b>Inmunolocalización de la subunidad grande de Rubisco y caracterización ultraestructural</b>	<b>73</b>
<b>Fluorescencia de clorofila</b>	<b>77</b>
<b>II.4) DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
<b>II.5) CONCLUSIONES</b>	<b>92</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>122</b>
<b>AI.1</b>	<b>122</b>
<b>AI.2</b>	<b>123</b>
<b>AI.3</b>	<b>127</b>
<b>AI.4</b>	<b>128</b>
<b>AI.5</b>	<b>135</b>
<b>AII.1</b>	<b>136</b>
<b>AII.2</b>	<b>139</b>
<b>AII.3</b>	<b>142</b>
<b>AII.4</b>	<b>145</b>
<b>AII.5</b>	<b>148</b>

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En la célula vegetal, la información genética está distribuída en tres compartimentos, el núcleo, los cloroplastos y las mitocondrias. Los cloroplastos y mitocondrias son de origen endosimbiótico y poseen relativamente pocos genes, producto de la transferencia de su material genético original hacia el núcleo durante la evolución. En el caso de los cloroplastos, los parientes actuales más cercanos a aquel endosimbionte original (un procarionta fotosintético precursor de las cianobacterias) pertenecen al género *Nostoc* (Dyall *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2002), y tienen un genoma que codifica más de 5.000 proteínas, mientras que el genoma de los cloroplastos o plastoma codifica entre 50 y 200 proteínas, según la especie. En consecuencia, la mayoría de las proteínas que cumplen funciones en el cloroplasto son codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citoplasma e importadas después de la traducción en las organelas con la ayuda de un péptido señal a través de una maquinaria de importación específica (Gray, 1992; Martin y Herrmann, 1998; Cavalier-Smith, 2000; Martin, 2003; Leister, 2005). Se ha estimado que unos 4.500 genes de proteínas nucleares de *Arabidopsis*, pertenecientes a todas las categorías funcionales, son de origen cianobacteriano (Martin *et al.*, 2002).

La compartimentalización de la información genética implica la existencia de mecanismos que integren la expresión génica del núcleo y el cloroplasto, incluyendo la señalización entre compartimentos y la expresión coordinada para asegurar el correcto ensamblaje de complejos que contienen proteínas codificadas en ambos genomas. El diálogo cruzado entre compartimentos incluye controles anterógrados (núcleo a organela), receptivos a señales endógenas y ambientales percibidas por el núcleo y retrógrados (organela al núcleo) que regulan la expresión de genes nucleares en respuesta al estado metabólico o de desarrollo de la organela (Hess *et al.*, 1997; Herrmann *et al.*, 2002; Leister, 2005; Nott *et al.*, 2006). Además de la comunicación entre las organelas y el núcleo, durante la evolución de las plantas se ha establecido también una comunicación entre cloroplastos y mitocondrias que coordinaría las actividades de dos organelas que tienen un alto grado de interdependencia metabólica (Leister, 2005).

En el marco de este complejo juego de interacciones, existe un tipo particular de interacción entre el núcleo y el plástido originada por los genes nucleares encargados de

mantener la estabilidad del plastoma, cuyo mal funcionamiento originaría mutaciones en el plastoma y de allí su designación como “mutadores de cloroplasto” (Kirk y Tilney- Basset, 1978; Börner y Sears, 1986; Hagemann, 1986; Chang *et al.*, 1996). El defecto en estos genes, que intervendrían en la replicación o reparación del ADN cloroplástico (Kirk y Tilney Basset, 1978), aumenta significativamente la tasa de mutación del plastoma. En este trabajo se aborda el estudio de un genotipo mutador de cloroplastos de cebada, el primero en inducir un amplio espectro de mutantes descrito en monocotiledóneas. Por otro lado, se estudia a nivel molecular la expresión de una de las mutantes de plastoma inducidas por el mismo (Prina, 1992, 1996). El interés en el estudio de este sistema experimental radica en la utilidad de disponer de una fuente de variabilidad genética bien caracterizada para un genoma altamente conservado, portador de genes que participan en procesos metabólicos relevantes, como la fotosíntesis, la tolerancia a estreses abióticos y a herbicidas. Además, el mutador de cloroplastos y sus mutantes constituyen una herramienta formidable para descifrar aspectos básicos de la interacción entre el núcleo y la organela (Prina, 1992).

En el primer capítulo de esta Tesis “Estudio de mutaciones en el ADN cloroplástico de mutantes de cebada inducidas por el genotipo mutador de cloroplastos” se tratará de caracterizar los efectos del mutador sobre el ADN cloroplástico de cuatro mutantes con el objeto de obtener información para dilucidar su mecanismo de acción.

En el segundo capítulo “Caracterización de la expresión génica en una mutante de plastoma de cebada derivada del genotipo mutador de cloroplastos que afecta el desarrollo temprano de los cloroplastos” se analizará la transcripción y traducción de genes plastídicos a lo largo de un gradiente de estadios de desarrollo y se buscarán evidencias sobre la posible existencia de una señal retrógrada del cloroplasto al núcleo en una de las mutante de plastoma.

Por la naturaleza del genotipo mutador de cloroplastos de cebada se considera que la información obtenida constituye un aporte original al avance del conocimiento de estos genotipos inestables. Además, los resultados permiten avanzar en el conocimiento de una herramienta valiosa para explorar el potencial de variabilidad con base en el genoma plastídico, teniendo en cuenta su posterior aplicación en las aplicaciones biotecnológicas derivadas de la manipulación del plastoma.



**CAPÍTULO I: ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL ADN CLOROPLÁSTICO DE  
MUTANTES DE CEBADA INDUCIDAS POR EL GENOTIPO MUTADOR DE  
CLOROPLASTOS.**

## I.1) INTRODUCCIÓN

### **El genoma cloroplástico.**

Desde que a principios del siglo pasado Baur (1909, 1910) postuló que la herencia no mendeliana de las variegaciones de las hojas podrían explicarse asumiendo que los cloroplastos contenían su propia información genética, pasaron más de cincuenta años para confirmar la existencia del ADN cloroplástico (Sager e Ishida, 1963; Chun *et al.* 1963). El análisis de las primeras secuencias del ADN cloroplástico reveló la relación evolutiva con los genomas eubacterianos (Schwarz y Kössel, 1979, 1980) dando soporte molecular a la teoría del origen endosimbionte de la organela. Según esta teoría, el cloroplasto desciende de un ancestro eubacteriano de vida libre relacionado con las Cianobacterias, que entabló una relación de endosimbiosis con una célula hospedante pre-eucariota. En esta relación el hospedante aportó el genoma nuclear, mientras que el genoma del cloroplasto derivó del endosimbionte, después de que gran parte los genes de éste fueron transferidos al núcleo o se perdieron en el curso de la reducción del genoma de la organela (Gray, 1989, 1999).

La elucidación de la secuencia completa de los genomas cloroplásticos (plastomas) de *Marchantia polymorpha* (Ohyama *et al.*, 1986) y tabaco (Shinozaki *et al.*, 1986) marcó un hito en la genética de las organelas y contribuyó sustancialmente al entendimiento de la biología y la evolución de los plástidos. Actualmente se conoce la secuencia completa de 128 plastomas de diversos organismos, de las cuales 110 corresponden a plantas verdes, *Viridiplantae* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/plastids\\_tax.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/plastids_tax.html)).

El ADN del cloroplasto, también llamado cromosoma plastídico o plastoma se ha descrito como una molécula circular de doble cadena (Bock, 2001; Sugiura y Takeda, 2000; Sugiura 1992, Palmer, 1985, 1991), si bien *in vivo* también pueden existir conformaciones alternativas, como moléculas lineares y concatémeros (Oldenburg y Bendich, 2004a, b; Bendich, 2004). Cada cloroplasto contiene entre decenas y centenas de copias de esta molécula, organizadas en nucleoides, asociados a la membrana interna en las organelas en activa división y a las granas de tilacoides en cloroplastos maduros (Mache y Lerbs-Mache, 2001). La mayoría de los plastomas de las plantas superiores tienen un tamaño de 120-160 kb, y comparten la distribución y organización de sus genes. A diferencia de las plantas

superiores, las algas presentan grandes variaciones en el tamaño y organización de sus plastomas. Los casos extremos están dados por el plastoma del alga verde *Codium fragile*, de 89 kb y el del alga verde gigante *Acetabularia*, de unos 400 kb. Considerando que la cianobacteria *Synechocystis* tiene un genoma de 3,57 Mbp, resulta evidente la pérdida de información originada durante la evolución de la organela (Wakasugi *et al.* 2001).

La **Figura I.1a)** muestra un mapa génico del cloroplasto de tabaco, considerado el más representativo de los plastomas de plantas terrestres, reflejando posiblemente el orden génico ancestral entre las plantas superiores (Palmer, 1991).

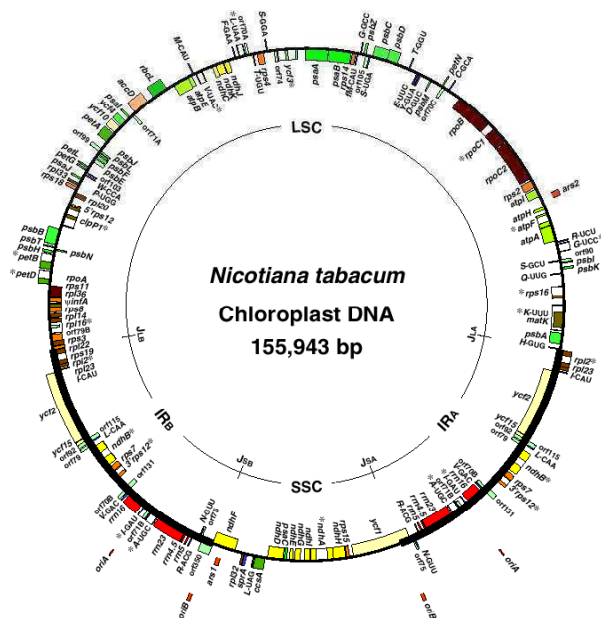
**Figura I.1**

**Mapas génicos de plastomas de distintas especies.**

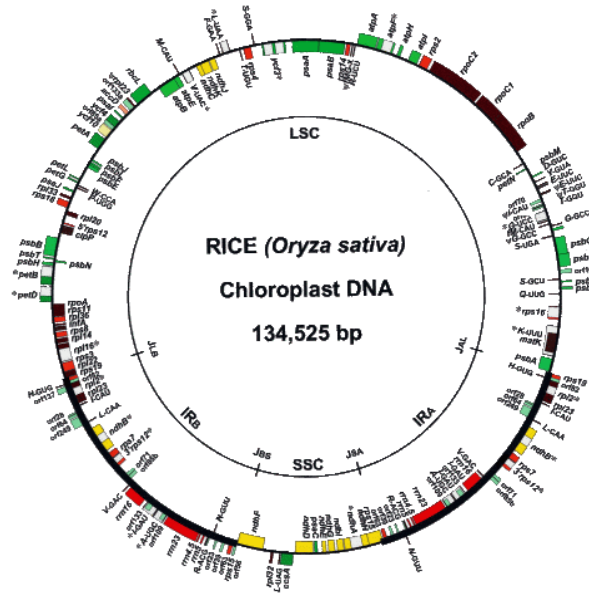
**a) Mapa génico del genoma cloroplástico de tabaco (*Nicotiana tabacum*).**

**Yukawa *et al.*, 2005.; b) Mapa génico del genoma cloroplástico de arroz (*Oryza sativa*). Tsudzuki *et al.* 2004.**

a)



b)



El genoma típico comprende cuatro regiones: una región grande de genes de copia simple (LSC), una región pequeña de genes de copia simple (SSC) y dos copias de una repetición invertida que separan las dos regiones de copia simple (IRA e IRB). La mayor fuente de la variación de tamaño entre plastomas de plantas está dada por el tamaño de las regiones IR, que varía de 0,5 a 76 kb. La mayoría de las plantas poseen regiones IR, pero algunas coníferas, leguminosas y algas no las presentan, sugiriendo que estas se perdieron durante la evolución (Sugiura y Takeda, 2000; Palmer, 1991).

Si bien la estructura general del genoma cloroplástico está conservada por la acción estabilizadora de las repeticiones invertidas, entre las angiospermas se han encontrado pequeños cambios estructurales incluyendo inversiones, translocaciones y deleciones (Ogihara *et al.*, 2000). Así, por ejemplo, existen rearrreglos evidentes dentro de la región LSC de las gramíneas respecto de la LSC de tabaco (Hiratsuka *et al.* 1989), resultado de tres inversiones a partir de un ancestro similar al tabaco (**Figura I.1b**).

El número de genes cloroplásticos varía según la especie: 113 en tabaco, 110 en arroz, 42 en *Epifagus virginiana* (una planta parásita no fotosintética). Los genes cloroplásticos pueden ser clasificados por su función en tres categorías principales: I) Genes del sistema de transcripción/traducción: se incluyen 4 genes para rRNAs (23S rRNA, 16S rRNA, 5S

rRNA y 4,5S rRNA); 30-32 genes de tRNAs, unas 20 proteínas ribosomales (genes *rpl* y *rps*); 4 genes para las subunidades de la RNA polimerasa plastídica (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoCI*) y 2 genes de factores de inicio y terminación de traducción (*infA* y *tufA*). II) Genes del aparato fotosintético: de los 60 polipéptidos de membrana, alrededor de 30 se codifican en el plastoma correspondiendo 6 al Fotosistema I (genes *psa*), 15 al Fotosistema II (genes *psb*), 6 al complejo del citocromo b/f (genes *pet*) y 6 al complejo ATP-asa (genes *atp*). También la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato-carboxilasa/oxigenasa (*rbcL*) se codifica en la organela; 3) Genes de biosíntesis y misceláneos: algunos grupos de plantas presentan genes que intervienen en la síntesis de clorofila (*chl*), de ácidos grasos (*accD*), de un citocromo tipo c, y otros que codifican para la subunidad proteolítica de la proteasa dependiente de ATP (*clpP*) y para dos proteínas de transporte (*cysA* y *cysT*). Existe además un complejo funcional NADH deshidrogenasa formado por 11 genes *ndh*, transferidos al núcleo en las algas y algunas plantas superiores (Sugiura y Takeda, 2000; Wakasugi *et al* 2001; Sugiura *et al.* 1998; Sugiura, 1992; Sugita y Sugiura 1996). Finalmente, se han identificado marcos de lectura abierto conservados entre especies que reciben el nombre de marco de lectura hipotético de cloroplasto (*ycf*) algunas de cuyas funciones fueron determinadas, quedando aún otras por dilucidar (Rochaix 1997, Wakasugi *et al.* 2001). Catorce a dieciocho genes cloroplásticos tienen intrones de 0,3-2,5 kpb y en la mayoría de los casos se trata de intrones simples (Wakasugi *et al.*, 2001). El gen *rps 12* lleva dos intrones y requiere “*trans splicing*” (Zaita *et al.* 1987). Según las secuencias de los bordes del intrón y las estructuras secundarias conservadas, los intrones se clasifican en tres grupos (Sugiura, 1992). El plastoma de las monocotiledóneas porta 17 intrones tipo II y uno tipo I (Wakasugi *et al.*, 2001). Como en las bacterias, muchos genes cloroplásticos están organizados en operones, integrados por genes de una misma o distinta función, y se expresan como unidades policistrónicas. Existen unas cincuenta unidades de transcripción, lo que implica la necesidad de un procesamiento post-transcripcional de las formas policistrónicas, (Mache y Lerbs-Mache, 2001; López-Juez y Pyke, 2005). Otra modificación a nivel de RNA se realiza a través del “*editing*”, mayormente restringido a sustituciones C→U localizadas en la segunda posición del codón, que restauran los codones internos correspondientes a los

aminoácidos más conservados, crean codones de inicio y de terminación (Hirose y Sugiura, 1997; Sugiura *et al.* 1998, Bock 2001).

### **Variabilidad del plastoma.**

Dada la naturaleza altamente conservativa del cloroplasto en la mayoría de las especies (Clegg *et al.* 1994), se dispone de muy poca variabilidad localizada en la organela. Michaelis (1969) menciona que en algunas especies las mutaciones de ADN de cloroplasto ocurren espontáneamente en 0,01-1,3% de las plantas de una población. Sobre la base de comparaciones evolutivas, se ha deducido una tasa de mutación espontánea de genes cloroplásticos de  $1.1-2.9 \times 10^{-9}$  sustituciones por sitio sinónimo por año, la que resulta muy inferior a la estimada para los genes nucleares, de  $5.8-31.5 \times 10^{-9}$  (Wolfe *et al.* 1987; Muse 2000). Las mutantes de plastoma constituyen un recurso valioso para estudios fisiológicos, moleculares, genéticos y bioquímicos del cloroplasto. Desde un punto de vista más aplicado son de utilidad para mejorar algunas características de importancia agronómica de las plantas cultivadas, como la resistencia a herbicidas y la eficiencia fotosintética (Börner y Sears, 1986). La inducción artificial de mutaciones mediante agentes químicos y físicos ha sido empleada en algas (Börner y Sears, 1986) pero la mutagénesis preferencial del genoma cloroplástico ha sido habitualmente poco exitosa en plantas (Prina 1989). La posibilidad de generar variantes en el plastoma aumentó sensiblemente a partir del desarrollo de la transformación genética de los cloroplastos (Boynton *et al.*, 1988; Svab *et al.*, 1990). Esta tecnología se basa en la incorporación de ADN en la organela por recombinación homóloga, permitiendo la disrupción de genes específicos (“knock out”) y la mutagénesis sitio-dirigida de cualquier gen cloroplástico. Con esta aproximación de genética reversa se ha avanzado no sólo en la identificación de funciones de genes cloroplásticos sino también en el análisis de los mecanismos moleculares involucrados en la expresión génica (Rochaix, 1997; Bock, 2001).

Otra fuente de variabilidad del plastoma, que es la que concierne al presente trabajo, se encuentra en la acción de los genes nucleares mutadores de cloroplasto (Kirk y Tilney-Basset, 1978; Börner y Sears, 1986; Hagemann, 1986; Chang *et al.*, 1996), los que, se postula, producirían un aumento de la tasa de mutación espontánea del plastoma, e

inducirían mutaciones dirigidas al plastoma con mayor eficiencia que los mutágenos físicos y químicos sin afectar el genoma nuclear y mitocondrial (Prina 1989). Los productos de estos genes mutadores estarían involucrados en la replicación y/o reparación del ADN cloroplástico, procesos cuyas enzimas son codificadas en el núcleo (Kirk y Tilney-Basset, 1978; Sears y Sokalski, 1991). Entre las enzimas involucradas en la replicación del ADN cloroplástico se han purificado ADN polimerasas (Kimura *et al.*, 2002; Sala *et al.*, 1980; McKown y Tewari, 1984; Heinhorst *et al.*, 1990), ADN topoisomerasas (Siedlecki *et al.*, 1983; Lam y Chua, 1987; Nielson y Tewari, 1988), ADN helicasas (Tuteja *et al.* 1996, Tuteja y Tuteja 2004) y una ADN primasa (Nielson *et al.*, 1991). En cuanto a la reparación del ADN cloroplástico, debe existir un eficiente mecanismo para mantener la tasa de mutación baja en comparación con la del genoma nuclear (Wolfe *et al.*, 1987). Se ha caracterizado la actividad de una proteína RecA homóloga a la de *E. coli* (Cerutti *et al.* 1992, Cerutti *et al.*, 1995) y se han descrito actividades enzimáticas relacionadas con la vía de reparación por escisión (Howland *et al.*, 1975; Mc. Lennan, 1988). Si bien no se conocen genes para fotoliasas con señalización al cloroplasto, se especula que las fotoliasas nucleares tengan acceso al ADN cloroplástico, quizás con la ayuda de otras proteínas (Draper y Hays, 2000).

Algunos mutadores inducen un solo tipo de fenotipo mutante, como el caso del maíz *iojap* (Walbot y Coe 1979) y la cebada *albostrians* (Hagemann y Scholz, 1962; Börner *et al.*, 1976) mientras otros producen una amplia variedad de mutaciones, como los descritos en *Arabidopsis thaliana* (Redei y Plurad, 1983), *Epilobium sp* (Michaelis, 1970), *Nepeta sp* (Woods y DuBuy, 1951), *Petunia sp* (Potrykus, 1970) y *Oenothera hookeri* (Epp, 1973). A este último grupo pertenece el mutador de cloroplastos de cebada (Prina 1992), el primero en su tipo descrito en monocotiledóneas.

### **El mutador de cloroplastos de cebada.**

El gen mutador de cloroplastos de cebada, *Cpm/cpm*, es un gen nuclear que al estado homocigota recesivo induce un amplio espectro de deficiencias clorofílicas de herencia citoplásmica, cuya expresión, una vez inducidas, es independiente de la constitución nuclear (Prina, 1992). Además del amplio espectro de deficiencias clorofílicas, se han

aislado dos mutantes con tolerancia atrazina inducidas por el genotipo mutador de cloroplastos (Ríos *et al.*, 2003).

El primer indicio de la ocurrencia de este genotipo inestable se tuvo con la aparición de plantas con diversos tipos de deficiencias clorofílicas en parcelas M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> de una mutante de grano seleccionada de un tratamiento mutagénico. La mayoría de las progenies de estas plantas (92,5%) presentó plántulas con variegación clonal (*striata*), que afectaron al 9% de todas las plántulas M<sub>6</sub> (1.311/14.617). El espectro de mutantes sólidas registradas en M<sub>6</sub> fue amplio, correspondiendo a tres tipos principales: *albina*, *viridis* (con varios grados de tonalidad verde claro-amarillento) y discontinuo (con variación en los colores y patrones posicionales) (**Figura I.2**). Se observó también que la mayoría de las plántulas *albinas* y algunas *virido-albina* presentaban hojas angostas, siendo éste el cambio morfológico más relevante. No se observaron otros efectos heredables sobre la morfología ni sobre la fertilidad de las plantas.

Se comprobó la transmisión citoplásmica de las deficiencias clorofílicas por medio de cruzamientos recíprocos. El análisis de la F<sub>2</sub> y siguientes filiales del cruzamiento (genotipo normal x genotipo mutador) demostró que la inducción de las mutaciones estaba bajo el control de un gen nuclear al estado homocigota recesivo. El pequeño tamaño de los sectores afectados en plántulas F<sub>2</sub> de las cruas (genotipo normal x genotipo mutador) y su aumento a través del desarrollo y en filiales más avanzadas, hasta producir mutantes sólidas en F<sub>4</sub>, son explicados por la lenta segregación de los cloroplastos mutados (Prina, 1992).

En cuanto a la función del gen mutador de cloroplastos de cebada, se ha propuesto que su producto estaría involucrado en la reparación del ADN cloroplástico (Prina 1992, 1996). La recesividad del gen mutador sugiere que la mutación resulta de la completa ausencia de un producto génico funcional, siendo compatible con una capacidad reparadora y no con una actividad ADN polimerasa (Hastings *et al.*, 1976).

La selección de mutantes a partir de la población portadora del genotipo mutador de cloroplastos y su estabilización genética a través de cruas y retrocruas permitió el aislamiento de varias líneas citoplásmicas (LCs) (Prina, 1996). La caracterización de estas mutantes demostró que presentan diversos patrones de variegación y expresión variable



según el estadio de crecimiento y/o la temperatura, así como marcadas diferencias en su estabilidad genética.

**Figura 1.2)**

**Algunos fenotipos de las mutaciones inducidas por el mutador de cloroplastos de cebada.**

**A) albina angosta; virido albina angosta. B) albina jaspeada; striata albina jaspeada. C) albina angosta; striata albina; virido reticulata. D) albina angosta; striata albina; virido albina; striata virido albina; viridis; striata viridis. E) virido albina; striata virido albina. F) striata albina angosta; albina angosta. G) striata xantha; striata viridis; striata albina. H) striata virido xantha. I) viridis amarillenta; striata viridis amarillenta; J) albina angosta; striata albina. K) albina; albina xantha; albo viridis.**

**A)**



**B)**

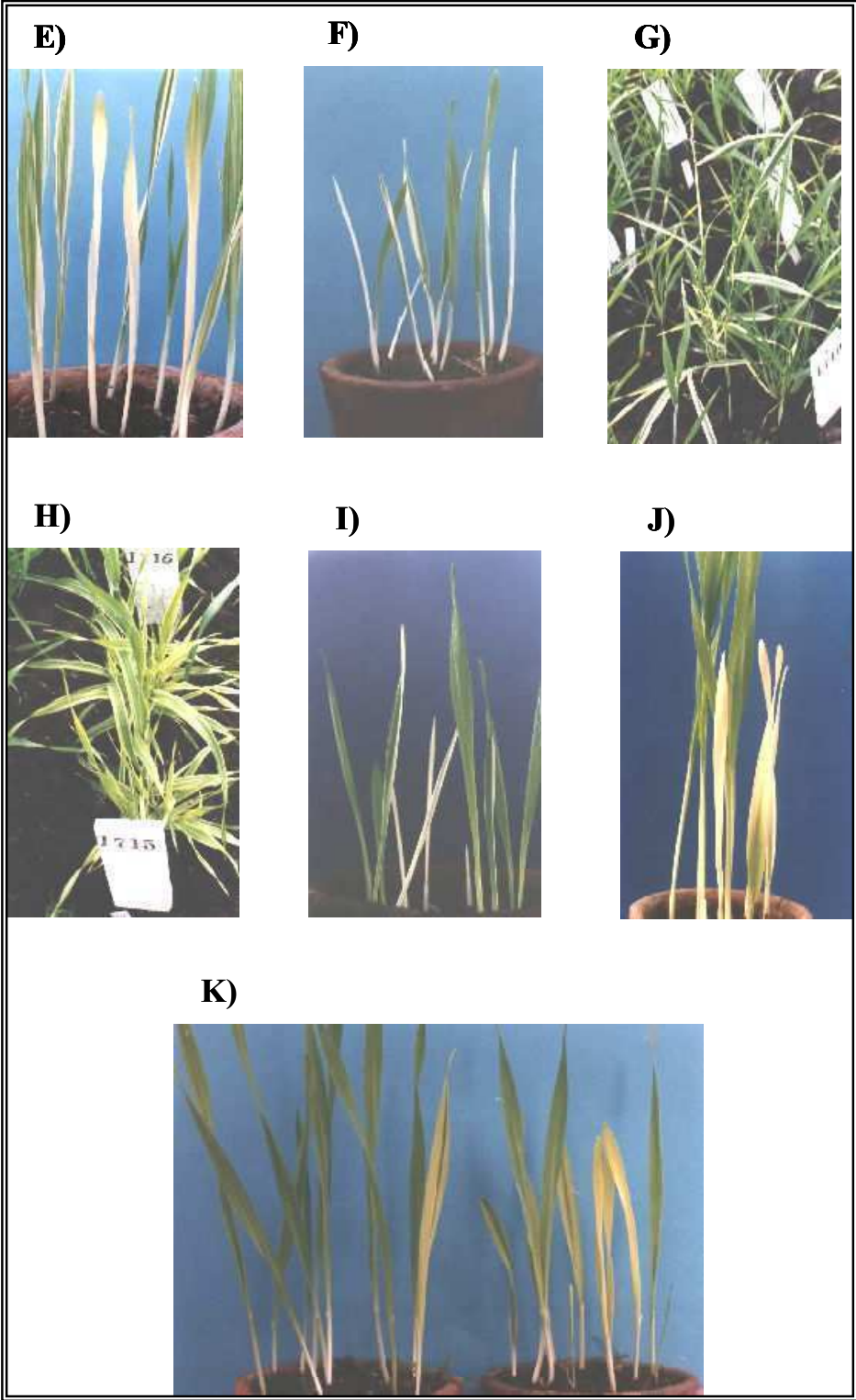


**C)**



**D)**

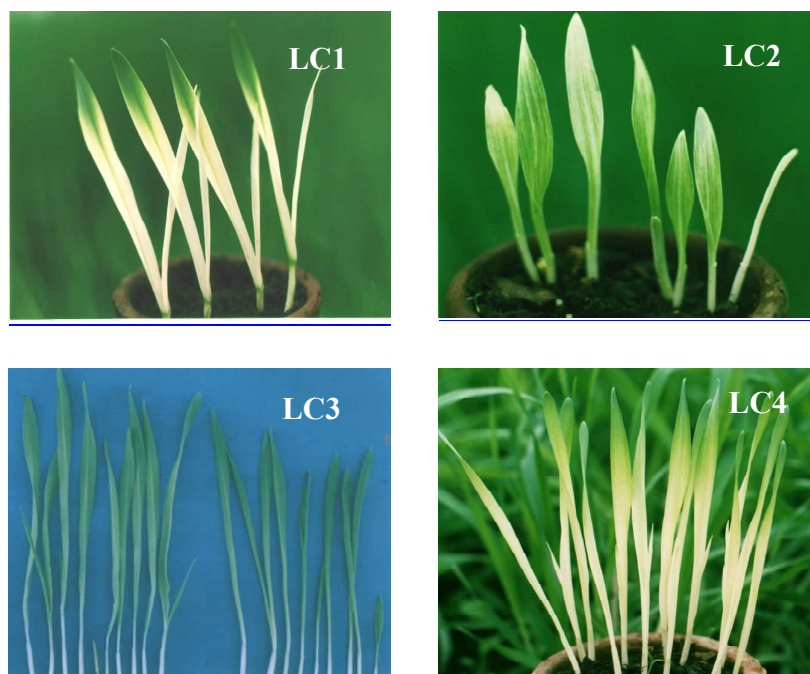




El análisis de la variabilidad inducida por el genotipo mutador de cloroplastos de cebada aportaría evidencias para ayudar a elucidar su mecanismo de acción. La caracterización molecular de las mutantes consiste en la detección y análisis de las mutaciones inducidas por el genotipo mutador de cloroplastos en el ADN de la organela. Con esta estrategia se logró la caracterización del mutador de cloroplastos de *Oenothera*, el mejor estudiado hasta la fecha. El análisis molecular de las mutantes permitió establecer que el genotipo *plastome mutator* origina deleciones e inserciones en sitios definidos por repeticiones directas a través de un mecanismo de corrimiento de templado (Chiu *et al.*, 1990, Chang *et al.*, 1996, Stoike y Sears, 1998).

En este trabajo se realizó caracterización molecular de cuatro mutantes de cebada, seleccionadas del material *cpm/cpm* llamadas LCs de 1 a 4 (Prina 1996). Las cuatro mutantes, ilustradas en la figura 1.3, son viables en condiciones de campo.

**Figura 1.3**  
**Líneas citoplásmicas (LCs) inducidas por el mutador de cloroplastos de cebada incluidas en este trabajo.**



La mutante LC1 presenta plántulas con variegación posicional o discontinua del tipo verde/albino. La primera hoja tiene el ápice y región central verdes, siendo blancos los márgenes y la base. La segunda hoja presenta un patrón inverso a la primera (ápice claro y base verde) y las siguientes son verdes cuando crece en invernáculo pero presentan márgenes claros o albinos en condiciones de campo.

La mutante LC2 presenta plántulas con variegación posicional o discontinua del tipo albino/verde. La primera hoja al emerger es albina o verde muy clara, volviéndose verde normal al desarrollarse pero usualmente manteniendo el ápice claro. Las hojas siguientes son de color verde normal.

La mutante LC3 es del tipo *viridis* (verde claro) homogéneo. Todas las hojas presentan el mismo fenotipo.

La mutante LC4 es del tipo viriscente (tejidos jóvenes verde claro que se hacen verde normal al crecer completamente). En la segunda hoja, presenta un patrón de variegación posicional *virido/xantha*. Las hojas siguientes son normales. La elevada tasa de reversión observadas en LC4 llevó a postular la existencia de un elemento transponible en el genoma del cloroplasto, cuya activación se explicaría en base a la teoría del estrés genómico, originado en este caso por el gen mutador (Prina 1996).

### **Hipótesis:**

La hipótesis de trabajo se basa en el supuesto relevante que se podrá detectar variación con métodos enzimáticos (digestión con endonucleasas de restricción) y/o métodos de detección de cambios conformacionales en el plegamiento comparativo de ADN (SSCP) en genes o secuencias indicativas y/o métodos de amplificación de regiones hipervariables del plastoma. La búsqueda de mutaciones en el plastoma de las mutantes se realizó mediante las técnicas de RFLP, PCR-RFLP-SSCP y microsatélites de cloroplasto, las que resultaron eficaces en el caso del *plastome mutator* de *Oenothera*, así como en otros trabajos dedicados a la caracterización de la variabilidad del ADN cloroplástico (Chiu *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1996; Day y Ellis 1984, 1985; Palmer, 1986; To *et al* 1993; Powell *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997, Provan *et al.*,1999).

## **OBJETIVOS**

Caracterizar el ADN cloroplástico de cuatro mutantes de herencia materna inducidas por el mutador de cloroplastos de la cebada con el objeto de obtener información útil para: a) establecer la naturaleza de los cambios inducidos por el gen mutador en el genoma cloroplástico; b) determinar la existencia de regiones “blanco” preferenciales en el plastoma para la acción del mutador; c) determinar la existencia de elementos transponibles en el genoma del cloroplasto; d) postular un mecanismo de acción para el gen mutador de cloroplastos; e) caracterizar regiones del ADN cloroplástico involucradas en la diferenciación temprana de la organela y en la regulación de la expresión génica.

## I.2) MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se estudiaron cuatro mutantes clorofilicas de cebada seleccionadas a partir de familias portadoras del genotipo mutador de cloroplastos de cebada (Prina 1992, 1996). Se designan LC1 a LC4 y han sido descritas previamente (Prina 1996). Un genotipo normal, MC 182, fue incluido como control. Las plantas fueron cultivadas en maceta en invernáculo; al estadio de segunda hoja se cortaron las hojas y se utilizaron frescas o se congelaron con nitrógeno líquido conservándose a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### Métodos

**Extracción y cuantificación de ADN genómico:** Se extrajo ADN total de la primera y segunda hoja de las mutantes LC1, LC2, LC3 y LC4 y del genotipo control usando el protocolo descrito por Saghai-Marroof *et al.*, (1984) con modificaciones menores. Se realizó la electroforesis del ADN extraído en un gel de 0,8% de agarosa en buffer 1X TAE (0,04M Tris-acetato pH8; 0,001M EDTA) a 60 V constantes durante 1 hora. Se cuantificó por fluorescencia de bromuro de etidio (10 mg/ml), con luz UV en un equipo White/UV Transiluminator (Life Sciences) comparando con distintas diluciones de ADN del fago  $\lambda$

**Análisis de RFLP con sondas específicas de cloroplasto:** Cuatro microgramos de cada genotipo fueron digeridos individualmente con *Pst* I, *Eco* RI, *Bam* HI y *Hind* III según las recomendaciones del proveedor (Invitrogen, Life Technologies). Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en buffer 1X TAE (0,04 M Tris-acetato pH 8,0 y 0,001 M EDTA) a 30V toda la noche y visualizados con bromuro de etidio; Luego fueron transferidos a una membrana de nylon Z-probe nylon por transferencia alcalina usando el TransVac Vacuum Transfer Unit (Hoefer Scientific Instruments) e hibridados con 18 sondas específicas de cloroplasto. Las sondas se obtuvieron de diversas fuentes: **a)** digestión de restricción de plásmidos portadores de fragmentos de ADN cloroplástico de tomate (Marano y Carrillo, 1992): *rps3-rpl16-rpl22*; *23S rRNA*; *rpoB*; *rpoC1*; *psbC*; **b)** amplificación por PCR de ADN total de cebada con primers designados sobre la secuencia del plastoma de arroz (Hiratsuka *et al.*, 1989) usando el software para análisis de primers OLIGO (version 4): *orf 230*; *ndhG*; *ndhF*; *16S rRNA*;

*psaB*. La elección de la secuencia del plastoma de arroz entre las secuencias disponibles al momento de realizar este trabajo se debió a que era, en ese momento, el más cercano al de cebada. Posteriormente se publicaron las secuencias de los plastomas de trigo (2001) y cebada (2006). Las secuencias de los “primers” y las temperaturas de anillado (“annealing”) optimizadas para amplificar estas sondas se muestran en la **Tabla 1.1**.

**Tabla I.1**  
**“Primers” y temperaturas de “annealing” para amplificar sondas de cloroplasto por PCR.**

SONDA	PRIMER	SECUENCIAS	“ANNEALING” (°C)	TAMAÑO DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN (pb)
<i>Orf 230</i>	<i>orf 230F</i>	5'-AAGAGAAACCGAATACACAT-3'	48	440
	<i>orf 230R</i>	5'-GACTACAAGCGAAGGAGATA-3'		
<i>ndhG</i>	<i>ndhGF</i>	5'-TATCGGCAAAACAACAAGTA-3'	55	1.600
	<i>ndhGR</i>	5'-GTAAATGGCTCAGGATGGIC-3'		
<i>ndhF</i>	<i>ndhFF</i>	5'-AAAATCCCCTACACGATTAGTT-3'	50	350
	<i>ndhFR</i>	5'-TATGGTCTTGGACCGTCAATAAT-3'		
<i>16S rRNA</i>	<i>16S rRNAF</i>	5'-TAGTGTGACGGGCGGTGTGT-3'	65	1.300
	<i>16S rRNAR</i>	5'-CAGTGGCGAACGGGTGAGTA-3'		
<i>psaB</i>	<i>psaBF</i>	5'-GCAAAAATGTTCTGA-3'	45	2.100
	<i>psaBR</i>	5'-AAAAAGTCCGTTAGG-3'		

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25µl usando 20ng de ADN genómico, Buffer de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, 50 mM KCl, (Gibco BRL), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco BRL), 0,2 mM de cada dNTP (Promega), 0,2 µM de cada primer y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Gibco BRL). Se utilizó un ciclador térmico de tapa caliente Techne

Progene con el siguiente perfil térmico: 3 min. a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1,5 min. a la temperatura de “annealing” correspondiente, y 1-4 min. a 72 °C según cada caso, con extensión final de 10 min. a 72 °C, seguida con incubación prolongada a 4 °C.; **c)** amplificación por PCR de ADN total de cebada usando “primers” publicados: *trnC/trnD*; *psaA/trnS*; *trnS/trnT*; *trnM/rbcL*; *FV*; *rpoA* (Demesure *et al.*, 1995); *psbB* (Chang *et al.*, 1996); *psbA* (Ríos *et al.*, 2003) según los protocolos correspondientes.

Las sondas fueron marcadas según los protocolos del proveedor usando 11-digoxigenina-dUTP (Boehringer Mannheim) y detección usando CDP-star (Boehringer Mannheim-Promega) como sustrato o ECL Direct Labelling and Detection System (Amersham Biosciences) con detección por quimioluminiscencia.

**Extracción de ADN cloroplástico y análisis de RFLP:** El ADN cloroplástico fue aislado de hojas jóvenes de las mutantes y el genotipo control siguiendo el procedimiento descrito por Taylor *et al.*, (1993). Las plántulas fueron mantenidas en oscuridad 24 horas previamente a la extracción. En este caso, 0.8 µg de cada genotipo fueron digeridos individualmente según los protocolos del proveedor, con 23 enzimas de restricción: *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Cla* I, *Eco* RV, *Kpn* I, *Bst*x I, *Nde* I, *Nco* I, *Spe* I, *Ava* I, *Bsa* I, *Hha* I, *Afl* II, *Hae* II, *Nsi* I, *Xmn* I, *Eae* I, *Bsp* HI, *Bcg* I, *Hinc* II, *Sal* I, *Xba* I (Promega, New England Biolabs, Invitrogen, Life Technologies). Los fragmentos de restricción entre 1-10 kb se analizaron por separación electroforética en geles de agarosa al 0,7% en buffer 0,5X TBE (0.045M Tris-borato pH8; 0.001M EDTA) a 30V toda la noche y visualizados con Gelstar (BMA). Los fragmentos entre 0.1-1 kb se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante al 4% con urea 7M en 1X TBE buffer (0.089M Tris-borato pH8; 0.002M EDTA) durante 4 horas a 180V y detectados por tinción con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito por Bassam *et al.*, (1991) con modificaciones menores.

**Análisis de PCR-RFLP-SSCP:** Se realizó la amplificación por PCR de los genes cloroplásticos *psaA*, *psaB*, *psbB*, *psbE+F* usando ADN total de las mutantes y el control. Se emplearon “primers” diseñados en el laboratorio Botany and Plant Pathology, Michigan State University (Sears, pers. comm). Las secuencias de los “primers” y temperaturas de “annealing” optimizadas se muestran en la **Tabla I.2.**



**Tabla I.2****“Primers” y temperaturas de “annealing” para amplificar genes de cloroplasto por PCR.**

GEN	”PRIMER”	SECUENCIA	TEMPERATURA DE “ANNEALING” °C
<i>psaA</i>	<i>psaAF</i>	5'-GTCACCCACAAACAGA-3'	42
	<i>psaAR</i>	5'-CTCCATTGCAAGC-3'	
<i>psaB</i>	<i>psaBF</i>	5'-GGTTTSGCCAAGGC-3'	45
	<i>psaBR</i>	5'-GAAAAGTGAGCTAA-3'	
<i>psbB</i>	<i>psbBF</i>	5'-CCTTGGTATCGTGT-3'	45
	<i>psbBR</i>	5'-GTAGTTGGATCTCC-3'	
<i>psbE+psbF</i>	<i>psbE+psbFF</i>	5'-ATGTCTGGAAGCAC-3'	42
	<i>psbE+psbFR</i>	5'-TTATCGTTGGATGAAC-3'	

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 100µl, con: 20ng de ADN genómico, Buffer de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, 50 mM KCl, Gibco BRL), 2mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco BRL), 0,2 mM de cada dNTP (Promega), 0,2 µM de cada primer y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Gibco BRL). Se utilizó un ciclador térmico de tapa caliente Techne Progene con el siguiente perfil térmico: 3 min. a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1.5 min. a la temperatura de “annealing” correspondiente, y 2 min. a 72 °C con extensión final de 10 min. a 72 °C, seguida con incubación prolongada a 4 °C. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa 1,5% en buffer 1X TBE (0,089M Tris-borato pH 8,0; 0,002M EDTA) a voltaje constante (60V) y se visualizaron con bromuro de etidio. Previamente a la digestión, los productos de PCR fueron precipitados y lavados con

etanol y disueltos en agua de grado HPLC (Ausubel *et al.*, 2002). Se realizó la digestión con las enzimas de restricción *Hae* III, *Sau* 3A I, *Taq* I, y *Bam* HI según recomendaciones del proveedor (Promega, New England Biolabs, Invitrogen, Life Technologies) para generar productos de tamaño adecuado para el análisis de SSCP. La digestión se realizó a la temperatura adecuada para cada enzima de restricción durante 4 horas, finalizando la reacción con EDTA 10 mM para *Taq* I y *Hae* III y a 65°C por 10 minutos en el caso de las enzimas termosensibles (*Sau*3A I, *Bam* HI). Las digestiones completas se precipitaron con etanol y se disolvieron en 10-20 µl de 0,6X TBE (0,054M Tris–borato pH 8,0; 0,0012 M EDTA). Algunas bandas de las digestiones fueron eluidas de geles de agarosa “low melting point” (BioRad) 1% según el protocolo recomendado por el proveedor. Las digestiones y las bandas eluidas fueron corridas en geles utilizando como sustrato MDE (Mutation Detection Enhancement, Baker). Se desnaturalizaron las muestras y los estándares de peso molecular (95°C por 5’ e inmediata inmersión en baño de hielo) y se incluyeron controles sin desnaturalizar en todos los geles. Las corridas electroforéticas se realizaron en 0,6X TBE (0,054M Tris–borato pH 8,0; 0,0012M EDTA), a 300 V constantes durante 15-18 horas. El equipo empleado para las corridas electroforéticas es el DC Code de BIO-RAD. La tinción de los geles se realizó con un protocolo consistente en la fijación con etanol 10% + ácido acético 0,5%, la tinción con nitrato de plata (1g/l), el revelado con borohidruro de sodio (0,01%) + formaldehído (37%) 4g/l + hidróxido de sodio 1,5% (p/v) y la detención de la reacción con carbonato de sodio 0,75% (Sears, com. pers.). Antes de secar los geles, se los trató con una solución preservante de etanol 25% + glicerol 10%.

Se evaluó la modificación de la técnica de SSCP usando geles de poliacrilamida en lugar de geles de MDE, dada la dificultad de conseguir este último sustrato en el país. Se probaron las siguientes condiciones de trabajo: a) C%: (relación bisacrilamida/acrilamida). 2% (49:1) - 2.6% (37,5:1); b) Concentración de acrilamida: 5%-8%; c) Tiempo de corrida: 15 horas – 3 horas; d) Glicerol: 0 - 5%. Con respecto a la tinción de los geles, se probaron tres protocolos basados en el uso de nitrato de plata: el de Bassam *et al.*, (1991), el de Sears (com. pers.) ya detallado y el de Beidler *et al.*, (1982) con modificaciones.

**Análisis de Microsatélites:** Se utilizaron 5 pares de “primers” específicos para amplificar microsatélites del cloroplasto de arroz (Provan *et al.*, 1997) y 4 pares específicos para

amplificar microsatélites del plastoma de cebada (Provan *et al.*,1999). Se puso a punto la reacción de PCR para amplificar estas regiones usando ADN total de las cuatro líneas mutantes y el genotipo control. En la **Tabla I.3** se muestra información sobre las condiciones de amplificación optimizadas y los productos esperados.

**Tabla I.3.**  
**Condiciones para amplificar microsatélites de cloroplasto por PCR.**

Nombre del locus	Tamaño del producto de PCR en arroz/cebada	Repetición	Condiciones de amplificación	
			Temperatura de “annealing” (°C)	[Cl <sub>2</sub> Mg]
Oscp76221	123	(A) <sub>10</sub> G(A) <sub>5</sub>	“Touch down” (65→60)	2,5
Oscp80599	95	(T) <sub>3</sub> C(T) <sub>10</sub> A(T) <sub>4</sub>	“Touch down” (65→60)	2,5
Oscp89568	114	(T) <sub>2</sub> A(T) <sub>10</sub> GC(T) <sub>3</sub>	“Touch down” (65→60)	2,5
Oscp75969	82	(T) <sub>10</sub> AC(T) <sub>5</sub>	53	1,5
Oscp78412	178	(T) <sub>17</sub>	45	2,5
hvcptrnS1	130	(A) <sub>7</sub> CGC(T) <sub>13</sub>	60	1,5
hvcptrnS2	113	(T) <sub>10</sub>	60	1,5
hvcppsA	130	(T) <sub>8</sub>	50	1,5
hvcprpoA	122	(T) <sub>8</sub> (CTT) <sub>3</sub>	60	2,5

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10µl con: 20ng de ADN genómico, Buffer de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, 50 mM KCl, Gibco BRL), 2,5 ó

1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco BRL), 0,2 mM de cada dNTP (Promega), 10 pmoles de cada primer y 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Gibco BRL). Se utilizó un ciclador térmico de tapa caliente Techne Progene. Para los microsatélites de arroz Oscp76221, Oscp80599 y Oscp89568 se utilizó el siguiente perfil térmico: 3 min. a 94 °C; 1 ciclo de 94 °C por 3min, 65 °C por 1 min y 72 °C por 1,5min; 10 ciclos de 94 °C por 1min, 64,5 a 60 °C (“touch down” de 0,5 °C por ciclo) por 1 min y 72 °C por 1,5 min; 19 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1,5 min; extensión final a 72 °C por 5 min. Los microsatélites Oscp 75969 y Oscp 78412 se amplificaron con un programa de 94 °C por 3min seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min. 53 °C y 45 °C respectivamente por 1 min y 72 °C por 1,5 min con extensión final de 72°C por 5 min. En el caso de los microsatélites de cebada, el perfil térmico fue de 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 ó 60 °C por 30 seg y 72 °C por 60 seg, con una extensión final igual a las anteriores. En los casos en que fue necesario optimizar la temperatura de “annealing” se recurrió a un ciclador Eppendorf con gradiente.

Se realizó la detección por dos métodos: 1): electroforesis en geles de poliacrilamida (19:1) al 6% y con 8M de urea, en buffer TBE 1X (0,089 M Tris–borato pH 8,0; 0,002 M EDTA) en equipo DC Code (Bio RAD) a 50W constantes por 1 hora 30min y tinción con nitrato de plata (Bassam *et al.*, 1991); 2) electroforesis en geles de agarosa Metaphor (FMC) al 3% en buffer TBE 1X a voltaje constante (100V) durante 2 horas y detección por fluorescencia de bromuro de etidio con luz ultravioleta.

### I.3) RESULTADOS

#### Análisis de RFLPs con sondas específicas de cloroplasto.

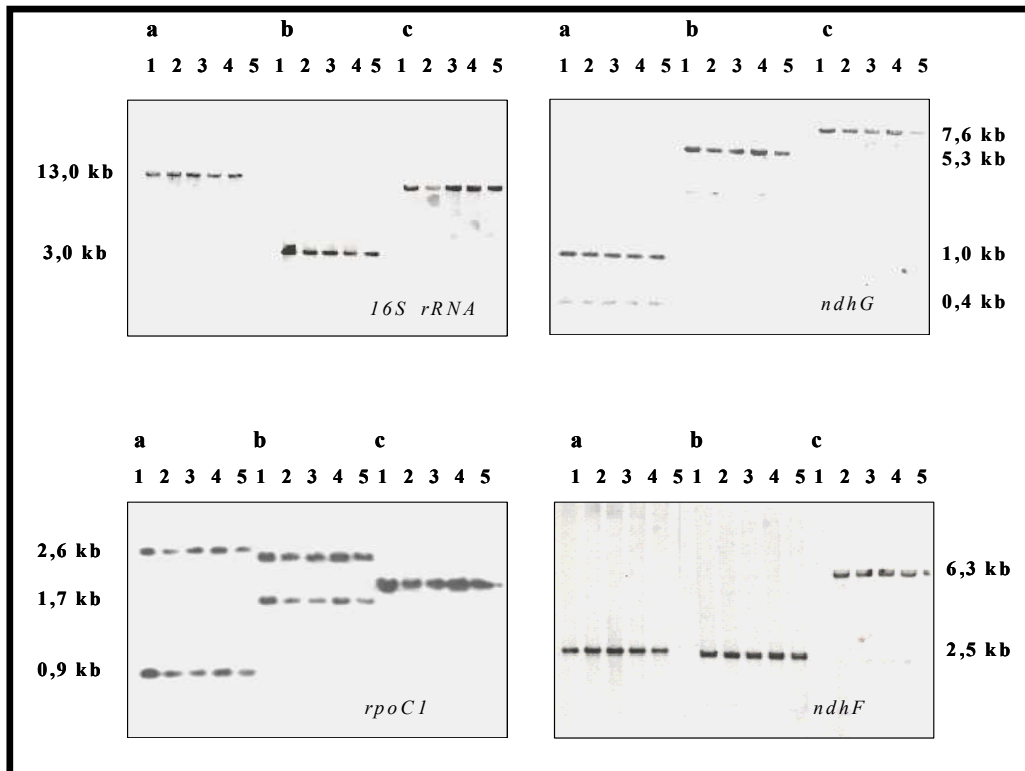
Para investigar la presencia de variaciones de la secuencia genómica del plastoma capaces de ser detectadas mediante mapeo de restricción, se digirió ADN purificado de plantas normales y mutantes con 4 endonucleasas de restricción (**AI.1**) y se revelaron los patrones de bandas generadas mediante hibridación con 18 sondas representativas de genes y secuencias nucleotídicas diversas mediante Southern blot (**Tabla I.4**).

Sondas	Fragmentos de restricción (kb)			
	<i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III
<i>rps3;rpl16;rpl22</i>	20,7			
<i>trnC/trnD</i>	20,4	4,2-0,9 0,5-0,4	6,4	8,9
<i>psbA</i>	18,4	2,0	4,6	1,4
Orf 230	13,5	9,4-3,8	6,3-2,2	8,0-1,7
<i>psaA/trnS</i>	12,7	5,9-5,3 2,4-0,8	2,6	5,6-4,5 0,5
<i>trn M/rbcL</i>	10,0	5,3	16,1	5,5
<i>trnS/trnT</i>		2,6	13,0-2,6	4,4
16S <i>rRNA</i>	8,4 (RIA) <sup>a)</sup> 8,4 (RIB) <sup>b)</sup>	13,0	3,0	9,0
23S <i>rRNA</i>	10,9 (RIA) 5,6 (RIB)	11,6	6,7	1,1-1,0
<i>ndhF</i>	5,3	2,8	2,5	6,3
<i>ndhG</i>		1,0-0,4	5,3	7,6
<i>psbC</i>		2,1	2,8	3,2-3,8
<i>psa B</i>		7,4	2,2-2,1	7,2
<i>psbB</i>		3,3-2,0	5,0	2,2-1,1
FV		5,9-1,7	14,8	5,9
<i>rpoA</i>		1,3	1,4	
<i>rpoB</i>		2,3-1,2	0,9	
<i>rpoC1</i>		2.6-0.9	2.4-1.7	1.9

**Tabla I.4**  
Fragmentos de restricción detectados en las mutantes de plastoma de cebada y el genotipo control con sondas específicas de cloroplasto.  
<sup>a)</sup>: Repetición Invertida A;  
<sup>b)</sup>: Repetición Invertida B.

No se encontraron diferencias entre los patrones de restricción de *Pst* I, *Eco* RI, *Bam* HI y *Hind* III correspondientes al genotipo control y a las cuatro líneas citoplásmicas inducidas por el gen mutador de cloroplastos. En el caso de *Pst* I, una enzima de corte poco frecuente, las sondas usadas en este estudio hibridaron con cada uno de los once fragmentos esperados de la digestión del ADN cloroplástico de cebada con *Pst* I (Poulsen, 1983). Las sondas que contenían los genes *23S rRNA* y *16S rRNA* hibridaron con los fragmentos de restricción correspondientes localizados en las repeticiones invertidas (RIA y RIB). Cuando el ADN total se digirió con enzimas de corte más frecuente y se hibridó con 17 sondas específicas de cloroplasto, se detectaron 29 fragmentos de restricción con *Eco* RI y 21 con *Bam* HI, representando el 77% y el 78% del plastoma de cebada, respectivamente. El ADN total cortado con *Hind* III e hibridado con las 15 sondas cloroplásticas mencionadas produjo 21 fragmentos representando el 68% del plastoma. La **Figura I.4** se presenta como ejemplo de este análisis y en el **Anexo AI.2** se muestran los demás resultados.

**Figura I.4.**  
**Fragmentos de restricción detectados luego de la digestión de ADN total con *Eco* RI (a); *Bam* HI (b); *Hind* III (c) e hibridación con distintas sondas cloroplásticas. Calles: 1: MC 182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4**



### **Análisis de RFLP de ADN cloroplástico.**

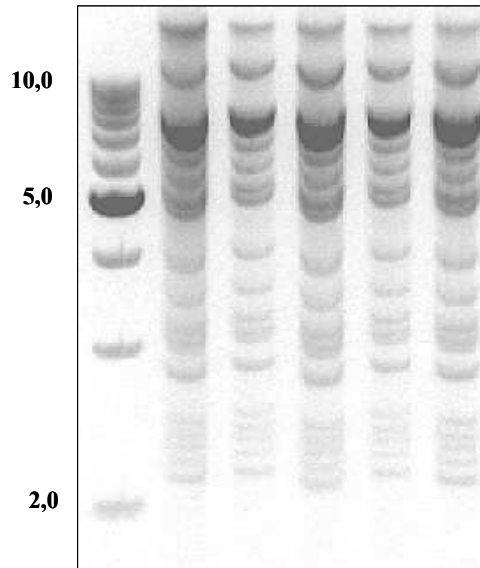
Con el propósito de avanzar en la búsqueda de mutaciones del plastoma en las líneas derivadas del mutador de cloroplasto se realizó la digestión directa del ADN cloroplástico, evitando así la hibridación con sondas específicas. Se obtuvo ADN de cloroplasto de calidad para su digestión con enzimas de restricción con un rendimiento promedio de 5-9 µg/150 g de tejido fresco (**Anexo AI.3**). El corte directo del ADN cloroplástico con 23 enzimas de restricción produjo 687 fragmentos de restricción monomórficos 0.1-10kb) en las mutantes y el genotipo control (**Tabla I.5**).

<i>Enzimas</i>	<b>Número de fragmentos</b>	<b>% del plastoma</b>
<i>Bam HI</i>	41	87
<i>Eco RI</i>	64	76
<i>Hind III</i>	44	80
<i>Cla I</i>	41	83
<i>Eco RV</i>	24	77
<i>Kpn I</i>	17	87
<i>Bstx I</i>	25	79
<i>Nde I</i>	33	94
<i>Nco I</i>	25	83
<i>Spe I</i>	29	94
<i>Ava I</i>	42	81
<i>Bsa I</i>	23	100
<i>Hha I</i>	40	77
<i>Afl I</i>	15	85
<i>Hae II</i>	19	29
<i>Nsi I</i>	23	86
<i>Xmn I</i>	21	83
<i>Eae I</i>	24	64
<i>BspH I</i>	30	74
<i>Bcgl I</i>	21	70
<i>Hinc II</i>	46	94
<i>Sal I</i>	12	87
<i>Xba I</i>	20	67

**Tabla I.5**  
**Fragmentos de**  
**restricción de ADN**  
**cloroplástico**  
**detectados en cuatro**  
**mutantes de**  
**plastoma de cebada**  
**y el genotipo control.**

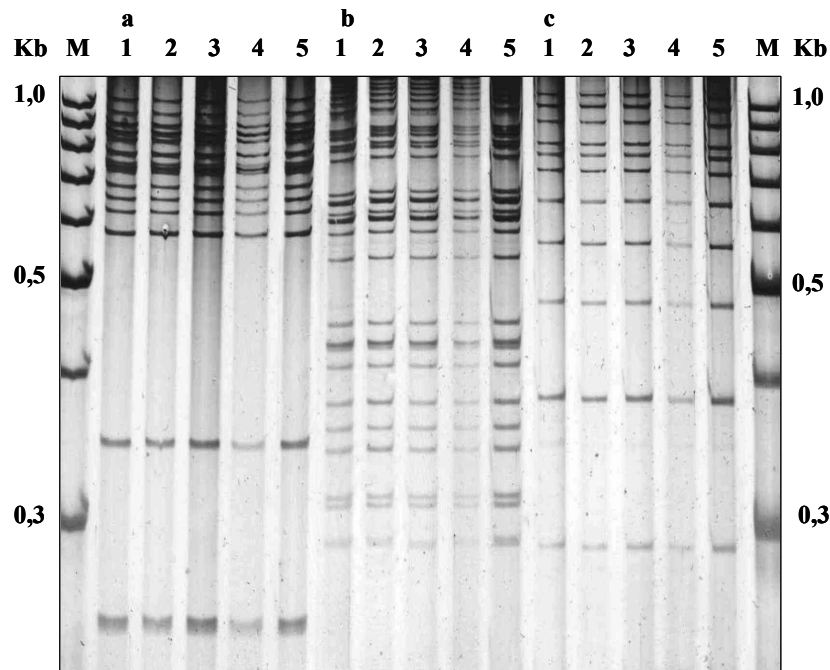
Las Figuras I.5 y I.6 se presentan como ejemplo de este análisis y en el Anexo AI.4 se muestra el resto de los resultados.

Kb M 1 2 3 4 5



**Figura I.5.**  
Fragmentos de restricción obtenidos luego de la digestión de ADN cloroplástico con *Cla I*. Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. Calles 1: MC 182; 2: CL1; 3: CL2; 4: CL3; 5: CL4, M: 1kb marcador de peso molecular.

**Figura I.6**  
Patrones de restricción obtenidos luego de la digestión de ADN cloroplástico con a: *Cla I*; b: *Eco RI*; c: *Bam HI*, Los fragmentos de restricción fueron separadas por electroforesis en geles denaturalizantes de acrilamida al 4% con 7M urea. Calles 1: MC 182; 2: CL1; 3: CL2; 4: CL3; 5: CL4, M: Marcador de peso molecular 100 pb.





Las mutantes analizadas no mostraron cambios mayores en el largo total ni en la organización del ADN cloroplástico comparado con el genotipo control. Además, no se encontraron mutaciones de punto en los sitios de restricción correspondientes a las enzimas usadas en este estudio.

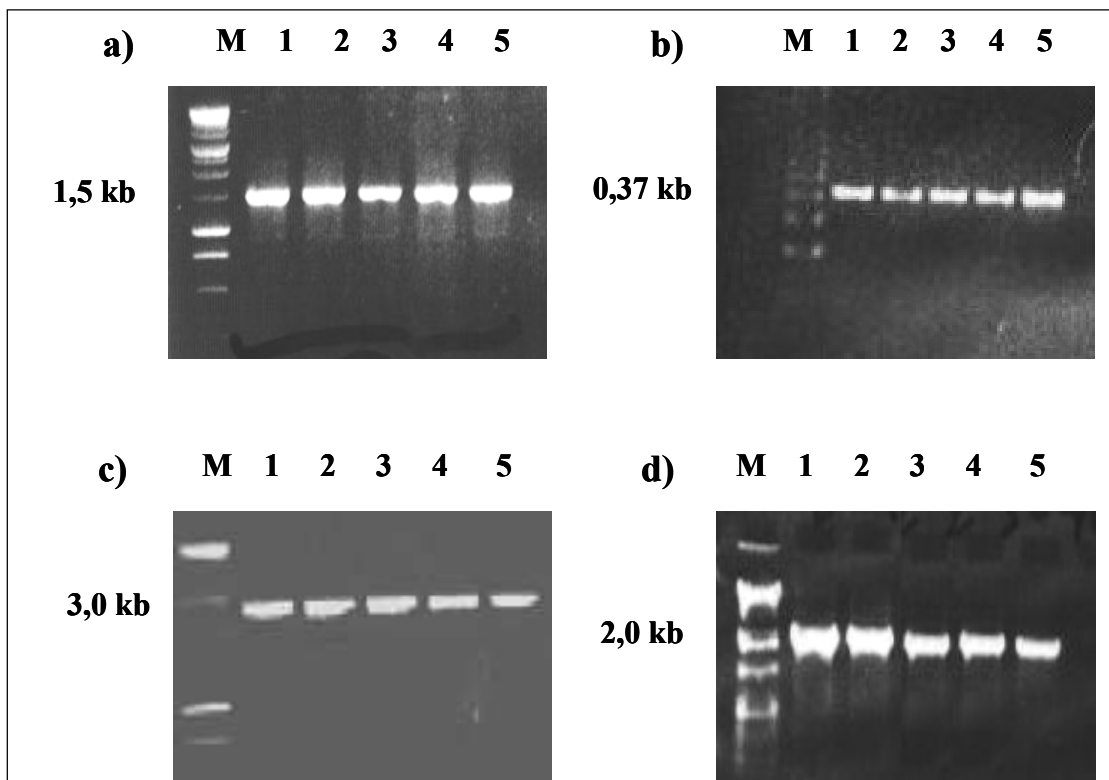
#### **Análisis de PCR-RFLP-SSCP.**

Utilizando otra aproximación para la búsqueda de mutaciones se recurrió a una metodología basada en las diferencias de conformación de las hebras de ADN correspondientes a productos de amplificación de genes cloroplásticos (SSCP). Se logró la amplificación por PCR de los genes cloroplásticos *psaA*, *psaB*, *psbB*, *psbE+F* en las cuatro mutantes y el control (**Figura I.7**)

**Figura I.7**

**Productos de PCR de genes cloroplásticos de fotosíntesis.**

a): *psbB*.; b): *psbE+F*; c) *psaA*; d) *psaB*. Los productos se corrieron en geles de agarosa al 1,5%. Calles: 1: MC182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4; M: marcador de peso molecular



Los productos de amplificación fueron del tamaño esperado según la secuencia del plastoma de arroz y resultaron monomórficos. En la **Tabla I.6** se detallan las regiones amplificadas, las enzimas de restricción empleadas para digerir los productos de amplificación y los fragmentos de restricción obtenidos.

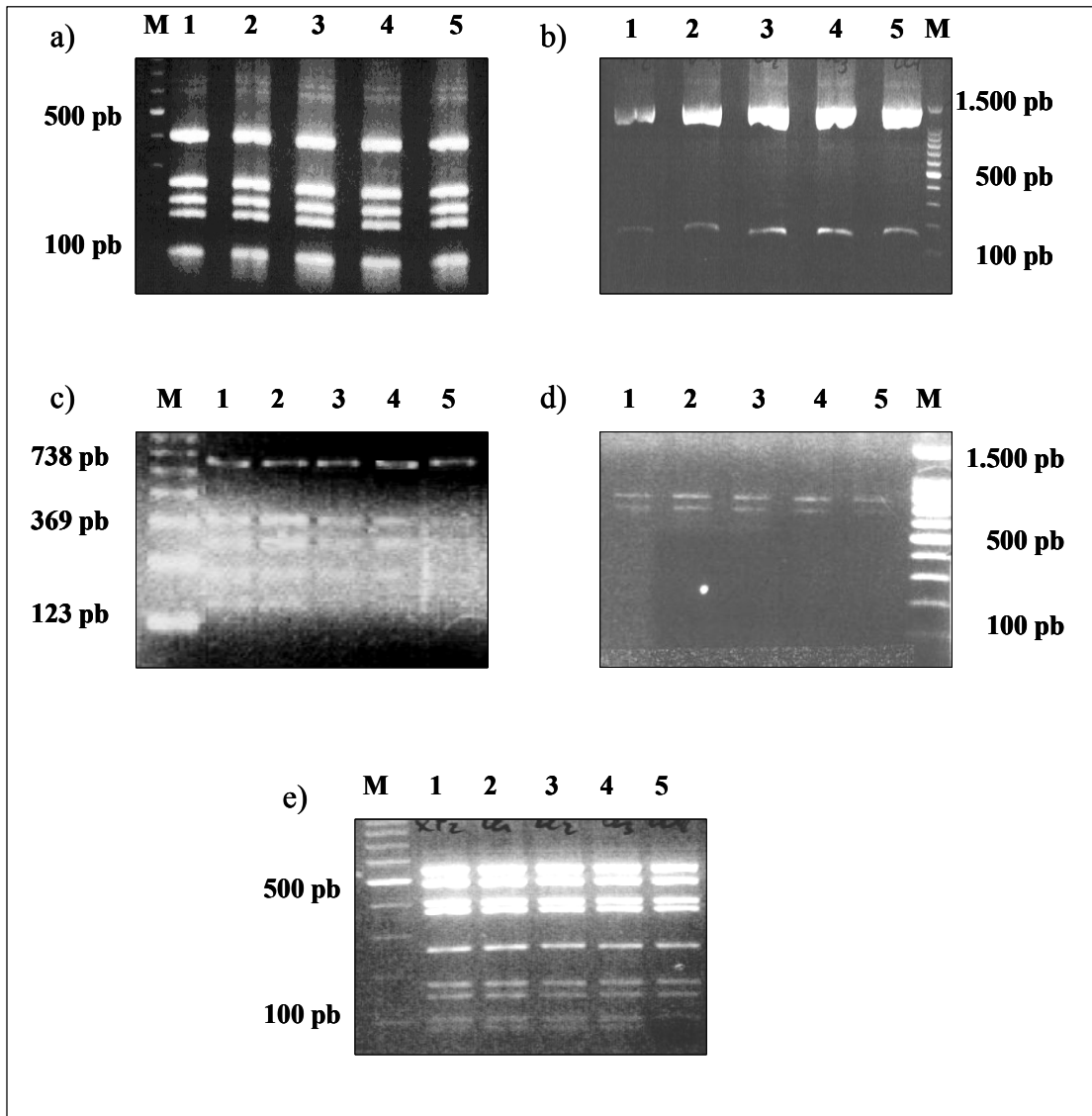
**Tabla I.6**  
**Análisis de PCR-RFLP-SSCP. Genes cloroplásticos relacionados con fotosíntesis amplificados, enzimas de restricción y fragmentos obtenidos.**

Gen	Tamaño del producto de PCR (pb)	Enzimas de restricción	Fragmentos de restricción esperados basándose en la secuencia del plastoma de arroz	Fragmentos de restricción obtenidos
<i>psbB</i>	1.498	<i>Sau</i> 3AI	411-255-254-150-97-93-63-62-60-33-12-9	411-255-254-210-160*-97-93
		<i>Bam</i> HI	1.352-146	1.350-150*
		<i>Taq</i> I	656-496-253-55-38	700-800
<i>psaA</i>	2.638	<i>Sau</i> 3AI	554-378-334-328-227-161-150-115-102-86-71-60-27-21-9	550-490-410-380-270-160-150-102-98-
<i>psaB</i>	2.121	<i>Taq</i> I	672-490-390-223-169-75-55-47	730-390-360-230-170
<i>psbE+psbF</i>	380	-	-	-

Las digestiones con las diversas enzimas produjeron patrones de restricción no coincidentes con los esperados según la secuencia del plastoma de arroz. En el caso del gen *psbB* digerido con *Taq* I, se obtuvieron fragmentos demasiado grandes para su empleo en el análisis de SSCP. En la **Figura I.8** se muestran las digestiones realizadas.

**Figura I.8**

**Digestión de productos de PCR. a) *psbB/Sau* 3AI; b) *psbB/Bam* HI; c) *psaB/Taq* I; d) *psbB/Taq* I; e) *psaA/Sau* 3AI. Calles: M: marcador de peso molecular; 1: MC 182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4.**



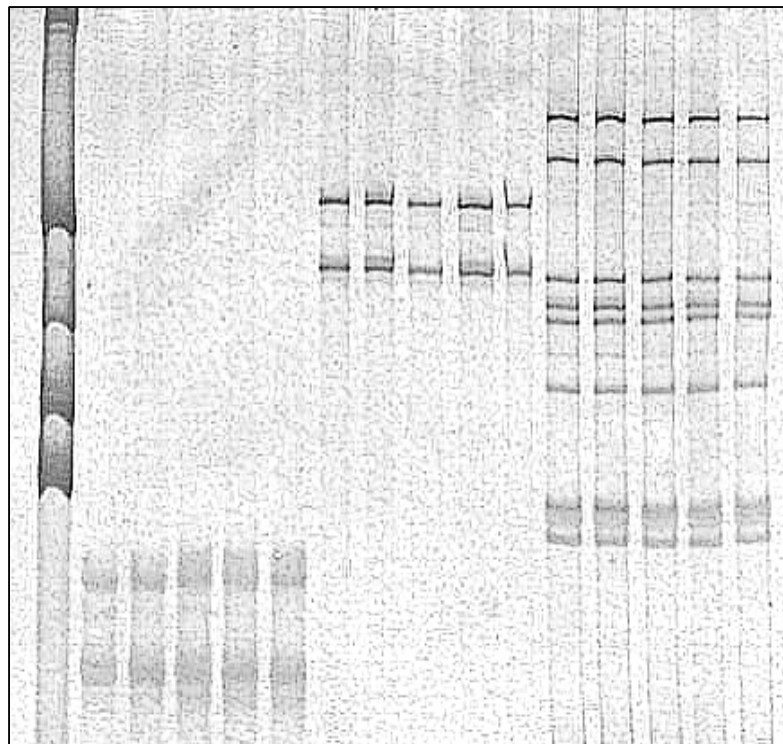
El análisis de las digestiones completas así como de algunos fragmentos de restricción eluidos de los geles usando la técnica de SSCP con MDE (Mutation Detection Enhancement, Baker) como sustrato para los geles, produjo patrones de bandas nítidas y repetibles (**Figura I.9**). Se observó un polimorfismo en LC1 y LC4 en las bandas correspondientes a la digestión del gen *psbB* con *Sau* 3 AI (**Figura I.9 b**), que no pudo ser reproducido usando productos de nuevas amplificaciones del mismo ADN ni con

nuevas extracciones de ADN genómico. No se detectaron polimorfismos entre las mutantes y la línea original en los genes de fotosíntesis analizados.

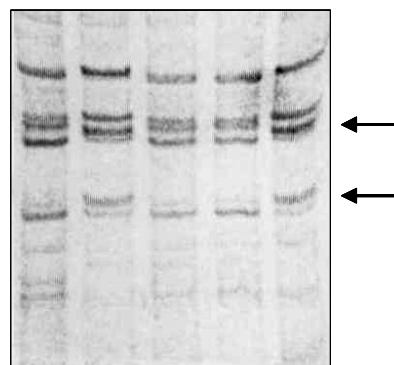
**Figura I.9**

**Análisis de SSCP en geles de MDE. a) 1-5: fragmento 150 pb *psbB/Bam* HI; 6-10: *psbE+F*; 11-15: *psaB/Taq* I. M: marcador de peso molecular. Calles 1, 6 y 11: MC182; 2, 7 y 12: LC1; 3, 8 y 13: LC2; 4, 9 y 14: LC3; 5, 10 y 15: LC4. b) *psbB/Sau* 3AI. Calles: 1: MC182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4.**

a) M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



b) 1 2 3 4 5



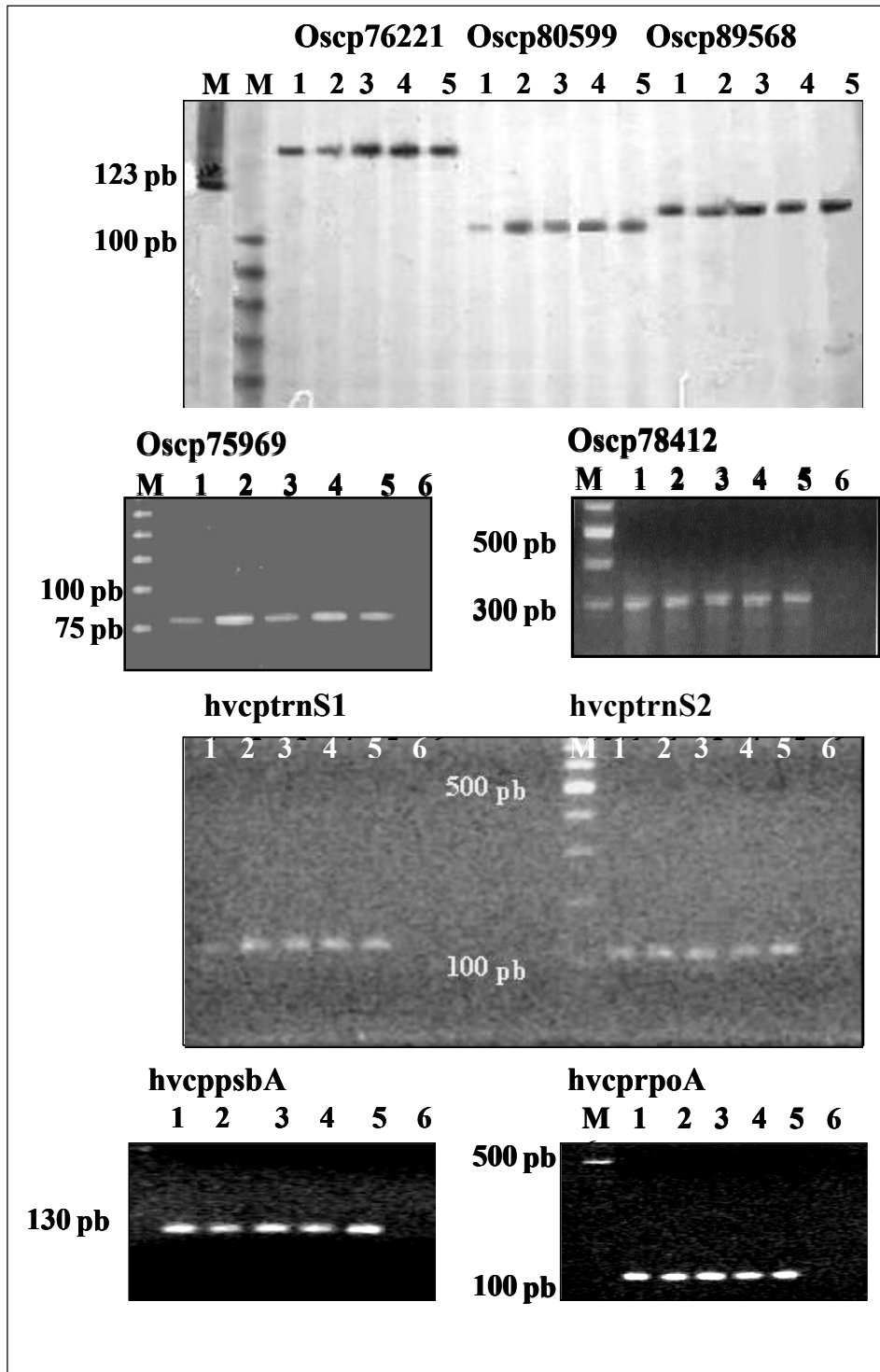
Con respecto a la modificación del protocolo experimental para reemplazar el MDE por acrilamida, la combinación óptima de condiciones fue obtenida en geles de 8% de acrilamida con un valor C de 2%, con el agregado de 5% de glicerol y corridos durante 3-4 horas a 300 V constantes **(AI.5)**. La mejor tinción se obtuvo con una modificación del protocolo de Beidler *et al.*, (1982). Los patrones de bandas obtenidos fueron repetibles pero no fueron comparables con los obtenidos con MDE. La puesta a punto de esta técnica reveló que los geles de poliacrilamida, en general, presentan menor grado de resolución que los de MDE, y requieren el ajuste de condiciones de trabajo para cada caso en particular.

#### **Análisis de microsatélites cloroplásticos.**

Con el propósito de dirigir la búsqueda de mutaciones a regiones altamente variables del plastoma, se realizó el análisis de nueve microsatélites o repeticiones de secuencia simple (SSRs) de cloroplasto. Se logró amplificar correctamente cinco microsatélites de cloroplasto de arroz, de los cuales tres (Oscp76221, Oscp80599 y Oscp78412) fueron de mayor tamaño en cebada que los publicados en arroz (Provan *et al.*, 1997) y dos (Oscp89568 y Oscp75969) fueron de tamaño similar **(Figura I.10)**. También se amplificaron cuatro microsatélites de cloroplasto con los “primers” específicos de cebada, los que resultaron de tamaños similares a los publicados (Provan *et al.*, 1999). La detección por tinción con nitrato de plata en geles de poliacrilamida desnaturalizante resultó más sensible que la detección en geles de agarosa Metaphor con bromuro de etidio. No se detectaron diferencias en los tamaños de estas regiones entre el genotipo control y las cuatro mutantes estudiadas.

**Figura I 10**

**Microsatélites de cloroplasto.** Los productos de amplificación se corrieron en geles desnaturalizantes de acrilamida al 6% con 8M urea (Oscp 76221, Oscp 80599 y Oscp 89568) y en geles de agarosa Metaphor al 3% (Oscp 75969, Oscp 78412, hvcp *trnS1*, hvcp *trnS2*, hvcp *psbA* y hv cp *rpoA*). M: Marcador de peso molecular.



#### I.4) DISCUSION

Se conocen genes nucleares mutadores de cloroplasto que inducen un amplio espectro de mutaciones en diferentes especies, incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Redei, 1973; Redei y Plurad, 1973), *Epilobium sp* (Michaelis, 1970), *Nepeta sp* (Woods y DuBuy, 1951), *Petunia sp* (Potrykus, 1970), *Oenothera hookeri* (Epp, 1973) y *Hordeum vulgare* (Prina, 1992).

Hasta el presente sólo se han caracterizado los efectos del mutador de plastoma de *Oenothera hookeri* sobre el ADN cloroplástico (Chiu *et al.*, 1990, Chang *et al.*, 1996). Al estado homocigota, este *plastome mutator (pm)* causa un aumento de 200-1000 veces en la aparición espontánea de sectores deficientes en pigmentos heredados citoplásmicamente (Epp 1973, Sears y Sokalski, 1991). Mediante análisis de RFLP del ADN cloroplástico digerido con *EcoRI*, *BamHI* y *Cla I*, Chiu *et al.*, (1990) encontraron polimorfismos consistentes en deleciones de 50-500pb. Al mapear las regiones variables en el plastoma mediante Southern, estos autores encontraron que coincidían con cinco “hot spots” evolutivos previamente definidos en el plastoma de *Oenothera*, uno de los cuales (ORF 2280) había sido caracterizado como portador de un número variable de repeticiones directas de 24 pb en dos líneas portadoras del gen *pm*. Se postuló así un mecanismo basado en la presencia de repeticiones directas para explicar la actividad del *plastome mutator*. Esta hipótesis fue probada amplificando y secuenciando regiones portadoras de repeticiones directas y secuencias repetitivas simples en una colección de mutantes (Chang *et al.*, 1996), encontrándose una deleción de 29 pb en la región intergénica *rps8-rpl14*, deleciones de 177 y 260 pb en el espaciador *16S rRNA-trnI*, una duplicación de 15 pb en el espaciador *trnG-trnR* y la inserción de una adenina en un tramo de repeticiones simples de la región intergénica *rpl14-rpl16*. Además se seleccionaron nuevas mutantes *pm* albinas y se realizó un análisis de PCR-RFLP-SSCP del gen de fotosíntesis *psbB*, revelándose la presencia de una inserción de 4 pb en medio de una serie de repeticiones en tandem en una de las líneas. Esta inserción determina un corrimiento del marco de lectura y la producción de una proteína truncada, lo que explicaría el fenotipo de la mutante. Otra de las mutantes presentó una transición de base simple (GxA) sin cambio en la secuencia de aminoácidos. De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis molecular de las mutantes se postuló que

el *plastome mutator* de *Oenothera* actúa a través de un mecanismo de corrimiento de templado durante la replicación del ADN cloroplástico y que el producto del gen mutador sería una proteína de tipo de isomerasa o helicasa, involucrada en la alteración de la topología del ADN cloroplástico o en la progresión de la replicación (Stoike y Sears, 1998). Otro caso muy estudiado es el del mutador de cloroplastos (*chloroplast mutator chm*) de *Arabidopsis*, en el cual se encontraron plástidos defectuosos en los sectores variegados (blancos y amarillos) inducidos en los órganos normalmente verdes de la planta (Redei 1973). Dada la herencia materna de la variegación y de los plástidos anormales se postuló la existencia de mutaciones inducidas por el gen *chm* en varios sitios de genoma plastídico. Sin embargo, no se encontraron polimorfismos del ADN cloroplástico en las mutantes inducidas por este mutador. En cambio, se demostró la existencia de rearrreglos de los genomas mitocondriales los que cosegregan con el fenotipo variegado (Martínez Zapater *et al.*, 1992). La presencia de dichos rearrreglos se observó también en las plantas normales, pero en muy bajas cantidades (Sakamoto, 1996), lo que llevó a proponer dos alternativas para la función del gen CHM. Una de ellas sería suprimir la amplificación del ADN mitocondrial mutante, la otra sería mantener un alto número de genomas mitocondriales “maestros” portadores de la información genética completa. En este contexto, la mutación primaria de las mutantes ocurre en el ADN de la mitocondria y estas organelas defectuosas afectan secundariamente la forma y función de los cloroplastos, generando células con deficiencias de pigmentos constituyendo un ejemplo de la conocida interacción entre organelas (Raghavendra *et al.*, 1994).

En el caso del genotipo mutador de cloroplastos de cebada, el espectro de mutantes inducidas estuvo compuesto en su gran mayoría por mutantes clorofílicas, muchas de ellas viables e incluso de vigor normal. Por otro lado, no se hallaron casos de machoesterilidad heredable y las alteraciones morfológicas independientes de los cambios clorofílicos son en general poco notorias, habiendo pasado desapercibidas en un principio (Prina, com.pers). Todo ello sumado al desarrollo de los sectores mutados a través de las generaciones que mostraron un lento “sorting out”, nos hicieron descartar el análisis de mutaciones del ADN mitocondrial, poniéndose todo el esfuerzo en el análisis del ADN de los plástidos de las líneas citoplásmicas en estudio.



El amplio espectro de mutantes inducidas por el genotipo mutador de cloroplastos de cebada incluye tipos viables y letales. Aquéllas viables son obviamente más fáciles de mantener y de hibridar, principalmente cuando se trata de genes heredados citoplásmicamente en los que no existe la posibilidad de utilizar los heterocigotas como medio de mantener los letales y en los que la segregación somática es flexible y por lo tanto poco predecible. Por esta razón, el presente estudio se realizó sobre una muestra, de cuatro líneas diferentes heredadas citoplásmicamente, que representan sólo a los tipos viables, en los que se pudo trabajar con seguridad en cuanto a su composición homoplástica -que se logró a través de retrocruzas con genotipos de núcleo normal (no mutador)- y la selección de plantas con características mutantes sólidas y genéticamente estables (Prina 1996)

Como un primer intento para caracterizar los efectos del genotipo mutador de cloroplastos de cebada a nivel molecular, se evaluó la presencia de cambios mayores de tamaño o estructura en el ADN cloroplástico. Usando *Pst* I, *Eco* RI, *Bam* HI y *Hind* III e hibridando con 18 sondas específicas de cloroplasto no se detectaron RFLPs en el ADN cp entre las mutantes inducidas por el gen mutador de cloroplasto y el genotipo control. Para avanzar más en este sentido, se continuó el análisis del plastoma mediante la digestión directa de ADN de cloroplasto purificado. Para ello, se realizó la extracción de ADN de cloroplasto ajustando un protocolo con buffer de extracción de alta salinidad (Taylor *et al.*, 1993). Entre los métodos comúnmente usados para purificar ADN cloroplástico éste es el más rápido y económico, ya que no requiere el armado de gradientes de sacarosa o Percoll para purificar las organelas intactas y tampoco requiere purificación del ADN cloroplástico por ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio (Milligan, 1989). El buffer de alta concentración salina actúa como osmótico y además disocia la cromatina en proteína y ADN, logrando el lavado del ADN nuclear (Bookjans *et al.*, 1984) y evitando así la exposición de los cloroplastos a la ADN-sa.

La digestión del ADN cloroplástico de las mutantes analizadas con 23 enzimas de restricción produjo los mismos patrones de restricción que el genotipo control. De manera similar, Epp *et al.*, (1987) usando enzimas de corte poco frecuente obtuvieron patrones de restricción idénticos entre el ADN de cloroplasto aislado de plástidos normales y el de distintos sectores variegados observados sobre plantas portadoras del mutador de plastoma de *Oenothera*. Sin embargo, Chiu *et al.*, (1990) usando enzimas de corte frecuente

encontraron una alta tasa de RFLPs de ADN cloroplástico en líneas del mutador de plastoma de *Oenothera*, consistentes en deleciones de 50-500 pb. Además, el análisis de fragmentos más pequeños y de productos de PCR reveló la presencia de inserciones y deleciones así como sustituciones de base mediadas por la presencia de repeticiones directas (Chang *et al.*, 1996).

Otra aproximación a la búsqueda de mutaciones se realizó mediante análisis de PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). La técnica fue descrita originalmente por Orita *et al.*, (1989). La misma consiste en la amplificación por PCR de una región de interés, la desnaturalización de los productos de PCR y la electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante, basándose en que la movilidad electroforética de una partícula en un gel depende de su tamaño y su forma. En condiciones no denaturalizantes, el ADN de simple cadena tiene una estructura plegada dada por interacciones intramoleculares, determinadas por su secuencia. En el análisis de SSCP, una mutación se detecta como un cambio de la movilidad en la electroforesis en gel de poliacrilamida causada por el cambio en la estructura (Hayashi, 1991). La sensibilidad de esta técnica disminuye al aumentar el tamaño del producto analizado. Así, se ha estimado que varía del 70 al 95% en productos de 200 pb o menos, y decrece a la mitad cuando se analizan fragmentos mayores de 400 pb (Grompe, 1993). Una alternativa para superar esta limitación consiste en la digestión del producto de PCR con enzimas de restricción para obtener fragmentos de un tamaño adecuado (Iwahana *et al.*, 1992), que es lo que se realizó en este trabajo. Para elegir los genes a estudiar, se consideró que las mutantes de plastoma causan tres clases de efectos fenotípicos principales: deficiencias fotosintéticas (asociadas con cambios en el contenido de pigmentos), resistencia a herbicidas y resistencia a antibióticos (Börner y Sears, 1986). Por tratarse de mutantes con deficiencia clorofilica (si bien sólo una de ellas, LC3 presenta un fenotipo homogéneo) se probaron cinco genes de fotosíntesis de los fotosistemas I (*psaA*, *psaB*) y II (*psbB*, *psbE*, *psbF*). Las cuatro mutantes revelaron idénticos patrones de migración, indicando la ausencia de mutaciones de punto. Dado el elevado número de genes cloroplásticos involucrados en la fotosíntesis (alrededor de 40), la búsqueda de mutaciones de punto por esta metodología resultaría extremadamente trabajosa, considerando que las condiciones experimentales deben ajustarse para cada caso. La opción sería aceptable, sin embargo, si se contara con una

profunda caracterización fisiológica de las mutantes que permitiera acotar la búsqueda a los genes participantes en un determinado componente del proceso fotosintético (PSI, PSII, *cytb6/f*, ATP sintetasa). La utilidad de la técnica de PCR-RFLP-SSCP en el análisis del plastoma fue demostrada en la detección de mutaciones de punto en el gen *psbB* en líneas derivadas del mutador de plastoma de *Oenothera sp.* (Chang *et al.*, 1996) y en el gen *16S rRNA* de mutantes de *Nicotiana plumbaginifolia* resistentes a la estreptomicina (To *et al.*, 1993).

Las repeticiones de secuencia simple (SSRs) o microsatélites son motivos repetidos en tandem de 6 o menos pares de bases que, en conjunto con la reacción de PCR, pueden generar marcadores moleculares muy informativos para la detección de variabilidad inter e intra específica en plantas. En el ADN del cloroplasto de diversas especies se han detectado microsatélites como repeticiones de mononucleótidos polimórficas, que identifican regiones altamente variables en un genoma de genética altamente conservativa (Powell *et al.*, 1995). El empleo de estos marcadores moleculares se basó en que una de las mutaciones inducidas por el mutador de plastoma de *Oenothera* correspondió a una inserción de A en un microsatélite de cloroplasto (Chang *et al.*, 1996). En nuestro caso, sin embargo, no se detectaron polimorfismos entre las mutantes y el control en los 9 loci estudiados. La escasez de “primers” específicos para el cloroplasto de cebada, así como la dificultad para obtener la amplificación de microsatélites usando “primers” diseñados para otras especies, reducen la utilidad de esta metodología para la detección de mutaciones en estos materiales.

La búsqueda de mutaciones en el ADN cloroplástico de las líneas derivadas del mutador de cloroplastos de cebada se completó con el análisis de regiones no codificantes mediante PCR-RFLP (Pimper, 2002). En este caso, además de las cuatro LCs, se incluyó una población portadora permanente del genotipo mutador en la que no se realizó selección. Se emplearon “primers” universales consensuados sobre las secuencias de genomas cloroplásticos conocidos, correspondientes a regiones codificantes muy conservadas y que permiten la amplificación de regiones no codificantes más variables. Los diez productos de amplificación obtenidos (1400-3400 pb) correspondientes al 17% del plastoma, fueron digeridos con 6 enzimas de restricción de corte frecuente, generando un total de 339 fragmentos de restricción, cuyos sitios de corte involucran 1169 bases (5.25 % de las

regiones amplificadas). No se observaron diferencias en los tamaños de los productos de amplificación entre los distintos materiales evaluados ni en los patrones de restricción considerando tanto los sitios como el tamaño de los fragmentos de restricción.

Nuestros resultados indican que en las líneas citoplásmicas analizadas el mutador de cloroplastos no indujo cambios mayores ni en el tamaño ni en el arreglo génico del plastoma. Sin embargo, la presencia de alteraciones menores en el ADN cloroplástico, como pequeñas deleciones o duplicaciones no puede ser excluida, así como la presencia de sustituciones.

La primera evidencia molecular del efecto del mutador de cloroplasto de cebada se obtuvo aislando y caracterizando dos mutantes de cebada tolerantes al herbicida atrazina. Ambas líneas presentan una transición de nucleótido simple (sustitución de adenina por guanina) en la posición +790 del gen cloroplástico *psbA*, que resultó en una sustitución aminoacídica de serina por glicina en el codón 264, en coincidencia con lo observado en mutantes tolerantes descritas en otras especies (Ríos *et al.*, 2003). Estos resultados en conjunto soportan la hipótesis de que el mutador de cloroplastos de cebada induce sólo pequeños cambios en el plastoma. Una de las LCs analizadas presentó una extremadamente alta tasa de reversión, lo que se postuló como debido a la activación de un elemento transponible putativo residente en el plastoma (Prina, 1996). Sin embargo, los resultados obtenidos no soportan esta hipótesis.

La investigación actualmente se dirige hacia la identificación y secuenciación de genes cloroplásticos responsables del fenotipo de estas y otras mutantes seleccionadas en plantas homocigotas para el mutador de cloroplastos. Siguiendo esta aproximación fue posible caracterizar recientemente las mutaciones inducidas por el mutador de cloroplastos en las líneas LC2 y LC3. En el caso de LC2, el crecimiento diferencial de la mutante en presencia de antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas de procariotas permitió postular la demora en la traducción plastídica temprana en la mutante (Prina *et al.*, 2003). Se propuso el gen plastídico *infA*, factor de inicio de la traducción, como candidato para explicar este fenotipo, y se secuenció este gen en la mutante y el control, encontrándose una transición de T por C en la posición 157, con el correspondiente cambio aminoacídico de serina a prolina en la posición 52. Posteriormente se aisló otra mutante de fenotipo similar a LC2, denominada LC2-like, cuyo gen *infA* presentó una transición de T por C en la posición 97,

con el correspondiente cambio aminoacídico fenilalanina por leucina en la posición 32 (Landau *et al.*, 2007). En el caso de la mutante LC3, que presenta una mayor sensibilidad a la alta temperatura, se analizaron los patrones de las proteínas fotosintéticas. Los resultados permitieron postular que bajo ciertas condiciones de luz y temperatura se afectaría el ensamble del fotosistema I, explicando así la mayor sensibilidad. Se secuenció el gen *ycf3*, chaperona plastídica involucrada en el armado del fotosistema I, en la mutante y el genotipo control, encontrándose dos mutaciones de punto en el intrón 1, que resultaron una sustitución T→C en el nucleótido 528 y una inserción de T en el nucleótido 150, en medio de una serie de 11 T (Landau, com. pers.). El análisis de los transcritos por Northern blot y RT-PCR reveló además *splicing* deficiente en la mutante, sugiriendo que la función chaperona del producto del gen *ycf3* sería defectuosa (Landau, com. pers.).

Si se considera en conjunto las evidencias obtenidas sobre el efecto del gen mutador de cloroplastos, si bien en un reducido número de líneas citoplásmicas de las que conforman su amplio espectro de mutantes, se observa que se han originado cuatro mutaciones de punto en el ADN cloroplástico y una inserción. Las cuatro sustituciones corresponden a transiciones.

Los mutadores sirven como herramientas genéticas para estudiar las vías de reparación (Miller, 1998). En *Escherichia coli*, se conocen mutantes con fenotipos mutadores, los que muestran una mayor frecuencia de mutaciones espontáneas respecto del normal como resultado de defectos en los genes de reparación del ADN (Horst *et al.*, 1999). El análisis de las mutaciones originadas por distintos genes mutadores de *E. coli* indica que cuando se afectan los genes del sistema de reparación de mismatch (MMR) aumenta la proporción de transiciones en relación con las transversiones, sugiriendo que el MMR tiene mayor afinidad por los errores de tipo transición (A-C y G-T) y los corrimientos de marco de lectura simple (Schaaper, 1993; Horst *et al.*, 1999; Harfe y Jinks –Robertson, 2000). Esta observación también se ha realizado en eucariotas (Baross-Francis *et al.*, 2001). Los estudios con sistemas mutadores de cloroplastos han buscado caracterizaciones similares a las realizadas en *Escherichia coli* de loci involucrados en las vías de replicación y/o reparación del ADN cloroplástico (GuhaMajumdar *et al.*, 2004). Si bien las cinco mutaciones del plastoma mencionadas resultan insuficientes para caracterizar el espectro de mutaciones inducidas por el genotipo mutador de cloroplastos de cebada, es posible

postular una hipótesis sobre su posible función. Considerando que cuatro de las cinco mutaciones encontradas fueron transiciones y la quinta una inserción, podríamos hipotetizar que alguno de los genes nucleares de la vía de reparación de mismatch (MMR) es el gen mutador de cloroplastos de cebada.

Si en lugar de considerar solamente el tipo de mutación originado por el genotipo mutador de cloroplastos en las mutantes estudiadas se tiene en cuenta además que no se trata de un mutador fuerte (como sí lo son los mutadores bacterianos que afectan la vía de reparación de mismatch), y que hasta la fecha todas las mutaciones se encontraron en la cadena de ADN transcrita, se podría postular que el gen mutador correspondería a alguno de los integrantes del sistema de reparación acoplado a la transcripción (TCR) (Prina, com. pers.). Este mecanismo de reparación es una sub-vía de la reparación por escisión de nucleótido (NER) que se encuentra conservado desde bacterias hasta humanos. El mismo se caracteriza por la mayor eficiencia en la reparación de algunos tipos de daño al ADN de la cadena transcrita de genes activos, comparado con la cadena no transcrita (Fleck y Nielsen, 2004; Mellon, 2005). Las lesiones reparadas incluyen dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) (Bohr *et al.*, 1985; Tornaletti *et al.*, 1999), y fotoproductos producidos por la luz UV y ciertas lesiones inducidas por agentes químicos (Chen *et al.*, 1992; van Hoffen *et al.*, 1995). Además de los genes UvrA, B C y D (propios de la vía NER), la reparación acoplada a transcripción requiere el producto del gen *mfd*, una proteína cuyas funciones serían mantener la burbuja de transcripción en el sitio de la lesión revirtiendo los complejos retroposicionados por la RNA polimerasa y posteriormente desplazar el complejo de la zona afectada para permitir el corte y síntesis de ADN (Mellon, 2005). En este caso, el gen *mfd* sería un candidato para el mutador de cloroplastos de cebada.

## **I.5) CONCLUSIONES**

-En las líneas citoplásmicas analizadas el mutador de cloroplastos no indujo cambios mayores ni en el tamaño ni en el arreglo génico del plastoma. Sin embargo, la presencia de alteraciones menores, como pequeñas deleciones, duplicaciones y sustituciones, no pudo ser excluida.

-Se descartó la existencia de elementos transponibles en el genoma del cloroplasto.

-Se teorizó sobre un posible mecanismo de acción para el gen mutador en base al tipo de mutaciones identificadas en sus mutantes por otros autores, así como por las características de su efecto mutador. Se postuló al gen *mfd*, integrante de la vía de reparación acoplada a la transcripción, como gen candidato para el mutador de cloroplastos de cebada

**CAPITULO II: CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN UNA  
MUTANTE DE PLASTOMA DE CEBADA DERIVADA DEL GENOTIPO  
MUTADOR DE CLOROPLASTOS QUE AFECTA EL DESARROLLO  
TEMPRANO DE LOS CLOROPLASTOS.**



## II.1) INTRODUCCIÓN

### **La biogénesis del cloroplasto.**

Los cloroplastos son las organelas más características de la célula vegetal. Originados a partir de la endosimbiosis entre un organismo procariota fotosintético y una célula hospedante pre-eucariota, se han diversificado en las plantas en otros tipos de plástidos no fotosintéticos e interconvertibles, para cumplir una variedad de roles en la biosíntesis de metabolitos, el almacenaje de distintos productos o para facilitar su propia transmisión, de acuerdo con el tipo de célula en que se encuentran (López Juez *et al.*, 2007).

La fuente original de la población de plástidos de una planta son los proplástidos contenidos en la célula huevo y el polen antes de la fertilización de las gametas y la formación del cigoto. En la mayoría de las Angiospermas el polen no posee plástidos funcionales, por lo que la población completa de plástidos deriva completamente de los pocos plástidos de la célula huevo. Por lo tanto, en la mayoría de las especies los plástidos son heredados maternamente, aunque existen algunos casos de transmisión biparental y de herencia paterna (Corriveau y Coleman, 1998; Mogensen y Rusche, 2000).

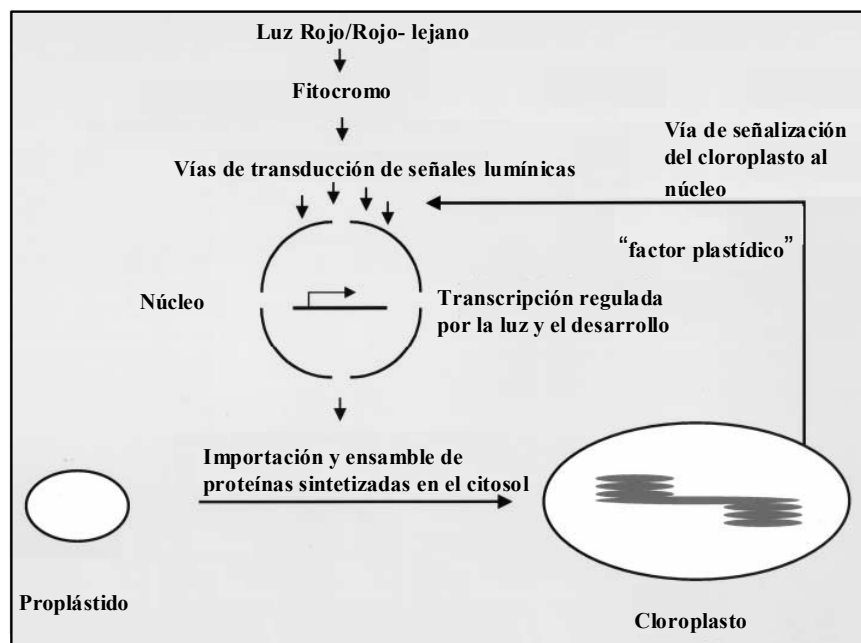
Durante la embriogénesis, los proplástidos derivados de la célula huevo se dividen por fisión binaria al ocurrir la división celular y construirse el plan básico del embrión, proliferando en las regiones meristemáticas para asegurar la continuidad de la línea plástidica en las células hijas (Chaley y Possingham, 1981; Maple y Moller, 2007). No se ha podido elucidar aún el mecanismo que asegura la correcta segregación de los proplástidos en las células hijas. Lo más probable es que el proceso dependa de una distribución moderadamente regular de los proplástidos dentro de la célula, que asegura que los proplástidos estén presentes en cualquiera de los polos celulares y por lo tanto en las células hijas (Waters y Pike, 2004).

En general existen unos 10-20 proplástidos por célula, aunque el número puede cambiar de acuerdo con el estadio del ciclo celular y la posición celular dentro del meristema (Juniper y Cloves, 1965; Possingham y Rose, 1976; Pyke y Leech, 1992). Aun en los estadios más tempranos de desarrollo celular en el meristema, existen diferencias en la morfología y contenido de ADN entre proplástidos de distintas capas del meristema apical del vástago –

L1, L2 y L3, sugiriendo que aun los proplástidos pueden mostrar características tejido-específicas (Fujie *et al.*, 1994). Durante la división celular los proplástidos replican su ADN, reunido en hasta 10 nucleoides dentro de la organela (Miyamura *et al.*, 1990). Los nucleoides se ordenan en un retículo asociado a la envoltura interna antes de la división, con la asistencia de la proteína PEND (“Plastid Envelope DNA-binding”) la que probablemente permite su partición equitativa (Terasawa y Sato, 2005).

La biogénesis del cloroplasto define un proceso en el que eventos reguladores originan grandes cambios estructurales y funcionales en la organela, a través de una sucesión de pasos que involucran la expresión génica regulada por la luz, el transporte de proteínas y su ensamble (**Figura II.1**).

**Figura II.1**  
**Representación esquemática de la biogénesis del cloroplasto.**  
**Bauer *et al.*, 2001.**



La conversión del proplástido en cloroplasto es inducida por la percepción de la luz por el fitocromo, como una parte de la respuesta fotomorfogénica general (Bauer *et al.*, 2001). Los fitocromos, junto con los criptocromos y las fototropinas, controlan y coordinan los cambios en la expresión de genes de proteínas cloroplásticas en respuesta a la luz (Huq *et al.*, 2004). El fitocromo absorbe la luz roja, sufre la fotoconversión a una forma activa (Pfr) y luego se transloca desde el citoplasma al núcleo (Smith 2000), donde interactúa con proteínas (PIFs) en un modo luz-reversible (Ni *et al.*, 1999, Huq *et al.*, 2004). Una de las respuestas fisiológicas a la transducción de la señal lumínica es la expresión de genes fotosintéticos, tanto en el cloroplasto como en el núcleo (Fankhauser y Chory, 1997). La proteína PIF3 funcionaría como un factor de transcripción, uniéndose a la secuencia motivo de la caja G, presente en los promotores de varios genes regulados por la luz, incluyendo la subunidad pequeña de Rubisco, RBCS (Martínez-García *et al.*, 2000). Como receptor primario de la señal del fitocromo, PIF3 desencadena los estadios más iniciales de la biogénesis del cloroplasto, causada por cambios en la expresión génica, liberando la represión de la transcripción ejercida por el grupo de represores de la fotomorfogénesis COP/DET/FUS (Ni *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002). Monte *et al.*, (2004) observaron que mutantes del gen PIF3 de *Arabidopsis* presentan un retardo en el verdecimiento de las plántulas y comprobaron que PIF3 funciona transduciendo las señales del fitocromo a genes nucleares involucrados en la generación de un aparato fotosintético funcional durante el proceso de de-etiolación temprana de la plántula.

La expresión de genes fotosintéticos nucleares está también regulada por señales de desarrollo de origen cloroplástico que comunican el estado de la organela al núcleo (señal retrógrada) y modulan la expresión de los genes controlados por la luz (Bauer *et al.*, 2001, Rodermeil, 2001). Dado que el ensamble de un cloroplasto funcional es estrictamente dependiente de la integración de productos codificados por el núcleo y el plástido, la existencia de estas señales reguladoras es de clara significación adaptativa (Waters y Pike, 2004). La propuesta inicial sobre la existencia de un “factor plastídico” fue reemplazada por el concepto de una red de múltiples vías de señalización operando para coordinar la expresión de los genes nucleares con los requerimientos del plástido (Beck, 2001;

Papenbrock y Grimm, 2001; Gray *et al.*, 2003; Surpin *et al.*, 2002; Gray, 2003; Pfannschmidt, 2003; Pfannschmidt *et al.*, 2003; Beck y Grimm, 2005; Beck, 2005).

Otro desafío para la célula vegetal durante la biogénesis del cloroplasto reside en la correcta importación y ensamble de proteínas codificadas por el núcleo y traducidas en el citosol (Martin *et al.*, 2002; Leister, 2003). Las proteínas nucleares dirigidas al cloroplasto contienen una secuencia N-terminal (péptido de tránsito) que las dirige hacia el estroma de la organela y que promueve la importación en el cloroplasto a través de una maquinaria de transporte localizada en las membranas. La importación es realizada por complejos proteicos ubicados en ambas membranas: el translocón de la envoltura exterior (Toc) y el translocón de la envoltura interior (Tic) (Soll, 2002). Una vez en el estroma el péptido de tránsito es cortado y algunas proteínas maduras son plegadas y acumuladas en el estroma mientras otras son transportadas hacia las tilacoides mediante una segunda secuencia señal (López Juez y Pyke, 2005; Robinson *et al.*, 1998). Mutantes defectivas en cualquier estadio del transporte o ensamble de las proteínas fotosintéticas presentan reducida expresión génica de los genes fotosintéticos inducidos por la luz, mediada por una señalización del cloroplasto al núcleo (Bauer *et al.*, 2001).

A pesar del importante avance en el conocimiento de la biogénesis de los cloroplastos, aún quedan enormes desafíos para completar el catálogo de las proteínas y procesos involucrados. En este sentido, comienza a definirse el rol de las proteínas pertenecientes a la familia de las repeticiones de pentatricopéptidos (PPRs) (Lurin *et al.*, 2004; Gothandam *et al.*, 2005), de aquéllas involucradas en el ensamble o funcionamiento de la maquinaria genética del plástido (Pesaresi *et al.*, 2006; Albrecht *et al.*, 2006; Ruppel y Hangarter, 2007; Motohashi *et al.*, 2007), o en la síntesis de isoprenoides (Guevara-García *et al.*, 2005; Gutiérrez Nava *et al.*, 2004) entre otras (López Juez, 2007).

### **El desarrollo de los plástidos y el desarrollo foliar en las Gramíneas.**

Las hojas de la cebada y otras especies de Gramíneas representan un sujeto particularmente interesante para los estudios de los cambios en la actividad génica que acompañan el desarrollo de los plástidos. A diferencia de las hojas de las Dicotiledóneas, las hojas de las Gramíneas crecen a partir de un meristema intercalar ubicado en la base de la hoja y por lo

tanto las células muestran un incremento continuo en su edad desde la base al ápice (Robertson y Laetsch, 1974). En consecuencia, existe un gradiente continuo de cambios en el estado metabólico de las células desde la heterotrofia a la autotrofia debido a la transformación de los proplástidos de las células basales a cloroplastos maduros en los tejidos fotosintéticamente activos de las regiones central y superior de la lámina foliar (Emanuel *et al.*, 2004).

Las células meristemáticas de la base contienen unos 10 proplástidos pequeños, no fotosintéticos, con pocos ribosomas y baja actividad transcripcional (Baumgartner *et al.*, 1989). El primer paso en la biogénesis de los cloroplastos involucra la síntesis de ADN plastídico y la replicación de los plástidos para mantener el número de organelas y su contenido de ADN en las células meristemáticas en división. A la fecha no se conocen genes plastídicos participando de la replicación de los plástidos ni en la síntesis de ADN plastídico, indicando que esta etapa temprana está controlada a través de la expresión génica del núcleo. Cuando las células entran en la zona de alargamiento celular, tanto la transcripción como la acumulación de transcritos se incrementan notablemente. Rapp *et al.*, (1992) y Baumgartner *et al.*, (1993) hallaron en esta etapa una acumulación mayor de los transcritos de los genes del sistema genético de la organela (como las subunidades de la ARN polimerasa plastídica, proteínas ribosomales, ARNs ribosomales y algunos ARNs de transferencia) en relación a los correspondientes a los genes de la fotosíntesis. Esta etapa es seguida por la activación de los genes plastídicos y nucleares que codifican las proteínas de fotosíntesis y el ensamble del aparato fotosintético (Klein y Mullet, 1987; Mullet y Klein, 1987; Rapp, 1992; Baumgartner *et al.*, 1993). Las células del mesófilo localizadas en las regiones maduras contienen en promedio unos 60 cloroplastos fotosintéticamente activos. Una vez que el complemento de cloroplastos maduros se ha establecido, las actividades de transcripción y traducción disminuyen, lo mismo que los ribosomas y los niveles de la mayoría de los ARN mensajeros (Mullet y Klein, 1987; Baumgartner *et al.*, 1989). Sin embargo, se mantiene elevada la síntesis de algunas proteínas plastídicas dañadas por la luz para mantener la funcionalidad del fotosistema II (Gamble *et al.*, 1988; Mullet, 1993). La última etapa del desarrollo del cloroplasto ocurre durante la senescencia

foliar, en que el volumen plastídico y el número de organelas por célula disminuyen y la planta recupera materiales útiles para el desarrollo de nuevas estructuras (Mullet, 1988).

En cebada, como en otras monocotiledóneas, el inicio del desarrollo de la hoja y del cloroplasto ocurre en ausencia de luz, y la activación de la transcripción y traducción plastídicas así como la acumulación de la mayoría de ARNm y proteínas puede ocurrir en plántulas crecidas en oscuridad. Sin embargo, los plástidos de estas plántulas, llamados etioplastos, carecen de actividad fotosintética debido a la ausencia de clorofila y de las apoproteínas clorofílicas de los fotosistemas I y II, indicando que la luz es necesaria para la maduración del cloroplasto. Después de la iluminación de las plántulas etioladas se completa la síntesis de clorofila, se acumulan las apoproteínas clorofílicas y se produce el ensamble de los fotosistemas I y II, activándose el transporte de electrones fotosintético (Klein y Mullet, 1986, 1987; Mullet y Klein, 1987; Mullet *et al.*, 1990).

#### **La transcripción plastídica durante el desarrollo del cloroplasto.**

La regulación diferencial de la transcripción de los genes cloroplásticos según el estadio de desarrollo y los fuertes cambios en las tasas de transcripción de los transcritos de los genes cloroplásticos durante el desarrollo de la organela sugieren que la maquinaria transcripcional juega un rol importante en la diferenciación del cloroplasto (Mullet, 1993).

La transcripción en los cloroplastos de cebada se realiza por dos tipos de ARN polimerasas, una codificada por el plástido (PEP) y otra codificada por el núcleo (NEP) (Hess y Börner, 1999; Shiina *et al.*, 2005; Liere y Börner, 2007). Los genes plastídicos *rpoA*, *B*, *C* y *Cl* codifican las subunidades de la PEP, una polimerasa de tipo eubacteriano que requiere factores de tipo sigma codificados por el núcleo para la unión específica del promotor y la eficiencia de la transcripción (Nagashima *et al.*, 2004; Ishizaki *et al.*, 2005; Khan, 2005; Loschelder *et al.*, 2006). En cuanto a la NEP, pertenece a la familia de las ARN polimerasas del tipo bacteriófago T3 y T7 (Lerbs-Mache, 1993). En plantas monocotiledóneas se ha identificado sólo un gen con actividad NEP (*RpoTp*) (Chang *et al.*, 1999; Ikeda y Gray, 1999; Emanuel *et al.*, 2004; Kusumi *et al.*, 2004) y en dicotiledóneas, dos (*RpoTp* y *RpoTmp*) (Hedtke *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 2001; Hedtke *et al.*, 2002;

Liere *et al.*, 2004; Emanuel *et al.*, 2006; Hricová *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2006, Khun *et al.*, 2007).

Mientras que los promotores reconocidos por PEP son similares a los promotores de tipo bacteriano -35/-10, los promotores para la NEP presentan una arquitectura completamente diferente y se han agrupado en tres tipos, según sus motivos de secuencia (Weihe y Börner, 1999). Los genes plastídicos se han clasificado de acuerdo con sus promotores en genes transcritos por PEP (en su mayoría los genes de fotosíntesis), genes transcritos por NEP (en su mayoría los genes de “housekeeping”, incluyendo los componentes del sistema genético del cloroplasto) y genes transcritos por PEP y NEP (Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Hübschmann y Börner, 1998; Silhavy y Maliga, 1998; Hess y Börner, 1999; Liere y Maliga, 1999; Weihe y Börner, 1999). Sin embargo, usando arreglos genómicos y ensayos de “run on” (Krause *et al.*, 2000; Legen *et al.*, 2002) se ha encontrado que cualquier gen plastídico puede ser transcrito en algún grado por NEP. Más recientemente, Cahoon *et al.*, (2004) han propuesto un nuevo modelo, que explica la acumulación de transcritos en los plástidos en desarrollo de maíz en base a la estabilidad diferencial de los ARN mensajeros en relación con cada ARN polimerasa.

Se ha postulado que la secuencia de hechos que ocurren durante a diferenciación normal del cloroplasto comienza con la activación de RpoTp en los proplástidos de las células meristemáticas. La enzima NEP transcribe los genes del sistema genético de la organela, haciendo así disponibles a la enzima PEP y los ribosomas para la expresión de los genes de fotosíntesis, que se expresan fuertemente en los estadios más tardíos del desarrollo del cloroplasto (Mullet, 1993; Hess y Börner, 1999; Emanuel *et al.*, 2004; Lopez-Juez y Pyke, 2005). El cambio en el uso de NEP a PEP durante el desarrollo del cloroplasto estaría mediado por el ARN de transferencia para glutamato (ARNt<sup>Glu</sup>), el que se une e inhibe la transcripción por la NEP “in vitro” (Hanaoka *et al.*, 2005).

### **La mutante de cebada LC2.**

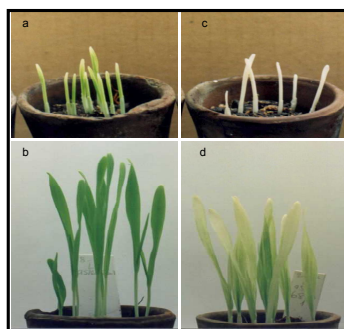
La relación entre la posición de una célula dentro de la hoja y el desarrollo de los cloroplastos se encuentra alterada en la hoja primaria de la mutante de cebada LC2 (línea

citoplásmica 2, Prina *et al.*, 2003). LC2 es una mutante deficiente en clorofila, de herencia materna, inducida por un gen mutador de cloroplastos nuclear. La mutante LC2 presenta plántulas con variegación posicional o discontinua del tipo albino/verde. La primera hoja al emerger es albina o verde muy claro, volviéndose verde normal al desarrollarse pero manteniendo usualmente el ápice claro (**Figura II.2**). Las hojas siguientes son de color verde normal (Prina, 1996).



**Figura II.2**  
**Plántulas de la**  
**mutante de**  
**cebada LC2.**

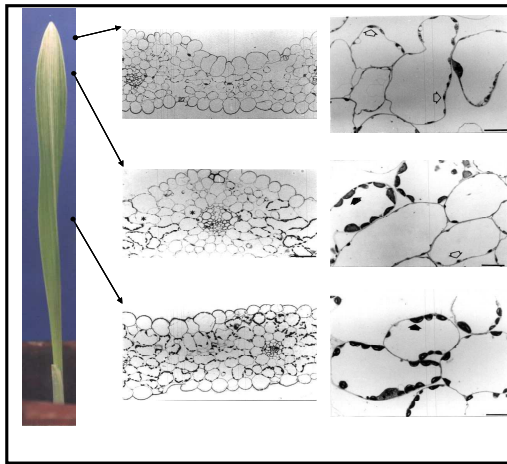
Es importante resaltar que la dinámica del verdecimiento difiere marcadamente entre plántulas LC2, según la temperatura en que ocurrió el desarrollo de la semilla (Prina *et al.*, 2003), como se observa en la **Figura II.3** y la temperatura durante el desarrollo inicial (Prina *et al.*, 1996).



**Figura II.3**  
**Plántulas de LC2**  
**provenientes de**  
**semillas formadas**  
**a 8°C/14°C (a,b) y**  
**a 20°C/26°C (c,d).**  
**Prina *et al.*, 2003**

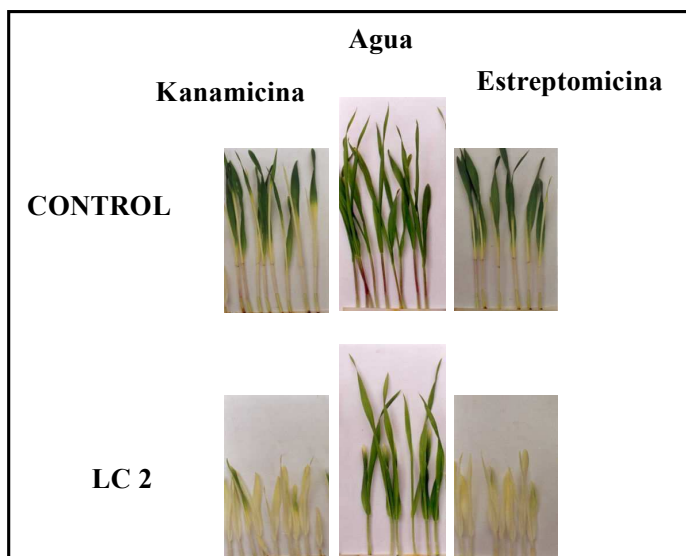
En las células del ápice de hojas primarias de LC2 de 3-7 días, se observaron plástidos pequeños y de forma anormal, con pocas membranas internas. En cambio, las células de la parte media de las hojas primarias contenían cloroplastos de desarrollo normal, como las hojas primarias del control (**Figura II.4**). En algunos plástidos anormales del ápice se observó ausencia de ribosomas plastídicos.





**Figura II.4**  
**Secciones transversales de la primera hoja de plántulas de LC2.**  
 \*: Células con cloroplastos mal desarrollados.  
 Cloroplastos normales ( → ) y anormales( ⇨ )  
 Prina *et al.*, 2003

Además, en experimentos en que se embebían las semillas con antibióticos inhibidores de la traducción plastídica se demostró que en las hojas primarias del control el contenido de pigmentos se reducía principalmente en la parte basal de la lámina y vaina foliar. En cambio, las hojas primarias de LC2 mostraban una marcada reducción de pigmentos en toda o casi toda la lámina (**Figura II.5**).



**Figura II.5**  
**Efecto de antibióticos sobre el crecimiento de plántulas LC2 y control.**  
 Prina *et al.*, 2003

Este efecto diferencial sobre la parte más vieja de la lamina, permitió postular la hipótesis de que existe una demora en la síntesis de proteínas plastídicas durante la embriogénesis de LC2 (Prina *et al.*, 2003).

El aparato de traducción de los plástidos está formado por componentes codificados por genes nucleares y plastídicos. El plastoma contiene genes para 4 ARNs ribosomales, 30-33 ARNs de transferencia, un tercio de las proteínas ribosomales (20-21 subunidades) y, en varias especies incluyendo cebada, un factor de inicio de traducción (Wakasugi *et al.*, 2001; Sugiura *et al.*, 1998; Sugiera, 1992; Millen *et al.*, 2001). Basándose en los resultados previos, se propuso el gen plastídico *infA*, como candidato para explicar el fenotipo LC2. EL gen *infA* es homólogo del gen bacteriano que codifica para el factor de inicio de traducción IF1 el que pertenece a una familia de proteínas de unión al ARN que incluye, entre otras, el factor de inicio de traducción eucariota eIF1A, la proteína de “cold-shock” CspA y la proteína ribosomal S1 (Kozak, 1983; Dahlquist y Puglisi, 2000; Boelens y Gualerzi, 2002; Croitoru *et al.*, 2004; Laursen *et al.*, 2005). Se secuenció este gen en la mutante y el control, encontrándose una transición de T por C en la posición 157, con el correspondiente cambio aminoacídico de serina a prolina en la posición 52. Posteriormente se aisló otra mutante de fenotipo similar a LC2, denominada LC2-like, cuyo gen *infA* presentó una transición de T por C en la posición 97, con el correspondiente cambio aminoacídico fenilalanina por leucina en la posición 32. Estos resultados sugieren fuertemente que LC2 es una mutante del gen *infA* (Landau *et al.*, 2007), siendo el primer caso de un fenotipo mutante atribuido a este gen en una planta superior.

La inhibición de la traducción plastídica determina la alteración de la expresión de genes plastídicos, mitocondriales y nucleares. En plantas deficientes en ribosomas plastídicos, como la mutante de cebada *albostrians* (Hagemann y Scholz, 1962; Börner *et al.*, 1976, 1979; Knoth y Hagemann, 1977) y la de maíz *iojap* (Shumway y Weier, 1967; Walbot y Coe, 1979) todas las proteínas codificadas por la organela están ausentes, incluyendo las subunidades de la PEP, resultando entonces que los transcritos plastídicos se deben a la actividad de la NEP. En estas plantas se observó que los niveles de los transcritos de varios genes nucleares relacionados con distintas vías metabólicas estaban drásticamente alterados, indicando una señalización retrógrada del plástido al núcleo (Bradbeer *et al.*,

1979; Hess *et al.*, 1994a; revisado en Hess *et al.*, 1997). Datos más recientes de los efectos de la mutante *albostrians* sugirieron la implicancia de señales plastídicas en la regulación de la transcripción de *RpoTp* (NEP) y *RpoTm*, la RNA polimerasa mitocondrial y de los genes transcritos por cada una de ellas (Hedtke *et al.*, 1999; Emanuel *et al.*, 2004). Del mismo modo, en las fenocopias de *albostrians* y *iojap* obtenidas por tratamientos con inhibidores de la traducción plastídica, (Zubko y Day, 1998), se observó una dramática reducción en los mensajeros de genes cloroplásticos transcritos por la PEP y un aumento en aquéllos transcritos por la NEP (Zubko y Day, 2002). Efectos similares se observaron cuando plantas normales fueron tratadas con inhibidores de la traducción plastídica (Oelmüller *et al.*, 1986; Adamska, 1995; Gray *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1998; Sullivan y Gray, 1999). Nuevas evidencias sobre el efecto de la inhibición de la traducción plastídica sobre la expresión de genes plastídicos y nucleares y el desarrollo temprano de los cloroplastos se han obtenido a partir del análisis de mutantes de arroz (Sugimoto *et al.*, 2004), tabaco (Alhert *et al.*, 2003) y *Arabidopsis* (Pesaresi *et al.*, 2006; Albrecht *et al.*, 2006; Ruppel y Hangarter, 2007; Motohashi *et al.*, 2007; Legen *et al.*, 2007).

### **Hipótesis:**

- 1) Sobre la base de las características de la mutante de plastoma de cebada LC2 y a los antecedentes sobre el efecto de la inhibición de la traducción plastídica sobre la transcripción, se postula la hipótesis de que la mutante LC2 afecta la transcripción de genes nucleares y plastídicos. Para comprobar esta hipótesis se realizó un análisis de la acumulación de transcritos en un gradiente de desarrollo de la primera hoja de la mutante LC2 y el control. En este análisis se incluyeron los genes de las RNA polimerasas plastídica y mitocondrial codificadas por el núcleo, algunos genes transcritos por la NEP y algunos genes transcritos por la PEP.
- 2) Dado el retraso en la traducción plastídica durante la embriogénesis, se postula la hipótesis de una acumulación de proteínas plastídicas diferencial en los tejidos del ápice de la primera hoja de LC2. Para comprobar esta hipótesis se realizó el análisis de la acumulación de proteínas tilacoidales y la inmunolocalización de la subunidad grande de Rubisco.

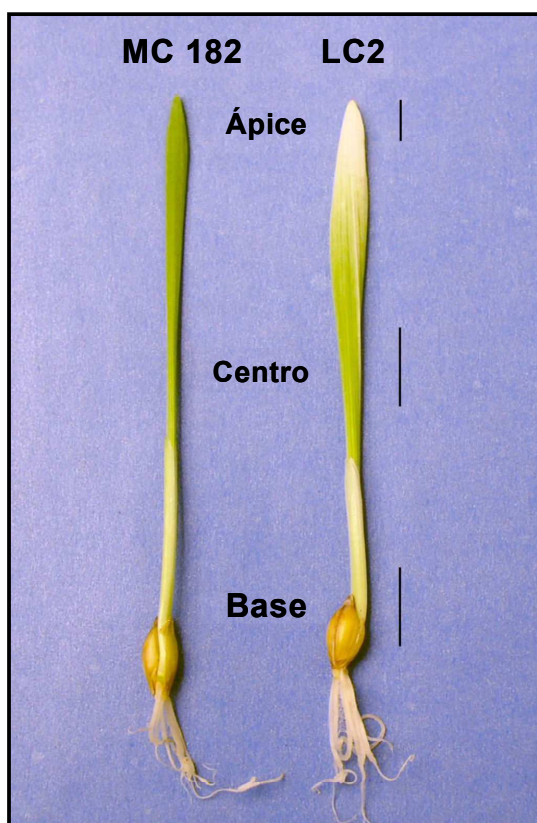
**OBJETIVOS:**

- Analizar el efecto de la mutante LC2 sobre la transcripción de los genes nucleares de las ARN polimerasas plastídica y mitocondrial en un gradiente de estadios de desarrollo de la primera hoja.
- Analizar el efecto de la mutante LC2 sobre la transcripción de genes cloroplásticos de “housekeeping” y de fotosíntesis en un gradiente de estadios de desarrollo de la primera hoja.
- Caracterizar la traducción plastídica en el ápice de la primera hoja de LC2.
- Caracterizar la eficiencia de fotosíntesis en la primera hoja de la mutante LC2.

## II.2) MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal.

Se trabajó con la mutante de cebada LC2 y un genotipo de cebada normal, MC 182. La mutante LC2 fue seleccionada a partir de plántulas portadoras del mutador de cloroplastos de cebada (Prina, 1992; 1996). Para todos los análisis realizados, las hojas primarias fueron cosechadas a los 5-7 cm de longitud. La semilla, el coleoptile y la segunda hoja fueron removidos de la plántula. Las hojas primarias fueron cortadas en tres secciones transversales (**Figura II.6**) correspondientes a la base (1 cm), el centro (1 cm) y el ápice (0,5 cm) de la lámina.



**Figura II.6**  
Plántulas de la mutante de plastoma de cebada LC2 y del genotipo control MC182. Se tomaron secciones transversales en la base (1cm), centro (1 cm) y ápice (0,5cm) de la lámina de hojas primarias de 5-7 cm de longitud.

Para los análisis de fluorescencia de clorofila y de RT-PCR cuantitativa en tiempo real, las semillas de LC2 y MC182 fueron crecidas en una mezcla de vermiculita y tierra en una

cámara de crecimiento a 20 °C bajo un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con una iluminación de 150  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ . Muestras de 7 plántulas fueron cosechadas por duplicado en nitrógeno líquido y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para los análisis de ARN, proteínas y microscopía, las semillas de LC2 y MC 182 fueron sembradas en hidroponía por el método del “sandwich” (Myhill y Konzak, 1967). Las plántulas fueron crecidas en un banco de crecimiento Conviron GB48 (Winnipeg, Canada) bajo un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de a 18 °C/15 °C. Las muestras del ápice, el centro y la base fueron obtenidas como ya se describió.

### **Métodos.**

**Extracción y purificación de ARN:** Se extrajo el ARN total de cada región de la primera hoja de LC2 y del control, usando TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) según recomendaciones del proveedor y se resuspendió en 50 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O purificada por columna. Se realizaron tratamientos con ADN-asa (DNA-free<sup>TM</sup>, Ambion Inc., Austin, EEUU) y limpieza del ARN (RNeasy, Qiagen, Hilden, Alemania). La cantidad y pureza del ARN se determinaron por la medición de la absorbancia a 260nm ( $A_{260}$ ) y por el cociente  $A_{260}/A_{280}$ , respectivamente, usando un espectrofotómetro Genequant II (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Holanda). La integridad del ARN fue verificada por electroforesis de cantidades iguales de ARN total en gel de agarosa desnaturalizante al 1,3% con formaldehído 2M y tinción con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989).

**Transferencia del ARN, obtención y marcado de sondas:** 15  $\mu\text{g}$  de ARN total de las distintas regiones de la primera hoja fueron separados en geles de agarosa desnaturalizante al 1,3% con formaldehído 2M y transferidos a membranas de nylon Z-probe (Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU) por capilaridad. La sonda *psaB* (alrededor de 2,1 kb) se obtuvo por amplificación por PCR de ADN total de cebada con los “primers” *psaBF*: 5'-GGTTTAGCCAAGGC-3' y *psaBR*: 5'-GAAAAGTGAGCTAA-3'. Las sondas ARNr 16S y *psbA* se obtuvieron por amplificación por PCR de ADN total de cebada usando “primers” publicados (Colombo *et al.*, 2006; Rios *et al.*, 2003). Las sondas fueron marcadas usando los protocolos del proveedor usando 11-Digoxigenina-dUTP (Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim, Alemania), con detección por quimioluminiscencia usando “CDP-star” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) como sustrato.

**Síntesis de ADNc:** El ARN fue retrotranscrito usando Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Hilden, Alemania). Se desnaturalizó 1,5 µg de ARN a 65 °C por 5 minutos y luego se agregó 1X buffer, 0,5 mM de cada dNTP, 2,5µM de “primers” hexámeros al azar (Randomoligos, Fermentas, Vilnius, Lituania), 12 U de inhibidor de RNasas (Fermentas, Vilnius, Lituania), 3 U de transcriptasa reversa y agua hasta un volumen final de 15µl. Después de la incubación de las reacciones a 37 °C durante 1 hora, se inactivó la enzima a 93 °C por 5 minutos. Se obtuvieron dos ADNc y un control RT- de cada muestra de ARN.

**RT-PCR cuantitativa en Tiempo Real:** Las reacciones se realizaron en un sistema de detección de secuencia PE Biosystems Gene Amp 5700 usando los reactivos del kit PE SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). La mezcla de ración incluyó 1X SYBR Green buffer, 1,0 mM de la mezcla de dNTPs , 3mM Cl<sub>2</sub>Mg, 0,625 U Amplitaq Gold DNA-polymerasa (Applied Biosystems), 0,250 U AmpErase UNG, 45 pmol de cada “primer” y diferentes cantidades de ADNc como templado, correspondiendo a 50ng (*RpoTp*, *RpoTm*), 5ng (*clpP*, *rpl2*, *rpoB*) y 10 pg (ARNr 18S) del ARN total retrotranscrito. Los pares de “primers” fueron designados y optimizados para producir productos de amplificación de 90-110 pb (Emmanuel *et al.*, 2004). El perfil térmico de la PCR incluyó un paso de incubación a 50 °C por 2 minutos, seguido de 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 45 segundos a 72 °C. Al finalizar el último ciclo se realizó un paso de desnaturalización con un gradiente de temperatura de 60 °C a 95 °C a 0,03° C/s, para mostrar la curva de disociación de los amplicones, de manera de detectar productos no específicos (Emanuel *et al.*, 2004). Todas las reacciones se realizaron por triplicado usando dos grupos independientes de ADNc. Esto se repitió para las dos preparaciones independientes de ARN, obteniéndose 12 valores individuales para cada muestra de ARN. Se incluyeron reacciones control sin templado (NTC) para cada par de “primers” y controles negativos (sin transcriptasa reversa, RT-) en todas las corridas para verificar que la total remoción del ADN. Para el análisis de los datos obtenidos se usó el software PE Gene Amp 5700 SDA, versión 1,3. Los datos se graficaron como señal reporte normalizada (Rn) versus número de ciclos. Se estableció manualmene

un valor umbral de 0,8 en el tercio superior de la fase lineal de la curva de amplificación. El valor CT (ciclo umbral) indica el número de ciclos en que la cantidad de regiones amplificadas alcanza el umbral. Todas las mediciones se normalizaron respecto del gen nuclear ARNr 18S como control endógeno. Se realizó un experimento de validación para demostrar que las eficiencias de amplificación de los genes a estudiar y de la referencia endógena eran aproximadamente iguales (Emanuel *et al.*, 2004). Se expresaron los datos como  $2^{-(CT - CT_{ARNr\ 18S})}$  como se describe en el manual de usuario (Applied Biosystems User Bulletin No. 2, P/N 4303859).

**Inmunodetección de RpoB:** Se aislaron las proteínas totales de diferentes regiones de la primera hoja, de acuerdo con el protocolo de Hess *et al.*, (1994b). Muestras de 10 µg de proteínas totales se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12% (Laemmli, 1970) y se transfirieron a membranas de nylon (Hybond-N, Amersham, GE Healthcare Buckinghamshire, Inglaterra) por electrotransferencia, usando la unidad mini-PROTEAN II (Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU), a voltaje constante de 100V por 90 minutos. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Sambrook *et al.*, 1989) para verificar igualdad de carga de las muestras. Después de la transferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau. El anticuerpo contra RpoB de tabaco fue un obsequio de M. Hanson (Cornell University, EEUU). El análisis de Western se realizó por quimioluminiscencia usando el “kit” Amersham ECL Western Blotting System (GE Healthcare Buckinghamshire, Inglaterra) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

**Acumulación de proteínas tilacoidales:** Se aislaron las proteínas tilacoidales de las distintas regiones de la primera hoja, machacando 200 mg de tejido en buffer de homogenización frío (50 mM Hepes, pH 7,4; 0.3 M Sacarosa; 1 mM EDTA Na<sub>2</sub>; 5 mM Cl<sub>2</sub>Mg) con el agregado de BSA (0.5 g/100ml) y filtrando a través de Miracloth. Se centrifugó a 3.000 g durante 5 min a 4 °C y se resuspendió el “pellet” en buffer de lavado (10 mM Hepes; 5 mM Sacarosa; 5 mM Cl<sub>2</sub>Mg). Se centrifugó en iguales condiciones y se resuspendió el “pellet” en buffer de almacenamiento (10mM Hepes; 5 mM Sacarosa; 5 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 10% Glicerol). Para determinar la concentración de clorofilas se agregó 1 ml de dimetilformamida a 10 µl de tilacoides centrifugando a máxima velocidad. Se midió la



absorbancia a 750 nm (a restar de cada uno de los restantes valores), a 647 nm y 664,5nm.

Se usó la fórmula:

$$\text{Chl } (\mu\text{g/ml}) = (17,9 \times A_{647}) + (8,08 \times A_{664,5})$$

Muestras de proteínas tilacoidales equivalentes a 1µg de clorofila se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 13% (Laemmli, 1970) y se transfirieron a membranas de nylon (Hybond-N, Amersham, GE Healthcare Buckinghamshire, Inglaterra) por electrotransferencia, usando la unidad mini-PROTEAN II (Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU), a voltaje constante de 100V por 1 hora.

Se utilizó un anticuerpo contra la proteína D1 del fotosistema II cedido por la Dra. A. Barkan (Oregon University, EEUU) y un anticuerpo contra las proteínas A y B del fotosistema I de cebada obsequio del Dr. H. Scheller (The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dinamarca). El análisis de Western se realizó por quimioluminiscencia usando el “kit” Amersham ECL Western Blotting System (GE Healthcare Buckinghamshire, Inglaterra) siguiendo las recomendaciones del proveedor

**Inmunolocalización de la subunidad grande de la Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco):** Se cortaron segmentos de 2mm del ápice de las hojas primarias de 5-7 cm de longitud de la mutante y el control, se fijaron con paraformaldehído 3% en buffer fosfato 0,1 M, se deshidrataron en una serie gradual de etanol y se incluyeron en resina LR White. Secciones transversales se montaron en portaobjetos tratados con gelatina. La inmunolocalización se realizó mediante marcación con oro coloidal y detección con el kit Silver Enhancer (Sigma-Aldrich Co., EEUU), según las recomendaciones del proveedor. El anticuerpo contra la subunidad grande de Rubisco (RbcL) fue un obsequio de J. J. Guamet (Universidad de La Plata).

**Caracterización ultraestructural:** Las muestras se fijaron toda la noche a 4°C en una solución de glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,2), se post-fijaron en OsO<sub>4</sub> al 1% (p/v) por 2 horas a 4 °C, se deshidrataron en una serie gradual de etanol-acetona y se incluyeron en resina Spurr. Se obtuvieron secciones cruzadas usando un ultramicrotomo. Se tiñeron las secciones semifinas para microscopía óptica con azul de toluidina O al 1% (p/v). Las secciones ultrafinas para microscopía electrónica se tiñeron con la coloración de Reynolds seguida de acetato de uranilo al 2% (p/v). Para los estudios

de microscopía electrónica se usó un microscopio Zeiss EM 10 (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

**Determinación de la eficiencia de fotosíntesis:** Se midió la fluorescencia de la clorofila en el centro y el ápice de las mismas hojas intactas de 5-7 cm y 10-12 cm, de la mutante y el control, con un fluorómetro portátil modulado por amplitud de pulso (Walz GmbH, Effeltrich, Alemania). El máximo rendimiento cuántico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) se midió en hojas adaptadas a la oscuridad por 30 minutos. El rendimiento cuántico aparente del fotosistema II (rendimiento) se midió en las mismas hojas expuestas a la luz. Los parámetros de fluorescencia fueron calculados según Rohacek (2002). Se presentan los datos como promedios y desviaciones estándar de por lo menos 5 mediciones independientes.

### II.3) RESULTADOS

#### **Acumulación de transcritos de las ARN polimerasas de organelas codificadas por el núcleo.**

La enzima RpoTp (NEP) transcribe varios genes de “housekeeping” en los plástidos de las plantas superiores, incluyendo los genes *rpoA*, *B*, *C1* y *C2*, que codifican las subunidades de la PEP. Por lo tanto, la expresión del gen *RpoTp* es de importancia central para la transcripción plastídica (Liere y Börner, 2007). En este trabajo se incluyó el estudio de *RpoTm* (que codifica para la ARNP mitocondrial) ya que anteriormente se encontró una respuesta similar en la expresión de *RpoTp* y *RpoTm* en hojas de cebada con cloroplastos mal desarrollados (Emanuel *et al.*, 2004).

La determinación precisa de los muy bajos niveles de los transcritos de *RpoTp* y *RpoTm*, así como los de los genes plastídicos de “housekeeping” analizados, requieren del método de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real por su sensibilidad (Emanuel *et al.*, 2004). En la **Tabla II.1** se presenta un ejemplo de los valores CT obtenidos para cada una de las reacciones de amplificación y en el Anexo II.1 a II.15 el análisis de los resultados obtenidos.

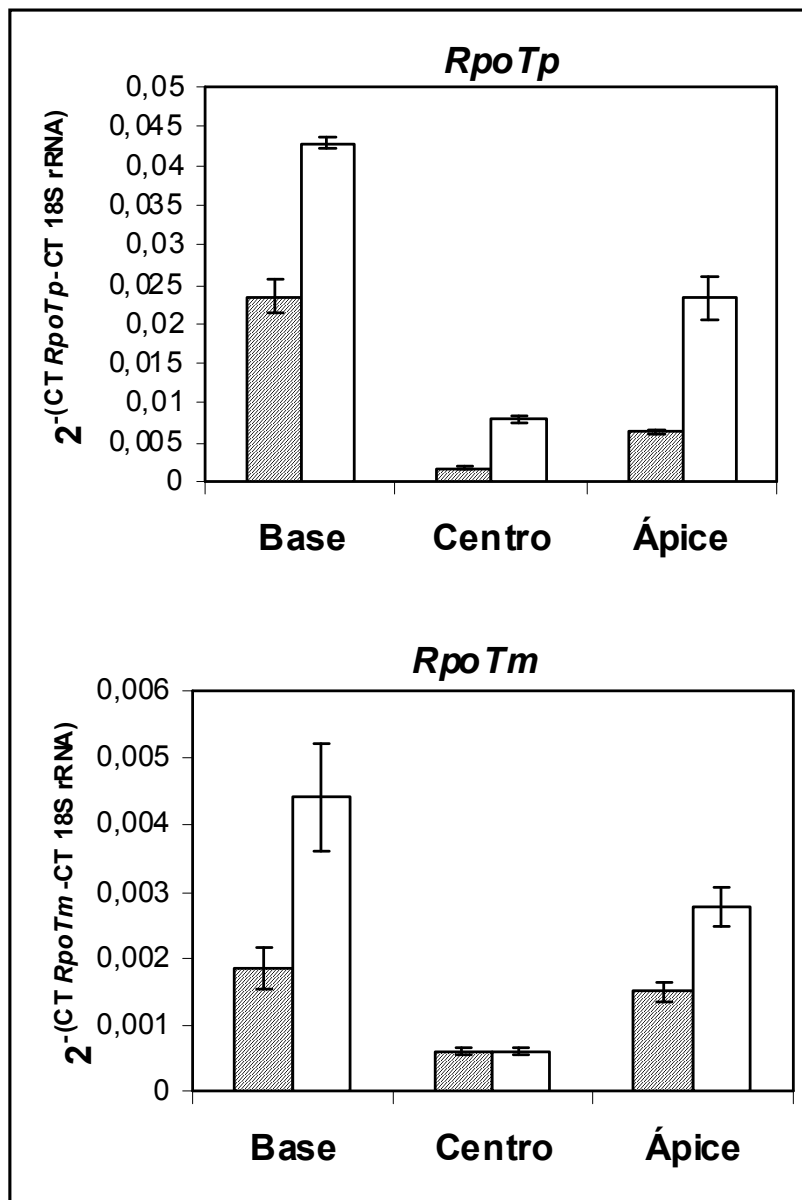
Se prepararon ARNs totales de las secciones apical, central y basal de hojas primarias de plántulas de LC2 y el control correspondiente; se retrotranscribieron en ADNc y se analizaron por PCR. En el control MC 182, los niveles de transcritos para *RpoTp* fueron máximos en la base y disminuyeron hacia la parte superior de la hoja. La acumulación de transcritos de *RpoTm* fue mayor en las secciones basal y apical que en la región central (**Figura II.7**). En LC2, los transcritos de *RpoTp* se acumularon a niveles más altos que en el control en todas las secciones de la primera hoja analizadas, variando entre 2 órdenes en la base y el centro y cuatro órdenes en el ápice. Con respecto a *RpoTm*, los niveles de sus transcritos fueron significativamente mayores en la mutante que en el control en las secciones basal y apical, mientras que en el centro de las hojas primarias se observaron los mismos niveles de transcritos en el control y la mutante (**Figura II.7**).

Well	Type	Name	Primer/Probe	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty
			File:	XT2_24_7.sds				
			User:	Administrator				
			Plate Type:	5700 Quantitation				
			PCR Volume:	25 mL				
			Threshold:	0.800				
B3	UNKN	XT/2/a/RpoTc	PR1	28.71	0.01			
B4	UNKN	XT/2/a/RpoTc	PR1	28.71	0.01			
B5	UNKN	XT/2/a/RpoTc	PR1	28.72	0.01			
B6	UNKN	XT/2/b/RpoTc	PR1	28.69	0.11			
B7	UNKN	XT/2/b/RpoTc	PR1	28.63	0.11			
B8	UNKN	XT/2/b/RpoTc	PR1	28.84	0.11			
B9	UNKN	XT/2/-/RpoTc	PR1	37.84	0.00			
B10	UNKN	XT/2/ntc/RpoTc	PR1	38.75	0.00			
C3	UNKN	XT/2/a/RpoTm	PR2	30.36	0.09			
C4	UNKN	XT/2/a/RpoTm	PR2	30.53	0.09			
C5	UNKN	XT/2/a/RpoTm	PR2	30.41	0.09			
C6	UNKN	XT/2/b/RpoTm	PR2	30.50	0.11			
C7	UNKN	XT/2/b/RpoTm	PR2	30.39	0.11			
C8	UNKN	XT/2/b/RpoTm	PR2	30.62	0.11			
C9	UNKN	XT/2/-/RpoTm	PR2	35.53	0.00			
C10	UNKN	XT/2/ntc/RpoTm	PR2	34.86	0.00			
D3	UNKN	XT/2/a/clpP	PR3	25.13	0.20			
D4	UNKN	XT/2/a/clpP	PR3	24.73	0.20			
D5	UNKN	XT/2/a/clpP	PR3	24.90	0.20			
D6	UNKN	XT/2/b/clpP	PR3	25.08	0.08			
D7	UNKN	XT/2/b/clpP	PR3	25.06	0.08			
D8	UNKN	XT/2/b/clpP	PR3	24.94	0.08			
D9	UNKN	XT/2/-/clpP	PR3	33.73	0.00			
D10	UNKN	XT/2/ntc/clpP	PR3	35.35	0.00			
E3	UNKN	XT/2/a/rpl2	PR4	23.26	0.11			
E4	UNKN	XT/2/a/rpl2	PR4	23.35	0.11			
E5	UNKN	XT/2/a/rpl2	PR4	23.47	0.11			
E6	UNKN	XT/2/b/rpl2	PR4	23.60	0.07			
E7	UNKN	XT/2/b/rpl2	PR4	23.68	0.07			
E8	UNKN	XT/2/b/rpl2	PR4	23.53	0.07			
E9	UNKN	XT/2/-/rpl2	PR4	30.42	0.00			
E10	UNKN	XT/2/ntc/rpl2	PR4	32.26	0.00			
F3	UNKN	XT/2/a/rpoB	PR5	28.06	0.49			
F4	UNKN	XT/2/a/rpoB	PR5	28.93	0.49			
F5	UNKN	XT/2/b/rpoB	PR5	28.10	0.49			
F6	UNKN	XT/2/b/rpoB	PR5	27.90	0.11			
F7	UNKN	XT/2/b/rpoB	PR5	28.12	0.11			
F8	UNKN	XT/2/b/rpoB	PR5	28.02	0.11			
F9	UNKN	XT/2/-/rpoB	PR5	32.92	0.00			
F10	UNKN	XT/2/ntc/rpoB	PR5	35.03	0.00			
G3	UNKN	XT/2/a/psbA	PR6	18.05	0.09			
G4	UNKN	XT/2/a/psbA	PR6	18.21	0.09			
G5	UNKN	XT/2/a/psbA	PR6	18.07	0.09			
G6	UNKN	XT/2/b/psbA	PR6	18.15	0.15			
G7	UNKN	XT/2/b/psbA	PR6	18.43	0.15			
G8	UNKN	XT/2/b/psbA	PR6	18.24	0.15			
G9	UNKN	XT/2/-/psbA	PR6	29.81	0.00			
G10	UNKN	XT/2/ntc/psbA	PR6	40.00	0.00			
H3	UNKN	XT/2/a/18S	PR7	21.21	0.08			
H4	UNKN	XT/2/a/18S	PR7	21.17	0.08			
H5	UNKN	XT/2/a/18S	PR7	21.33	0.08			
H6	UNKN	XT/2/b/18S	PR7	21.32	0.10			
H7	UNKN	XT/2/b/18S	PR7	21.32	0.10			
H8	UNKN	XT/2/b/18S	PR7	21.38	0.10			
H9	UNKN	XT/2/-/18S	PR7	32.79	0.00			
H10	UNKN	XT/2/ntc/18S	PR7	32.85	0.00			

**Tabla II.1**  
**Valores de**  
**CT** **obtenidos**  
**en la reacción**  
**de RT-PCR**  
**cuantitativa**  
**en tiempo**  
**real para los**  
**genes *RpoTc,***  
***RpoTm, clpP,***  
***rpl2, rpoB,***  
***psbA* y 18S**  
**ARNr con dos**  
**ADNc (a y b)**  
**obtenidos de**  
**una**  
**extracción de**  
**ARN (2) del**  
**tejido apical**  
**del control**  
**(XT) por**  
**triplicado.**  
**(-):control**  
**negativo.**  
**ntc: reacción**  
**sin templado.**

**Figura II.7**

Acumulación de transcritos de los genes *RpoTp* y *RpoTm* determinada por RT-PCR cuantitativa en tiempo real a lo largo de la primera hoja de MC182 (▨) y LC2 (□).

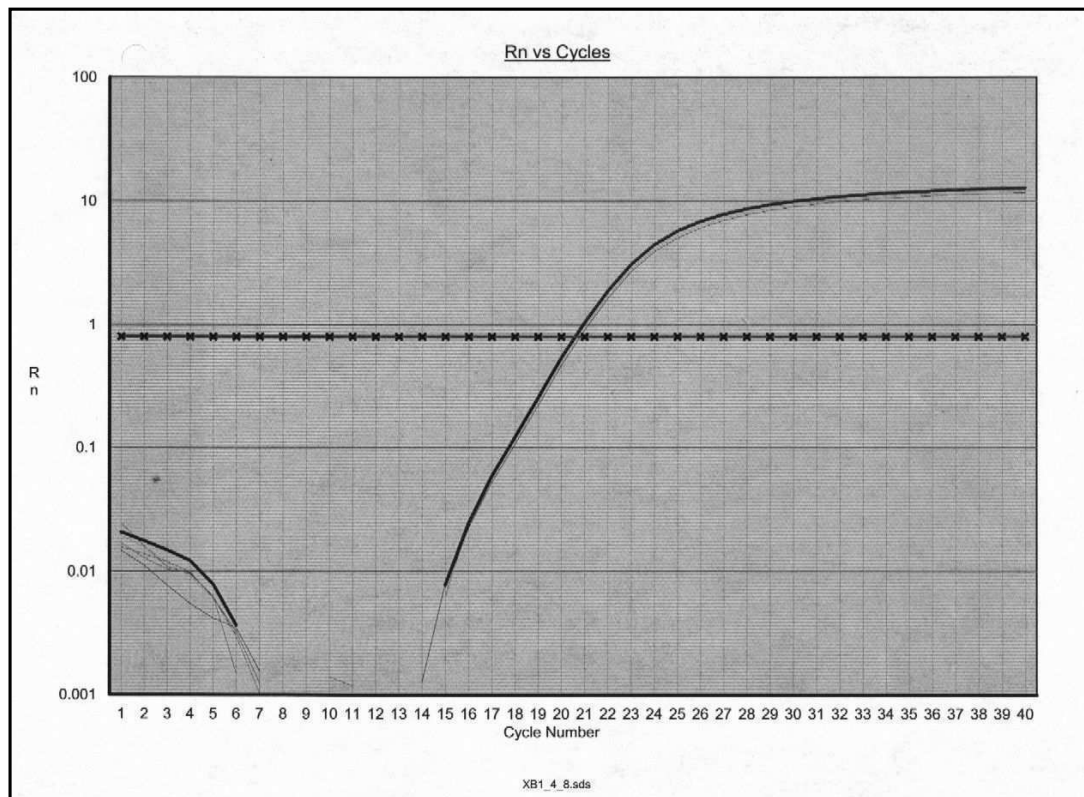


### Acumulación de transcritos de genes transcritos por NEP.

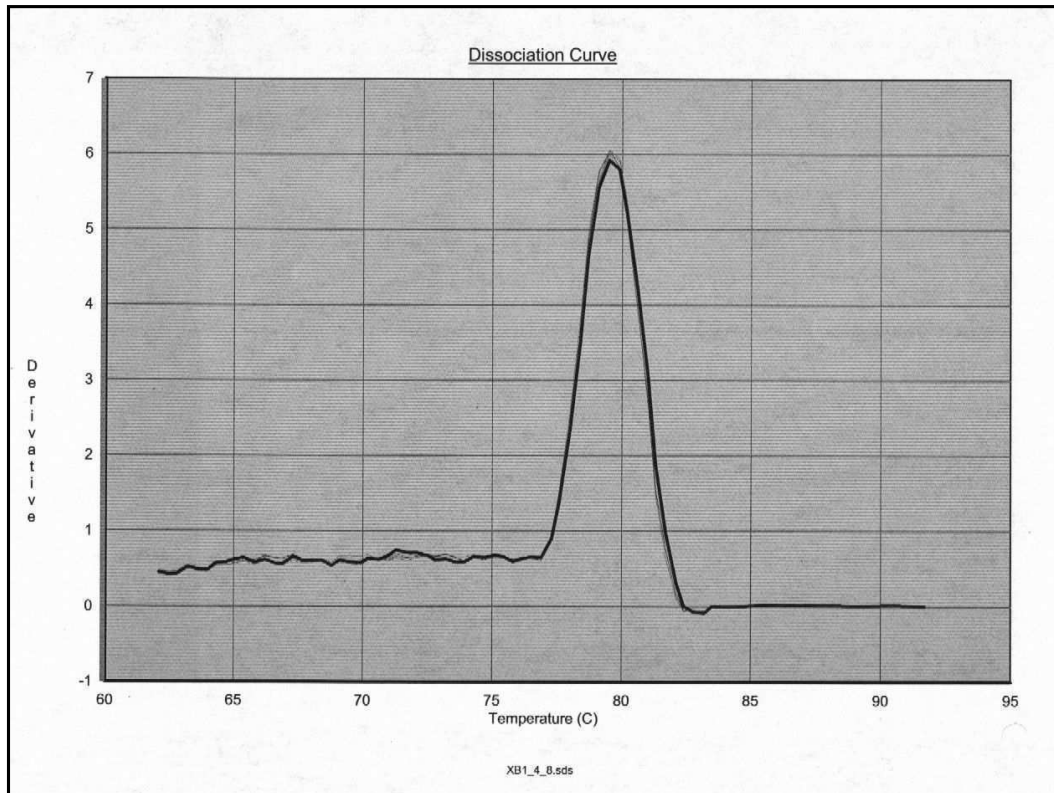
La drástica alteración de los niveles de transcritos de *RpoTp* en LC2 sugirió la existencia de consecuencias para la transcripción plastídica. Se eligieron tres genes plastídicos de “housekeeping” transcritos por NEP (Hübschmann y Börner, 1998; Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Hess *et al.*, 1993) para analizar la acumulación de sus transcritos por RT-PCR cuantitativa en tiempo real a lo largo del gradiente foliar. El gen *clpP* codifica para la subunidad proteolítica de la proteasa Clp, *rpl2* codifica para la proteína Rpl2 de la subunidad grande de los ribosomas plastídicos y *rpoB* codifica para la subunidad  $\beta$  de PEP. En la Figuras II.8 y II.9 se muestran las curvas de amplificación y de disociación obtenidas para el gen *rpl2* como ejemplo de la aplicación de la metodología de RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

**Figura II.8**

**Curva de amplificación del gen *rpl2* obtenida por RT-PCR cuantitativa en tiempo real correspondiente a triplicados de dos ADNc de una muestra de ARN de la región basal del genotipo control.**



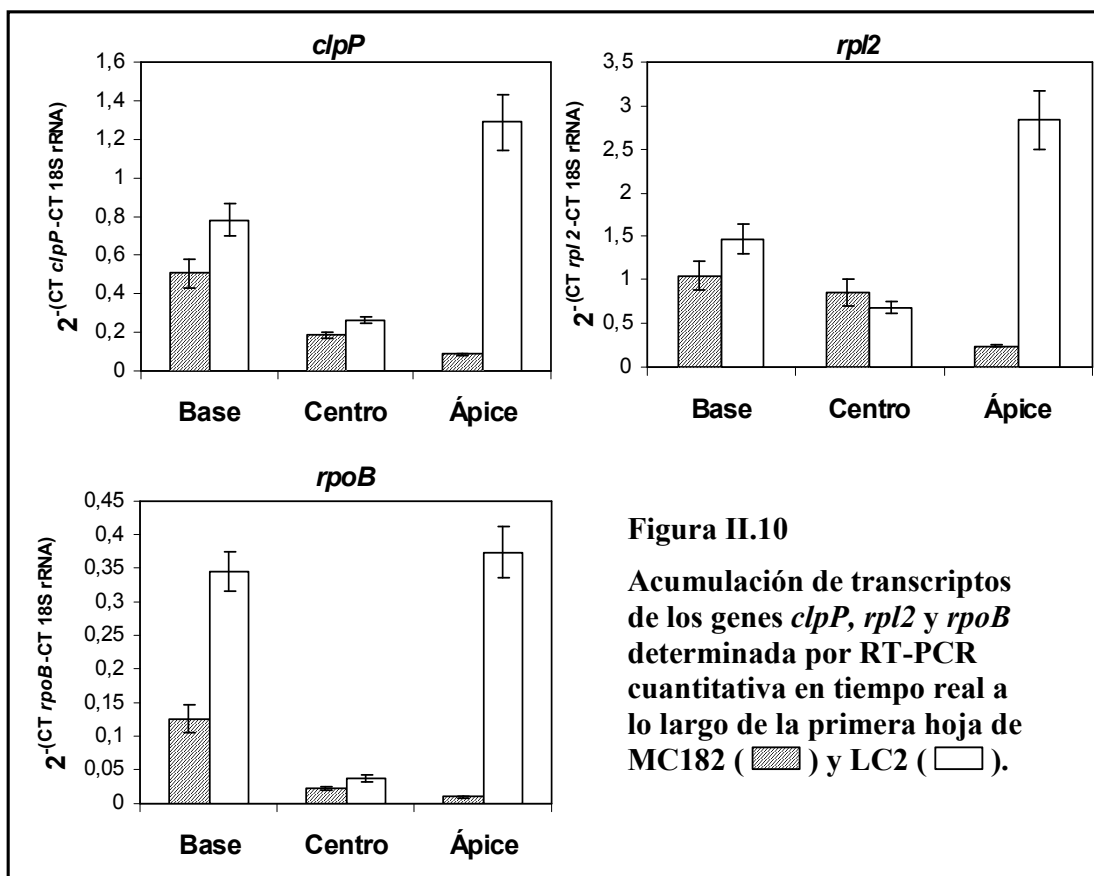
**Figura II.9**  
**Curva de disociación del producto de RT-PCR cuantitativa en tiempo real del gen *rpl2*.**



En el control, MC 182, estos genes mostraron la máxima acumulación de transcritos en el tejido más joven de la base y una progresiva disminución hacia las partes más viejas de la primera hoja, al igual que los transcritos de *RpoTp* (**Figura II.10**) confirmando estudios previos sobre la expresión de genes cloroplásticos en cebada (Baumgartner *et al.*, 1993; Emanuel *et al.*, 2004).

En contraste, los niveles de transcritos para estos genes en la sección apical de la primera hoja de LC2 fueron 11 (*clpP*), 15 (*rpl2*) y 40 (*rpoB*) veces mayores que en el control (**Figura II.10**). Los niveles de transcritos también fueron mayores en la sección basal de LC2, aunque las diferencias con el control fueron mucho menores comparadas con lo observado en el ápice de la hoja primaria. Resultados similares se obtuvieron previamente con los plástidos deficientes en ribosomas de la mutante de cebada *albostrians* (Emanuel *et*

al., 2004). Notablemente, y a diferencia de la situación en las hojas de *albostrians*, los niveles de transcritos de los genes transcritos por NEP no mostraron diferencias entre el control y la mutante en la parte central de las hojas primarias.



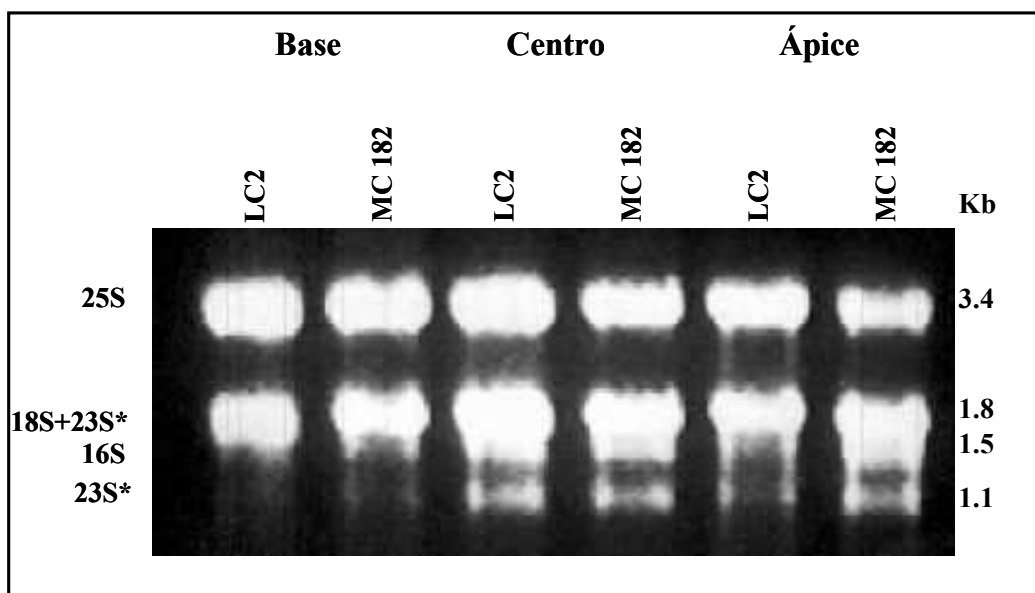
#### Acumulación de transcritos de genes transcritos por PEP.

Los altos niveles de transcritos de los genes plastídicos para proteínas del aparato fotosintético hacen apropiado el uso de Northern blots para estudiar la expresión de los genes transcritos por la PEP. Los ARNs totales aislados del ápice, centro y base de las hojas primarias de plántulas de LC2 y el correspondiente control fueron separados por electroforesis en gels de agarosa desnaturalizantes teñidos con bromuro de etidio. La



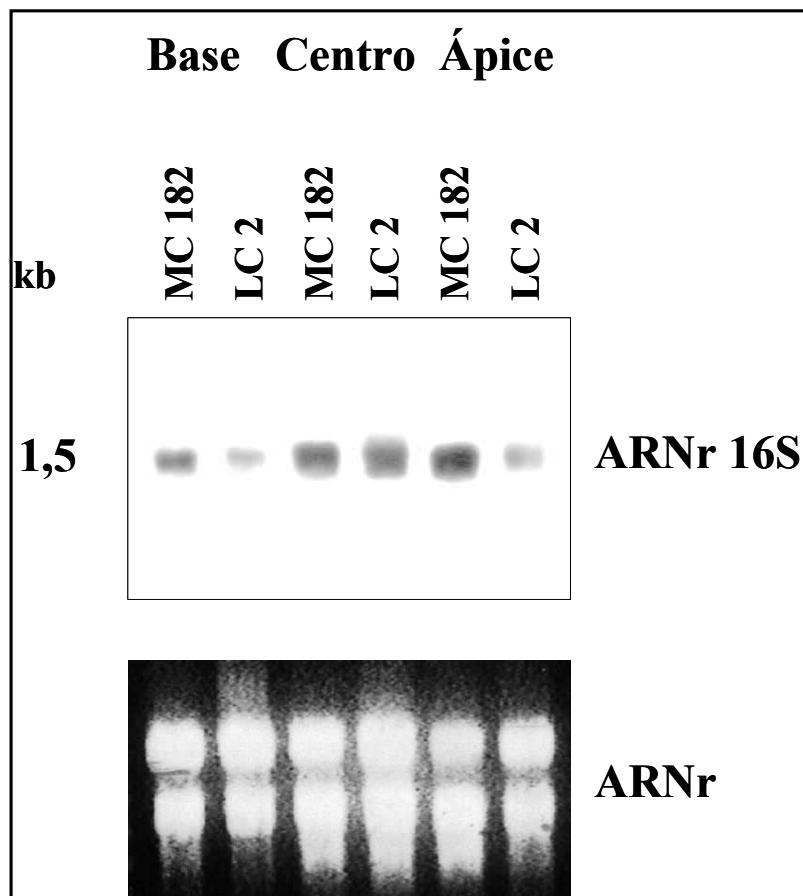
**Figura II.11** muestra los patrones de ARNr obtenidos, incluyendo las subunidades de los ribosomas citoplásmicos (25S y 18S) y plastídicos (23S y 16S).

**Figura II.11**  
**Patrones de ARN ribosomales plastídicos y nucleares. Se separó el ARN total de base, centro y ápice de la primera hoja de LC2 y MC182 en geles de agarosa desnaturalizante.**



Como ocurre con los ARNr de otras especies, el ARNr 23S no fue visible como una banda individual de 2,9 kb en los geles teñidos, dado que se encuentra cortado en especies de ARN de 1,8 kb y 1,1 kb (Wollgiehn y Parthier, 1980; Poulsen, 1983; Zubko y Day, 2002). En las secciones basal y apical de LC2 se observa menores cantidades de ARNr plastídicos comparadas con las hojas del control, mientras que las regiones centrales mostraron cantidades aparentemente iguales. Este resultado se confirmó mediante un Northern blot usando una sonda del gen ARNr 16S (**Figura II.12**).

**Figura II.12**  
**Acumulación de transcritos del gen ARNr 16S determinada por hibridación de ARN total y detección por quimioluminiscencia.**  
**Panel inferior: muestras de ARN teñidas con bromuro de etidio como control de carga.**

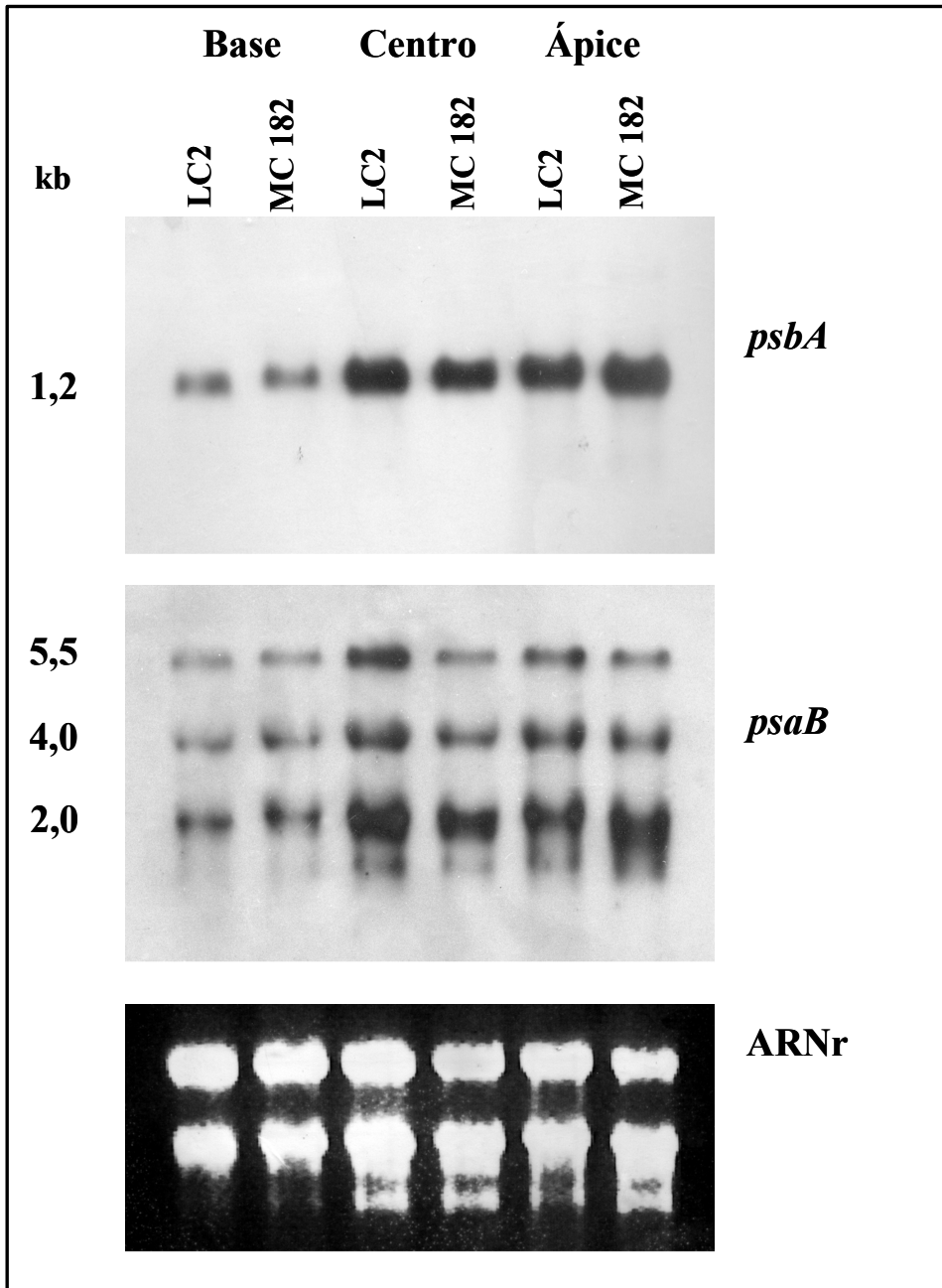


Los niveles de transcritos de los genes de fotosíntesis seleccionados, *psba* y *psaB* (así como los genes co-transcritos, todos transcritos por PEP: Boyer y Mullet, 1988; Hajdukiewicz *et al.*, 1997) fueron idénticos en las hojas primarias del control y de LC2 (**Figura II.13**). El gen cloroplástico *psbA* codifica la proteína D1 del fotosistema II. El operon *psaA* incluye los genes *psaA* y *psaB* para las proteínas core del fotosistema I y el gen *rps14* para una proteína ribosomal de la subunidad pequeña de los ribosomas plastídicos (Meng *et al.*, 1988).

**Figura II.13**

Acumulación de transcritos de genes de fotosíntesis determinada por hibridación de ARNs totales con las sondas *psbA* y *psaB*.

Panel inferior: muestras de ARN teñidas con bromuro de etidio como control de carga.



En el control, se detectó un transcrito de ~1,2 kb con la sonda *psbA*, como se esperaba en cebada (Klein y Mullet, 1986). Confirmando resultados anteriores en hojas de cebada normal (Baumgartner *et al.*, 1993; Klein y Mullet, 1990; Emanuel *et al.*, 2004), se observó mayor expresión de *psbA* en el ápice y la parte central de la primera hoja en comparación con el tejido basal, fotosintéticamente inactivo. En el caso del operon *psaA*, la acumulación de los cotranscritos a lo largo de la primera hoja también reveló el mismo patrón en ambos genotipos (**Figura II.13**). La acumulación de transcritos fue mayor en el ápice y centro que en la base de la hoja. Las hibridaciones usando una sonda *psaB* mostraron un patrón complejo con tres bandas diferentes. En cebada, *psaA* y *psaB* son co-transcritos en un transcrito de 5,3 kb (Berends *et al.*, 1987; Rapp *et al.*, 1992). La banda de 5.5 kb correspondería al mensaje tricistrónico y las bandas de menor tamaño a los transcritos procesados (Legen *et al.*, 2002).

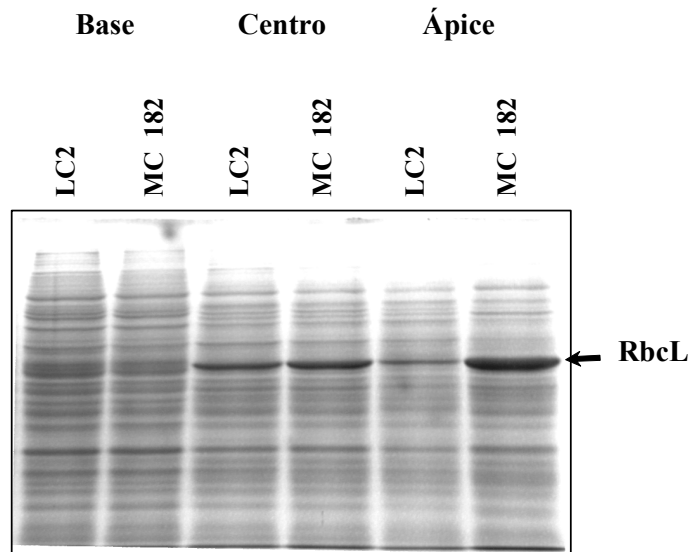
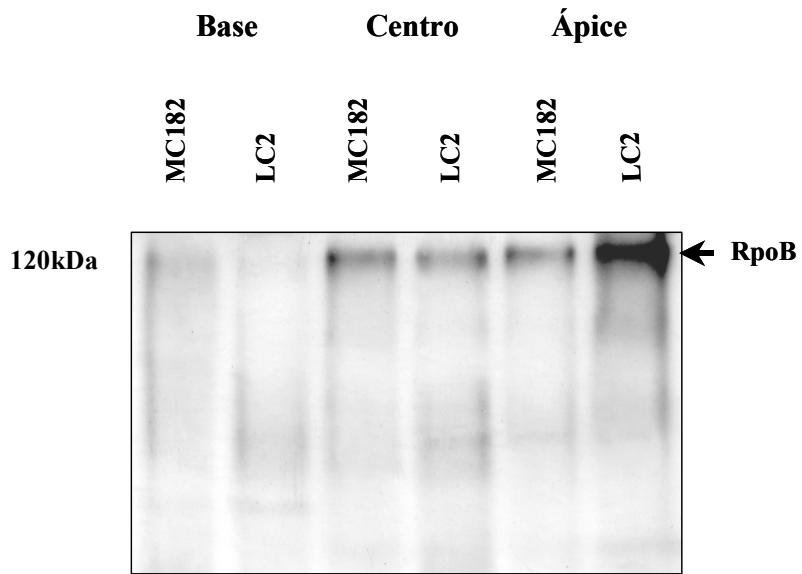
### **Inmunodetección de RpoB.**

El hallazgo de niveles idénticos de ARNm de los genes transcritos por la PEP en tejidos que difieren con respecto a la acumulación de transcritos de *rpoB*, nos llevó a analizar el producto del gen *rpoB*, una subunidad esencial de la PEP, al nivel de proteína. Se realizó un Western blot transfiriendo las proteínas totales extraídas de diferentes regiones de la primera hoja de LC2 y el control MC 182 a membranas de nitrocelulosa y tratando con un antisuero anti-RpoB producido contra un péptido sintético predicho a partir de la secuencia de RpoB de tabaco (Hegeman *et al.*, 2005). La acumulación de la proteína RpoB fue similar en la mutante y el control en todos los tejidos analizados, excepto una cantidad ligeramente mayor en la sección apical de LC2 comparada con las hojas de MC 182 (**Figura II.14**).

La escasa acumulación de la proteína RpoB en la región meristemática basal coincide con los resultados reportados por Kusumi *et al.*, (2004) quienes observaron baja acumulación de dos subunidades de PEP (la subunidad  $\alpha$  RpoA y el factor sigma OsSIG1) en la porción basal del vástago de arroz normal.

**Figura II.14**

**Inmunodetección de la proteína RpoB mediante Western blot usando un anticuerpo primario contra un péptido de tabaco. Panel inferior: proteínas totales teñidas con Coomassie como control de carga.**



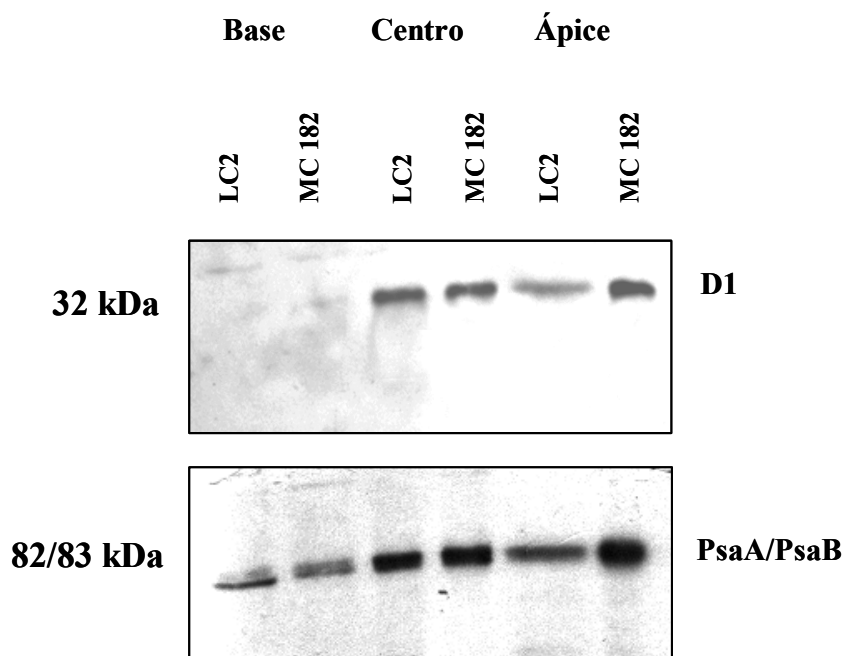
En la tinción de Coomassie (panel inferior de la **Figura II 14**) se observa una banda predominante correspondiente a la subunidad grande de Rubisco, RbcL. Esta proteína es codificada por el plastoma y traducida en los ribosomas cloroplásticos. Tal como se espera para la porción basal (Viro y Kloppstech, 1980; Kusumi *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004) RbcL presenta muy baja expresión en esa región de la primera hoja de LC2 y el control. En la región central del control y la mutante LC2 se observaron niveles similares de RbcL, en concordancia con los datos obtenidos para la acumulación de ARNr 16S (Figura II.12). Estos resultados sugieren un normal funcionamiento de los ribosomas plásticos ese sector de la primera hoja de LC2. Sin embargo, esto contrasta con la situación en las regiones apicales, donde los niveles de RbcL fueron distintivamente menores en las hojas de LC2 que en el control, soportando la idea de que la síntesis de proteínas está afectada en las partes superiores de la hoja de LC2.

#### **Acumulación de proteínas tilacoidales**

Para caracterizar la traducción plástica a lo largo del gradiente de desarrollo de la primera hoja, se realizó la inmunodetección de proteínas tilacoidales codificadas en el plastoma. Se estudiaron las proteínas D1, PsaA y PsaB codificadas por los genes *psbA* y *psaA* y *psaB* respectivamente, cuyos patrones de acumulación de ARNm fueron anteriormente determinados. La proteína D1, de 32 kDa, forma parte del centro de reacción del fotosistema II junto con la proteína D2, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del citocromo  $b_{559}$  y las proteínas codificadas por los genes *psbI* y *psbW* (Baena González y Aro, 2002). Las proteínas PsaA y PsaB, de 82 y 83 kDa respectivamente, forman el heterodímero PsaA/PsaB que inicia el ensamble del fotosistema I y controla la acumulación de las otras subunidades (Schwabe y Kruij, 2000). Se realizó un Western blot transfiriendo las proteínas tilacoidales extraídas de diferentes regiones de la primera hoja de LC2 y del control MC 182 a membranas de nitrocelulosa y tratando con anticuerpos anti-D1 y anti-PsaA/PsaB. En cebada, la expresión de estas proteínas aumenta a lo largo del gradiente de desarrollo desde la base al ápice de la primera hoja, acompañando el grado de desarrollo del aparato fotosintético (Funk *et al.*, 1995). En el caso de LC2, la acumulación de D1, PsaA y PsaB mostró niveles similares a los del control en la región central (**Figura II.15**). Por el

contrario, en la base y el ápice de LC2 se observó una menor acumulación de las tres proteínas respecto del control, contrastando con los resultados del análisis de Northern (Figura II.13) que mostró niveles de transcritos similares en ambos genotipos.

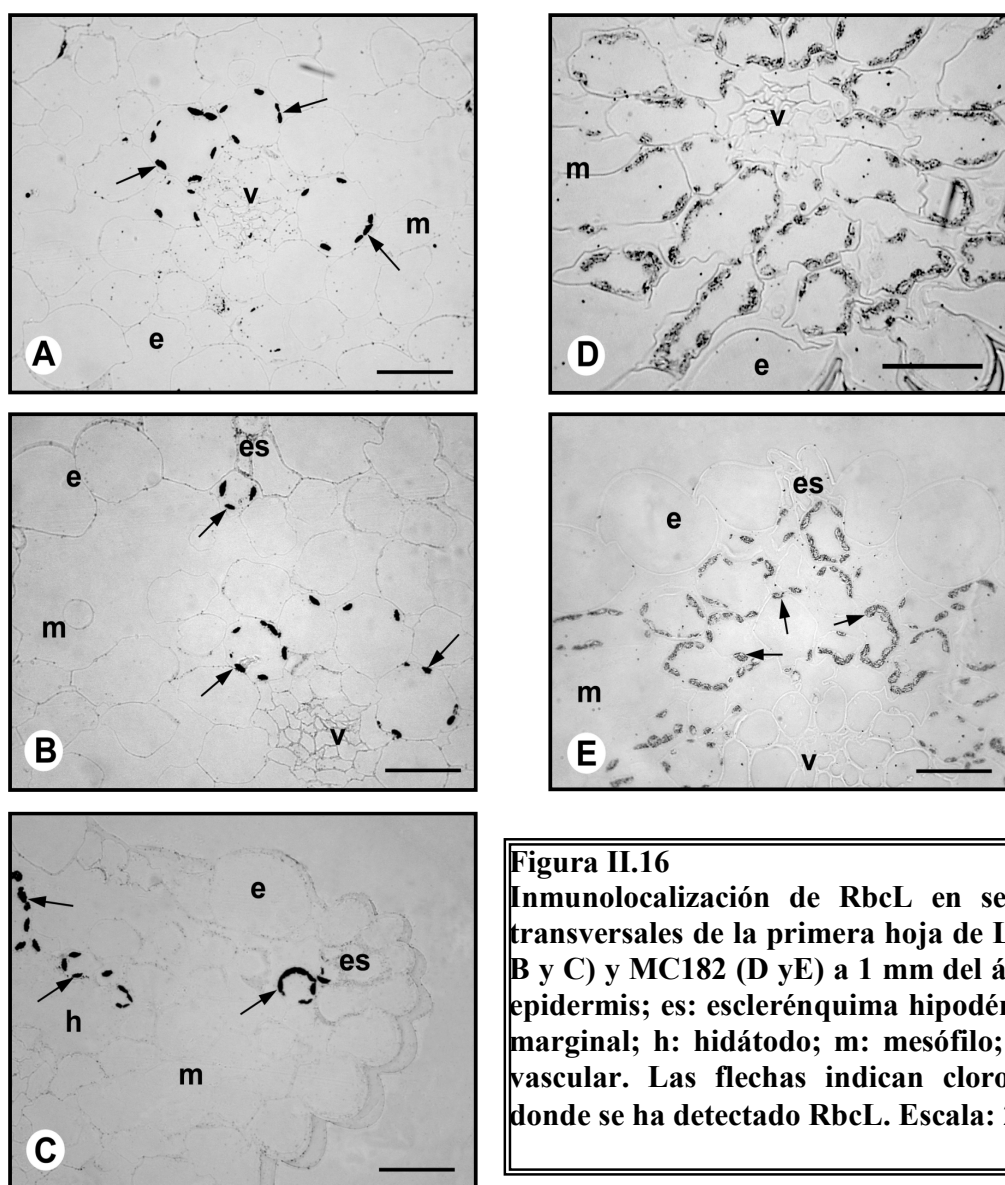
**Figura II.15**  
**Inmunodetección de las proteínas PsaA y PsaB mediante Western blot de proteínas tilacoidales con anticuerpos específicos.**



#### **Inmunolocalización de la subunidad grande de Rubisco y caracterización ultraestructural.**

La inmunolocalización de RbcL (subunidad grande de Rubisco) se realizó en células localizadas a 1 mm del ápice de las hojas primarias de 5-7 cm de LC2 y el control (Figura II.16). El objetivo fue investigar la distribución de una proteína codificada por un gen transcrito por la PEP y sintetizada en los ribosomas plastídicos. En LC2, RbcL presenta

un patrón de expresión diferencial en distintos sectores de la hoja. En los plástidos anormales del mesófilo no se detectó señal. En cambio, se observó acumulación de RbcL en cloroplastos de algunas células asociadas a estructuras vasculares como las de la vaina parenquimática (A y B) y aquéllas que rodean los hidátodos (C) y en células cercanas a cordones de esclerenquima, tanto hipodérmicos (B) como marginales (C). En el control RbcL fue detectada de forma homogénea en todos los cloroplastos de los distintos tipos celulares de la hoja (D y E).



**Figura II.16**  
**Inmunolocalización de RbcL en secciones**  
**transversales de la primera hoja de LC2 (A,**  
**B y C) y MC182 (D yE) a 1 mm del ápice. e:**  
**epidermis; es: esclerenquima hipodérmico o**  
**marginal; h: hidátodo; m: mesófilo; v: haz**  
**vascular. Las flechas indican cloroplastos**  
**donde se ha detectado RbcL. Escala: 25 μ.**



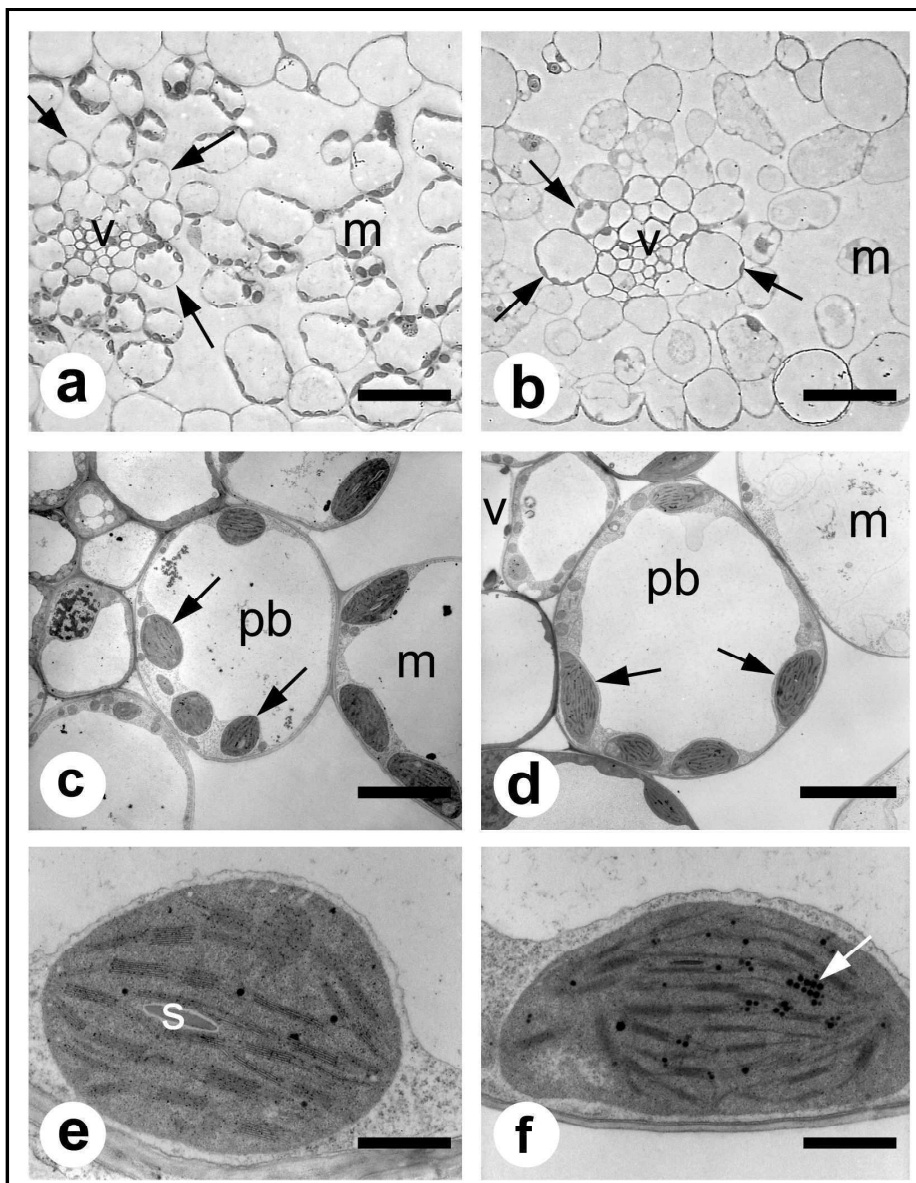
Este resultado se complementa con la caracterización ultraestructural de los mismos tejidos realizada en paralelo por microscopía óptica y electrónica (en colaboración con la Lic. Verónica Lainez, del Laboratorio de Embriología Vegetal, DBGE, FCEN, UBA) que revelaron diferencias en el desarrollo de los plástidos entre ambos genotipos (**Figura II.17**). En secciones transversales tomadas a 1 mm del ápice de la primera hoja, las células de mesófilo del control MC 182 mostraron una vacuola central y plástidos bien desarrollados (**Figura II.17a**). Las células de la vaina parenquimática del haz vascular (PBS) presentaron también cloroplastos normales, en menor número y de menor tamaño (**Figura II.17c y e**) tal como se espera en hojas de gramíneas tipo C3 (Esau, 1977).

En LC2, la mayoría de las células del mesófilo no contenían cloroplastos desarrollados (**Figura II.17b**). Algunas células de la vaina parenquimática de los haces vasculares, sin embargo, presentaron cloroplastos aparentemente normales con buen desarrollo de tilacoides y una vacuola central grande (**Figura II.17d y f**). A 5 mm del ápice de la primera hoja de LC2, el número de células con cloroplastos normales aumentó, generalmente asociadas con los haces vasculares más jóvenes y con las células del mesófilo más cercanas a la epidermis adaxial.

**Figura II.17**

**Desarrollo diferencial de los plástidos en el control MC 182 (a, c, e) y en LC2 (b, d, f) en secciones transversales tomadas a 1mm del ápice de la primera hoja.**

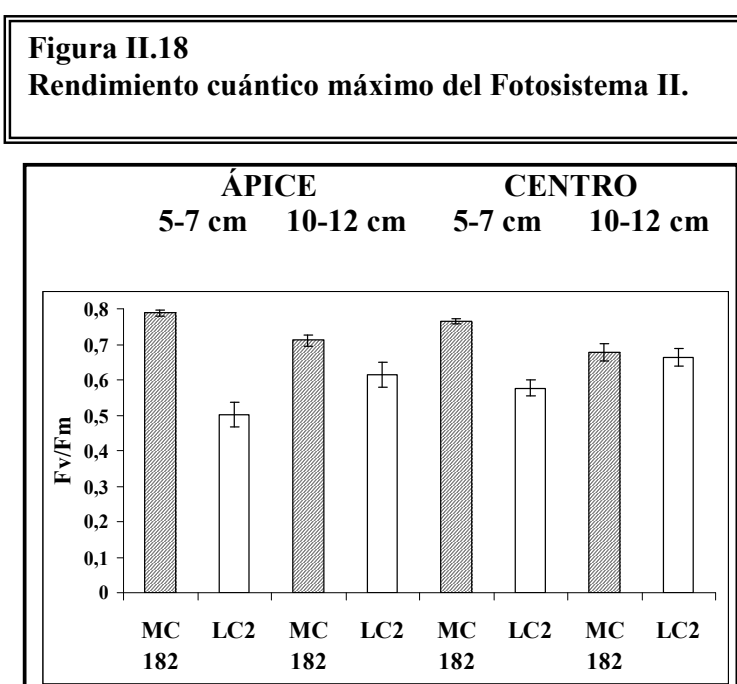
**a y b: Microscopía óptica. Escala: 50 $\mu$ ; c y d: Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de células PBS. Escala: 3,5  $\mu$  (c), 5  $\mu$  (d); e y f: TEM de cloroplastos de células PBS. Escala: 0,75 $\mu$ . Las flechas negras señalan cloroplastos y la flecha blanca plastoglóbulos. m: mesófilo, v: haz vascular, Pb: vaina parenquimática del haz, s: almidón.**



### Fluorescencia de clorofila.

Se usaron técnicas de fluorescencia de clorofila para caracterizar la eficiencia de la fotosíntesis en LC2, sobre la base de que es una vía complementaria a las vías alternativas e de-excitación de la energía absorbida: la fotoquímica y la disipación térmica.

El máximo rendimiento cuántico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) depende de la integridad del aparato fotosintético y, parcialmente, del contenido de pigmentos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura II.18**.

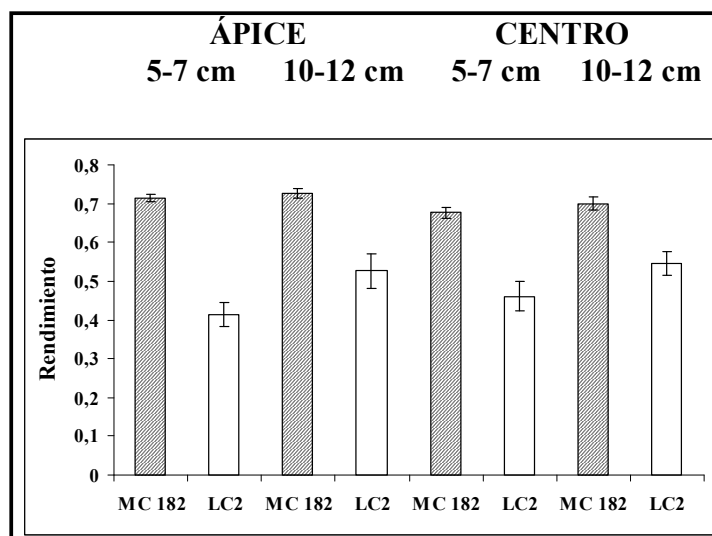


En el control MC 182, los valores de  $F_v/F_m$  fueron de  $\sim 0,8$  para los tejidos apical y central en la primera hoja de 5-7 cm de largo, en coincidencia con lo esperado para plantas no estresadas (Björkman y Demmig, 1987). En hojas de 10-12 cm, los valores de  $F_v/F_m$  fueron de  $\sim 0,7$ , a causa del daño causado por la manipulación en mediciones sucesivas. Las hojas primarias de 5-7 cm de LC2 mostraron una disminución de 37% y 25% respecto del control en las secciones apical y central, respectivamente. Cuando se analizaron hojas de 10-12 cm en comparación con las más jóvenes, los valores de  $F_v/F_m$  aumentaron en

ambos sectores, en coincidencia con la recuperación gradual del fenotipo normal observada en hojas más desarrolladas de la mutante.

El rendimiento cuántico aparente del fotosistema II es un indicador del uso actual de la energía absorbida en determinadas condiciones de crecimiento. En la **Figura II.19** se observa que en las hojas de 5-7 cm de LC2 este parámetro fue 42% y 32% menor que en el control MC 182 para los tejidos apical y central, respectivamente. En hojas más desarrolladas los valores se incrementaron pero siguieron siendo inferiores a los del control.

**Figura II.19**  
**Rendimiento cuántico aparente del Fotosistema II.**



## II.4) DISCUSIÓN

La mutante LC2 presenta un fenotipo tiempo-y-posición-dependiente, con plántulas albino a verde claro al germinar las que, durante el desarrollo subsiguiente, adquieren color verde gradualmente desde la base hacia el centro de la lámina de las hojas primarias. Cuando la primera hoja está totalmente desarrollada, la mayoría de su superficie es verde. Una pequeña zona cerca del ápice, sin embargo, usualmente permanece blanca o al menos verde más claro. El síndrome LC2 se caracteriza por un retraso en la síntesis de proteínas plastídicas en embriogénesis, asociado con un retraso -y algunas veces fracaso- en el desarrollo temprano de los cloroplastos y la formación de ribosomas plastídicos. Por lo tanto, la relación estrecha entre la posición de una célula dentro de la hoja y el desarrollo de los cloroplastos típica de las gramíneas está alterada en las hojas primarias de LC2 (Prina, 1996; Prina *et al.*, 2003).

LC2 es una mutante del gen plastídico *infA* (factor de inicio de la traducción 1), inducida por un gen mutador nuclear (Landau *et al.*, 2007). El sistema de traducción de los cloroplastos es muy similar al de los procariotas aunque también presenta algunas semejanzas con el núcleo-citosólico de los eucariotas (Sugiura, 1992; Zerges, 2000). En bacterias, el paso limitante para el inicio de la traducción es la formación de un complejo ternario entre la subunidad 30S con el ARNm, lo que requiere de la presencia de tres factores de traducción: IF1, IF2 e IF3 (Pon y Gualerzi, 1984; Stern *et al.*, 1997; Boelens y Gualerzi, 2002). El gen *infA* es el único de los genes bacterianos que codifican factores de inicio de traducción que tiene homólogos en el plastoma de algunas plantas superiores, como la cebada, mientras que en otras especies se encuentra en el núcleo y lleva un péptido señal que lo dirige al cloroplasto (Hirose *et al.*, 1999; Millen *et al.*, 2001). La proteína IF1, codificada por el gen *infA*, es esencial para *E.coli* y funciona interactuando con el sitio ribosomal A para facilitar el acceso del ARNt iniciador al sitio ribosomal P. La unión del IF1 altera la conformación de la subunidad ribosomal 30S y modula las interacciones 30S-IF2 y la asociación-disociación de las subunidades ribosomales en la célula bacteriana. Además, IF1 se une al ARNm en el sitio A y actúa como una chaperona de ARN (Dahlquist y Puglisi, 2000; Boelens y Gualerzi, 2002; Croitoru *et al.*, 2004, 2006; Laursen *et al.*,

2005). Por lo tanto, y teniendo presente además que en el cloroplasto la fase de iniciación es aquella en la que más frecuentemente ocurre la regulación de la traducción (Zerges, 2000), la mutación en el gen *infA* podría causar una menor eficiencia del inicio de la traducción en los plástidos de LC2. Esta baja eficiencia de la síntesis de proteínas en los plástidos de LC2 puede a su vez explicar la demora en el desarrollo de los cloroplastos en el estadio temprano del desarrollo de las hojas primarias (Prina *et al.*, 2003). Resultados previos mostraron que el número de ribosomas por plástido aumenta durante la biogénesis normal del cloroplasto (Smith, 1970; Bisanz-Seyer *et al.*, 1989). Dean y Leech, (1982) hallaron que los ARN ribosomales plastídicos aumentan 30 veces durante el desarrollo de la hoja en trigo y que el número de ribosomas 70S por célula aumenta 7 veces entre las 30 y las 48 horas siguientes al comienzo del desarrollo. Estos autores concluyeron que el período de más rápida síntesis de proteínas cloroplásticas claramente ocurre antes de completar el desarrollo del aparato fotosintético. La producción de ARNr plastídicos es un punto regulador clave en la producción de ribosomas y el nivel de éstos últimos puede limitar la capacidad de traducción, el crecimiento y el desarrollo (Rapp *et al.*, 1992).

La abundancia de ARN ribosomales plastídicos refleja la abundancia de ribosomas plastídicos ya que los ARNr no se detectan fuera del ribosoma en el cloroplasto normal (Williams y Barkan, 2003; Siemenroth *et al.*, 1981). La presencia de ARNr plastídicos en todas las regiones de la primera hoja de LC2, aunque en distintas cantidades respecto del control, sugieren que la mutante afecta la dinámica de la formación de ribosomas plastídicos. Dado que parte de las proteínas ribosomales son sintetizadas en los ribosomas plastídicos, se espera que una baja eficiencia de la traducción resulte en bajo número de ribosomas y bajos niveles de ARNr plastídico. Los menores niveles de ARNr plastídicos observados en las secciones basal y apical de las hojas primarias de LC2 en comparación con las hojas del control indican la presencia de un menor número de ribosomas plastídicos y, en consecuencia, una traducción afectada en esas partes de las hojas de la mutante.

Para comprobar este efecto sobre la traducción plastídica, se analizó la acumulación de proteínas de tilacoides codificadas por el plastoma. Las membranas tilacoides se extienden paralelas al eje principal del cloroplasto, formando vesículas chatas, algunas de las cuales aparecen individualmente -tilacoides estromáticas- y otras organizadas en pilas o granas,

con un espacio interno llamado lumen. En las membranas tilacoides se encuentran los cuatro principales complejos proteína-pigmento involucrados en las reacciones lumínicas de la fotosíntesis: los fotosistemas I y II, el complejo citocromo b6/f y la ATP sintetasa. El fotosistema I, que cataliza la oxidación-reducción plastocianina-ferredoxina inducida por la luz se localiza en las tilacoides estromáticas; el fotosistema II, que transfiere los electrones liberados de la oxidación del agua inducida por la luz a moléculas de plastoquinona, se encuentra casi exclusivamente en las granas; la ATP sintetasa, que produce ATP a expensas de la energía del gradiente de protones originado por las reacciones de transferencia de electrones, se ubica principalmente en las tilacoides estromáticas; el citocromo b6/f, que media el transporte de electrones entre el fotosistema II y el fotosistema I y convierte la energía redox en parte del gradiente de protones usado para la formación de ATP, se localiza en las granas y sus márgenes. Recientemente se ha demostrado que numerosas tilacoides estromáticas rodean y a menudo conectan oblicuamente a múltiples capas de tilacoides en granas (López Juez, 2005; Nelson y Yocum, 2006). Todos los complejos están formados por múltiples subunidades codificadas por el plastoma y por el núcleo. Por lo tanto, la síntesis coordinada y la inserción en la membrana de las subunidades codificadas en ambos compartimentos es un prerrequisito para el ensamble exitoso de los complejos. (Wollman *et al.*, 1999).

En este trabajo se analizó la acumulación de las proteínas tilacoidales PsaA y PsaB, componentes del heterodímero central del fotosistema I y D1, componente del centro de reacción del fotosistema II. Durante la biogénesis del cloroplasto, la luz induce la síntesis de PsaA, PsaB y D1 y el ensamble de los fotosistemas. En cloroplastos maduros se mantiene una elevada transcripción y traducción de los genes plastídicos que codifican para componentes del fotosistema II para sostener la actividad del complejo (Klein *et al.*, 1988; Gamble y Mullet, 1989), amenazada por radicales libre y especies activas de oxígeno, que causan daño irreversible al fotosistema. El diseño del fotosistema II permite que el daño se dirija principalmente a una sola subunidad, la proteína D1. Si bien otras subunidades del fotosistema II también son reemplazadas, D1 presenta la mayor tasa de “turn over” (Baena-González y Aro, 2002).

Nuestros resultados revelaron una menor acumulación de las proteínas tilacoidales D1 y PsaA y PsaB, en coincidencia con los menores niveles de ARNr plastídicos de la base y el ápice de la primera hoja de LC2 respecto del control, confirmando las observaciones previas (Prina, 2003). Estos resultados claramente muestran que la mutación en el gen *infA* no bloquea completamente la síntesis de proteínas en los plástidos, como ocurre en el caso de la cebada *albostrians*. Además, parece no interferir con la formación de ribosomas y la traducción en la sección central de la primera hoja. Por lo tanto, el normal funcionamiento de IF1 sería necesario solamente en el desarrollo temprano de la hoja, cuando se originan los cloroplastos a partir de los proplástidos. Resultados similares fueron obtenidos por Albrecht *et al.*, (2006), quienes caracterizaron la síntesis de proteínas cloroplásticas en cotiledones de *scoI*, una mutante del gen nuclear para el factor de elongación de la traducción G. de *Arabidopsis*. Estos autores encontraron niveles reducidos de RbcL y D1 en estadios tempranos del desarrollo, siendo la acumulación de los correspondientes transcritos similar a la del control.

Recientemente se ha comenzado a acumular evidencias sobre el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas plastídicas sobre la biogénesis del cloroplasto y el desarrollo de las plantas. Ahlert *et al.*, (2003) demostraron que la síntesis de proteínas plastídicas juega un rol esencial en el desarrollo de la hoja y en el desarrollo floral de tabaco. Por medio de la transformación de cloroplastos produjeron “knock-outs” de la traducción plastídica basados en la delección de un gen de resistencia a la espectinomicina inducida por recombinación homóloga (RIKT), obteniendo plantas quiméricas que, en presencia de inhibidores de la traducción mostraron anomalías severas del desarrollo.

Otra vía de aproximación a este tema se basa en el estudio de mutantes involucradas en el ensamble y funcionamiento del aparato de traducción. Entre ellas, las ya mencionadas mutantes del gen nuclear que codifica el factor de elongación de traducción G, *scoI* de *Arabidopsis thaliana*, han aportado nuevos conocimientos sobre el desarrollo de los cloroplastos durante la fase más temprana de la embriogénesis. Ruppel y Hangarter, (2007) seleccionaron y caracterizaron dos mutaciones por inserción de ADN-T en la secuencia codificante de *scoI*, que resultaron en un fenotipo letal embrionario, indicando que el factor de elongación G es esencial durante la embriogénesis. Además, caracterizaron otros dos



alelos del mismo gen, que mostraron fenotipos letales condicionados en estadio de plántula: si bien presentaban cotiledones e hipocótilo albinos y morían después de la germinación, eran capaces de producir hojas verdes fotosintéticamente activas a partir del meristema apical cuando crecían en presencia de sacarosa. Estos resultados revelaron que existen diferencias en los requerimientos de síntesis de proteínas plastídicas para la formación de los cloroplastos durante la germinación en comparación con la diferenciación de los cloroplastos en células derivadas del meristema apical (Ruppel y Hangarter, 2007).

Recientemente, Motohashi *et al.*, (2007) determinaron que otro componente del sistema de traducción plastídica, el factor de liberación de los ribosomas (AtcpRF1), también resulta esencial para el desarrollo de los cloroplastos. Estos autores analizaron una mutante albina de *Arabidopsis thaliana*, obtenida mediante el sistema de transposones *Activator/Dissociation (Ac/Ds)*, que presentaba una disrupción en el gen *AtcpRF1*. El análisis fisiológico de la mutante reveló que este gen tiene un rol esencial en la terminación de la traducción plastídica y en el desarrollo del cloroplasto. Además de estos resultados referidos a genes nucleares involucrados en la traducción plastídica, Legen *et al.*, (2007) han demostrado que los *trnC-GCA* y *trnN-GUU*, codificados por el plastoma, son esenciales para el desarrollo de los cloroplastos y la célula en *Arabidopsis*.

Para comprobar la hipótesis de que la mutante LC2 afecta la transcripción de genes nucleares y plastídicos se realizó un análisis de la acumulación de transcritos en un gradiente de desarrollo de la primera hoja de la mutante LC2 y el control. En este análisis se incluyeron los genes de las ARN polimerasas plastídica y mitocondrial codificadas por el núcleo, algunos genes transcritos por la NEP y algunos genes transcritos por la PEP.

Para este estudio se empleó la técnica de RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El campo de aplicaciones de esta metodología es muy amplio e incluye la medición de los niveles de expresión de ARN mensajeros, del número de copias de ADN, del número de copias de transgenes y análisis de expresión, discriminación alélica y medición de títulos virales (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002). La rápida evolución del instrumental y los reactivos empleados ha llevado a su aplicación extensiva en estudios de genómica funcional, medicina molecular y forense, virología, microbiología y biotecnología (Bustin *et al.*, 2005).

En relación con el motivo de nuestro estudio, este es el método más sensible para la detección y cuantificación de niveles de expresión génica, en particular para los ARN mensajeros de baja abundancia, en tejidos con bajas concentraciones de ARN mensajeros, muestras limitadas de tejido y para detectar pequeños cambios en los niveles de expresión (Bustin, 2000; Pfaffl *et al.*, 2002; Gachon *et al.*, 2004).

El análisis reveló que en el ápice de las hojas primarias de LC2, los ARN mensajeros de ambas ARN polimerasas y los correspondientes a los genes de “housekeeping” transcritos por NEP (*rpoB*, *clpP* y *rpl2*) se acumulan a niveles drásticamente mayores que en el control. Un aumento similar en la acumulación de *RpoTp* y genes transcritos por NEP fue observado en la cebada *albostrians* deficiente en ribosomas plastídicos (Emanuel *et al.*, 2004) y en sus fenocopias (Zukko y Day, 2002), en el arroz *vir-2*, una mutante con traducción plastídica afectada en el desarrollo temprano de los plástidos (Sugimoto *et al.*, 2004) y en el arroz *vir-1*, una mutante condicionada por la temperatura y deficiente en cloroplastos (Kusumi *et al.*, 2004). Este incremento en la expresión es muy probablemente una respuesta de las células de la hoja a la inhibición de la síntesis de proteínas, con el objeto de superar este defecto por la activación de la maquinaria de expresión génica. A pesar de que los altos niveles de transcritos de los genes de “housekeeping” pueden en parte estar causados por un aumento de su estabilidad (Rapp *et al.*, 1992; Baumgartner *et al.*, 1993), los niveles claramente aumentados de *RpoTp* sugieren que la mayor abundancia de la NEP es la responsable del efecto observado.

En la base de la primera hoja de LC2, donde también se observaron menores niveles de ARN ribosomales plastídicos, se determinó un aumento en la acumulación de transcritos de ambas ARN polimerasas nucleares y del gen plastídico *rpoB* (PEP). Sería necesario realizar un análisis microscópico adicional para completar la caracterización del estado de los plástidos en esta región.

Con respecto a la ARN polimerasa mitocondrial y en coincidencia con nuestros resultados en la región apical de la hoja primaria de LC2, Emanuel *et al.*, (2004) hallaron mayores niveles de transcritos para *RpoTm* en los plástidos albinos de la cebada *albostrians*, Estos autores encontraron también expresados diferencialmente los genes mitocondriales *coxII* y *atp9*. Si bien en este estudio no se incluyeron genes mitocondriales, es posible que el

aumento observado en la expresión de *RpoTm* se correlacione con una mayor expresión de genes mitocondriales en los sectores de la hoja primaria de LC2 con plástidos anormales.

Hedke *et al.*, (1999) estudiando la cebada *albostrians* y plantas de cebada normal tratadas con el inhibidor de la síntesis de carotenoides norflurazon, determinaron que la falta de actividad cloroplástica conduce a un incremento en el número de copias de genes mitocondriales y a un nivel elevado de sus transcritos. Estos resultados sugieren la existencia de una o varias señales que operan en las células de las hojas y coordinan la expresión génica de los genomas del núcleo, los plástidos y las mitocondrias. Es muy probable que estos procesos ocurran durante el desarrollo normal de las plantas, por ejemplo en la transición de células meristemáticas de la base de la hoja a células del mesófilo (Hedke *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 1998).

Los mayores niveles de transcritos de *RpoTp* y *RpoTm* en las secciones basal y apical de LC2 en comparación con el control normal resultarían de una señalización retrógrada del plástido al núcleo. El primer indicio de la existencia de señales plastídicas que afectan la expresión de genes nucleares fue obtenido por Bradbeer *et al.*, (1979) estudiando las concentraciones de las enzimas del ciclo de Calvin en la cebada *albostrians*. Posteriormente se demostró, en la misma mutante, una compleja alteración en los patrones de acumulación de ARN mensajeros de varios genes nucleares, en particular una fuerte represión de genes relacionados con la fotosíntesis (Hess *et al.*, 1991, 1992, 1994a), y se estableció que la regulación se ejercía a nivel transcripcional. Los mismos resultados se obtuvieron tratando plantas normales con inhibidores de la traducción plastídica (Oelmüller *et al.*, 1986; Adamska, 1995; Gray *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1998) Estos antecedentes revelan que la síntesis de proteínas reducida o aun ausente afecta la transcripción y la acumulación de transcritos de algunos genes nucleares debido a la señalización del estado de desarrollo y metabólico del plástido al núcleo.

Se han descrito tres vías de señalización retrógrada del plástido al núcleo. La mejor estudiada está relacionada con la acumulación en el plástido de un precursor de la clorofila, protoporfirina-Mg IX, que origina la regulación negativa de un centenar de genes en *Arabidopsis* (Susek *et al.*, 1993; Mochizuki *et al.*, 2001; Surpin *et al.*, 2002; Strand *et al.*, 2003; Strand, 2004); la segunda vía de señalización se relaciona con al inhibición de la

expresión genética del plástido (PGE) e incluye los efectos de la transcripción y la traducción plastídica sobre la expresión de genes de fotosíntesis (Gray *et al.*, 1995; Sullivan y Gray, 1999; Ahlert *et al.*, 2003; Pesaresi *et al.*, 2006); la tercera vía de señalización retrógrada comprende las señales derivadas del estado de reducción/oxidación (redox) de la cadena fotosintética de transferencia de electrones (PET), incluyendo el estado redox del “pool” de plastoquinonas y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y afectando la expresión tanto de genes nucleares relacionados con la fotosíntesis como de genes relacionados con la respuesta a estrés (Pfannschmidt, 2003; Pfannschmidt *et al.*, 2003; op den Camp *et al.*, 2003; Karpinski *et al.*, 1999; Yabuta *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2004). Recientemente Koussevitzky *et al.*, (2007) han presentado en *Arabidopsis* evidencia acerca de la integración de las tres vías de señalización retrógrada a través de dos componentes comunes a todas ellas: GUN1, una proteína del tipo repetición pentatricopéptido localizada en el cloroplasto y AB14, un factor de transcripción tipo AP2 (Apetala 2). Según el modelo propuesto por estos autores, GUN 1 genera o transmite una señal común al núcleo, lo que lleva a la represión de genes nucleares mediada por AB14. Un beneficio potencial de la convergencia en una vía común de las múltiples señales generadas en el plástido, es que permite el monitoreo de parámetros clave de un cloroplasto funcional, evitando las consecuencias potencialmente desastrosas del control ejercido por señales en conflicto sobre la expresión génica nuclear (Koussevitzky *et al.*, 2007).

La acumulación de genes transcriptos por PEP en la primera hoja de la mutante LC2 mostró resultados inesperados. Si asumimos que la traducción plastídica está afectada en el ápice de LC2, entonces la síntesis de PEP también se vería afectada y, en consecuencia, se esperaría una severa disminución de los transcriptos derivados de la PEP como se observó en las hojas albinas de la cebada *albostrians* (Emanuel *et al.*, 2004), en sus fenocopias (Zubko y Day, 2002) y en el arroz *vir-2* (Sugimoto *et al.*, 2004). Sin embargo, el gen *psbA* y el operon *psaA* mostraron una expresión comparable con la del genotipo control en el ápice de la primera hoja, sugiriendo que existe actividad de la PEP en ese tejido. Una hipótesis alternativa consideraría que la transcripción de los genes de fotosíntesis analizados fue conducida por la NEP y postularía el uso de promotores NEP alternativos, como se ha visto en otros sistemas desprovistos de PEP. Sin embargo, el tamaño del

cotranscripto del operon *psaA* en el tejido apical de LC2 (unos 5,5 kb) coincide con el observado en la cebada normal cuando es transcripto por la PEP, y no con aquéllos resultantes del uso de un promotor NEP localizado “upstream” del locus *ycf3* (7,5 y 9,5 kb) observado en sistemas deficientes en PEP (Legen *et al.*, 2002). El perfil de los ARN ribosomales plastídicos de los tejidos del ápice de LC2, soporta la hipótesis de que debería haber al menos algunos cloroplastos normales con ribosomas funcionales, donde se podría sintetizar la PEP, permitiendo así la acumulación de sus transcritos. De hecho, la inmunodetección reveló una acumulación aun mayor de RpoB en el ápice de la primera hoja de LC2 comparado con el control, lo que se corresponde con los muy superiores niveles de transcritos de *rpoB* en ese tejido de la mutante. Podría postularse, entonces, que los elevados niveles de transcritos compensarían el menor número de ribosomas en el mismo tejido, evidenciado por la baja cantidad de ARNr plastídicos. También se debe considerar que en el sector de 5 mm de tejido apical considerado como ápice en LC2, la proporción de células con cloroplastos normalmente desarrollados es mayor que la observada en secciones más distales (Láinez, com. pers.) y, por lo tanto, esos cloroplastos podrían contribuir a la acumulación observada de RpoB (PEP). Además, es posible especular que parte de la subunidad RpoB acumulada en el tejido apical de LC2 habría sido sintetizada y estabilizada durante la embriogénesis para soportar la transcripción en condiciones de traducción afectada. En este sentido, Demarsy *et al.*, (2006) han mostrado recientemente que PEP está ya presente en semillas secas de *Arabidopsis thaliana* y *Spinacia oleracea*. Resultados previos (Prina *et al.*, 2003) indicaron que la síntesis de proteínas plastídicas en la parte superior de la hoja primaria de plántulas de LC2 se afectaba de manera diferencial respecto del control por los tratamientos de semillas con antibióticos que inhiben la traducción procariota, sugiriendo que probablemente existe una divergencia temporal entre la síntesis de PEP en el embrión (Demarsy *et al.*, 2006) y la síntesis de proteínas plastídicas afectada por el síndrome de LC2 durante la embriogénesis (Prina *et al.*, 2003).

Con el objetivo de caracterizar la traducción plastídica en el ápice de la hoja primaria de LC2 se recurrió a técnicas de inmunohistoquímica complementadas con la caracterización ultraestructural por microscopía óptica y electrónica de transmisión. Este análisis sirvió

para describir la distribución espacial de los plástidos normales y mutantes en el ápice de la hoja primaria de LC2. Llamativamente, las células más distales -1 mm del ápice- de las hojas primarias mostraron un patrón de desarrollo completamente diferente del control. Estas células son las más viejas y se originaron durante la embriogénesis. En este sector se observan muchas células que fueron excluidas de los procesos de verdecimiento y normalización que ocurren en las otras regiones de la hoja primaria de LC2. En la mayoría de las células del mesófilo de ese tejido apical los plástidos carecían de sistemas de membranas tilacoides ordenadas y no mostraban acumulación de RbcL, demostrando su incapacidad para la síntesis de proteínas. Previamente se observó que por lo menos parte de los plástidos anormales en esta región de la hoja no contienen ribosomas en cantidades detectables por microscopía electrónica (Prina *et al.*, 2003). En la región apical de la hoja primaria de LC2 sólo unas pocas células asociadas a estructuras vasculares presentaban cloroplastos desarrollados y contenían RbcL, es decir, que su aparato de traducción era funcional.

El estudio del desarrollo diferencial entre las células de la vaina del haz y las del mesófilo en las hojas de especies de C<sub>3</sub> ha recibido poca atención en comparación con los sistemas de C<sub>4</sub> (Langdale *et al.*, 1989; Dengler *et al.*, 1994). En *Arabidopsis* -una planta C<sub>3</sub>- se ha demostrado un desarrollo diferencial entre ambos tipos de células mediante el estudio de la mutante *dov1* (Kinsman y Pyke, 1998). En esta mutante las células de la vaina del haz vascular presentan cloroplastos normales, mientras que en las células del mesófilo se observan cloroplastos anormales, con la morfología perturbada a nivel ultraestructural y en menor cantidad por célula. Al igual que la mutación *dov1*, LC2 parece afectar el desarrollo de los cloroplastos en las células del mesófilo y no en las de la vaina del haz vascular.

En cebada, las células de la vaina parenquimática del haz vascular (PBS) cumplen una función importante en el transporte de asimilados al floema (Williams *et al.*, 1989; Farrar *et al.*, 2000; Pollock *et al.*, 2000, 2003). Si bien en las plantas C<sub>3</sub> estas células tienen menos cloroplastos y éstos son más pequeños que los de las células del mesófilo (Kinsman y Pyke, 1998; Koroleva *et al.*, 2001; Ueno *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 2004), el desarrollo de las granas es similar en ambos tipos de cloroplastos (Yamane *et al.*, 2003, Yoshimura *et al.*, 2004). Asimismo, la proteína Rubisco se acumula tanto en los cloroplastos de las células de

la vaina como en los de las células del mesófilo en hojas maduras de cebada (Hong *et al.*, 2004) y arroz (Yamane *et al.*, 2003) aunque recientemente se ha establecido que en las células de la vaina parenquimática del haz vascular su ARN mensajero se transcribe en estadios tempranos de desarrollo y cesa en estadios tardíos (Tsutsumi *et al.*, 2006). Considerando que LC2 es una mutante del gen *infA*, componente del aparato de traducción del plástido, podríamos hipotetizar que el efecto diferencial en el desarrollo de los plástidos del mesófilo y la vaina del haz vascular se debe a que el requerimiento de síntesis de proteínas en estos últimos es menor, dado su menor número y tamaño. En este sentido, Majeran *et al.* (2005) realizaron una caracterización funcional de los cloroplastos de las células del mesófilo y de la vaina del haz en maíz (C<sub>4</sub>), usando proteómica comparativa. Entre las proteínas acumuladas preferentemente en las células del mesófilo, se encontraron varias proteínas ribosomales del cloroplasto, los factores de elongación de la traducción Tu y G, una proteína involucrada en un módulo regulador de la traducción a nivel de la estructura de la subunidad 30S y dos ribonucleoproteínas estromáticas cuya función sería la protección de los ARN mensajeros que no están siendo traducidos. Los autores señalan que es probable que la tasa de síntesis de proteínas sea mayor en los plástidos del mesófilo que en aquéllos de la vaina del haz vascular, y atribuyen la acumulación diferencial de estas proteínas a satisfacer estas mayores necesidades.

Para completar la caracterización de la mutante LC2 con datos sobre la eficiencia de fotosíntesis se realizó un análisis de fluorescencia de clorofila. Es un hecho bien conocido que la cinética de la emisión de fluorescencia de la clorofila es un indicador del desempeño fotosintético de las plantas (Mc Allister y Myers, 1940; Kautsky *et al.*, 1960) y que los parámetros de fluorescencia se relacionan directamente con la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> de las hojas (Genty *et al.*, 1989, 1990; Cornic y Ghashghaie, 1991; Harbison *et al.*, 1990; Krall *et al.*, 1991; Edwards y Baker, 1993; Siebke *et al.*, 1997). El principio de este análisis se basa en que la energía absorbida por las moléculas de clorofila puede ser usada en fotosíntesis (fotoquímica), disipada como calor o reemitida como luz (fluorescencia de clorofila). Los tres procesos son competitivos, de manera que cualquier aumento en la eficiencia de uno de ellos resultará en la disminución en el rendimiento de los otros dos (Maxwell y Johnson, 2000). En consecuencia, cualquier perturbación en el metabolismo

fotosintético (inducida por factores bióticos y abióticos) y aun alteraciones en procesos no directamente relacionados con la fotosíntesis, modificarán significativamente las características de la cinética de la emisión de fluorescencia de las plantas (Barbagallo *et al.*, 2003; Baker y Rosenquist, 2004).

La mutante LC2 presenta menor contenido de clorofila (Prina *et al.*, 2003) y menor acumulación de la proteína D1 -integrante del centro de reacción del fotosistema II- que el control normal, principalmente en la parte superior de la lámina de la primera hoja y por esta razón resultó de interés el análisis de los parámetros de fluorescencia de clorofila. El máximo rendimiento cuántico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) indica la máxima eficiencia a la cual la luz absorbida por las antenas del fotosistema II es convertida en energía química. Se estima midiendo la relación entre la fluorescencia mínima en un material adaptado a la oscuridad, cuando virtualmente todos los centros del fotosistema II están abiertos (correspondiente a la máxima oxidación de la quinona aceptora primaria  $Q_A$ ) y la fluorescencia máxima resultante después de aplicar un pulso de luz saturante, cuando virtualmente todos los centros están cerrados (máxima reducción de  $Q_A$ ). Este parámetro ha sido muy usado para detectar perturbaciones en el aparato fotosintético inducidas por estrés, ya que una caída del valor de  $F_v/F_m$  por debajo del óptimo es indicativa del desarrollo de fotodaño a los centros de reacción del fotosistema II, el cual reduce la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II. El segundo parámetro, rendimiento cuántico aparente del fotosistema II, provee una medida de la eficiencia cuántica del transporte lineal de electrones a través del fotosistema II a una determinada intensidad lumínica. Se obtiene mediante la medición de la relación entre la fluorescencia en un material adaptado a la luz y aquella resultante cuando todos los centros del fotosistema II están cerrados y permite estimar la eficiencia operativa de la fotoquímica de ese fotosistema bajo un determinado conjunto de condiciones ambientales. Este parámetro es levemente inferior a  $F_v/F_m$  en condiciones limitantes de luz y decrece rápidamente al alcanzarse la saturación lumínica (Genty *et al.*, 1989; Owens, 1996; Baker y Rosenquist, 2004).

La disminución observada en ambos parámetros en las hojas primarias de 5-7 cm de LC2 respecto del control, se corresponde con el gradiente anormal en el desarrollo de cloroplastos, con el menor contenido de clorofila reportado previamente en la hoja primaria



de LC2 (Prina *et al.* 2003) y con la menor acumulación de la proteína D1. Resultados similares se han obtenido al evaluar estos parámetros en plantas de tabaco cuya síntesis de clorofila es inhibida por la transformación con un gen antisentido (Matorin *et al.*, 1999), en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con varios herbicidas que afectan diferentes procesos metabólicos (Barbagallo *et al.*, 2003) y en mutantes de *Arabidopsis* que afectan la traducción plastídica y mitocondrial (Pesaresi *et al.*, 2006).

La utilidad de la fluorescencia para proporcionar una medición rápida, correcta y mínimamente invasiva de los cambios en una muestra particular a través del tiempo (Maxwell y Jonson, 2000, Murchie *et al.*, 1999) fue aprovechada en este trabajo para describir la evolución de la fotosíntesis en distintas regiones de la misma hoja primaria a lo largo del desarrollo. El empleo de las mismas hojas en mediciones sucesivas garantizó la comparación entre los registros obtenidos en hojas de 5-7 cm y en hojas de 10-12 cm de longitud. A pesar de que el desarrollo de los cloroplastos se ve afectado en los estadios tempranos del desarrollo de LC2, durante el crecimiento subsiguiente se observa el desarrollo de plástidos de estructura completamente normal en la parte central de la lámina foliar (Prina *et al.*, 2003). Esta recuperación se refleja en el aumento de los valores de los parámetros de fluorescencia estimados en las regiones central y apical de hojas más desarrolladas.

## II.5) CONCLUSIONES

-La mutante de cebada LC2 presentó un incremento en la transcripción de los genes nucleares de las ARN polimerasas plastídica y mitocondrial en las secciones basal y apical de la primera hoja que se explica como resultado de la señalización retrógrada del plástido al núcleo.

-En concordancia con el aumento en la expresión de la ARN polimerasa plastídica nuclear (NEP), los niveles de ARN mensajeros de genes plastídicos de “housekeeping” transcritos por ésta resultaron incrementados en las secciones basal y apical de la hoja primaria de la mutante.

-La ARN polimerasa plastídica (PEP) presentó una acumulación similar en la mutante LC2 y en el control a lo largo del gradiente de desarrollo de la primera hoja, produciendo patrones de transcritos comparables para los genes plastídicos de fotosíntesis.

-Se observó una menor acumulación de proteínas cloroplásticas en el sector apical y basal de la primera hoja de LC2 respecto del control, en coincidencia con menores niveles del ARN ribosomal plastídico 16S.

-La inmunolocalización de la subunidad grande de Rubisco en la región apical de la primera hoja de LC2 y el control permitió establecer que no sólo existe una expresión diferencial del síndrome en lo que respecta a la posición de las células a lo largo de la hoja, sino que existe también una expresión diferencial de las proteínas plastídicas entre células del mesófilo y aquéllas de la vaina parenquimática del haz vascular.

-Los parámetros de fluorescencia de clorofila reflejan la alteración en la fotosíntesis de la primera hoja de la mutante LC2 en etapas más tempranas y la recuperación de este proceso en un estadio más avanzado. Asimismo, este análisis confirma que LC2 retiene un grado de actividad fotosintética en el tejido apical, en concordancia con la presencia de algunos cloroplastos normales en dicho tejido.

-Los resultados son compatibles con una menor eficiencia en la traducción plastídica durante el desarrollo temprano de LC2.

-LC2 es una mutante útil para el estudio del efecto del plástido sobre la expresión concertada de los distintos genomas de la célula vegetal.

## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se avanzó sobre la caracterización del efecto del genotipo mutador de cloroplastos de cebada, determinando que no produce grandes cambios a nivel molecular. Si a este resultado se agregan los de análisis de secuenciación de algunas de las mutantes inducidas que sólo mostraron cambios a nivel de nucleótidos individuales, es posible pensar que el mutador en estudio induciría principalmente mutaciones de punto en el plastoma. Esta característica, sumada a su amplio espectro de acción, lo transforma en una valiosa herramienta para la exploración y explotación de la variabilidad genética del plastoma. Su utilidad para obtener series alélicas presenta una metodología alternativa y superadora respecto del “knock-out” génico, para identificar diversidad funcional en un genoma de alto grado de conservación. En este sentido, se abre la posibilidad de combinar la acción del mutador de cloroplastos con metodologías de detección de mutaciones de alta procesividad como el Tilling -Targeting Induced Local Lesions In Genomes- (McCallum *et al.*, 2000), con el objeto de revelar el potencial de variabilidad genética del plastoma que es hasta ahora poco conocido. Estas investigaciones ya forman parte de un Proyecto Específico Propio de Red (AEBIO 4461, INTA) en el cual se espera obtener tanto información básica sobre el espectro de mutaciones inducidas por el mutador en un locus en particular y en el plastoma en general, así como información funcional de genes candidatos relacionados con estrésemos abióticos.

Sin duda, una de las tareas pendientes para completar el estudio y aprovechamiento del gen mutador de cloroplastos de cebada es lograr la identificación del gen nuclear responsable. Al respecto, en este trabajo se postuló al mecanismo de reparación acoplada a la transcripción (TCR) como posiblemente involucrado y en el IGEAF (INTA) ya se comenzó el estudio de sus componentes (Pacheco, *com. pers.*).

Por otro lado, en este trabajo se realizaron estudios sobre una de las mutantes obtenidas a partir del genotipo mutador, codificada como LC2. Los resultados obtenidos apoyan la idea de que el gen *infA* interviene en la traducción plastídica y que la mutación presente en LC2 origina una deficiencia en la síntesis de proteínas en el desarrollo temprano de los plástidos (Landau *et al.*, 2007) siendo ésta la primera caracterización de la expresión molecular de

una mutante de este gen en plantas superiores. De esta manera, con este trabajo hemos recorrido un camino en dos direcciones, al estudiar el efecto que el núcleo ejerce sobre la estabilidad del genoma cloroplástico y al detectar efectos de la mutante de plastoma LC2 sobre la expresión de genes nucleares. En este sentido, se aportó nueva evidencia a un cuerpo de conocimientos que indica que la traducción plastídica, directa o indirectamente, interviene en una de las vías de señalización retrógrada (Gray *et al.*, 1995; Sullivan y Gray, 1999; Ahlert *et al.*, 2003; Pesaresi *et al.*, 2006).

Finalmente, considerando el creciente interés de utilizar al genoma del plastidio como blanco de la biotecnología (Leister, 2003; Devine y Daniell, 2004; Maliga, 2004; Bock, 2007), en términos generales puede decirse que los resultados obtenidos aportan significativamente al conocimiento sobre la generación de nueva variabilidad de interés y sobre aspectos novedosos de la expresión de los genes del plastoma y del núcleo durante el desarrollo del cloroplasto.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adamska I (1995) Regulation of early light-inducible protein gene expression by blue and red light in etiolated seedlings involves nuclear and plastid factors. *Plant Physiol.* 107:1167–1175
- Ahlert D, Ruf S y Bock R (2003) Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:15730–15735
- Albrecht V, Ingenfeld A y Apel K (2006) Characterization of the snowy cotyledon 1 mutant of *Arabidopsis thaliana*: the impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality. *Plant Mol. Biol.* 60:507–518
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Eds) (2002) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. Vol 1. Suppl. 59: 2.1.1-2.1.10
- Azevedo J, Courtois F y Lerbs-Mache S (2006) Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts. *Nucl. Acids Res.* 34:436–444
- Baena-González E y Aro EM (2002) Biogenesis, assembly and turnover of photosystem II units. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357:1451–1460
- Baker NR y Rosenquist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. of Exp. Bot.* 55:1607–1621
- Barbagallo RP, Oxborough K, Pallett KE y Baker NR (2003) Rapid, non-invasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 132:485–493
- Baross-Francis A, Makhani N, Liskay RM, Jirik FR (2001) Elevated mutant frequencies and increased C:G→T:A transitions in Mlh1<sup>-/-</sup> versus Pms2<sup>-/-</sup> murine small intestinal epithelial cells. *Oncogene* 20:619–625
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196:80-83
- Bauer J, Hiltbrunner A y Kessler F (2001) Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:420-433

- Baumgartner BJ, Rapp JC y Mullet JE (1989) Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development. *Plant Physiol.* 89:1011-1018
- Baumgartner BJ, Rapp JC y Mullet JE (1993) Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development (evidence of selective stabilization of *psbA* mRNA). *Plant Physiol.* 101:781-791
- Baur E (1909) Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der “Varietates albomarginatae hort” von *Pelargonium zonale*. *Zschr. Induct. Abstammungs-Vererbungs* 1:330-351
- Baur, E. (1910) Untersuchungen über die Vererbung von Chromatophorenmerkmalen bei *Melandrium*, *Antirrhinum* und *Aquilegia*. *Zschr. Induct. Abstammungs-Vererbungs* 4:81-102
- Beck CF (2001) Signalling pathways in chloroplast-to-nucleus communication. *Protist* 152:175 –182
- Beck CF (2005) Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta* 222:743-756
- Beck CF y Grimm B (2005) Involvement of tetrapyrroles in cellular regulation. En: Grimm B, Porra RJ, Rüdiger W, Scheer H (eds) *Biochemistry, Biophysics and Biological Functions of Chlorophylls*. Springer, The Netherlands.
- Beidler JL, Hilliard, PR y Rill RL (1982) Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* 126:374-380
- Bendich AJ (2004) Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *The Plant Cell* 16:1661-1666
- Berends T, Gamble PE y Mullet JE (1987) Characterization of the barley chloroplast transcription units containing *psaA-psaB* and *psaD-psaC*. *Nucl. Acids Res.* 15:5217-5240
- Bisanz-Seyer C, Li Y-F, Seyer P y Mache R (1989) The components of the plastid ribosome are not accumulated synchronously during the early development of spinach plants. *Plant Mol. Biol.* 12:201-211

- Björkman O y Demmig D (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence at 77k among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489-504
- Bock R (2007) Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr. Op. in Biotech.* 18:100–106
- Bock R (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J. Mol. Biol.* 312: 425-438
- Boelens R y Gualerzi CO (2002) Structure and function of bacterial initiation factors. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 3:107–119.
- Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS y Hanawalt PC (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40:359-369
- Bookjans G, Stummann BM y Henningsen KW (1984) Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength. *Anal. Biochem.* 141:244–247
- Börner T, Manteuffel R y Welburn AR (1979) Enzymes of plastid ribosome-deficient mutants. Chloroplast ATPase (CF<sub>1</sub>). *Protoplasma* 98:153-161
- Börner T, Schumann B y Hagemann R (1976) Biochemical studies on a plastid ribosome-deficient mutant of *Hordeum vulgare*. En: Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria (Bücher T, Neupert W, Sebald W y Werner S, eds.) Amsterdam: Elsevier/North Holland, pp 41-48
- Börner T y Sears B. (1986) Plastome mutants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 4:69-92
- Boyer SK y Mullet JE (1988) Sequence and transcription map of barley chloroplast *psbA* gene. *Nucl. Acids Res.* 16:8184
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR *et al.* (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240:1534-1538
- Bradbeer JW, Atkinson, I, Börner T y Hagemann R (1979) Cytoplasmic synthesis of plastid polypeptides may be controlled by plastid-synthesised RNA. *Nature* 279: 816 – 817
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. End.* 25:169–193

- Bustin SA, Benes V, Nolan T y Pfaffl MW (2005) Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. End.* 34:597–601
- Cahoon AB, Harris FM y Stern DB (2004) Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type. *EMBO reports* 5:801-806
- Cavalier-Smith T (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Sci.*5:174-182
- Cerutti H, Johnson AM, Boynton JE y Gilham NW (1995) Inhibition of chloroplast DNA recombination and repair by dominant negative mutants of *Escherichia coli* RecA. *Mol. Cell Biol.* 15:3003-3011
- Cerutti H, Osman M, Grandoni P y Jagendorf AT (1992) A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8068-8072
- Chaley N y Possingham JV (1981) Structure of constricted proplastids in meristematic plant tissues. *Biol. Cell* 41:203-210
- Chang CC, Sheen J, Bligny M, Niwa Y, Lerbs-Mache S y Stern DB (1999) Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell* 11:911-926
- Chang TL, Stoike LL, Zarka D, Schewe G, Chiu WL, Jarrell DC y Sears BB (1996) Characterization of primary lesions caused by the plastome mutator of *Oenothera*. *Curr. Genet.* 30:522-530
- Chen RH, Maher VM, Brouver J, van de Putte P y Mc.Cormick JJ (1992) Preferential repair and strand-specific repair of benzo [a] pyrene diol epoxide adducts in the HPRT gene of diploid human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89:5413-5417
- Chitnis PR (2001) Photosystem I: function and physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:593-626
- Chiu W-L, Johnsonn EM, Kaplan SA, Blasko K, Sokalsky M, Wolfson R y Sears BB (1990) *Oenothera* chloroplast DNA polymorphisms associated with plastome mutator activity. *Mol. Gen. Genet.* 221:59-64
- Chun EHL, Vaugham MH y Rich A (1963) The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. *J. Mol. Biol.* 7:130-141



- Clegg MT, Gaut BS, Learn GH Jr, Morton BR. (1994) Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 6795-6801
- Colombo N, Ríos RD y Prina AR (2006) Plastome analysis of barley chloroplast mutator-induced mutants. *J. Basic Appl. Genet.* 17:5-9
- Cornic G y Ghashghaie J (1991) Effect of temperature on net CO<sub>2</sub> assimilation and photosystem II quantum yield on electron transfer of French bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) during drought stress. *Planta* 183:178–184
- Correns C (1909) Vererbungsversuche mit blass (gelb) grünen und buntblättrigen Sippen bei *Mirabilis jalapa*, *Urtica pilulifera* und *Lunaria annua*. *Zschr. Induct. Abstamm-Vererb. Lehre* I:291-329
- Corriveau JL, y Coleman AW (1988) Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 Angiosperm species. *An. J. Bot.* 75:1443-1458
- Croitoru V, Bucheli-Witschel M, Hägg P, Abdulkarim F y Isaksson LA (2004) Generation and characterization of functional mutants in the translation initiation factor IF1 of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 271:534–544
- Dahlquist KD y Puglisi JD (2000) Interaction of translation initiation factor IF1 with the *E. coli* ribosomal A site. *J. Mol Biol.* 299:1–15
- Day A y Ellis THN (1984) Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. *Cell.* 39:359–368
- Day A y Ellis THN (1985) Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr. Genet.* 9:671-678
- Dean C y Leech RM (1982) Genome expression during normal leaf development. I. Cellular and chloroplast numbers and DNA, ARN and protein levels in tissues of different ages within a seven-day-old wheat leaf. *Plant Physiol* 69:904-910
- Demarsy E, Courtois F, Azevedo J, Buhot L y Lerbs-Mache S (2006) Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiology* 142:993–1003

- Demesure B, Sodzi N, Petit RJ (1995) A set of universal primers for amplification of non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4:129-131
- Dengler N, Dengler R, Donnelly P y Hattersley P (1994) Quantitative leaf anatomy of C3 and C4 grasses (Poaceae): Bundle sheath and mesophyll surface area relationships. *Ann. Bot.* 73:241-255
- Devine A y Daniell H (2004) Chloroplast genetic engineering. En: *Plastids* (S. Moller Ed.), Blackwell Publishers, Reino Unido Capítulo 10, pp 283-320
- Draper CK y Hays JB (2000) Replication of chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA during growth of unirradiated and UVB-irradiated *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 23:255-265
- Dyall SD, Brown MT y Johnson PJ (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 340:253–257
- Emanuel C, von Groll U, Müller M, Börner T y Weihe A (2006) Development-and tissue-specific expression of the RpoT gene family of *Arabidopsis* encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases. *Planta* 223:998–1009
- Emanuel C, Weihe A, Graner A, Hess W y Börner T (2004) Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant J.* 38:460-472
- Epp MD (1973) Nuclear gene-induced plastome mutations in *Oenothera hookeri* I. Genetic analysis. *Genetics* 75:465-483
- Epp MD, Erion JL, Sears BB, Stubbe W (1987) The plastome mutator of *Oenothera* continues to function as originally described. *Mol. Gen. Genet.* 206:515-518
- Esau K (1977) *Anatomy of Seed Plants*, 2nd edn. John Wiley and Sons, New York, USA, pp 351–374
- Fankhauser C y Chory J (1997) Light control of plant development. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13:203-229
- Farrar J, Pollock C y Gallagher J (2000) Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Sci.* 154:1–11
- Fleck O. y Nielsen O. (2004) DNA repair. *J. of Cell Sci.* 117:515-517

- Fujie M, Kuroiwa H, Kawano S y Kuroiwa T (1994) Behaviour of organelles and their nucleoids in the shoot apical meristem during leaf development in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* 194:394-405
- Funk C, Adamska I, Green BR, Andersson B y Renger G (1995) The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *J. Biol. Chem.* 270:30141–30147
- Gachon C, Mingam A y Charrier B (2004) Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J. Experim. Bot.* 55:1445–1454
- Gamble PE, Sexton TB y Mullet JE (1988) Light-dependent changes in *psbD* and *psbC* transcripts of barley chloroplasts: accumulation of two transcripts maintains *psbD* and *psbC* translation capability in mature chloroplasts. *EMBO J.* 7:1289-1297
- Gamble PE y Mullet JE (1989) Translation and stability of proteins encoded by the plastid *psbA* and *psbB* genes are regulated by a nuclear gene during light-induced chloroplast development in barley. *J. Biol. Chem.* 264:7236-7247
- Genty B, Briantais JM y Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87–92
- Genty B, Harbinson J y Baker NR (1990) Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 28:1–10
- Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30:503-512
- Gothandam KM, Kim ES, Cho HJ y Chung YY (2005) OsPPR1, a pentatricopeptide repeat protein of rice is essential for the chloroplast biogenesis. *Plant Mol. Biol.* 58:421-433
- Gray JC (2003) Chloroplast-to-nucleus signalling: a role for Mg- protoporphyrin. *Trends Genet.* 19:526 –529
- Gray JC, Sullivan JA, Wang JH, Jerome CA y MacLean D (2003) Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci* 358:135–144
- Gray MW (1989) The evolutionary origin of organelles. *Trends Genet.* 5:294-299

- Gray MW (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int.Rev. Cytol.* 141:233-357
- Gray MW (1999) Evolution of organellar genomes. *Curr. Opin. Gen. and Dev.* 9:678-687
- Gray JC, Sornarajah R, Zabron AA, Duckett CM y Khan MS (1995) Chloroplast control of nuclear gene expression. En: *Photosynthesis, from Light to Biosphere*, P. Mathis, (ed) Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp 543–550
- Grompe M (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat. Genet.* 5:111-117
- Guevara-García A, San Román C, Arroyo A, Cortés ME, Gutiérrez-Nava ML y Leon P (2005) Characterization of the *Arabidopsis clb6* mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Cell* 17:628–643
- GuhaMajumdar M y Sears BB (2004) Chloroplast DNA base substitutions: an experimental assessment. *Mol. Gen. Genomics* 273:177–183
- Gutiérrez-Nava ML, Gillmor CS, Jiménez LF, Guevara-García A y Leon P (2004) Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant Physiol.* 135:471–482
- Hagemann R y Scholz F (1962) Ein Fall Gen-induzierter Mutationen des Plasmotyps bei Gerste. *Züchter* 32:50-59
- Hagemann R (1986) A special type of nucleus–plastid-interactions: nuclear gene induced plastome mutants. En: *Regulation of Chloroplast Differentiation* (G Akoyunoglou & H Senger eds.), pp 455–466
- Hagemann R, y Börner Th (1978) Plastid ribosome-deficient mutants as a tool in studies on chloroplast biogenesis. En: *Chloroplast Development*. G. Akoyunoglou y J.H. Argyroudi-Akoyunoglou. (Eds.). Elsevier/Nort-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp.709-720
- Hajdukiewicz PTJ, Allison LA y Maliga P (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.* 16:4041-4048

- Hanaoka M, Kanamaru K, Fujiwara M, Takahashi H y Tanaka K (2005) Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. *EMBO reports* 6:545-550
- Harbinson J, Genty B y Baker NR (1990) The relationship between CO<sub>2</sub> assimilation and electron transport in leaves. *Photosynth. Res.* 25:213–224
- Harfe BD, Jinks-Robertson S (2000) DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu. Rev. Genet.* 34:359–399
- Hastings PJ, Quah SK y Börstel RC (1976) Spontaneous mutations by mutagenic repair of spontaneous lesions in DNA. *Nature* 264:719-722
- Hayashi K (1991) PCR\_SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1:34-38
- Hedtke B, Börner T y Weihe A (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277:809-811
- Hedtke B, Legen J, Weihe A, Herrmann RG y Börner T (2002) Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* 30:625-637
- Hedtke B, Wagner I, Börner T y Hess WR (1999) Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels. *Plant J.* 19:635-643
- Hegeman CE, Halter CP, Owens TG y Hanson MR (2005) Expression of complementary RNA from chloroplast transgenes affects editing efficiency of transgene and endogenous chloroplast transcripts. *Nucleic Acids Res.*33:1454-1464
- Heinhorst S, Cannon GC y Weissbach A (1990) Chloroplast and mitochondrial DNA polymerases from cultured soybean cells. *Plant Physiol.* 92:939-945
- Herrmann RG, Maier RM y Schmitz-Linneweber c (2002) Eukaryotic genome evolution: rearrangement and coevolution of compartmentalized genetic information. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (2003) 358: 87–97
- Hess WR y Börner T (1999) Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cyt.* 190:1-59
- Hess WR, Müller A, Nagy F y Börner T (1994a)) Ribosome deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal. *Mol. Gen. Genet.* 242:305-312

- Hess WR, Hoch B, Zeltz P, Hübschmann T, Kössel H y Börner T (1994b) Inefficient *rpl2* splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids. *Plant Cell*, 6:1455-1465
- Hess WR, Prombona A, Fieder B, Subramanian AR y Börner T (1993) Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *EMBO J.* 12:563-571
- Hess WR, Schendel R, Börner T y Rüdiger W (1991) Reduction of mRNA level for two nuclear encoded light regulated genes in the barley mutant *albostrians* is not correlated with phytochrome content and activity. *J. Plant Physiol.* 138:292–298
- Hess WR, Schendel R, Rüdiger W, Fieder B y Börner T (1992) Components of chlorophyll biosynthesis in a barley *albina* mutant unable to synthesize aminolevulinic acid by utilizing the transfer RNA for glutamic acid. *Planta* 188:19-27
- Hess WR, Linke B y Börner T (1997) Impact of plastid differentiation on transcription of nuclear and mitochondrial genes. En: H.E.A. Schenk, R.G. Herrmann, K.W. Jeon, N.E. Müller, W. Schwemmler (eds.), Springer, pp 233-242
- Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun CR, Meng BY, Li YQ, Kanno A, Nishizawa Y, Hirai A, Shinozaki K y Sugiura M (1989) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217: 185-194
- Hirose T, Ideuea T, Wakasugi T y Sugiura M (1999) The chloroplast *infA* gene with a functional UUG initiation codon. *FEBS Lett.* 445:169-172
- Hirose T y Sugiura M (1997) Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J.* 16:6804–6811
- Hong J, Wang WB, Jiang DA y Hu DW (2004) The immunogold localization of Rubisco and its activase in chloroplasts of barley and maize leaves. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 30:561-568

- Horst JP, Wu T-H y Marinus MG (1999) *Escherichia coli* mutator genes. Trends Microbiol. 7:29-36
- Howland GP, Hart RW y Yette ML (1975) Repair of DNA strand breaks after gamma-irradiation of protoplasts isolated from cultured wild carrot cells. Mut. Res. 1: 81-87
- Hricová A, Quesada V y Micol JL (2006) The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 141:942–956
- Hübschmann T y Börner T (1998) Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. Plant Mol. Biol. 36:493-496
- Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K y Quail PH (2004) Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. Science 305:1937–1941
- Ikeda TM y Gray MW (1999) Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. Plant Mol. Biol. 40:567-578
- Ishizaki Y, Tsunoyama Y, Hatano K, Ando K, Kato K, Shinmyo A, Kobori M, Takeba G, Nakahira Y y Shiina T (2005) A nuclear-encoded sigma factor, *Arabidopsis* SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. Plant J. 42:133–144
- Iwahana H, Yoshimoto K y Itakara M (1992) Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. Biotechniques 12:64
- Juniper BE y Clowes FAL (1965) Cytoplasmic organelles and cell growth in root caps. Nature 208:864-865
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G y Mullineaux P (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. Science 284:654 –657
- Kautsky H, Apel W y Amann H (1960) Chlorophyllfluorescenz und Kohlensaureassimilation. Biochem Z 322: 277–292
- Khan MS (2005) Unraveling the complexities of plastid transcription in plants. Trends Biotechnol. 23:535-538

- Kim T-H, Kim B-Y y von Amim AG (2002) Repressors of photomorphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 220:185-223
- Kimura S, Uchiyama Y, Kasai N, Namekawa S, Saotome A, Ueda T, Ando T, Ishibashi T, Oshige M, Furukawa T, Yamamoto T, Hashimoto J y Sakaguchi K. (2002) A novel DNA polymerase homologous to *Escherichia coli* DNA polymerase I from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Nucleic Acids Res.* 30:1585-1592
- Kinsman EA y Pyke KA (1998) Bundle sheath cells and cell-specific plastid development in *Arabidopsis* leaves. *Development* 125:1815-1822
- Kirk JTO y Tilney-Basset RAE (1978) The plastids. Elsevier, North Holland, Amsterdam
- Klein RR y Mullet JE (1986) Regulation of chloroplast-encoded chlorophyll-binding protein translation during higher plant chloroplast biogenesis. *J. Biol. Chem.* 261:11138-11145
- Klein RR y Mullet JE (1987) Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis: protein synthesis and transcript levels of *psbA*, *psaA-psaB*, and *rbcL* in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Biol. Chem.* 262:4341-4348
- Klein R, Mason HS y Mullet JE (1988) Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *PsaA-PsaB*, *PsbA*, and *RbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Cell Biol.* 106: 289-301
- Klein RR y Mullet JE (1990) Light-induced transcription of chloroplast genes. *psbA* transcription is differentially enhanced in illuminated barley. *J. Biol. Chem.* 265:1895-1902
- Knoth R y Hagemann R (1977) Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden und der electronenmikroskopischen Nachweis echter Mischzellen in Blättern der Plastommutationen auslösenden Genmutante albostrians von *Hordeum vulgare* L. *Biol Zentralbl.* 96:141-150
- Kobayashi Y, Dokiya Y y Sugita M (2001) Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:1106-1113



- Koroleva OA, Tomos AD, Farrar JF, Roberts P y Pollock CJ (2001) Tissue distribution of primary metabolism between epidermal, mesophyll and parenchymatous bundle sheath cells in barley leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 27:747-755
- Koussevitzky K, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R y Chory J (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316:715-719
- Kozak M (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in Procaryotes, Eucaryotes, and Organelles. *Microbiol. Rev.* 47:1-45
- Krall JP, Edwards GE y Ku MSB (1991) Quantum yield of photosystem II and efficiency of CO<sub>2</sub> fixation in *Flaveria* (Asteraceae) species under varying light and CO<sub>2</sub>. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:369-383
- Krause K, Maier RM, Kofer W, Krupinska K y Herrmann RG (2000) Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 263:1022-1030
- Kuhn K, Bohne A-V, Liere K, Weihe A y Börner T (2007) *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: accurate *in vitro* transcription of organellar genes. *Plant Cell*: 959-971
- Kusumi K, Yara A, Mitsui N, Tozawa Y y Iba K (2004) Characterization of a rice nuclear-encoded plastid RNA polymerase gene *OsRpoTp*. *Plant Cell Physiol.* 45:1194-1201
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lam, E. y Chua N-H. (1987) Chloroplast DNA gyrase and *in vitro* regulation of transcription by template topology and novobiocin. *Plant Mol. Biol.* 8:415-424
- Landau A, Díaz Paleo A, Civitillo R, Jauregui-alzo M y Prina AR (2007) Two *infA* gene mutations independently originated from a mutator genotype in barley. *J. Hered.* 98:272-276
- Langdale J A, Lane B, Freeling M y Nelson T (1989) Cell lineage analysis of maize bundle sheath and mesophyll cells. *Dev. Biol.* 133:128-139
- Laursen BS, Sorensen HP, Mortensen KK y Sperling-Petersen HU (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:101-123

- Legen J, Kemp S, Krause K, Profanter B, Herrmann RG y Maier RM (2002) Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP deficient transcription machineries. *Plant J.* 2:171-188
- Legen J, Wanner G, Herrmann RG, Small I, Schmitz-Linneweber C (2007) Plastid tRNA genes trnC-GCA and trnN-GUU are essential for plant cell development. *Plant J.* 51:751-762
- Leister D (2005) Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in *Arabidopsis*. *Gene* 354:110–116
- Leister D (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet.* 19:47-56
- Lerbs-Mache S (1993) The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNAdependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5509–5513
- Liere K y Maliga P (1999) *In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J.*18:249–257
- Liere K y Börner T (2007) Transcription of plastid genes. En: Grasser KD (ed) *Regulation of Transcription in Plants*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 184-223
- Liere K, Kaden I, Maliga P y Börner T (2004) Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type. *Nucleic Acids Res.* 32:1159-1165
- Lopez-Juez E (2007) Plastid biogenesis, between light and shadows. *J. Exp. Bot.* 58:11-26
- Lopez-Juez E y Pyke KA (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49:557-577
- Loschelder H, Schweer J, Link B y Link G (2006) Dual Temporal Role of Plastid Sigma Factor 6 in *Arabidopsis* Development. *Plant Physiol.* 142:642-650
- Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L y Smalla I (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16:2089–2103

- Mache R y Lerbs-Mache S (2001) Chloroplast genetic system of higher plants: Chromosome replication, chloroplast division and elements of the transcriptional apparatus. *Curr. Sci.* 80:217-224
- Majeran W, Cai Y, Sun Q y van Wijk KJ (2006) Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell* 17:3111–3140
- Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:289–313
- Maple J y Moller SG (2007) Plastid division: Evolution, Mechanism and Complexity. *Ann. Bot.* 99:565–579
- Marano MR y Carrillo N (1992) Constitutive transcription and stable RNA accumulation in plastids during the conversion of chloroplasts to chromoplasts in ripening tomato fruits. *Plant Physiol.* 100:1103-1113
- Martin W (2003) Gene transfer from organelles to the nucleus: Frequent and in big chunks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:8612–8614
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M y Penny D (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12246–12251
- Martin W y Herrmann WR (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens and why? *Plant Physiol.* 118:9-17
- Martinez-Garcia JF, Huq E y Quail PH (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288:859–863
- Martínez-Zapater JN, Gil P, Capel J y Somerville CR (1992) Mutations at the *Arabidopsis* CHM locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. *Plant Cell* 4:889-899
- Matorin DN, Pörs Y y Hoffmann P (1999) Changes in light sensitivity of photosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants transformed with the antisense gene of glutamate-1-semialdehyde aminotransferase. *Russ. J. Plant Physiol.* 46:467-473

- Maxwell K y Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51:659–668
- McCallum CM, Comai L, Greene EA y Henikoff S (2000) Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) for Plant Functional Genomics. *Plant Physiol.* 123:439-442
- Mc. Lennan, A.G. (1988) DNA damage, repair, and mutagenesis. En: DNA replication in plants. (Bryant JA y Dunham VL eds). Boca Raton, Florida: CRC Press, pp 135-186
- McAllister ED y Myers J (1940) The time course of photosynthesis and fluorescence observed simultaneously. *Smithson Misc. Collect.* 99:1–37
- Mckown RL y Tewari KK (1984) Purification and properties of pea chloroplast DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2354-2358
- Mellon I. (2005) Transcription-coupled repair: A complex affair. *Mut. Res.* 577:155-161
- Meng BY, Tanaka M, Wakasugi T, Ohme M, Shinozaki K y Sugiura M (1988) Cotranscription of the genes encoding two P700 chlorophyll a apoproteins with the gene for ribosomal protein CS14: determination of the transcriptional initiation site by in vitro capping. *Curr. Genet.* 14:395-400
- Michaelis P (1969) Über Restitutionen (Rückmutationen) . *Cytologia* 34 (Suppl):1-115
- Michaelis P (1970) Beiträge Zum Problem der Plastiden-Abänderung. IV. Über das Plasma-und Plsticen-abänderung auslösende, isotoopen-(32P)-induzierte Kerngenmp1 von *Epilobium*. *Mol. Gen. Genet.* 101:257-306
- Millen RS, Olmstead RG, Adams KL, Palmer JD, Lao NT, Heggie L, Kavanagh TA, Hibberd JM, Gray JC, Morden CW, Calie PJ, Jermiin LS, y Wolfe KH (2001) Many parallel losses of *infA* from chloroplast DNA during Angiosperm evolution with multiple independent transfers to the nucleus. *Plant Cell* 13:645-658
- Miller JH (1998) Mutators in *Escherichia coli*. *Mut. Res.* 409:99-106
- Milligan BG (1989) Purification of chloroplast DNA using hexadecyltrimethylammonium bromide. *Plant Mol. Biol. Rep.* 7:144-149

- Miyamura S, Kuroiwa T y Nagata T (1990) Multiplication and differentiation of plastid nucleoids during development of chloroplasts and etioplasts from proplastids in *Triticum aestivum*. *Plant Cell Physiol.* 31:597-602
- Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A y Chory J (2001) *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (GUN 5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2053–2058
- Mogensen HL y Rusche M (2000) Occurrence of plastids in rye sperm cells. *Am. J. Bot.* 87:1189-1192
- Monte E, Tepperman JM, Al-Sady B, Kaczorowski KA, Alonso JM, Ecker JR, Li X, Zhang Y y Quail PH (2004) The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:16091–16098
- Motohashi R, Yamazaki T, Myouga F, Ito T, Ito K, Satou M, Kobayashi M, Nagata N, Yoshida S, Nagashima A, Tanaka K, Takahashi S y Shinozaki K (2007) Chloroplast ribosome release factor 1 (AtcpRF1) is essential for chloroplast development. *Plant Mol. Biol.* 64:481–497
- Mullet JE (1988) Chloroplast development and gene expression. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:475-502
- Mullet JE (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.* 103:309-313
- Mullet JE y Klein RR (1987) Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J.* 6:1571-1579
- Mullet JE, Gamble PE, Klein P y Klein RR (1990) Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4038-4042
- Murchie EH, Chen YZ, Hubbart S, Peng SB y Horton P (1999) Interactions between senescence and leaf orientation determine *in situ* patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice. *Plant Physiol.* 119:553-563
- Muse SV (2000) Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. *Plant Mol. Biol.* 42:25-43

- Myhill RR y Konzak CF (1967) A new technique for culturing and measuring barley seedlings. *Crop Sci.* 7:275–277
- Nagashima A, Hanaoka M, Motohashi R, Seki M, Shinozaki K, Kanamaru K, Takahashi H y Tanaka K (2004) DNA microarray analysis of plastid gene expression in an *Arabidopsis* mutant deficient in a plastid transcription factor Sigma, SIG2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:694-704
- Nelson N y Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:521–65
- Ni M., Halliday KJ, Tepperman JM y Quail PH (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* 95:657–667
- Ni M., Tepperman JM y Quail PH (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* 400:781–784
- Nielson B y Tewari KK (1988) Pea chloroplast topoisomerase: purification, characterization and role in replication. *Plant Mol. Biol.* 11:3-14
- Nielson B, Rajasekhar VK y Tewari KK (1991) Pea chloroplast DNA-primase. *Plant Mol. Biol.* 16:1019-1034
- Nott A, Hou-Sung J, Koussevitzky S y Chory J (2006) Plastid-to nucleus retrograde signalling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:739–759
- Oelmüller R, Levitan I, Bergfeld R, Rajasekhar VK y Mohr H (1986) Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on plastids. *Planta* 168:482–492
- Ogihara Y, Isono K, Kojima T, Endo A, Hanaoka M, Shiina T, Terachi T, Utsugi S, Murata M, Mori N, Takumi S, Ikeo K, Gojobori T, Murai R, Murai K, Matsuoka Y, Ohnishi Y, Tajiri H y Tsunewaki K (2000) Chinese Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Chloroplast Genome: Complete Sequence and Contig Clones. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18:243–253
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, Aota S-I, Inokuchi H y Ozeki H (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322:572–574

- Oldenburg DJ y Bendich AJ (2004 a)). Changes in the structure of DNA molecules and the amount of DNA per plastid during chloroplast development in maize. *J. Mol. Biol.* 344:1311-1330
- Oldenburg DJ y Bendich AJ (2004 b)). Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *J. Mol. Biol.* 335:953-970
- op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Göbel C, Feussner I, Nater M y Apel K (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:2320–2332
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K y Sekiya T (1989 a)) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-stranded conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T y Hayashi K (1989b)) A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879
- Owens TG (1996) Processing of excitation energy by antenna pigments. En: Baker NR (eds) *Photosynthesis and the environment*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1-23
- Palmer JD (1985) Comparative organization of chloroplast genomes. *Ann. Rev. Genet.* 19:325-354
- Palmer JD (1991) Plastid chromosome structure and evolution. En: *The molecular biology of plastids*. Bogorad, L. y Vasil, I.K. (eds.) Academic Press, San Diego, EEUU pp 5-53
- Palmer JD (1986) Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Methods Enzymol.* 118:167-186
- Papenbrock J y Grimm B (2001) Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis—studies for intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta* 213:667–681
- Pesaresi P, Masiero S, Eubel H, Braun HP, Bhushan S, Glaser E, Salamini F y Leister D (2006) Nuclear photosynthetic gene expression is synergistically modulated by

- rates of protein synthesis in chloroplasts and mitochondria. *Plant Cell* 18:970-991
- Pfaffl MW, Horgan GW y Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:e36
- Pfannschmidt T (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* 1:33–41
- Pfannschmidt T, Schütz K, Fey V, Sherameti I y Oelmüller R (2003) Chloroplast redox control of nuclear gene expression —a new class of plastid signals in interorganellar communication. *Antiox. Redox Signal* 5:95–101
- Pimper L (2000) Análisis de regiones no codificantes del ADN cloroplástico en mutantes derivadas del gen mutador de cloroplastos de cebada Tesis presentada para optar al Grado de Licenciada en Ciencias Biológicas, FCEN, UBA, 2002
- Pollock CJ, Farrar J, Koroleva OA, Gallagher JA y Tomos AD (2000) Intracellular and intercellular compartmentation of carbohydrate metabolism in leaves of temperate gramineae. *Rev. Bras. Bot.* 23:349-357
- Pollock CJ, Farrar J, Tomos D, Gallagher J, Lu Ch y Koroleva O (2003) Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. *J. Exp. Bot.* 54 382:489-494
- Pon CL y Gualerzi CO (1984) Mechanism of protein biosynthesis in prokaryotic cells. Effect of initiation factor IF1 on the initial rate of 30S initiation complex formation. *FEBS Lett.* 175:203–207
- Possingham JV y Rose RJ (1976) Chloroplast replication and chloroplast DNA synthesis in spinach leaves. *Proc. R. Soc. Lond. B* 193:295-305
- Potrykus I (1970) Mutationen und Rückmutation extrachromosomal vererbter Plastidenmerkmale von *Petunia*. *Z. Pflanzenzucht.* 63:4-40
- Poulsen C (1983). The barley chloroplast genome: physical structure and transcriptional activity in vivo. *Carls. Res. Comm.* 48:57-80
- Powell W, Morgante M, Andre C, Mc Nicol JW, Machray GC, Doyle JJ, Tingey SV y Rafalski JA (1995) Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Curr. Biol.* 5:1023-1029



- Prina AR (1989) Consideraciones sobre la aplicación eficiente de la mutagénesis inducida en fitomejoramiento. *Mendeliana IX*: 5-49
- Prina AR (1992) A mutator nuclear gene inducing a wide spectrum of cytoplasmically - inherited chlorophyll deficiencies in barley. *Theor. Appl. Genet.* 85:245-251
- Prina AR (1996) Mutator-induced cytoplasmic mutants in barley: genetic evidence of activation of a putative chloroplast transposon. *J. Hered.* 87:85-389
- Prina AR, Maldonado S, Arias MC, Colombo N, RíosRD, Acevedo A, Otegui M (1996) Mutator-induced variability in barley. In: Slinkart A. *et al.* (eds.) Proceedings of the V International Oat Conference and VII International Barley Genetics Symposium. University of Saskatchewan, Vol 2, pp 552-554
- Prina AR, Arias MC, Lainez V, Landau A y Maldonado S (2003) A cytoplasmically inherited mutant controlling early chloroplast development in barley seedlings. *Theor. Appl. Genet.* 107:1410–1418
- Provan J, Corbett G, Mc Nicol JW y Powell E (1997) Chloroplast DNA variability in wild and cultivated rice (*Oryza spp.*) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Genome* 40:104-110
- Provan J, Russell JR, Booth A y Powell W (1999) Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Mol. Ecol.* 8:505-511
- Pyke K y Leech RM (1992) Chloroplast division and expansion is radically altered by nuclear mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 99:1005-1008
- Raghavendra AS, Padmasree K y Saradadevi K. (1994) Interdependence of photosynthesis and respiration in plant cells: interactions between chloroplasts and mitochondria. *Plant Sci.* 97:1-14
- Rapp JC, Baumgartner BJ y Mullet J (1992) Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. Transcription rates and mRNA levels vary over 300-fold; predicted mRNA stabilities vary 30-fold. *J. Biol. Chem.* 267:21404-21411
- Redei GP (1973) Extrachromosomal mutability determined by a nuclear gene locus in *Arabidopsis*. *Mut. Res.* 18:149-162
- Redei GP y Plurad SB (1973) Hereditary structural alterations of plastids induced by a nuclear mutator gene in *Arabidopsis*. *Protoplasma* 77:361-380

- Rios RD, Saione H, Robredo C, Acevedo A, Colombo N y Prina AR (2003) Isolation and molecular characterization of atrazine tolerant barley mutants. *Theor. Appl. Genet.* 106:696-702
- Robertson D y Laetsch W McM (1974) Structure and function of developing barley plastids. *Plant Physiol.* 54:148-159
- Robinson C, Hynds PJ, Robinson D y Mant A (1998) Multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 38:209–221
- Rochaix JD (1997) Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes. *Trends Plant Sci.* 2:419-425.
- Rodermel S (2001) Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci.* 6:471-478
- Roháček K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40:13–29
- Ruppel NJ y Hangarter RP (2007) Mutations in a plastid-localized elongation factor G alter early stages of plastid development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 7:37 doi:10.1186/1471-2229-7-37
- Sager R e Ishida MR(1963) Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50:725-730
- Saghai-MarooF M, Soliman K, Jorgensen R y Allard R (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:8014-8018
- Sakamoto W, Kondo H, Murata M y Motoyoshi F (1996) Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by *chloroplast mutator*. *Plant Cell* 8:1377-1390
- Sala F, Amileni AR, Parisi B y Spadari S (1980) A gamma like DNA polymerase in spinach chloroplast. *Eur. J. Biochem.* 112:211-217
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (2<sup>nd</sup> Edn), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schaaper RM.(1993) Base Selection, Proofreading, and Mismatch Repair during DNA Replication in *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* 268:23762-23765
- Schwabe TM y Kruip J (2000) Biogenesis and assembly of photosystem I. *Indian J. Biochem. Biophys.* 37: 351–359

- Schwarz Z y Kössel H (1979) Sequencing of the 3'- terminal region of a 16S rRNA gene from *Zea mays* chloroplast reveals homology with *E. coli* 16S rRNA. *Nature* 279:520-522
- Schwarz. Z. y Kössel, H (1980) The primary structure of 16S rDNA from *Zea mays* chloroplast is homologous to *E.coli* 16S rRNA. *Nature* 283:739-742
- Sears BB y Sokalski MB (1991) The *Oenothera lamarckiana* mutator: effect of UV-radiation and nitroso-methyl-urea on mutation frequencies. *Mol. Gen. Genet.* 229:245-252
- Shiina T, Tsunoyama Y, Nakahira Y y Khan MS (2005) Plastid polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 244:1-68
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng B. Y, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H y Sugiura M (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5:2043–2049
- Shumway LK y Weier TE (1967) The Chloroplast Structure of *Iojob* Maize. *Am. J. Bot.* 54:773-780
- Siebke K, von Caemmerer S, Badger M y Furbank RT (1997) Expressing an *RbcS* antisense gene in transgenic *Flaveria bidentis* leads to an increased quantum requirement for CO<sub>2</sub> fixed in photosystems I and II. *Plant Physiol.* 105:1163–1174
- Siedlecki J, Zimmersmann W y Weissbach A (1983) Characterization of a prokaryotic topoisomerase I activity in chloroplasts from spinach. *Nucleic Acids Res.* 11:1523-1536
- Siemenroth A, Wollgiehn R, Neumann D y Börner T (1981) Synthesis of ribosomal RNA in ribosome-deficient plastids of the mutant “*albostrians*” of *Hordeum vulgare* L. *Planta* 153:547-555
- Silvahy D y Maliga P (1998) Mapping of promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the *iojob* maize mutant. *Curr. Genet.* 33:340-344

- Smith H (1970) Changes in plastid ribosomal RNA and enzymes during the growth of barley leaves in darkness. *Phytochemistry* 9:965-975
- Smith H (2000) Phytochromes and light signal perception by plants –an emerging synthesis. *Nature* 407:585-591
- Soll J (2002) Protein import into chloroplasts. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:529–535.
- Stern DB, Higgs DC, y Yang J (1997) Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 2:308-315
- Stoike LL, Sears BB (1998) Plastome mutator-induced alterations arise in *Oenothera* chloroplast DNA through template slippage. *Genetics* 149:347-353
- Strand A (2004) Plastid-to-nucleus signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:621–625
- Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR y Chory J (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* 421:79 –83
- Sugimoto H, Kusumi K, Tozawa Y, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S y Iba K (2004) The *virescent-2* mutation inhibits translation of plastid transcripts for the plastid genetic system at an early stage of chloroplast differentiation. *Plant Cell Physiol.* 45:985-996
- Sugita M y Sugiura M (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 32:315-326
- Sugiura M (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19:149–168
- Sugiura M (1998) The discovery of the complete sequence of tobacco and rice chloroplast genomes. En: Kung SD y Yang SF (eds) *Discoveries in Plant Biology, Vol II*, World Scientific, Singapore, pp 45–60
- Sugiura M, Hirose T y Sugita M (1998) Evolution and mechanisms of translation in chloroplasts. *Ann. Rev. Genet.* 32:437-459
- Sugiura M y Takeda Y (2000) Nucleic acids. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. B.Buchanan, W.Gruissem y R.Jones, (eds) American Society of Plant Physiologists, Maryland, EEUU, 1367 pp
- Sullivan JA y Gray JC (1999) Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant. *Plant Cell* 11:901-910

- Surpin M, Larkin RM y Chory J (2002) Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell* 14 (Suppl):S327–S338
- Susek RE, Ausubel FM y Chory J (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74:787–799
- Svab Z, Hajdukiewicz P y Maliga P (1990) Stable transformation in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530
- Taylor BH, Manhart JR, Amasino RM (1993) Isolation and Characterization of Plant DNAs. In: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* (Glick, B.R., Thompson, J.E. eds) CRC Press, 360pp
- Terasawa K y Sato N (2005) Visualization of plastid nucleoids *in situ* using the PEND-GFP fusion protein. *Plant Cell Physiol.* 46:649–660
- Thompson P, Brosher, CG y Tobin, AK (1998) Heterogeneity of mitochondrial protein biogenesis during primary leaf development in barley. *Plant Physiol.* 118:1089-1099
- Thompson E, Walbot V, y Coe EH Jr. (1983). Plastid development in *iojap*-and chloroplast mutator-affected maize plants. *Amer. J. Bot.* 70:940-950
- To K-Y, Liu Ch, Liu S-T y Chang, Y-S (1993) Detection of point mutations in the chloroplast genome by single-stranded conformation polymorphism analysis. *The Plant J.* 3:183-186
- Tornaletti S, Reines D, Hanawalt PC (1999) Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA. *J. Biol. Chem.* 274:24124-24130
- Tsudzuki J, Tsudzuki T, Wakasugi T, Kinoshita K, Kondo T y Sugiura M (2004) Comparative analysis of the whole chloroplast genomes from rice, maize and wheat. *Endocyt. Cell Res.* 15:339-344
- Tsutsumi K, Taniguchi Y, Kawasaki M, Taniguchi M y Miyake H (2006) Expression of photosynthesis-related genes during leaf development of a C<sub>3</sub> plant rice as visualized by *in situ* hybridization. *Plant Prod. Sci.* 9:232-241
- Tuteja N and Tuteja R (2004) Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases Essential molecular motor proteins for cellular machinery. *Eur. J. Biochem.* 271:1835-1848

- Tuteja N, Phan T-N, Tewari KK (1996) Purification and characterization of a DNA helicase from pea chloroplast that translocates in the 3' to 5' direction. *Eur. J. Biochem.* 238:54-63
- Ueno O, Bang WB, Wada Y, Kondo A, Ishibara K, Kaaneko Y y Matsuzawa Y (2003) Structural and biochemical dissection of photorespiration in hybrids differing in genome construction between *Diplotaxis tenuifolia* (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>) and radish (C<sub>3</sub>). *Plant Physiol.* 132:1550-1559
- van Hoffen A, Venema J, Meschini R, van Zeeland AA y Mullenders LH (1995) Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *EMBO J.* 14:360-367
- Viro M y Kloppstech K (1980) Gene expression in the developing barley leaf under varying light conditions. *Planta* 157:202-208
- Wagner D, Przybyla D, op den Camp R, Kim C, Landgraf F, Lee KP, Würsch M, Laloi C, Nater M, Hideg E y Apel K (2004) The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 306:1183–1185
- Wakasugi T, Tsudzuki T y Sugiura M (2001) The genomics of land plant chloroplasts: gene content and alteration of genomic information by RNA editing. *Photosynth. Res.* 70:107–118
- Walbot V y Coe EH (1979) Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2760-2764
- Wang GZ, Miyashita NT y Tsunewaki K (1997) Plasmon analyses of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*: PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analyses of organellar DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14570-14577
- Waters M y Pyke K (2004) Plastid development and differentiation. En: *Plastids*. Moller SG (ed), Blackwell, Oxford, pp 30-59
- Weihe A y Börner T (1999) Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 4:169–170
- Williams ML, Farrar JF y Pollock CJ (1989) Cell specialisation within the parenchymatous bundle sheath of barley. *Plant Cell Environ.* 12:909-918

- Williams PM y Barkan A (2003) A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J.* 36:675–686
- Wolfe KH, Li WH y Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9054-9058
- Wollgiehn R y Parthier B (1980) ARN and protein synthesis in plastid differentiation. En: Reinert J (ed) *Results and Problems in Cell Differentiation*. Springer-Verlag, Berlin.
- Wollman FA, Minai L y Nechushtai R (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1411:21-85
- Woods MW y DuBuy MG (1951) Hereditary and pathogenic nature of mutant mitochondria in *Nepeta*. *J. Nat. Cancer Inst.*:1105-1151
- Yabuta Y, Maruta T, Yoshimura K, Ishikawa T y Shigeoka S (2004) Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant Cell Physiol* 45:1586–1594
- Yamane K, Hayakawa K, Kawasaki M, Taniguchi M y Miyake H (2003) Bundle sheath chloroplasts of rice are more sensitive to drought stress than mesophyll chloroplasts. *J. Plant Physiol.* 160:1319-1327
- Yoshida R, Sato T, Kanno A, y Kameya T (1998) Streptomycin mimics the cool temperature response in rice plants. *J. Exp. Bot.* 49:221–227
- Yoshimura Y, Kubota F y Ueno O (2004) Structural and biochemical bases of photorespiration in C<sub>4</sub> plants: quantification of organelles and glycine decarboxylase. *Planta* 220:307-317
- Zaita N, Torazawa K, Shinozaki K y Sugiura M (1987) *Trans* splicing in vivo: joining of transcripts from the ‘divided’ gene for ribosomal protein S12 in the chloroplasts of tobacco. *FEBS Lett* 210:153–156
- Zerges W (2000) Translation in chloroplasts. *Biochimie* 82:583–601
- Zubko MK y Day A (1998) Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome-free plastid inheritance. *Plant J* 15:265–271
- Zubko MK y Day A (2002) Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase, and DNA amplification, within ribosome-

deficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants. *Mol. Gen. Genomics* 267:27-37

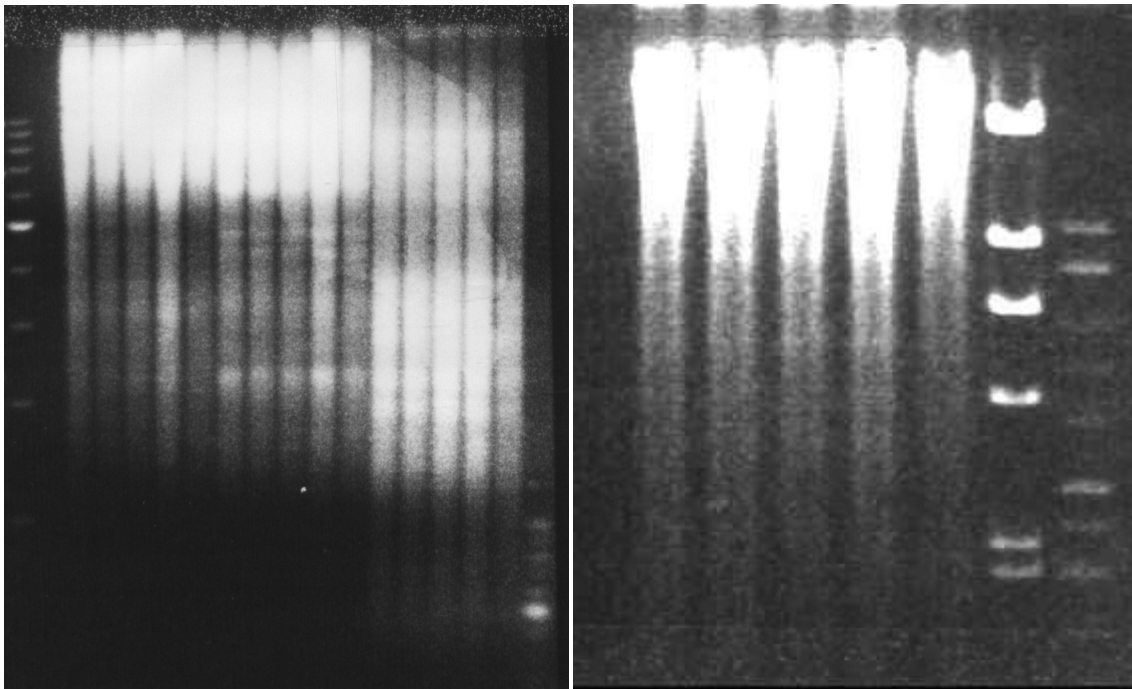


## **ANEXOS**

**AI.1**

**Digestión de ADN total con enzimas de restricción. a) *Eco* RI; b) *Bam* HI; c) *Hind* III; d) *Pst* I. Calles: 1: MC 182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4; 6: ADN fago  $\lambda$  digerido con *Hind* III**

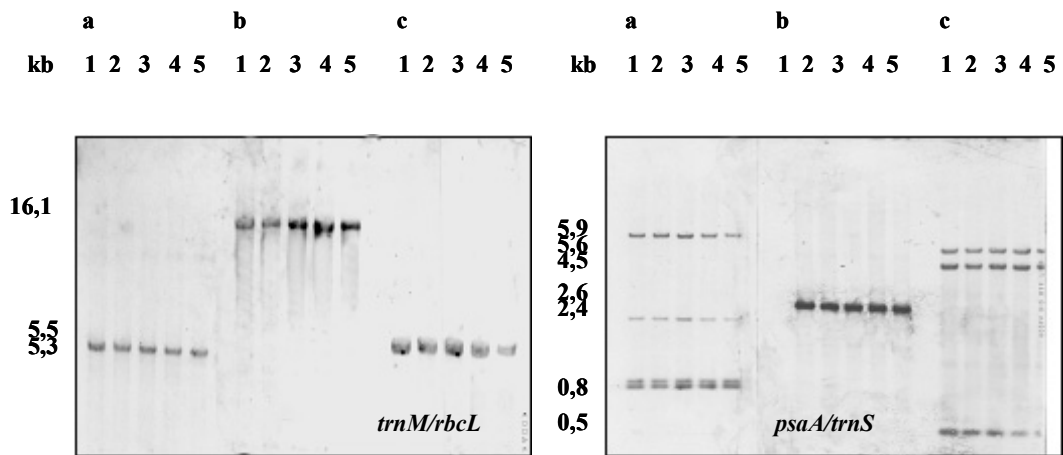
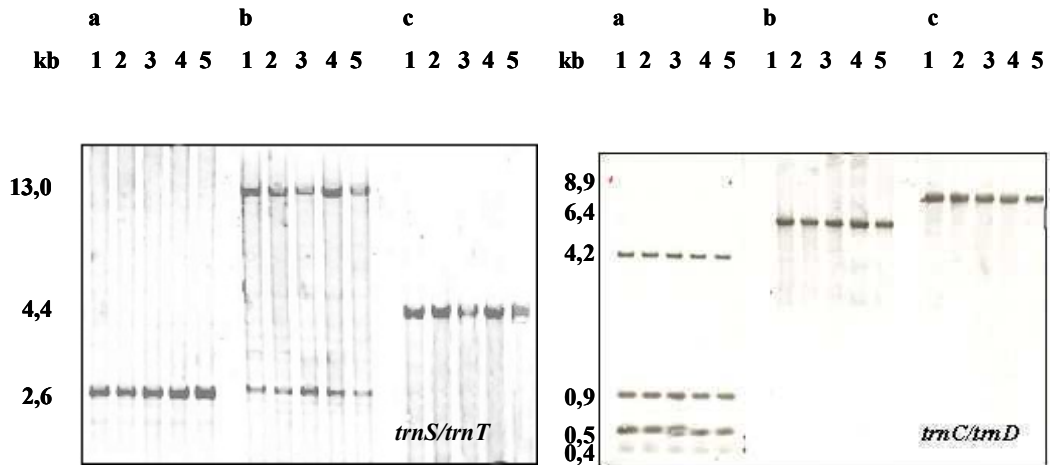
a)                    b)                    c)                    d)  
kb 1 2 3 4 5    1 2 3 4 5    1 2 3 4 5 100 pb    1    2    3    4    5    6    kb



AI.2

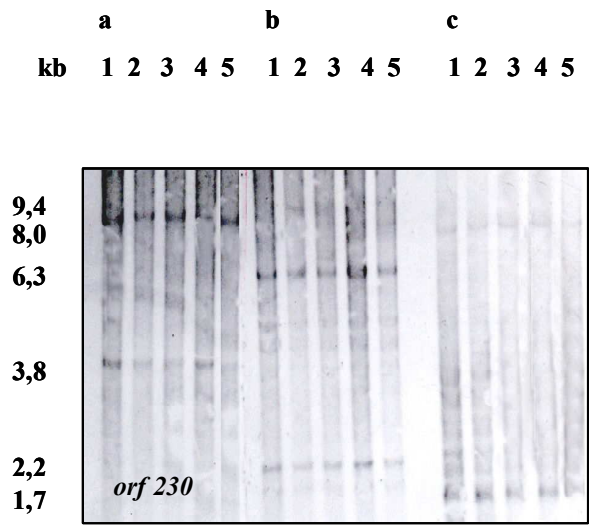
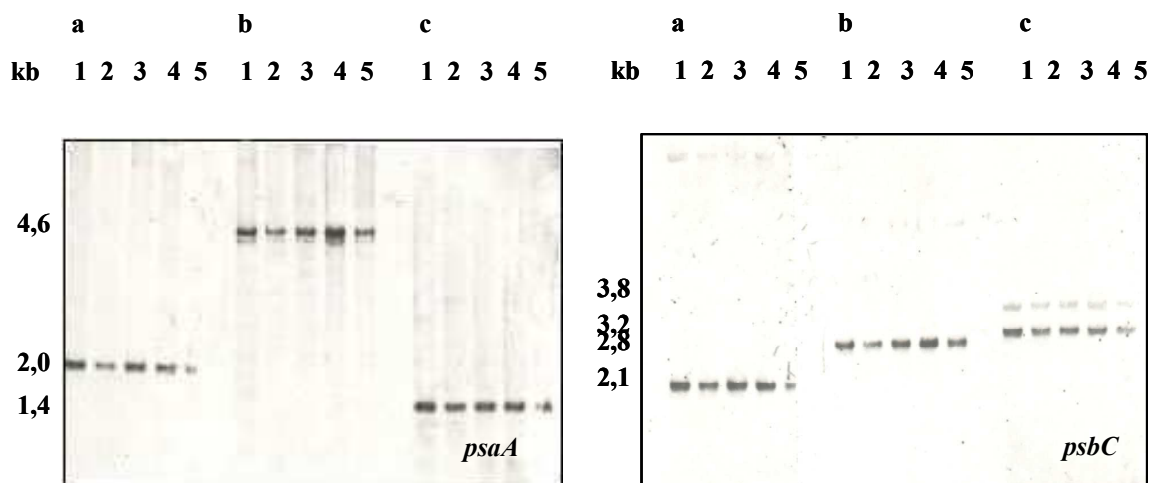
Fragmentos de restricción detectados luego de la digestión de ADN total con *Eco* RI (a); *Bam* HI (b); *Hind* III (c) e hibridación con distintas sondas cloroplásticas. Calles: 1: MC 182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4

cloroplásticas. Calles: 1: MC 182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4



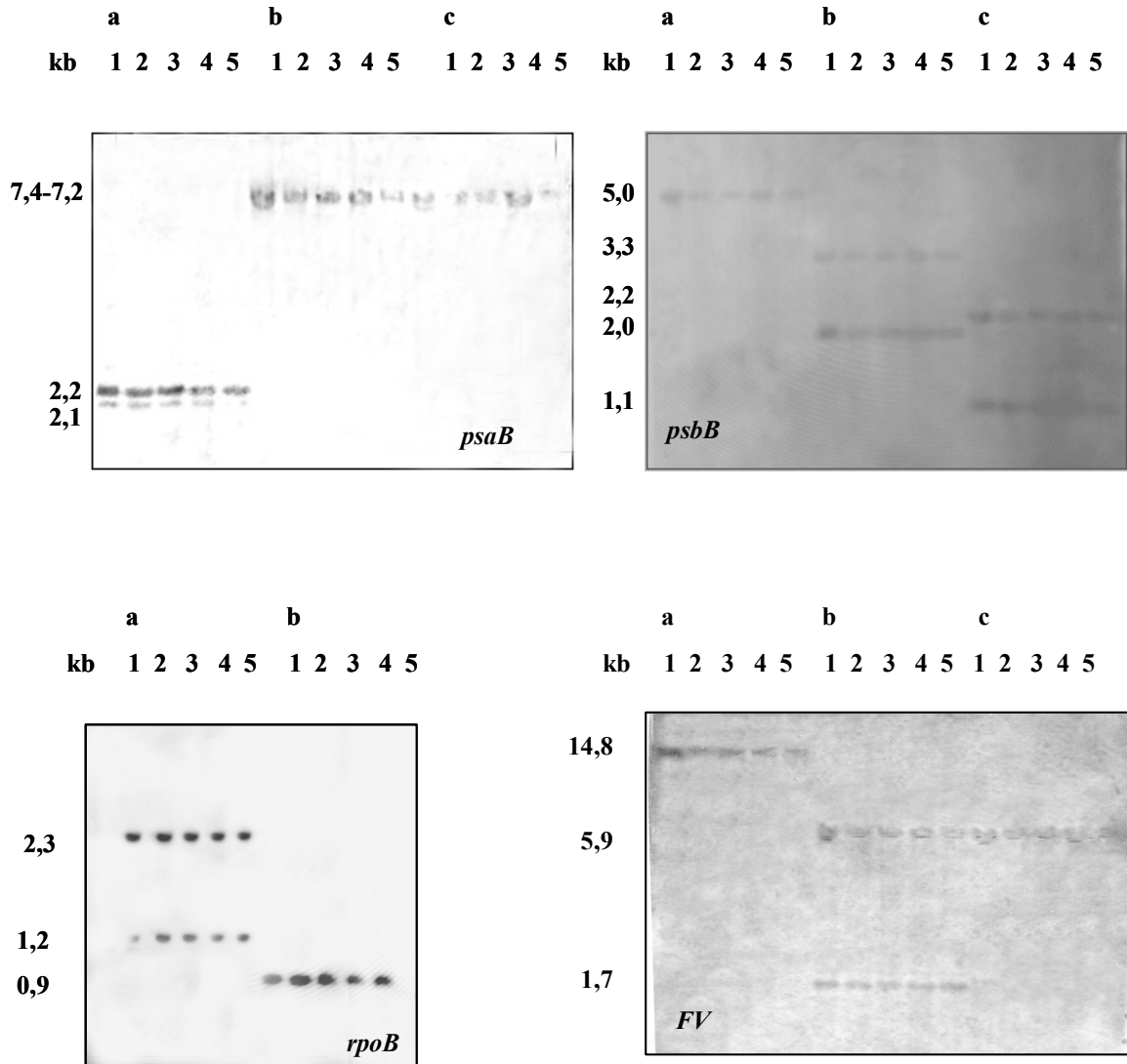
**AI.2**

**Fragmentos de restricción detectados luego de la digestión de ADN total con *Eco* RI (a); *Bam* HI (b); *Hind* III (c) e hibridación con distintas sondas cloroplásticas. Calles: 1: MC 182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4**



**AI.2**

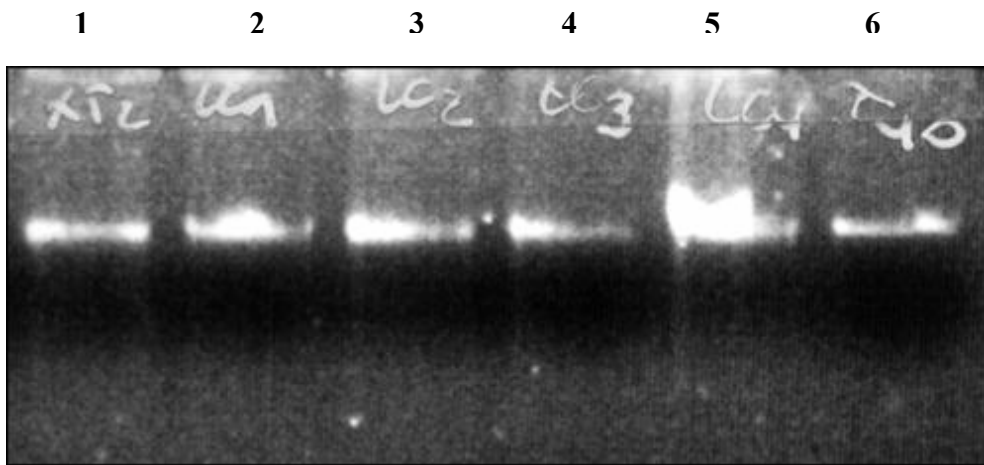
**Fragmentos de restricción detectados luego de la digestión de ADN total con *Bam* HI (a); *Eco* RI (b); *Hind* III (c) e hibridación con distintas sondas cloroplásticas. Calles: 1: MC182; 2: LC1; 3: LC2; 4:LC3; 5: LC4**



**AI.3**

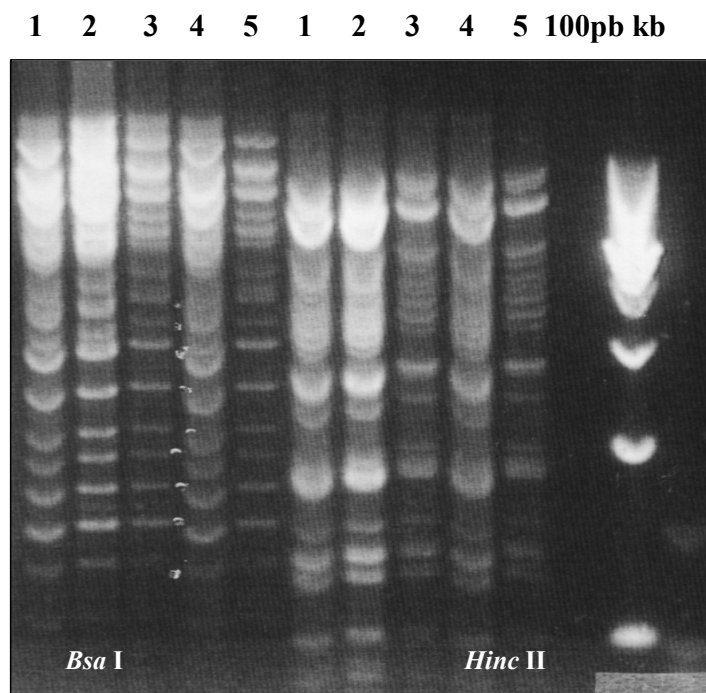
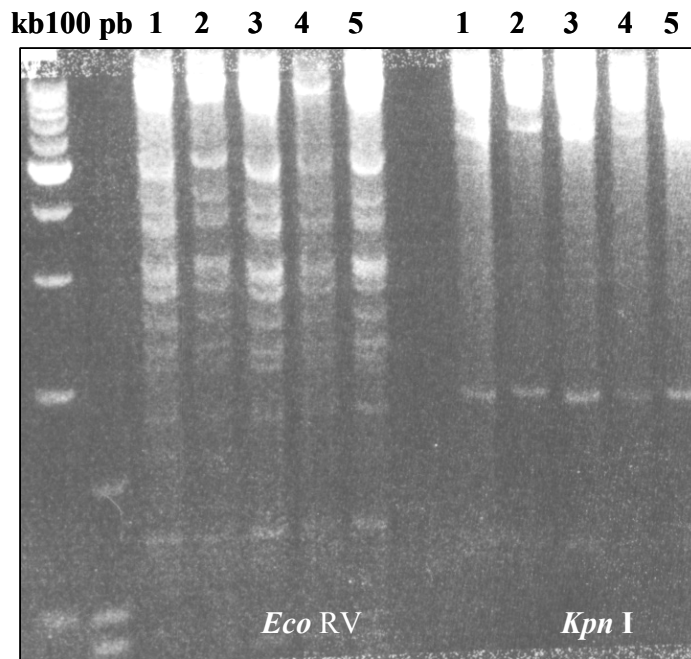
**Extracción de ADN cloroplástico.**

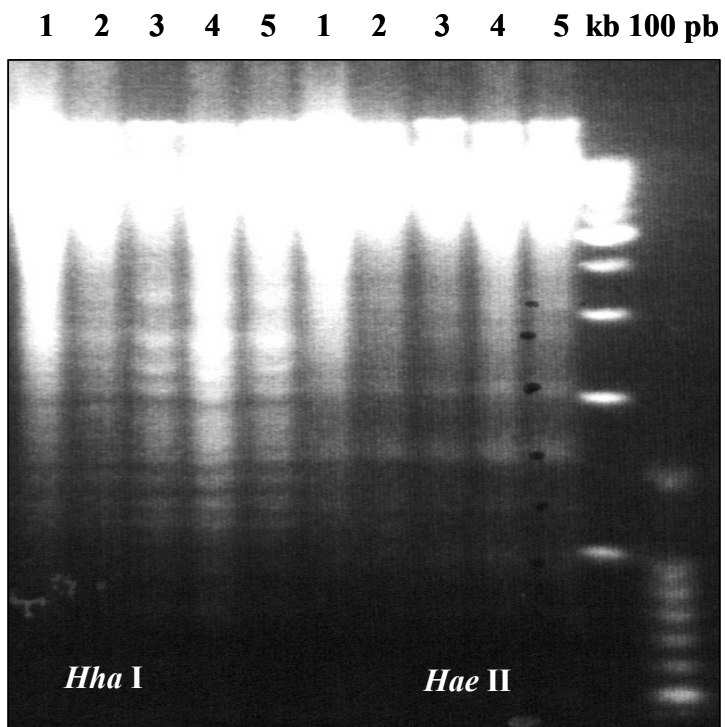
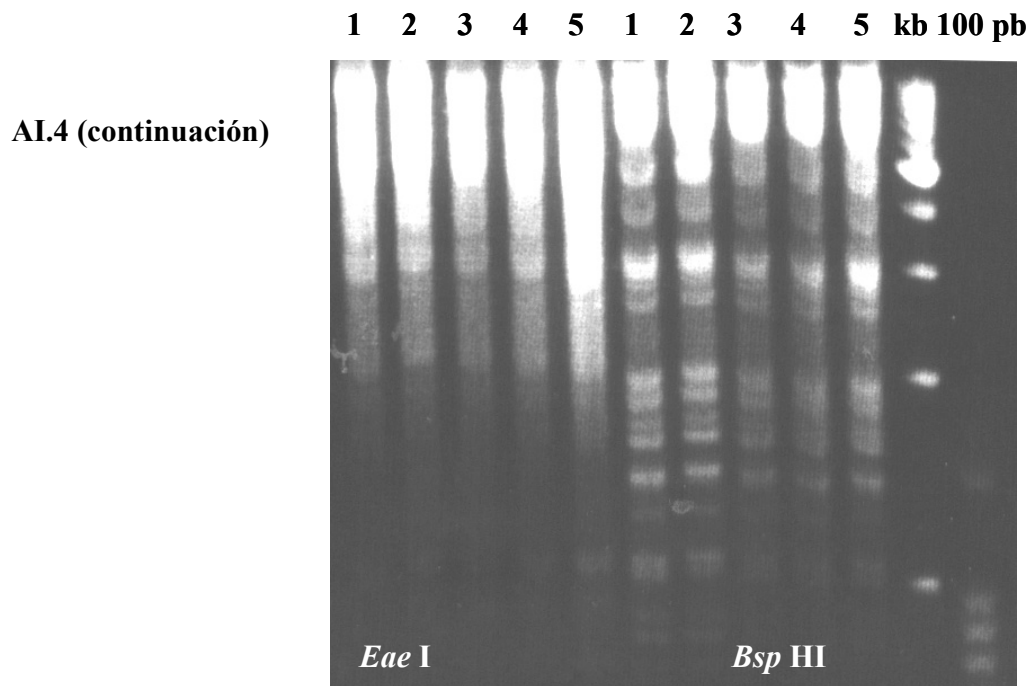
**1: MC 182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4; 6: ADN fago  $\lambda$  (40 ng/ $\mu$ l)**



**AI.4**

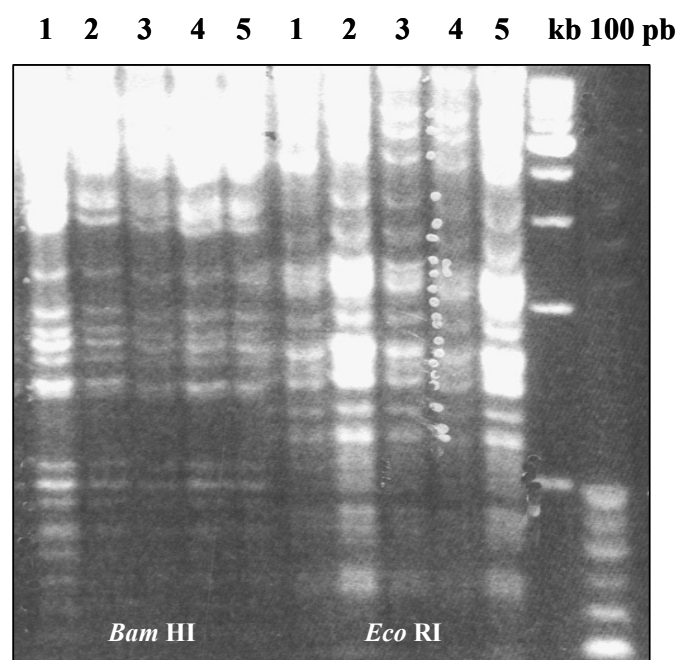
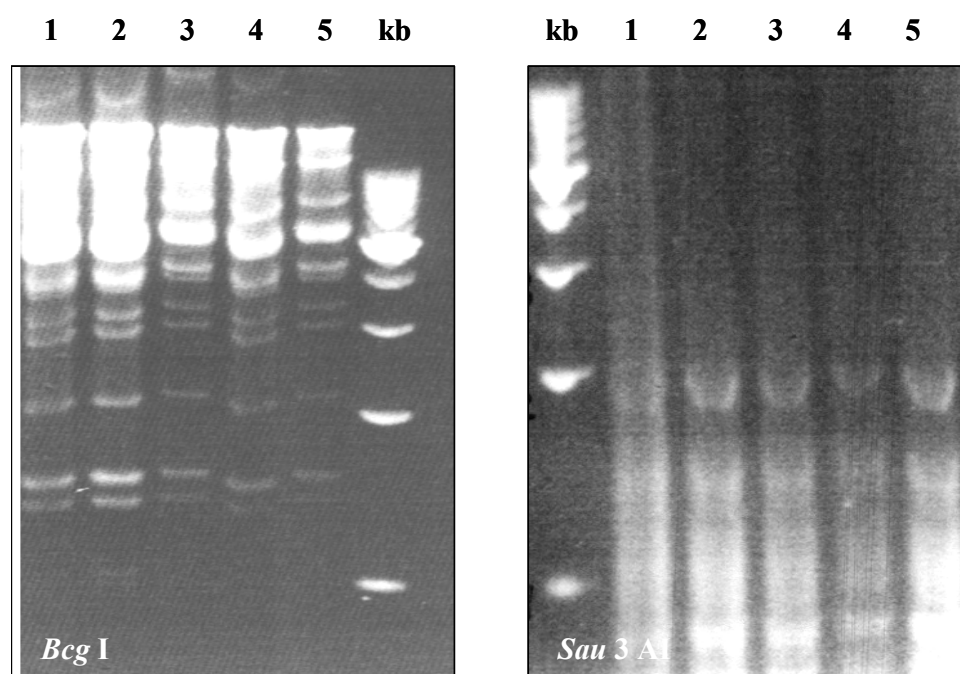
**Digestión de ADN cloroplástico con enzimas de restricción. Separación de fragmentos de restricción por electroforesis en gels de agarosa. 1: MC 182; 2: LC1; 3: LC2; 4: LC3; 5: LC4**



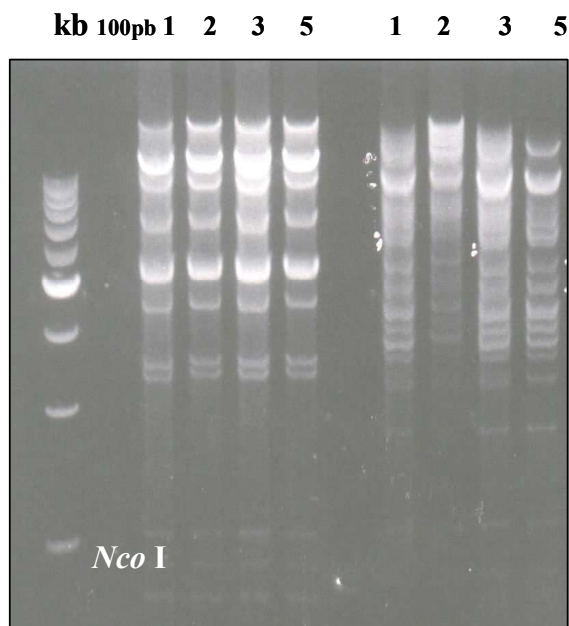
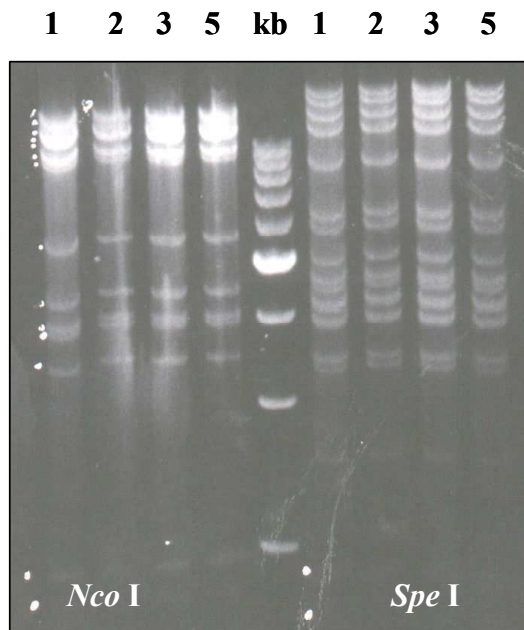
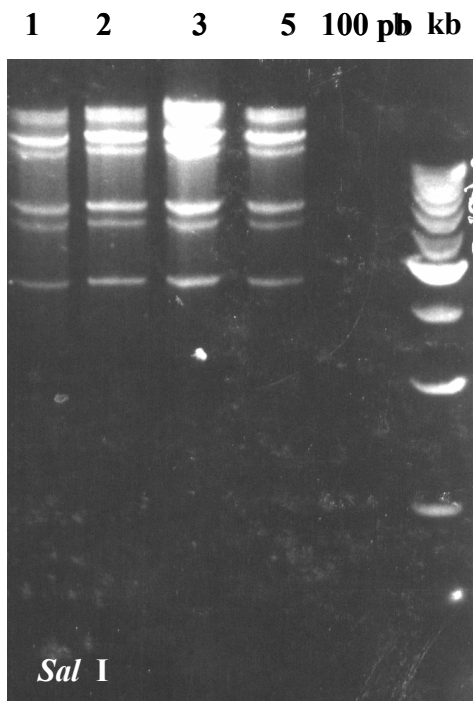




AI.4 (continuación)

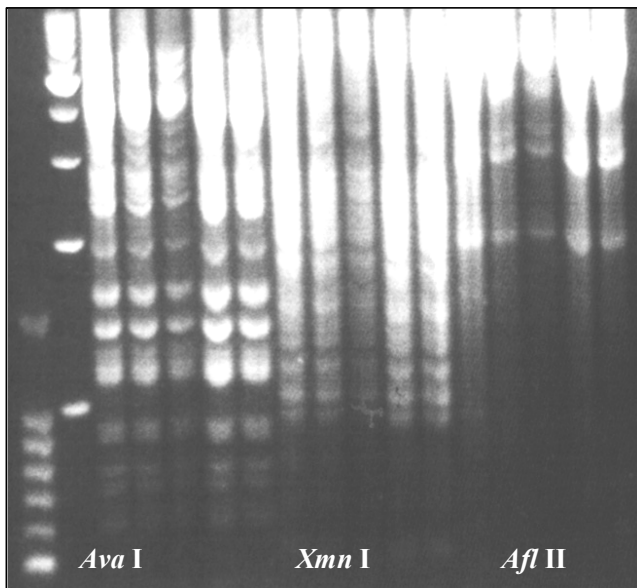


AI.4 (continuación)

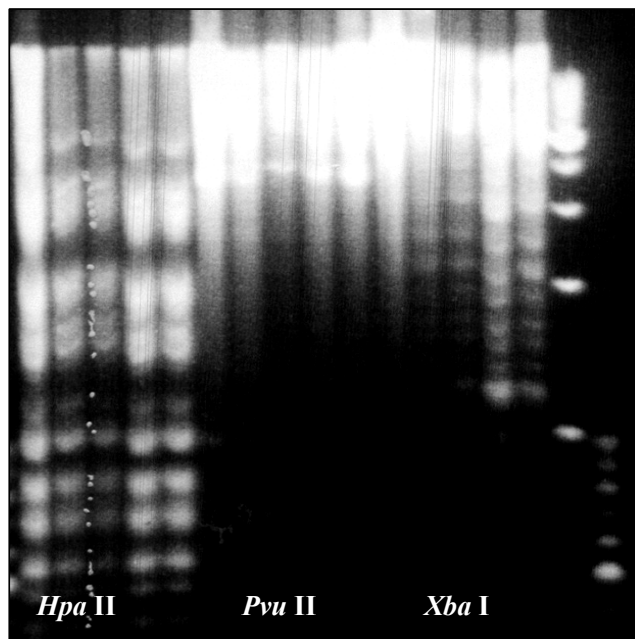


**AI.4 (continuación)**

**100 pb kb 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5**



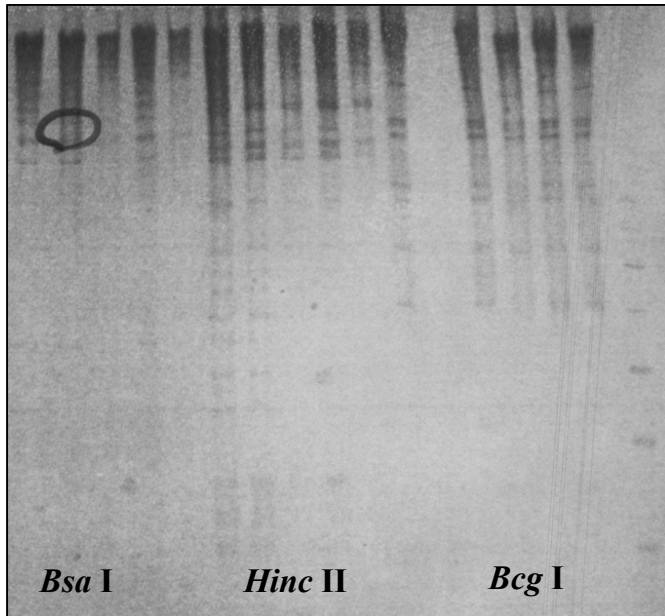
**1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 kb 100pb**



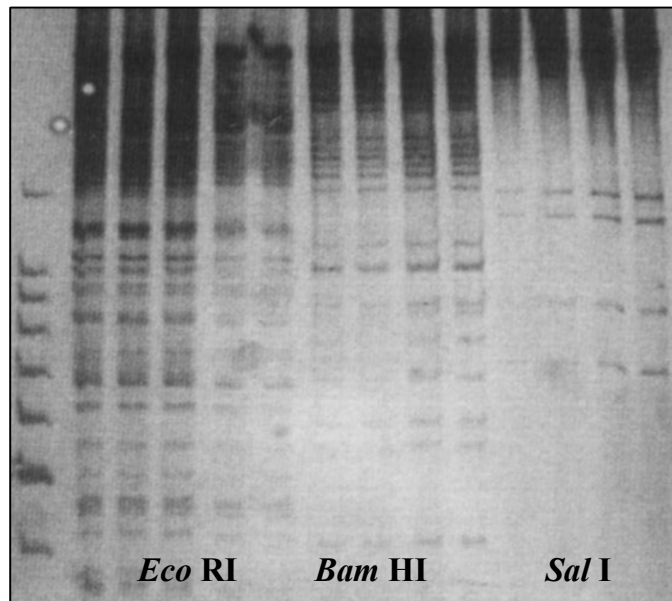
**AI.4**

**Digestión de ADN cloroplástico con enzimas de restricción. Separación de fragmentos de restricción por electroforesis en geles de acrilamida. 1: MC 182; 2:**

1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 100 pb

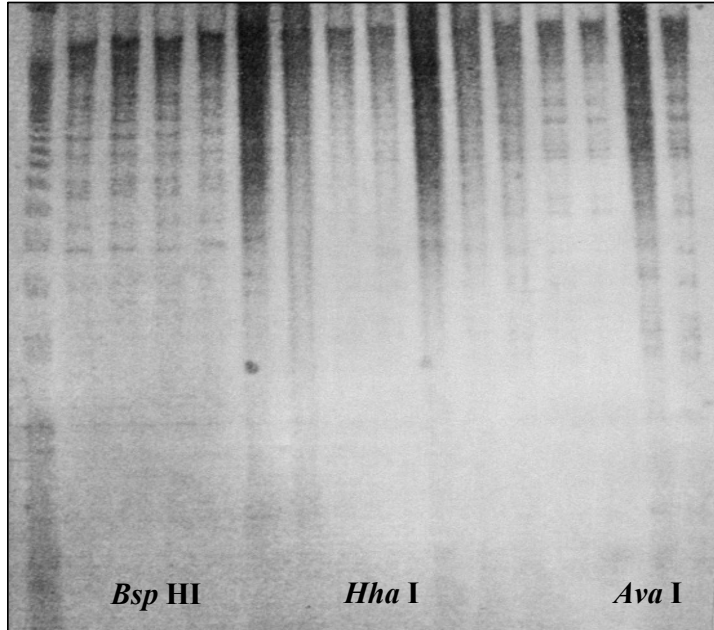


100 pb 1 2 3 5 5 1 2 3 5 1 2 3 5

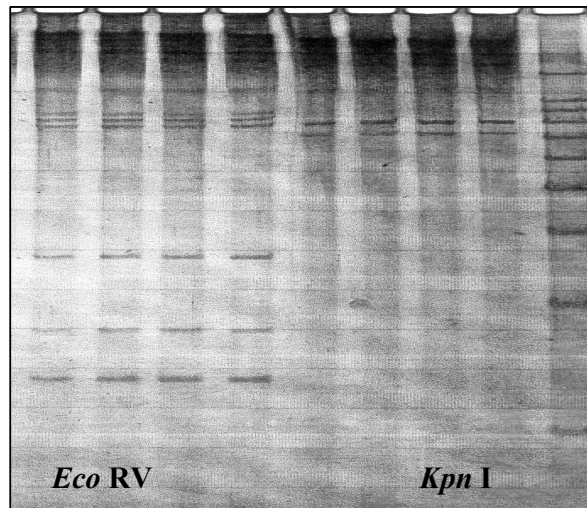


AI.4 (continuación)

123pb 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5



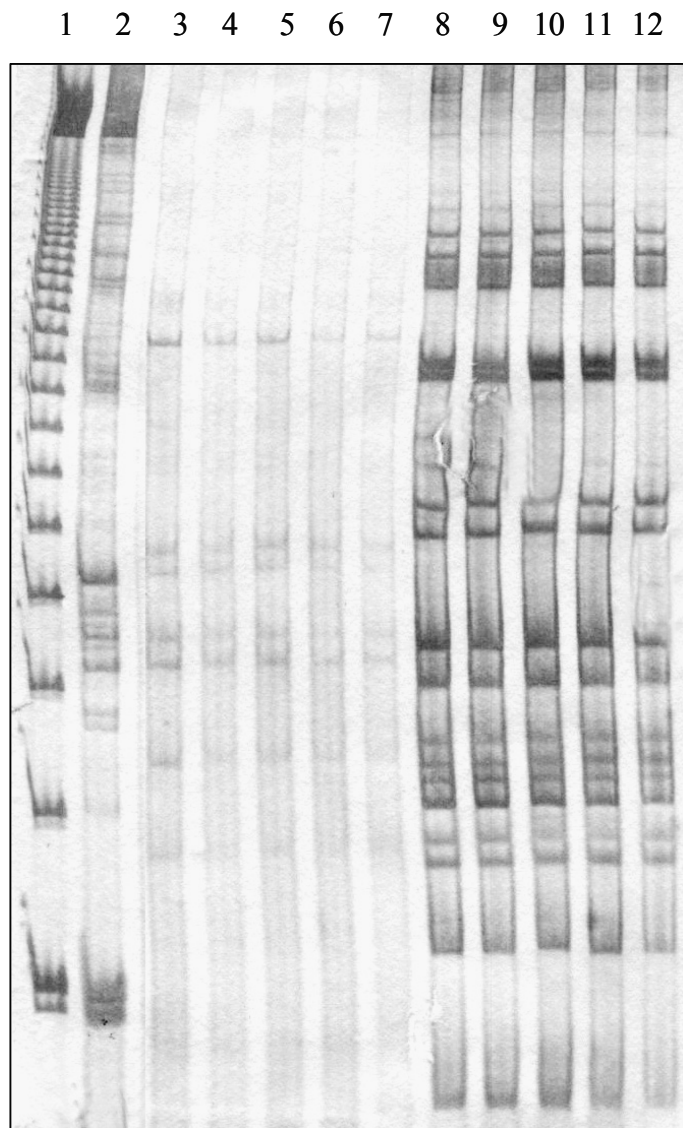
1 2 3 5 1 2 3 5 100pb



**AI.5**

**Análisis de SSCP en geles de acrilamida con glicerol.**

**1: 123 pb (nd); 2: 123 pb (d); 3 a 7: *psbB/Sau 3AI*; 8 a 12: *psaA/Sau 3 AI*.  
3 y 8: MC182; 4 y 9: LC1; 5 y 10: LC2; 6 y 11: LC3; 7 y 12: LC4**



## AII.1

### Análisis de resultados de RT-PCR cuantitativa en tiempo real para el gen *RpoTp*

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPPLICATE CT 18S	TRIPPLICATE DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STND.DEV.:		
XT2	Top	1a	<i>RpoTp</i>	28,5	28,4233333	21,24	21,2266667	7,19666667	0,00681691	0,00644398	0,00063981
XT2	Top	1a		28,2		21,1					
XT2	Top	1a		28,57		21,34					
XT2	Top	1b		28,45	28,5266667	21,32	21,38	7,14666667	0,00705731		
XT2	Top	1b		28,39		21,45					
XT2	Top	1b		28,74		21,37					
XT2	Top	2a		28,71	28,7133333	21,21	21,2366667	7,47666667	0,00561434		
XT2	Top	2a		28,71		21,17					
XT2	Top	2a		28,72		21,33					
XT2	Top	2b		28,69	28,72	21,32	21,4066667	7,31333333	0,00628735		
XT2	Top	2b		28,63		21,52					
XT2	Top	2b		28,84		21,38					
CL2 II	Top	1a		29,27	29,2733333	21,62	21,595	7,67833333	0,00488193		
CL2 II	Top	1a		29,29		21,57					
CL2 II	Top	1a		29,26							
CL2 II	Top	1b		29,59	29,7466667	22,07	22,07	7,67666667	0,00488757		
CL2 II	Top	1b		29,86		22,12					
CL2 II	Top	1b		29,79		22,02					
CL2 II	Top	2a		27,01	27,0033333	21,01	21,0166667	5,98666667	0,01577008	0,0232911	0,00544803
CL2 II	Top	2a		26,87		20,89					
CL2 II	Top	2a		27,13		21,15					
CL2 II	Top	2b		27,02	27,04	21,91	21,8033333	5,23666667	0,026522		
CL2 II	Top	2b		27,06		21,64					
CL2 II	Top	2b				21,86					
CL2 II	Top	3a		26,29	26,1333333	20,74	20,685	5,44833333	0,02290278		
CL2 II	Top	3a		26,01		20,63					
CL2 II	Top	3a		26,1		-					
CL2 II	Top	3b		25,61	25,7666667	20,58	20,6066667	5,16	0,02796953		
CL2 II	Top	3b		25,71		20,56					
CL2 II	Top	3b		25,98		20,68					

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE	CT 18S	TRIPLICATE	DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STND.DEV.:
XT2	Middle	1a	<i>RpoTp</i>	30,41	30,2333333	21,33	21,2866667	8,94666667	0,00202668	0,00183732	0,000227015
XT2	Middle	1a		30,13		21,19					
XT2	Middle	1a		30,16		21,34					
XT2	Middle	1b		30,3	30,18	20,93	21,01	9,17	0,00173602		
XT2	Middle	1b		30,03		21,04					
XT2	Middle	1b		30,21		21,06					
XT2	Middle	2a		31,01	30,88	21,74	21,56	9,32	0,00156459		
XT2	Middle	2a		30,84		21,38					
XT2	Middle	2a		30,79		-					
XT2	Middle	2b		30,3	30,2266667	21,3	21,2766667	8,95	0,002022		
XT2	Middle	2b		30,17		21,25					
XT2	Middle	2b		30,21		21,28					
CL2 II	Middle	1a		27,8	27,6133333	20,6	20,54	7,07333333	0,00742531	0,00802653	0,000931156
CL2 II	Middle	1a		27,48		20,48					
CL2 II	Middle	1a		27,56		-					
CL2 II	Middle	1b		27,27	27,2733333	20,44	20,4166667	6,85666667	0,00862855		
CL2 II	Middle	1b		27,24		20,42					
CL2 II	Middle	1b		27,31		20,39					
CL2 II	Middle	2a		27,39	27,3466667	20,17	20,2	7,14666667	0,00705731		
CL2 II	Middle	2a		27,26		20,13					
CL2 II	Middle	2a		27,39		20,3					
CL2 II	Middle	2b		27,46	27,4566667	20,8	20,66	6,79666667	0,00899496		
CL2 II	Middle	2b		27,42		20,55					
CL2 II	Middle	2b		27,49		20,63					



GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE	CT 18S	TRIPLICATE	DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STN.DV
XT2	Bottom	1a	<i>RpoTp</i>	26,3	26,2033333	20,7	20,655	5,54833333	0,02136905	0,02354264	0,00439104
XT2	Bottom	1a		26,12		20,61					
XT2	Bottom	1a		26,19							
XT2	Bottom	1b		26,08	26,14	21,06	21,08	5,06	0,029977		
XT2	Bottom	1b		26,14		21,1					
XT2	Bottom	1b		26,2							
XT2	Bottom	2a		26,84	26,79	21,21	21,165	5,625	0,02026312		
XT2	Bottom	2a		26,76		21,12					
XT2	Bottom	2a		26,77							
XT2	Bottom	2b		26,62	26,7133333	21,17	21,2433333	5,47	0,02256139		
XT2	Bottom	2b		26,62		21,34					
XT2	Bottom	2b		26,9		21,22					
CL2 II	Bottom	1a		25,17	25,1566667	21,02	20,92	4,23666667	<u>0,053044</u>	0,04292358	0,01418779
CL2 II	Bottom	1a		25,06		20,82					
CL2 II	Bottom	1a		25,24		-					
CL2 II	Bottom	1b		24,8	24,8	20,76	20,67	4,13	<u>0,05711447</u>		
CL2 II	Bottom	1b		24,66		20,58					
CL2 II	Bottom	1b		24,94		-					
CL2 II	Bottom	2a		26,76	26,685	20,64	20,63	6,055	0,01504054		
CL2 II	Bottom	2a		26,61		20,62					
CL2 II	Bottom	2a	-			-					
CL2 II	Bottom	2b		26,48	26,4933333	21,65	21,5266667	4,96666667	0,03198043		
CL2 II	Bottom	2b		26,33		21,53					
CL2 II	Bottom	2b		26,67		21,4					
CL2 II	Bottom	2a		25,9	25,695	20,69	20,6	5,095	<u>0,02925851</u>		
CL2 II	Bottom	2a		25,49		20,61					
CL2 II	Bottom	2a	-			20,5					
CL2 II	Bottom	2b		24,98	25,1033333	20,16	20,15	4,95333333	<u>0,03227737</u>		
CL2 II	Bottom	2b		25,16		20,14					
CL2 II	Bottom	2b		25,17		-					

## AII.2

### Análisis de resultados de RT-PCR cuantitativa en tiempo real para el gen *RpoTm*

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE CT 18S	TRIPLICATE DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STND.DEV.:		
XT2	Top	1a	<i>RpoTm</i>	31,05	31,06	21,24	21,2266667	9,83333333	0,00109615	0,00151253	0,00032491
XT2	Top	1a		31,07		21,1					
XT2	Top	1a		-		21,34					
XT2	Top	1b		30,8	30,8366667	21,32	21,38	9,45666667	0,00142318		
XT2	Top	1b		30,77		21,45					
XT2	Top	1b		30,94		21,37					
XT2	Top	2a		30,36	30,4333333	21,21	21,2366667	9,19666667	0,00170423		
XT2	Top	2a		30,53		21,17					
XT2	Top	2a		30,41		21,33					
XT2	Top	2b		30,5	30,5033333	21,32	21,4066667	9,09666667	0,00182655		
XT2	Top	2b		30,39		21,52					
XT2	Top	2b		30,62		21,38					
CL2 II	Top	1a		31,33	31,2	21,62	21,595	9,605	0,00128412		
CL2 II	Top	1a		31,07		21,57					
CL2 II	Top	1a		-		-					
CL2 II	Top	1b		31,45	31,5566667	22,07	22,07	9,48666667	0,00139389		
CL2 II	Top	1b		31,75		22,12					
CL2 II	Top	1b		31,47		22,02					
CL2 II	Top	2a		30,19	30,07	21,01	21,0166667	9,05333333	<u>0,00188224</u>	0,00277229	0,00059671
CL2 II	Top	2a		30,16		20,89					
CL2 II	Top	2a		29,86		21,15					
CL2 II	Top	2b		30	30,125	21,91	21,8033333	8,32166667	<u>0,00312557</u>		
CL2 II	Top	2b		30,25		21,64					
CL2 II	Top	2b		-		21,86					
CL2 II	Top	3a		29,12	29,075	20,74	20,685	8,39	<u>0,00298098</u>		
CL2 II	Top	3a		29,03		20,63					
CL2 II	Top	3a		-		-					
CL2 II	Top	3b		28,95	28,94	20,58	20,6066667	8,33333333	<u>0,00310039</u>		
CL2 II	Top	3b		28,84		20,56					
CL2 II	Top	3b		29,03		20,68					

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE	CT 18S	TRIPLICATE	DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STND.DEV:.
XT2	Middle	1a	<i>RpoTm</i>	32,11	32,055	21,33	21,2866667	10,7683333	0,00057334	0,00060383	0,000118311
XT2	Middle	1a		-		21,19					
XT2	Middle	1a		32		21,34					
XT2	Middle	1b		32,14	31,93	20,93	21,01	10,92	0,00051612		
XT2	Middle	1b		31,76		21,04					
XT2	Middle	1b		31,89		21,06					
XT2	Middle	2a		32,61	32,3933333	21,74	21,56	10,8333333	0,00054808		
XT2	Middle	2a		32,24		21,38					
XT2	Middle	2a		32,33		-					
XT2	Middle	2b		31,55	31,605	21,3	21,2766667	10,3283333	0,00077779		
XT2	Middle	2b		31,66		21,25					
XT2	Middle	2b		-		21,28					
CL2 II	Middle	1a		31,31	31,22	20,6	20,54	10,68	0,00060954	0,00060518	6,63776E-05
CL2 II	Middle	1a		31,13		20,48					
CL2 II	Middle	1a		-		-					
CL2 II	Middle	1b		31,21	31,18	20,44	20,4166667	10,7633333	0,00057533		
CL2 II	Middle	1b		31,15		20,42					
CL2 II	Middle	1b		-		20,39					
CL2 II	Middle	2a		31,28	31,5133333	21,02	21,0233333	10,49	0,00069534		
CL2 II	Middle	2a		31,84		20,99					
CL2 II	Middle	2a		31,42		21,06					
CL2 II	Middle	2b		31,5	31,5133333	20,8	20,66	10,8533333	0,00054053		
CL2 II	Middle	2b		31,39		20,55					
CL2 II	Middle	2b		31,65		20,63					

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE CT 18S	TRIPLICATE	DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STN.DV	
XT2	Bottom	1a	<i>RpoTm</i>	30,1	29,9833333	20,7	20,655	9,32833333	0,00155558	0,00186049	0,00062633
XT2	Bottom	1a		30,01		20,61					
XT2	Bottom	1a		29,84		-					
XT2	Bottom	1b		29,61	29,6533333	21,06	21,08	8,57333333	0,00262524		
XT2	Bottom	1b		29,68		21,1					
XT2	Bottom	1b		29,67		-					
XT2	Bottom	2a		31,21	31,1733333	21,46	21,455	9,71833333	0,00118711		
XT2	Bottom	2a		31,27		21,45					
XT2	Bottom	2a		31,04		-					
XT2	Bottom	2b		30,16	30,1566667	21,17	21,2433333	8,91333333	0,00207405		
XT2	Bottom	2b		30,19		21,34					
XT2	Bottom	2b		30,12		21,22					
CL2 II	Bottom	1a		28,54	28,4566667	21,02	20,92	7,53666667	<u>0,00538564</u>	0,00441702	0,00160847
CL2 II	Bottom	1a		28,57		20,82					
CL2 II	Bottom	1a		28,26		-					
CL2 II	Bottom	1b		27,98	28,01	20,76	20,67	7,34	<u>0,0061722</u>		
CL2 II	Bottom	1b		27,99		20,58					
CL2 II	Bottom	1b		28,06		-					
CL2 II	Bottom	2a		30,31	30,365	20,64	20,63	9,735	0,00117347		
CL2 II	Bottom	2a		30,42		20,62					
CL2 II	Bottom	2a	-			-					
CL2 II	Bottom	2b		29,5	29,4833333	21,65	21,5266667	7,95666667	0,00402536		
CL2 II	Bottom	2b		29,48		21,53					
CL2 II	Bottom	2b		29,47		21,4					
CL2 II	Bottom	2a		28,95	28,895	20,69	20,6	8,295	<u>0,00318388</u>		
CL2 II	Bottom	2a		28,84		20,61					
CL2 II	Bottom	2a	-			20,5					
CL2 II	Bottom	2b		28,35	28,5666667	20,16	20,15	8,41666667	<u>0,00292638</u>		
CL2 II	Bottom	2b		28,75		20,14					
CL2 II	Bottom	2b		28,6		-					

### AII.3

#### Análisis de resultados de RT-PCR cuantitativa en tiempo real para el gen *clpP*

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE	CT 18S	TRIPLICATE	DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STND.DEV.:
XT2	Top	1a	<i>clpP</i>	25,08	25,015	21,24	21,2266667	3,788333333	0,07237658	0,08428748	0,01467801
XT2	Top	1a		24,95		21,1					
XT2	Top	1a		-		21,34					
XT2	Top	1b		24,64	24,62333333	21,32	21,38	3,243333333	0,1055989		
XT2	Top	1b		24,56		21,45					
XT2	Top	1b		24,67		21,37					
XT2	Top	2a		25,13	24,92	21,21	21,2366667	3,683333333	0,0778406		
XT2	Top	2a		24,73		21,17					
XT2	Top	2a		24,9		21,33					
XT2	Top	2b		25,08	25,0266667	21,32	21,4066667	3,62	0,081333387		
XT2	Top	2b		25,06		21,52					
XT2	Top	2b		24,94		21,38					
CL2 II	Top	1a		<b>24,71</b>	24,55	21,62	21,595	2,955	0,1289604		
CL2 II	Top	1a		<b>24,39</b>		21,57					
CL2 II	Top	1a		-		-					
CL2 II	Top	1b		24,81	24,81	22,07	22,07	2,74	0,14968484		
CL2 II	Top	1b		24,88		22,12					
CL2 II	Top	1b		24,73		22,02					
CL2 II	Top	2a		21,35	21,1166667	21,01	21,0166667	0,1	<u>0,93303299</u>	1,29216183	0,2901121
CL2 II	Top	2a		21,01		20,89					
CL2 II	Top	2a		20,99		21,15					
CL2 II	Top	2b		21,06	21,0866667	21,91	21,80333333	-0,71666667	<u>1,64338063</u>		
CL2 II	Top	2b		21,07		21,64					
CL2 II	Top	2b		21,13		21,86					
CL2II	Top	3a		20,5	20,32	20,74	20,685	-0,365	<u>1,28788163</u>		
CL2II	Top	3a		20,19		20,63					
CL2II	Top	3a		20,27		-					
CL2II	Top	3b		20,24	20,22333333	20,58	20,6066667	-0,383333333	<u>1,30435207</u>		
CL2II	Top	3b		20,13		20,56					
CL2II	Top	3b		20,3		20,68					

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE CT 18S	TRIPLICATE DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STND.DEV.:		
XT2	Middle	1a	<i>clpP</i>	24,04	24,0433333	21,57	21,74	2,30333333	0,20259447	0,18214266	0,03092181
XT2	Middle	1a		24,04		21,96					
XT2	Middle	1a		24,05		21,69					
XT2	Middle	1b		23,88	23,8166667	20,93	21,01	2,80666667	0,14292531		
XT2	Middle	1b		23,8		21,04					
XT2	Middle	1b		23,77		21,06					
XT2	Middle	2a		24,24	24,0966667	21,74	21,56	2,53666667	0,17234046		
XT2	Middle	2a		23,95		21,38					
XT2	Middle	2a		24,1		-					
XT2	Middle	2b		23,56	23,5233333	21,3	21,2766667	2,24666667	0,21071039		
XT2	Middle	2b		23,54		21,25					
XT2	Middle	2b		23,47		21,28					
CL2 II	Middle	1a		22,48	22,515	20,6	20,54	1,975	<u>0,25436992</u>		
CL2 II	Middle	1a		22,55		20,48					
CL2 II	Middle	1a	-			-					
CL2 II	Middle	1b		24,06	23,975	20,44	20,4166667	3,55833333	0,08488578		
CL2 II	Middle	1b		23,89		20,42					
CL2 II	Middle	1b	-			20,39					
CL2 II	Middle	2a		22,49	22,3533333	20,17	20,2	2,15333333	<u>0,22479263</u>		
CL2 II	Middle	2a		22,17		20,13					
CL2 II	Middle	2a		22,4		20,3					
CL2 II	Middle	2b		22,47	22,3633333	20,8	20,66	1,70333333	<u>0,30707579</u>		
CL2 II	Middle	2b		22,35		20,55					
CL2 II	Middle	2b		22,27		20,63					
CL2 II	Middle	1b rep		22,69	22,75	20,89	20,8	1,95	<u>0,25881623</u>	0,26126364	0,03407052
CL2 II	Middle	1b rep		22,73		20,71					
CL2 II	Middle	1b rep		22,83		-					

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPPLICATE CT 18S	TRIPPLICATE DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STN.DV		
XT2	Bottom	1a	<i>clpP</i>	21,96	21,8233333	20,7	20,655	1,16833333	0,44493505	0,50372498	0,14940075
XT2	Bottom	1a		21,72		20,61					
XT2	Bottom	1a		21,79		-					
XT2	Bottom	1b		21,55	21,5566667	21,06	21,08	0,47666667	0,71863611		
XT2	Bottom	1b		21,62		21,1					
XT2	Bottom	1b		21,5		-					
XT2	Bottom	2a		22,5	22,58	21,21	21,165	1,415	0,37500975		
XT2	Bottom	2a		22,66		21,12					
XT2	Bottom	2a	-								
XT2	Bottom	2b		22,31	22,3133333	21,17	21,2433333	1,07	0,476319		
XT2	Bottom	2b		22,31		21,34					
XT2	Bottom	2b		22,32		21,22					
CL2 II	Bottom	1a		21,42	21,2766667	21,02	20,92	0,35666667	<u>0,78096691</u>	0,78161982	0,16378593
CL2 II	Bottom	1a		21,12		20,82					
CL2 II	Bottom	1a		21,29		-					
CL2 II	Bottom	1b		20,7	20,6633333	20,76	20,67	-0,00666667	<u>1,00463167</u>		
CL2 II	Bottom	1b		20,7		20,58					
CL2 II	Bottom	1b		20,59		-					
CL2 II	Bottom	2a		23,09	23,075	20,64	20,63	2,445	0,18364608		
CL2 II	Bottom	2a	-			20,62					
CL2 II	Bottom	2a		23,06		-					
CL2 II	Bottom	2b		22,82	22,7666667	21,65	21,5266667	1,24	0,42337266		
CL2 II	Bottom	2b		22,7		21,53					
CL2 II	Bottom	2b		22,78		21,4					
CL2 II	Bottom	2a		21,15	21,0633333	20,69	20,6	0,46333333	<u>0,7253085</u>		
CL2 II	Bottom	2a		21,01		20,61					
CL2 II	Bottom	2a		21,03		20,5					
CL2 II	Bottom	2b		20,79	20,85	20,16	20,15	0,7	<u>0,61557221</u>		
CL2 II	Bottom	2b		20,91		20,14					
CL2 II	Bottom	2b	-			-					

#### AII.4

#### Análisis de resultados de RT-PCR cuantitativa en tiempo real para el gen *rpl2*

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE CT 18S	TRIPLICATE DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STND.DEV:.		
XT2	Top	1a	<i>rpl2</i>	23,07	23,115	21,24	21,2266667	1,888333333	0,27011893	0,24094129	0,02256253
XT2	Top	1a		23,16		21,1					
XT2	Top	1a		-		21,34					
XT2	Top	1b		23,43	23,40333333	21,32	21,38	2,023333333	0,24598916		
XT2	Top	1b		23,24		21,45					
XT2	Top	1b		23,54		21,37					
XT2	Top	2a		23,26	23,36	21,21	21,2366667	2,123333333	0,229516		
XT2	Top	2a		23,35		21,17					
XT2	Top	2a		23,47		21,33					
XT2	Top	2b		23,6	23,60333333	21,32	21,4066667	2,196666667	0,21814107		
XT2	Top	2b		23,68		21,52					
XT2	Top	2b		23,53		21,38					
CL2 II	Top	1a		<b>24,01</b>	24,215	21,62	21,595	2,62	0,16266773		
CL2 II	Top	1a		<b>24,42</b>		21,57					
CL2 II	Top	1a		-		-					
CL2 II	Top	1b		24,33	24,2966667	22,07	22,07	2,226666667	0,21365179		
CL2 II	Top	1b		24,31		22,12					
CL2 II	Top	1b		24,25		22,02					
CL2 II	Top	2a		19,64	19,6866667	21,01	21,0166667	-1,33	<u>2,51402675</u>	2,83551726	0,67971331
CL2 II	Top	2a		19,64		20,89					
CL2 II	Top	2a		19,78		21,15					
CL2 II	Top	2b		19,72	19,8566667	21,91	21,80333333	-1,946666667	<u>3,85482847</u>		
CL2 II	Top	2b		19,94		21,64					
CL2 II	Top	2b		19,91		21,86					
CL2II	Top	3a		19,31	19,3766667	20,74	20,685	-1,308333333	<u>2,47655272</u>		
CL2II	Top	3a		19,54		20,63					
CL2II	Top	3a		19,28		-					
CL2II	Top	3b		19,33	19,2866667	20,58	20,6066667	-1,32	<u>2,4966611</u>		
CL2II	Top	3b		19,19		20,56					
CL2II	Top	3b		19,34		20,68					



GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE CT 18S	TRIPLICATE DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STN.DV		
XT2	Middle	1a	<i>rpl2</i>	22,34	22,32	21,33	21,2866667	1,03333333	0,48857998		
XT2	Middle	1a		22,24		21,19					
XT2	Middle	1a		22,38		21,34					
XT2	Middle	1b		22,76	22,86	20,93	21,01	1,85	0,27739237		
XT2	Middle	1b		22,83		21,04					
XT2	Middle	1b		22,99		21,06					
XT2	Middle	2a		21,71	21,7266667	21,74	21,56	0,16666667	0,89089872		
XT2	Middle	2a		21,67		21,38					
XT2	Middle	2a		21,8	-						
XT2	Middle	2b		21,31	21,25	21,3	21,2766667	-0,02666667	1,01865581		
XT2	Middle	2b		21,21		21,25					
XT2	Middle	2b		21,23		21,28					
CL2 II	Middle	1a		21,1	21,2433333	20,6	20,54	0,70333333	0,61415157	0,68547623	0,13831473
CL2 II	Middle	1a		21,26		20,48					
CL2 II	Middle	1a		21,37	-						
CL2 II	Middle	1b		21,07	21,0133333	20,44	20,4166667	0,59666667	0,66128007		
CL2 II	Middle	1b		20,97		20,42					
CL2 II	Middle	1b		21		20,39					
CL2 II	Middle	2a		20,81	20,9866667	20,17	20,2	0,78666667	0,5796819		
CL2 II	Middle	2a		21		20,13					
CL2 II	Middle	2a		21,13		20,3					
CL2 II	Middle	2b		20,83	20,8333333	20,8	20,66	0,17333333	0,88679139		
CL2 II	Middle	2b		20,84		20,55					
CL2 II	Middle	2b		20,83		20,63					
XT2	Middle	1a	<i>rpl2</i>	22,27	22,37	21,63	21,7533333	0,61666667	0,65217603	0,84855134	0,3155161
XT2	Middle	1a		22,47		21,89					
XT2	Middle	1a		22,37		21,74					
XT2	Middle	1b		22,25	22,2066667	21,44	21,41	0,79666667	0,57567774		
XT2	Middle	1b		22,18		21,47					
XT2	Middle	1b		22,19		21,32					
XT2	Middle	2a		21,68	21,76	22,23	22,1133333	-0,35333333	1,27750889		
XT2	Middle	2a		21,85		22,18					
XT2	Middle	2a		21,75		21,93					
XT2	Middle	2b		21,09	21,14	20,95	20,97	0,17	0,88884268		
XT2	Middle	2b	-			21,01					
XT2	Middle	2b		21,19		20,95					

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPPLICATE CT 18S	TRIPPLICATE DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STN.DV		
XT2	Bottom	1a	<i>rpl2</i>	20,53	20,6466667	20,7	20,655	-0,008333333	1,00579294	1,05155585	0,31613421
XT2	Bottom	1a		20,66		20,61					
XT2	Bottom	1a		20,75		-					
XT2	Bottom	1b		20,52	20,5	21,06	21,08	-0,58	1,49484925		
XT2	Bottom	1b		20,48		21,1					
XT2	Bottom	1b		20,5		-					
XT2	Bottom	2a		21,51	21,585	21,21	21,165	0,42	0,74742462		
XT2	Bottom	2a		-		21,12					
XT2	Bottom	2a		21,66							
XT2	Bottom	2b		21,34	21,305	21,17	21,24333333	0,061666667	0,95815657		
XT2	Bottom	2b		-		21,34					
XT2	Bottom	2b		21,27		21,22					
CL2 II	Bottom	1a		20,35	20,305	21,02	20,92	-0,615	<u>1,531558</u>	1,46836714	0,34008038
CL2 II	Bottom	1a		20,26		20,82					
CL2 II	Bottom	1a		-		-					
CL2 II	Bottom	1b		19,86	19,76333333	20,76	20,67	-0,906666667	<u>1,87470899</u>		
CL2 II	Bottom	1b		19,77		20,58					
CL2 II	Bottom	1b		19,66		-					
CL2 II	Bottom	2a		22,41	22,52333333	20,64	20,63	1,893333333	0,26918439		
CL2 II	Bottom	2a		22,44		20,62					
CL2 II	Bottom	2a		22,72		-					
CL2 II	Bottom	2b		22,56	22,50333333	21,65	21,52666667	0,976666667	0,50815247		
CL2 II	Bottom	2b		22,59		21,53					
CL2 II	Bottom	2b		22,36		21,4					
CL2 II	Bottom	2a		20,08	20,09666667	20,69	20,6	-0,503333333	<u>1,41748487</u>		
CL2 II	Bottom	2a		20,07		20,61					
CL2 II	Bottom	2a		20,14		20,5					
CL2 II	Bottom	2b		20,14	20,08	20,16	20,15	-0,07	<u>1,04971668</u>		
CL2 II	Bottom	2b		19,95		20,14					
CL2 II	Bottom	2b		20,15		-					

## AII.5

### Análisis de resultados de RT-PCR cuantitativa en tiempo real para el gen *rpoB*

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE CT 18S	TRIPLICATE	DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STND.DEV.:	
XT2	Top	1a	<i>rpoB</i>	28,34	28,2333333	21,24	21,2266667	7,00666667	0,00777648	0,00905257	0,00106091
XT2	Top	1a		28,1		21,1					
XT2	Top	1a		28,26		21,34					
XT2	Top	1b		28,01	28,1033333	21,32	21,38	6,72333333	0,00946401		
XT2	Top	1b		28,02		21,45					
XT2	Top	1b		28,28		21,37					
XT2	Top	2a		28,06	28,08	21,21	21,2366667	6,84333333	0,00870866		
XT2	Top	2a				21,17					
XT2	Top	2a		28,1		21,33					
XT2	Top	2b		27,9	28,0133333	21,32	21,4066667	6,60666667	0,01026113		
XT2	Top	2b		28,12		21,52					
XT2	Top	2b		28,02		21,38					
CL2 II	Top	1a		26,62	26,5133333	21,62	21,595	4,91833333	0,03307		
CL2 II	Top	1a		26,39		21,57					
CL2 II	Top	1a		26,53	-						
CL2 II	Top	1b		26,55	26,68	22,07	22,07	4,61	0,04094979		
CL2 II	Top	1b		26,85		22,12					
CL2 II	Top	1b		26,64		22,02					
CL2 II	Top	2a		22,73	22,895	21,01	21,0166667	1,87833333	<u>0,27199776</u>	0,37297268	0,0774815
CL2 II	Top	2a		23,06		20,89					
CL2 II	Top	2a	-			21,15					
CL2 II	Top	2b		22,88	22,925	21,91	21,8033333	1,12166667	<u>0,45956261</u>		
CL2 II	Top	2b		22,97		21,64					
CL2 II	Top	2b	-			21,86					
CL2 II	Top	3a		22,3	22,12	20,74	20,685	1,435	<u>0,36984688</u>		
CL2 II	Top	3a		22,01		20,63					
CL2 II	Top	3a		22,05	-						
CL2 II	Top	3b		21,89	21,9633333	20,58	20,6066667	1,35666667	<u>0,39048346</u>		
CL2 II	Top	3b		21,87		20,56					
CL2 II	Top	3b		22,13		20,68					

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPLICATE CT 18S	TRIPLICATE DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STN.DV		
XT2	Middle	1a	<i>rpoB</i>	26,86	26,8566667	21,33	21,2866667	5,57	0,02105052	0,02278742	0,00680004
XT2	Middle	1a		26,79		21,19					
XT2	Middle	1a		26,92		21,34					
XT2	Middle	1b		27	27,06333333	20,93	21,01	6,053333333	0,01505792		
XT2	Middle	1b		27,05		21,04					
XT2	Middle	1b		27,14		21,06					
XT2	Middle	2a		27,09	26,9666667	21,74	21,56	5,406666667	0,02357388		
XT2	Middle	2a		26,78		21,38					
XT2	Middle	2a		27,03		-					
XT2	Middle	2b		26,17	26,2666667	21,3	21,2766667	4,99	0,03146736		
XT2	Middle	2b		26,28		21,25					
XT2	Middle	2b		26,35		21,28					
CL2 II	Middle	1a		25,64	25,46333333	20,6	20,54	4,923333333	0,03295558	0,03807155	0,00897496
CL2 II	Middle	1a		25,4		20,48					
CL2 II	Middle	1a		25,35		-					
CL2 II	Middle	1b		25,17	25,21333333	20,44	20,4166667	4,796666667	0,03597986		
CL2 II	Middle	1b		25,22		20,42					
CL2 II	Middle	1b		25,25		20,39					
CL2 II	Middle	2a		25,33	25,16333333	20,17	20,2	4,963333333	0,03205441		
CL2 II	Middle	2a		25,04		20,13					
CL2 II	Middle	2a		25,12		20,3					
CL2 II	Middle	2b		25,02	24,945	20,8	20,66	4,285	0,05129635		
CL2 II	Middle	2b		24,87		20,55					
CL2 II	Middle	2b				20,63					

GENOTYPE	TISSUE	RNA/cDNA	GENE	CT VALUE	TRIPPLICATE CT 18S	TRIPPLICATE	DELTA CT	2/-Delta CT	AVERAGE	STN.DV	
XT2	Bottom	1a	<i>rpoB</i>	24,17	24,21	21,16	21,2	3,01	0,12413656	0,12536297	0,04200688
XT2	Bottom	1a		24,25		21,22					
XT2	Bottom	1a	-			21,22					
XT2	Bottom	1b		23,37	23,52	21,06	21,08	2,44	0,18428365		
XT2	Bottom	1b		23,71		21,1					
XT2	Bottom	1b		23,48	-						
XT2	Bottom	2a		24,87	24,6766667	21,21	21,165	3,51166667	0,08767646		
XT2	Bottom	2a		24,56		21,12					
XT2	Bottom	2a		24,6							
XT2	Bottom	2b		24,42	24,49	21,17	21,2433333	3,24666667	0,10535519		
XT2	Bottom	2b		24,49		21,34					
XT2	Bottom	2b		24,56		21,22					
CL2 II	Bottom	1a		22,73	22,5966667	21,02	20,92	1,67666667	<u>0,31280453</u>	0,34450475	0,06063188
CL2 II	Bottom	1a		22,55		20,82					
CL2 II	Bottom	1a		22,51	-						
CL2 II	Bottom	1b		22	22,06	20,76	20,67	1,39	<u>0,3815648</u>		
CL2 II	Bottom	1b		22,12		20,58					
CL2 II	Bottom	1b		22,06	-						
CL2 II	Bottom	2a		25,43	25,3166667	20,64	20,63	4,68666667	0,03883048		
CL2 II	Bottom	2a		25,1		20,62					
CL2 II	Bottom	2a		25,42	-						
CL2 II	Bottom	2b		25,01	25,1066667	21,65	21,5266667	3,58	0,08362047		
CL2 II	Bottom	2b		25,03		21,53					
CL2 II	Bottom	2b		25,28		21,4					
CL2 II	Bottom	2a		22,01	21,895	20,69	20,6	1,295	<u>0,40753617</u>		
CL2 II	Bottom	2a		21,78		20,61					
CL2 II	Bottom	2a	-			20,5					
CL2 II	Bottom	2b		21,78	22,0066667	20,16	20,15	1,85666667	<u>0,2761135</u>		
CL2 II	Bottom	2b		22,09		20,14					
CL2 II	Bottom	2b		22,15	-						