

Tesis Doctoral

Análisis molecular y funcional de líneas citoplásmicas con deficiencias clorofílicas originadas por un gen mutador de cloroplastos de cebada

Landau, Alejandra Mabel

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Landau, Alejandra Mabel. (2008). Análisis molecular y funcional de líneas citoplásmicas con deficiencias clorofílicas originadas por un gen mutador de cloroplastos de cebada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Landau, Alejandra Mabel. "Análisis molecular y funcional de líneas citoplásmicas con deficiencias clorofílicas originadas por un gen 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

**ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LÍNEAS
CITOPLÁSMICAS CON DEFICIENCIAS CLOROFÍLICAS
ORIGINADAS POR UN GEN MUTADOR DE
CLOROPLASTOS DE CEBADA**

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

Alejandra Mabel Landau

Directores de tesis: Ing. Agr. Ms. Sci. Alberto Raúl Prina

Dr. Horacio Esteban Hopp

Consejero de estudios: Dra. Sara Maldonado

Instituto de Genética "Ewald A. Favret" CICVyA-CNIA-INTA

Buenos Aires, 2008

ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LÍNEAS CITOPLÁSMICAS CON DEFICIENCIAS CLOROFÍLICAS ORIGINADAS POR UN GEN MUTADOR DE CLOROPLASTOS DE CEBADA

Resumen

Los cloroplastos son organelas exclusivas de la célula vegetal y en ellas se produce uno de los procesos más fundamentales de la vida terrestre que es la fotosíntesis. Las mismas poseen su propio ADN o plastoma que se hereda de manera citoplasmática. El plastoma está altamente conservado observándose poca variabilidad natural y la inducción artificial de mutaciones ha sido dificultosa. En el Instituto de Genética se caracterizó genéticamente un gen mutador de cloroplastos en cebada que induce un amplio espectro de mutaciones plastómicas. En este trabajo de tesis se analizaron y caracterizaron fisiológica, bioquímica y molecularmente tres mutantes aisladas a partir del genotipo mutador, las líneas citoplásmicas LC2, LC3 y LC9.

Para la mutante LC9, de tipo *virescente*, no se hicieron postulaciones sobre posibles genes candidatos, sin embargo, de acuerdo a los resultados del análisis de RFLPs pudo concluirse que esta línea mutante no porta grandes rearrreglos o deleciones en el plastoma.

En el caso de la mutante LC2, de tipo *albo-viridis*, los resultados de determinación de pigmentos y proteínas codificadas por el plastoma en experimentos de imbibición de las semillas con antibióticos que inhiben la traducción plastídica, sugirieron que las plántulas LC2 tienen un retraso en la síntesis de proteínas plastídicas en la parte superior de la lámina de la primera hoja, proceso que en el caso de la cebada normal se produciría antes de la germinación. El único gen en el plastoma involucrado en la regulación de la traducción cloroplástica es el gen *infA*, que fue postulado como candidato del fenotipo LC2. Luego de su secuenciación se halló una mutación puntual que produce un cambio de aminoácido en la proteína IF1 ("initiation factor 1"). Se concluyó que se trata de una mutante del gen *infA*, siendo la primera vez que un fenotipo mutante es atribuido a este gen en plantas superiores. Además, el fenotipo LC2 se vió estrechamente asociado a mutaciones en el gen *infA* como claramente se demostró mediante el aislamiento de nuevas mutantes tipo LC2 (LC2-like).

En el caso de la mutante LC3, de tipo *viridis* y sensible a alta temperatura, se analizó la composición de clorofilas y carotenoides demostrándose que LC3 tiene un menor contenido de clorofilas totales en comparación con el control, sobre todo a alta temperatura. Los resultados del contenido de pigmentos del ciclo de las

xantofilas indicaron que la mutante sufre de estrés fotooxidativo. También se realizaron mediciones de los espectros de fluorescencia de la clorofila a temperatura ambiente y a 77 K, y éstos demostraron fotoinhibición y un fotosistema I (PSI) afectado en LC3. A nivel de proteínas de las tilacoides, se encontró que en LC3 estaban disminuidos o ausentes algunos polipéptidos componentes del PSI cuando la mutante creció en condiciones de luz y temperatura determinadas. A partir de estos resultados se postularon como responsables los *loci ycf3* e *ycf4*, que codifican para dos chaperoninas involucradas en el ensamblaje del PSI. En el primero de ellos se encontraron dos mutaciones puntuales localizadas en el intrón 1 que afectaron la eficiencia de "splicing" de este gen que se vio disminuida en función de la temperatura.

Los resultados indican que el genotipo mutador estudiado es una fuente promisoría para el análisis funcional del plastoma.

Palabras clave: cloroplasto, cebada, mutantes de plastoma, genotipo mutador, *infA*, *ycf3*, PSI.

MOLECULAR AND FUNCTIONAL ANALYSES OF CHLOROPHYLL DEFICIENT CYTOPLASMIC LINES ORIGINATED FROM A CHLOROPLAST MUTATOR GENE

Summary

Chloroplasts are exclusive organelles of the plant cell. Photosynthesis, one of the major processes for life in Earth, is carried out within them. These organelles hold their own DNA or plastome which is cytoplasmically inherited and highly conserved. Natural variability of the plastome is hardly observed and the artificial induction of mutations has been very difficult to obtain. A barley chloroplast mutator gene was genetically characterized in the Institute of Genetics, which induces a wide spectrum of plastome mutations. In this thesis, three chloroplast mutants isolated from the mutator genotype, the cytoplasmic lines CL2, CL3 and CL9, were analyzed from physiological, biochemical and molecular approaches.

In the case of CL2 mutant, an *albo-viridis* type, the results of pigment and chloroplast proteins determination in experiments of seed imbibitions with antibiotics that inhibit chloroplast translation, suggest that CL2 seedlings have a delay in chloroplast protein synthesis in the upper part of the first leaf blade. In the wild type barley, this process appears to take place before germination.

The only plastome gene involved in the regulation of chloroplast translation is the *infA* gene, which was consequently postulated as a candidate gene for CL2 phenotype. After sequencing *infA* gene in CL2, a point mutation that changed an amino acid in IF1 (initiation factor 1) protein was found. It was concluded that CL2 is an *infA* gene mutant, being this the first time that a mutant phenotype is associated to this gene in higher plants. Furthermore, the CL2 phenotype was observed to be closely linked to mutations in *infA* gene, as was clearly demonstrated after isolation of new CL2-like mutants.

In the case of CL3 mutant, a *viridis* and temperature-sensitive type, the chlorophyll and carotenoids composition was determined showing that CL3 has lower chlorophyll content than the wild type, especially at high temperature.

The results of xanthophylls cycle pigment content pointed out that the mutant suffers from photo-oxidative stress. Furthermore, the chlorophyll fluorescence spectra at room temperature or at 77 K indicated photoinhibition and an affected photosystem I (PSI) in CL3.

When the thylakoid proteins were analyzed, some PSI subunits were found to be decreased or absent in CL3 when the seedlings were grown under certain light and temperature conditions.

Taking into account the above mentioned results, the *loci ycf3* and *ycf4*, which encode two chaperones involved in PSI assembly, were postulated as candidate genes for CL3 phenotype. After sequencing both genes, two point mutations were found in intron 1 of *ycf3*, which showed to affect splicing depending on temperature.

CL9 mutant, a virescent type, does not bear any conspicuous rearrangements or deletions in the plastome detectable by RFLP in the conditions assayed in this thesis. Postulations on possible candidate genes were not elaborated for this mutant and the molecular basis of the mutation remains to be established.

The results indicate that the mutator genotype in study is a promising resource for the functional analysis of the plastome.

Key words: chloroplast, barley, plastome mutants, mutator genotype, *infA*, *ycf3*, PSI.

Agradecimientos:

-A mis directores Alberto Prina y Esteban Hopp, por darme la oportunidad de trabajar en el INTA y por confiar en mí.

-A mis compañeros del IGEEAF, en especial a Gaby Pacheco, Noemí Colombo, Roberto Civitillo, Vale Etchart, Laurita Lima, Dalia Lewi, Antonio Díaz Paleo, Ezequiel Bossio, Paulita Faccio, Ceci Décima, Germán González, Fernando Ardila, Sarita Ameijeiras, y Abel Moglie, por su ayuda, consejos o por simplemente aguantarme.

-A Thomas Börner, Heiko Lokstein y Henrik Scheller por darme la oportunidad de trabajar en sus laboratorios y por enseñarme.

-A Juan José Guiamet por sus consejos y donación de anticuerpos.

-A Verónica Láinez y Sara Maldonado por su ayuda y colaboración en los experimentos de microscopía electrónica.

-A mis padres y a Dany que siempre me brindaron su apoyo incondicional.

Para Laura

Parte de los resultados presentados en esta tesis se encuentran publicados en los siguientes trabajos:

"Two *infA* gene mutations independently originated from a mutator genotype in barley". Landau A., Díaz Paleo A., Civitillo R., Jaureguiualzo M., Prina A. R. (2007) J. Hered. 98(3): 272–276.

"A cytoplasmically inherited mutant controlling early chloroplast development in barley seedlings". Prina A. R., Arias M. C., Láinez V., Landau A., Maldonado S. (2003) Theor. Appl. Genet. 107: 1410–1418.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1 La cebada.	1
I.2 El cloroplasto.	1
I.2.1 Origen de los cloroplastos.	3
I.2.2 La genética cloroplástica.	5
I.2.2.1 Estructura del genoma cloroplástico o plastoma.	5
I.2.2.2 Transcripción y traducción en los cloroplastos.	7
I.2.3 Relación núcleo-cloroplasto.	8
I.2.4 Variabilidad plastómica y mutantes cloroplásticas.	10
I.3 El gen mutador de cloroplastos de cebada.	11
I.4 Las líneas citoplásmicas (LCs) originadas por el mutador de cloroplastos de cebada.	12
II. ANÁLISIS DE LA MUTANTE LC9 O LÍNEA CITOPLÁSMICA 9	14
II.1 INTRODUCCIÓN	15
II.2 OBJETIVOS	16
II.3 MATERIALES Y MÉTODOS	17
II.3.1 Material vegetal.	17
II.3.2 Métodos.	17
II.3.2.1 Extracción de ADN de cloroplasto.	17
II.3.2.2 Cuantificación del ADN.	17
II.3.2.3 RFLPs con ADN de cloroplasto.	17
II.3.2.4 Aislamiento de membranas tilacoides.	18
II.3.2.5 Medición de clorofila y solubilización de las tilacoides.	18
II.3.2.6 Minigeles de SDS-PAGE.	19
II.3.2.7 Tinción de minigeles con Coomassie blue.	19
II.4 RESULTADOS	20
II.4.1 Análisis de polimorfismos en el ADN del cloroplasto entre la mutante LC9 y su línea madre MC169 GRAL.	20
II.4.2 Perfil de proteínas de tilacoides.	21
II.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	23
III. ANÁLISIS DE LA MUTANTE LC2 O LÍNEA CITOPLÁSMICA 2	24
III.1 INTRODUCCIÓN	25
III.2 OBJETIVOS	27

III.3 MATERIALES Y MÉTODOS	28
III.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.	28
III.3.2 Métodos.	28
III.3.2.1 Extracción de ADN total.	28
III.3.2.2 Cuantificación del ADN.	28
III.3.2.3 Tratamiento con antibióticos.	28
III.3.2.4 Determinación de pigmentos por espectrofotometría.	29
III.3.2.5 Métodos utilizados para el análisis del gen <i>infA</i>.	29
III.3.2.5.1 PCR para amplificar el gen <i>infA</i>.	29
III.3.2.5.2 Clonado de los fragmentos de PCR y secuenciación.	30
III.3.2.5.3 Alineamiento de secuencias.	30
III.3.2.5.4 Extracción de ARN total.	30
III.3.2.5.5 Cuantificación del ARN.	31
III.3.2.5.6 Tratamiento del ARN con ADNasa.	31
III.3.2.5.7 RT-PCR sobre el transcripto del gen <i>infA</i>.	31
III.3.2.5.8 Clonado del ADNc de <i>infA</i> en LC2 y en el genotipo salvaje.	32
III.3.2.6 Aislamiento de membranas tilacoides.	32
III.3.2.7 Medición de clorofila y solubilización de las tilacoides.	32
III.3.2.8 Minigeles de SDS-PAGE.	32
III.3.2.9 Tinción de minigeles con Coomassie blue.	32
III.3.2.10 Western blots.	32
III.3.2.11 Experimento de complementación de un knock-out del gen <i>infA</i> en <i>E. coli</i>.	33
III.4 RESULTADOS	35
III.4.1 Tratamiento con antibióticos.	35
III.4.2 El gen cloroplástico <i>infA</i> como candidato del fenotipo LC2.	36
III.4.2.1 Secuenciación del gen <i>infA</i> en LC2.	37
III.4.3 Western blots de proteínas tilacoidales.	39
III.4.4 Aislamiento de nuevas mutantes con fenotipo similar a LC2.	40
III.4.5 Experimento de complementación de un knock-out del gen <i>infA</i> en <i>E. coli</i>.	44
III.5 DISCUSIÓN	45

III.6 CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	49
IV. ANÁLISIS DE LA MUTANTE LC3 O LÍNEA CITOPLÁSMICA 3	50
IV.1 INTRODUCCIÓN	51
IV.1.2 El fenotipo LC3.	51
IV.1.3 Mutantes <i>viridis</i> de cebada.	51
IV.1.4 Mutantes sensibles a alta temperatura.	52
IV.1.5 Los fotosistemas.	53
IV.1.5.1 El fotosistema I (PSI).	53
IV.1.5.2 El fotosistema II (PSII).	54
IV.2 OBJETIVOS	56
IV.3 MATERIALES Y MÉTODOS	57
IV.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.	57
IV.3.2 Métodos.	57
IV.3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN total.	57
IV.3.2.2 Determinación del porcentaje de agua en tejido fresco.	57
IV.3.2.3 Determinación de pigmentos.	57
IV.3.2.3.1 Determinación de pigmentos por espectrofotometría.	57
IV.3.2.3.2 Determinación de pigmentos por HPLC.	57
IV.3.2.4 Medición de fluorescencia de la clorofila.	58
IV.3.2.4.1 Fluorescencia de la clorofila a temperatura ambiente.	58
IV.3.2.4.2 Fluorescencia de la clorofila a 77 K.	58
IV.3.2.5 Análisis de proteínas.	58
IV.3.2.5.1 Aislamiento de membranas tilacoides.	58
IV.3.2.5.2 Medición de clorofila y solubilización de las tilacoides.	59
IV.3.2.5.3 Minigeles de SDS-PAGE.	59
IV.3.2.5.4 Tinción de minigeles con Coomassie blue.	59
IV.3.2.5.5 Western blots.	59
IV.3.2.6 Análisis de ARN.	59
IV.3.2.6.1 Extracción de ARN total.	59
IV.3.2.6.2 Cuantificación del ARN.	59
IV.3.2.6.3 Tratamiento del ARN con DNAsa.	59
IV.3.2.6.4 Northern blots.	59
IV.3.2.7 Métodos utilizados para el análisis del gen <i>ycf3</i>.	62
IV.3.2.7.1 PCR para amplificar el gen <i>ycf3</i>.	62

IV.3.2.7.2 Secuenciación de <i>ycf3</i> .	63
IV.3.2.7.3 Clonado del gen <i>ycf3</i> .	63
IV.3.2.7.4 RT-PCR sobre los transcritos del gen <i>ycf3</i> .	64
IV.3.2.7.5 Clonado de los ADNc de <i>ycf3</i> en la mutante LC3 y en el genotipo normal o salvaje MC182.	64
IV.3.2.7.6 Puesta a punto de un anticuerpo contra la proteína Ycf3 de cebada.	64
IV.3.2.8 Métodos utilizados para el análisis del gen <i>ycf4</i> .	65
IV.3.2.8.1 PCR para amplificar el gen <i>ycf4</i> para secuenciación.	65
IV.3.2.8.2 Clonado del gen <i>ycf4</i> .	65
IV.3.2.8.3 Alineamiento de secuencias.	66
IV.3.2.9 Análisis de Microscopía electrónica.	66
IV.4 RESULTADOS	67
IV.4.1 Observación del fenotipo de LC3 en diferentes condiciones de luz y temperatura.	67
IV.4.2 Determinación del porcentaje de agua en tejido fresco.	67
IV.4.3 Análisis de pigmentos clorofílicos.	68
IV.4.3.1 Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría.	68
IV.4.3.2 Cuantificación de pigmentos por HPLC.	70
IV.4.4 Mediciones de fluorescencia de la clorofila.	72
IV.4.4.1 Espectros de emisión de fluorescencia a 77 K.	72
IV.4.4.2 Espectros de emisión de fluorescencia a temperatura ambiente.	73
IV.4.5 Microscopía electrónica.	77
IV.4.6 Análisis de proteínas tilacoideas.	81
IV.4.6.1 Proteínas del PSII.	81
IV.4.6.2 Proteínas del complejo ATPasa.	83
IV.4.6.3 Proteínas del PSI.	83
IV.4.7 Análisis de la expresión de genes del PSI.	85
IV.4.8 El gen cloroplástico <i>ycf3</i> como candidato del fenotipo LC3.	87
IV.5 DISCUSIÓN	97
IV.5.1 Análisis de composición relativa de pigmentos y de fluorescencia de la clorofila. .	97
IV.5.2 Análisis de proteínas involucradas en la maquinaria fotosintética.	98
IV.5.3 Determinación de la base molecular de LC3.	101

IV.5.4 Análisis de microscopía electrónica.	103
IV.6 CONCLUSIÓN y PERSPECTIVAS	104
V. CONCLUSIÓN GENERAL	105
VI. BIBLIOGRAFÍA	106

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa I
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNcp	ADN cloroplástico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosin 5'-trifosfato
BSA	seroalbúmina bovina
Ca	clorofila a
Cb	clorofila b
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
dATP	deoxiadenosin trifosfato
dCTP	deoxicitidin trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	deoxiguanosin trifosfato
dNTP	deoxinucleósido trifosfato
DTT	ditiotreitól
dTTP	deoxitimidin trifosfato
dUTP	deoxiuridin trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EtBr	bromuro de etidio
g	gramos o gravedad
HEPES	N-(2-hidroxiethyl) piperazin N'-(2-etano ácido sulfónico)
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	isopropil-1-tio- β -D-galactósido
IR	repetición invertida
kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
LB	medio de cultivo Luria Bertani
LHC	light harvesting complex
mA	miliampers
MOPS	ácido sulfónico 3-(N-morfolino) propano
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
nm	nanometro

NPQ	"quenching" no fotoquímico
ORF	marco de lectura abierto (open reading frame)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PSI	fotosistema I
PSII	fotosistema II
qP	"quenching" fotoquímico
RFLP	restriction-fragment-length-polymorphisms
ARNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcriptasa reversa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SSC	buffer citrato salino estandar
TBE	buffer Tris-borato-EDTA
TEM	microscopía electrónica
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilen diamina
TTBS	buffer Tris-borato-salino con Tween 20
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1 La cebada.

La cebada es una planta diploide autógena que además de ser un cultivo de gran importancia comercial es un material experimental muy adecuado para investigaciones genéticas. Tiene sólo siete pares de cromosomas, que pueden ser visualmente identificados al microscopio óptico y que han sido objeto de extensivos análisis citogenéticos. Existe una enorme cantidad de información del uso de la cebada en experimentación sobre inducción de mutaciones por agentes químicos y por radiaciones ionizantes, habiéndose originado de esta forma una gran diversidad genética que se sumó a la ya muy importante diversidad natural existente en los bancos de germoplasma. Además, esta planta se ha convertido en uno de los principales materiales experimentales en cuanto al desarrollo de conocimientos relevantes a nivel bioquímico y molecular. La cebada tiene una larga historia como cultivo domesticado, fue usada inicialmente como fuente de alimento de humanos y animales y más tarde se la utilizó para la elaboración de la cerveza. Además, también se la utiliza para elaborar otras bebidas basadas en el proceso de destilación como el whisky. Según datos de USDA-FAS, en diciembre de 2007 la producción mundial de cebada fue de 133.678.000 de toneladas métricas y en Argentina, de 1.200.000 de toneladas métricas. El cultivo de la cebada muestra un espectro muy amplio de adaptación, ya que crece tanto en condiciones de fertilidad como en zonas marginales, incluyendo altitudes de hasta 4.500 m en el Himalaya, zonas inundadas del sudeste asiático, y zonas áridas del Mediterráneo.

I.2 El cloroplasto.

Los cloroplastos (Fig. I.1) son organelas típicas de la célula vegetal. Los cloroplastos tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis y así proveen de carbohidratos a la célula vegetal. Éstos son sólo uno de los distintos tipos de plástidos que incluyen además amiloplastos (que acumulan gránulos de almidón, y se hallan en raíces y tubérculos); cromoplastos (que acumulan pigmentos como carotenoides y xantofilas, y se encuentran en flores y frutos); y etioplastos que son plástidos que se desarrollaron en plantas crecidas en oscuridad (López-Juez y Pyke, 2005). Todos ellos provienen de un tipo básico de plástidos, los proplástidos embrionarios a partir de los cuales se diferencian y desarrollan. Los proplástidos son pequeños (1-2 μm de diámetro, Robertson y Laetsch, 1974) respecto de los tipos diferenciados y no contienen pigmentos. Éstos se encuentran en tejidos meristemáticos tanto del tallo como de los ápices de las raíces (Waters y Pike, 2005). Los plástidos son portadores de ADN y los genes codificados por su genoma

(plastoma) tienen una herencia de tipo citoplasmática con reglas que considerablemente difieren de las leyes mendelianas de la genética aplicadas a los genes nucleares (Birky 2001).

Los cloroplastos se caracterizan por estar delimitados por una doble membrana, compuesta por una capa externa ("outer envelope") y una interna ("inner envelope"). Además, cuentan con membranas internas llamadas tilacoides, que se forman por invaginación de esta última. Las tilacoides forman vesículas chatas, conteniendo un espacio interno o lumen, algunas de las cuales se presentan en forma individual (tilacoides del estroma), y otras aparecen apiladas, constituyendo la grana. Las tilacoides alojan a los cuatro principales complejos fotosintéticos: fotosistema I, fotosistema II, citocromo b_6/f y ATP sintasa (Fig. I.2). (López-Juez y Pyke, 2005). Los fotosistemas están compuestos por polipéptidos, moléculas de clorofila y moléculas aceptoras y dadoras de electrones. Todos los complejos tienen parte de sus componentes codificados por el núcleo y por el cloroplasto.

Además de la función de fotosíntesis, proceso fundamental para la vida en la Tierra, los cloroplastos tienen otras importantísimas funciones como: la síntesis de ácidos grasos, la formación de tetrapirroles y carotenoides, la reducción del nitrógeno, el metabolismo del sulfuro, la síntesis de aminoácidos y el almacenamiento de almidón, proteínas y lípidos.

En el caso de la cebada, la herencia de los plástidos es estrictamente materna (Tsuchiya, 1987; Mogensen, 1996). Además, la cebada sirve como un buen modelo de planta para el análisis molecular del cloroplasto ya que se puede obtener un gran número de cloroplastos poco tiempo después de la siembra (por ejemplo de plántulas de 5 días) (Okkels, 1992). El crecimiento de la hoja en monocotiledóneas como la cebada ocurre primariamente por división celular en el meristema basal y elongación de las células cerca de la base de la hoja. En consecuencia, una sola hoja de cebada contiene proplástidos en las células meristemáticas en la base de la hoja (Mullet, 1988) y progresivamente, cloroplastos maduros hacia la punta de la hoja, proveyendo un material de fácil acceso para el estudio del desarrollo del cloroplasto (Okkels, 1992; Baumgartner et al., 1989).

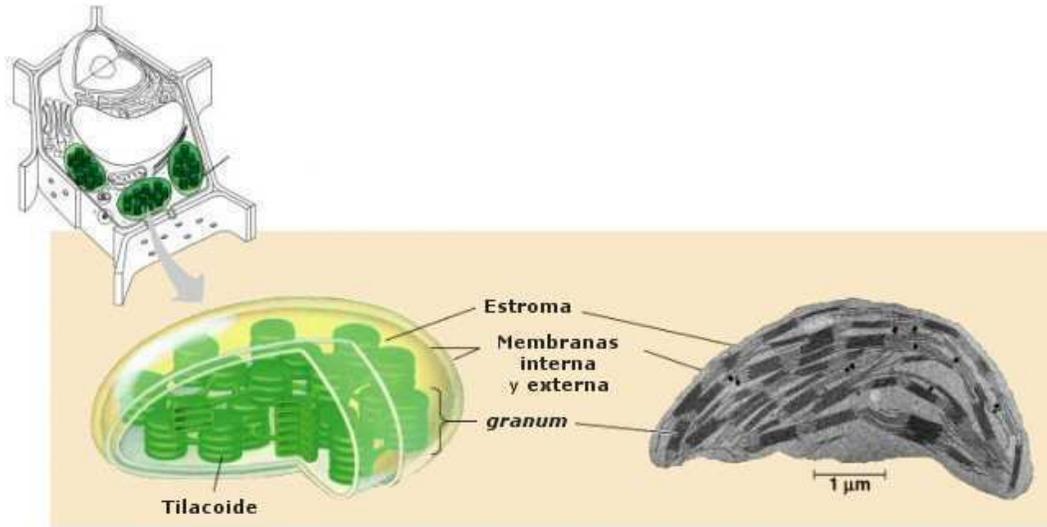


Figura. I.1 Esquema e imagen de microscopía electrónica de un cloroplasto. Tomado de "The Internet Encyclopedia of Science".

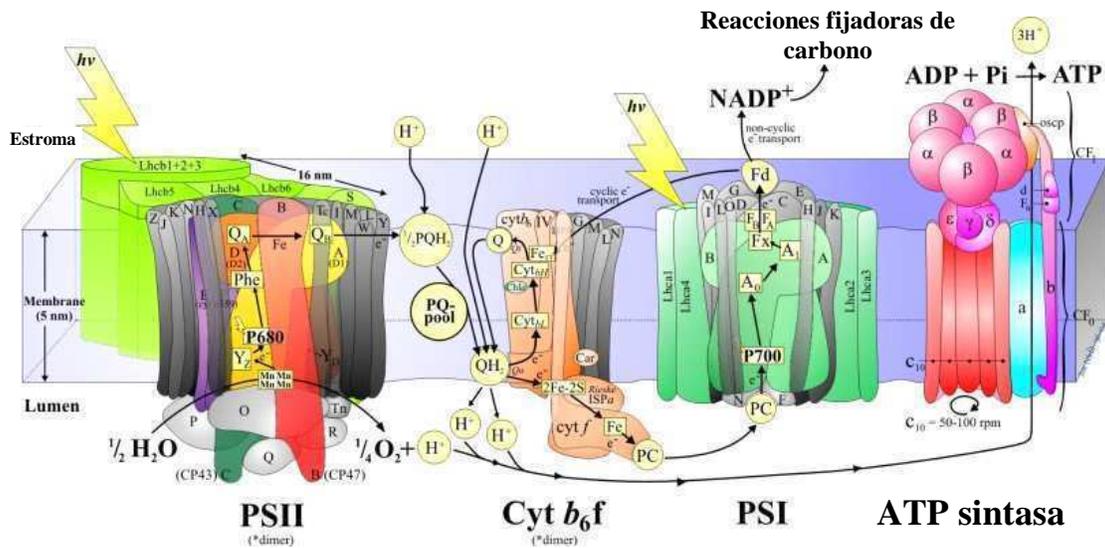


Figura. I.2 Representación esquemática de los complejos fotosintéticos de la cadena de transporte de electrones.

I.2.1 Origen de los cloroplastos.

Los cloroplastos son organelas semi-autónomas que se originaron en lo que fueron alguna vez precursores de las cianobacterias o algas verde-azuladas libres y han preservado remanentes del genoma eubacteriano. La teoría de la endosimbiosis (Kutschera y Niklas, 2005) postula que un organismo unicelular fotosintético

procariota arcaico habría sido fagocitado por un ancestro eucariota unicelular no fotosintético, en cuyo citoplasma habría quedado incluido (Fig. I.3). Este evento se conoce como endosimbiosis primaria que dio origen a las glaucocitas, las algas rojas y las algas verdes. Estas últimas dieron origen a las plantas terrestres. Otros organismos como los euglenidos y los dinoflagelados provienen de endosimbiosis secundaria y terciaria respectivamente (Ravi *et al.*, 2008).

Según la teoría de endosimbiosis primaria ambos organismos iniciarían una relación de simbiosis que, con el tiempo, daría lugar a un solo organismo integrado, con capacidades metabólicas provenientes de la combinación de las de ambos predecesores. Las evidencias que apoyan esta teoría son las siguientes (McFadden, 2001):

- Los cloroplastos son similares a las bacterias en tamaño y estructura.
- Estas organelas están rodeadas de una doble membrana, la membrana externa derivaría de la vacuola de fagocitosis, y la membrana interna derivaría de la membrana plasmática del procariota original.
- Los cloroplastos contienen moléculas de ADN desnudo circular y se dividen por fisión binaria como las bacterias.
- Poseen sus propios ribosomas que se asemejan más a los procarióticos que a los eucarióticos y, de hecho, tienen la misma sensibilidad a antibióticos que los bacterianos (Galili *et al.*, 1989; Harris *et al.*, 1989; Kavanagh *et al.*, 1994; Yeh *et al.*, 1994).

Durante la evolución, los cloroplastos exportaron muchos de sus genes hacia el núcleo pero los productos de estos genes son reimportados con la ayuda de péptidos de tránsito y la maquinaria de importación de proteínas. Este proceso, a lo largo del tiempo, fue concentrando el material genético en el núcleo, de esta forma en los cloroplastos de las plantas superiores actualmente sólo se codifican alrededor de 60 a 90 proteínas (Martin y Herrmann, 1998; De Las Rivas, 2000; Ravi *et al.*, 2008). Ello hizo pensar en un momento que el genoma del cloroplasto jugaría un papel pasivo en la interacción con el genoma nuclear, como receptor de las señales nucleares. Sin embargo, también ocurren señales en la dirección inversa, demostrando que existe una interdependencia y necesidad mutua para la coordinación de la expresión de ambos genomas (Susek y Chory, 1992; Hess *et al.*, 1994; Rodermeil, 2001; Vothknecht y Westhoff, 2001; Pfannschmidt, 2003; Strand *et al.*, 2003; Woodson y Chory, 2008).

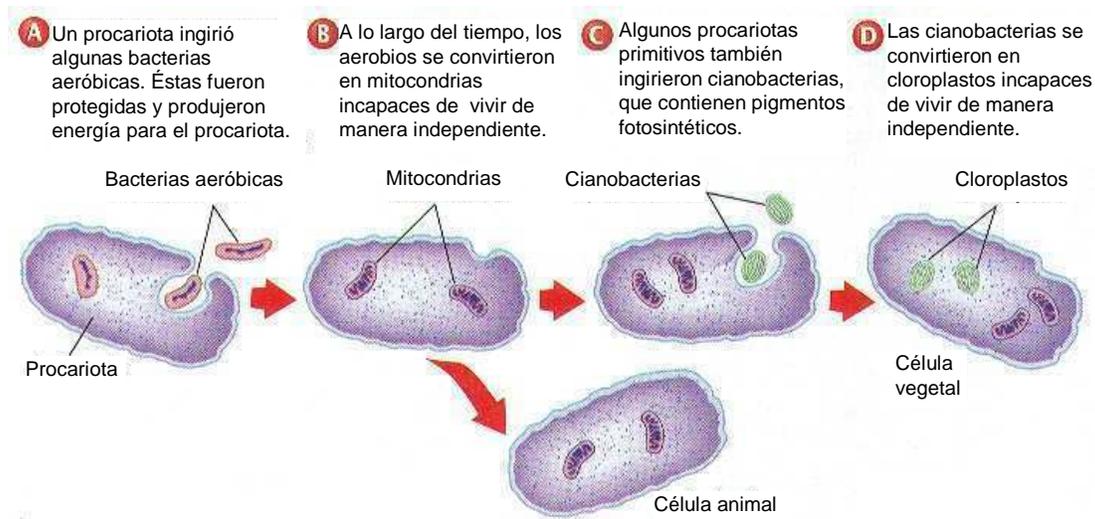


Figura. I.3 Imagen representativa de la teoría endosimbiótica. Origen de la célula animal y vegetal de algas verdes y plantas terrestres.

Tomado de <http://68.90.81.6/ScienceTAKS/Kingdom%20Details.htm>

I.2.2 La genética cloroplástica.

I.2.2.1 Estructura del genoma cloroplástico o plastoma.

El ADN cloroplástico o plastoma de las plantas superiores es un ADN doble cadena cuyas moléculas tienen un tamaño que ronda entre los 115 y los 165 kb en la mayoría de los organismos fotosintéticos (Ravi *et al.*, 2008). Se encuentran entre 1.000 y 10.000 copias de plastomas por célula. Hasta hace poco se creía que la mayoría de las moléculas de ADNcp eran circulares. Sin embargo, experimentos de electroforesis en campo pulsado indicaron que la mayoría del ADN cloroplástico se encuentra en la forma de monómeros lineales, multímeros y en formas complejas y ramificadas con sólo el 3 al 4 % como círculos (Rochaix, 2006).

Una característica de los plastomas es la presencia de largas repeticiones invertidas (IRs, "inverted repeats"), que pueden tener entre 10 y 85 kb, que separan el resto de la molécula en regiones de copia única grande y pequeña. Estos arreglos resultan en duplicaciones de los genes ARNr y de otros incluidos en las IRs. Sin embargo, existen excepciones a este patrón de organización génica como en algunas especies de legumbres, coníferas y algas que carecen de IRs (Sugiura *et al.*, 1998). La estructura y el contenido génico de los plastomas están conservados en diversidad de plantas. Los genes cloroplásticos se pueden agrupar en distintas categorías. Una de ellas comprende a los genes de fotosíntesis incluyendo al PSI, PSII, citocromo b6f, ATP sintasa, RuBisCo y NAD(P)H dehidrogenasa. Otro grupo es

el de los genes ARN y que codifican para el aparato genético, es decir, los ARN de transferencia, ARN ribosomales, ARN polimerasa y proteínas ribosómicas. El tercer grupo comprende a los ORFs conservados llamados *ycfs* ("Hypothetical chloroplast open reading frames") y a otros genes como *matK*, que codifica para una maturasa, y *cemA*, que codifica para una proteína de la membrana interna (Ravi *et al.*, 2008). Actualmente han sido secuenciados los genomas cloroplásticos de 128 organismos fotosintéticos (http://www.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/cp_list.html), como por ejemplo, tabaco, arroz, maíz, Arabidopsis, Oenothera, espinaca, *Pinus thunbergii*, *Marchantia polymorpha*, Chlorella, Euglena y trigo. La comparación de las secuencias de los plastomas en general ha demostrado la naturaleza conservativa de la evolución genética de los cloroplastos. Sin embargo, en algunas angiospermas se han encontrado alteraciones estructurales como inversiones, translocaciones y deleciones (Ogihara *et al.*, 2002).

Es importante mencionar aquí que la secuencia del plastoma de cebada recién estuvo disponible en noviembre de 2006 por lo cual, para diseñar oligonucleótidos que nos permitieran amplificar y aislar genes de cloroplasto de cebada, nos basamos en la secuencia del genoma cloroplástico de trigo. El número de acceso al plastoma de cebada publicado en NCBI es NC_008590, su tamaño es de 136.462 pb y codifica para 141 genes.

En varias comparaciones de algunos genes específicos entre cebada y otras especies, hemos hallado las mayores homologías con el trigo.

El genoma cloroplástico de trigo tiene 134.545 pb y cada uno de los IRs tiene un tamaño de 20.703 pb. Las regiones IR dividen el resto de la secuencia en un fragmento de 80.349 pb (LSC, "large single-copy") y otro de 12.790 pb (SSC, "small single-copy") (Fig. I.4). (Ogihara *et al.*, 2002). El genoma cloroplástico de trigo codifica los ARNr 16S, 23S, 4.5S y 5S, 30 ARNt, 31 proteínas de la maquinaria fotosintética, 26 proteínas del sistema transcripción-traducción, 11 proteínas del complejo NADH-dehidrogenasa, 3 proteínas misceláneas y 5 ORFs (Ogihara *et al.*, 2000). Dos de éstos últimos, *ycf3* y *ycf4*, están involucrados en el ensamblaje del PSI en *Chlamydomonas* (Boudreau *et al.*, 1997).

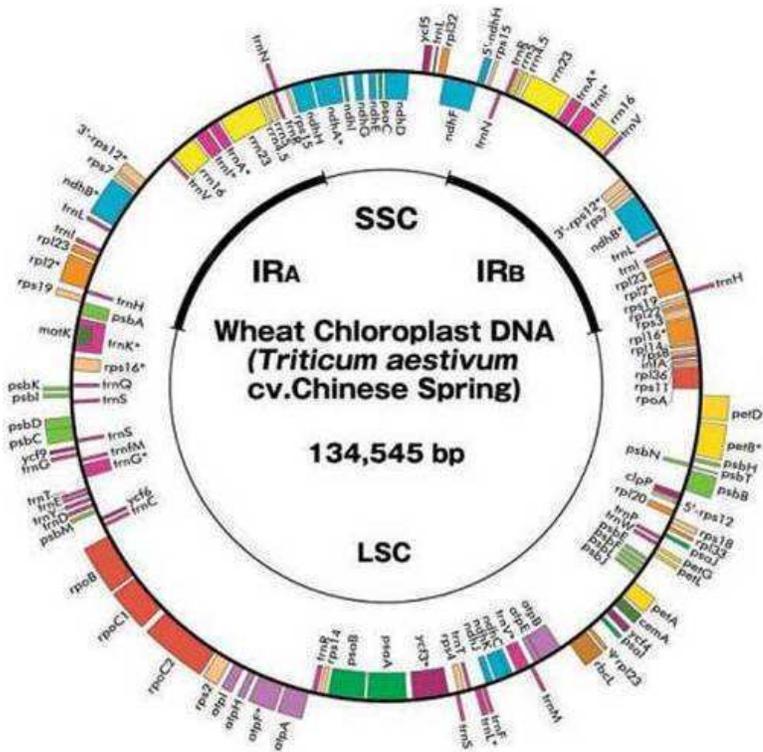


Figura. I.4 Genoma del cloroplasto de trigo. Los genes que aparecen del lado de afuera del círculo se transcriben en el sentido contrario a las agujas del reloj. Los genes marcados con asteriscos contienen intrones (Tomado de Ogiwara *et al.* 2002).

I.2.2.2 Transcripción y traducción en los cloroplastos.

La mayoría de los genes de cloroplasto forman "clusters" y son transcritos policistricamente, lo que se considera una reminiscencia de los operones bacterianos. En arroz, Kanno y Hirai (1993) encontraron 16 "clusters" y 22 transcritos monocistricos.

Los genes o "clusters" de cloroplasto están generalmente precedidos por las secuencias consenso en las posiciones -35 y -10 típicos de los promotores procariontas. Estos promotores procariontas son reconocidos por una ARN polimerasa de origen bacteriano, "*Escherichia coli*-like", codificada por el genoma plástido ("plastid-encoded RNA polymerase"= PEP) y son designados como promotores PEP. Además de estos promotores, existen unos alternativos, que no requieren de secuencias río arriba, como en el caso de algunos ARNt. También existen promotores regulados por luz como en el caso del "cluster" *psbD/C*. Hasta hace poco se creía que los promotores que son reconocidos por otra RNA polimerasa, codificada por el núcleo ("nuclear-encoded RNA polymerase"=NEP) se encontraban en genes que codifican proteínas ribosomales y algunas subunidades de ATPasa pero que estaban ausentes en genes de fotosíntesis (Stern *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios recientes utilizando un microarreglo genómico revelaron que en ausencia de PEP, la mayoría de los genes cloroplásticos son transcritos (Rochaix,

2006). Actualmente se sabe que la mayoría de los genes cloroplásticos tienen promotores para las dos polimerasas (Woodson y Chory, 2008).

La PEP se compone de cuatro subunidades codificadas por el cloroplasto, y una subunidad σ codificada por el núcleo. La NEP es una polimerasa tipo fago ("T7-like"). En dicotiledóneas existe también una ARN polimerasa tipo III codificada por el núcleo que se dirige a cloroplasto y a mitocondria (Sugita y Sugiura, 1996; Stern *et al.*, 1997; Liere y Börner, 2006; Azevedo *et al.*, 2006; Courtois *et al.*, 2007).

Algunos genes cloroplásticos contienen intrones, por lo cual, sus transcriptos necesitan del proceso de "splicing". La mayoría de los intrones del genoma del cloroplasto entran en la clasificación de grupo II (Vogel *et al.*, 1999) encontrada en los genomas nuclear y mitocondrial (Gruissem, 1989).

Los ARNm maduros y funcionales de cloroplastos, a diferencia de los encontrados en el citoplasma, no tienen estructuras cap, ni colas poli(A) (Sugiura *et al.*, 1998).

Los transcriptos de cloroplasto pueden ser sujetos a un mecanismo de procesamiento del ARN cambiando la identidad de nucleótidos individuales y alterando la información contenida en el ARNm. Este proceso se llama "RNA editing" y consiste en la conversión de residuos citosina a uracilo, y en algunas briófitas, también ocurre el proceso inverso, transiciones uracilo a citosina. El "editing" es un evento post-transcripcional y generalmente ocurre en la segunda posición del codón. Es un proceso confinado a los ARNm y no se verían afectados los ARNr, ARNt, ni los intrones (Bock, 2000). Además de los ribosomas y los ARNt, para la traducción de proteínas en el cloroplasto se requiere la presencia de factores iniciadores de la traducción, que son homólogos a los bacterianos (Stern *et al.*, 1997). El IF1 es el único codificado por el cloroplasto en monocotiledóneas y en algunas dicotiledóneas salvo en algunas excepciones como en la monocotiledónea *Tricyrtis* y en dicotiledóneas como *Arabidopsis* y el género *Solanum* (Millen *et al.*, 2001).

I.2.3 Relación núcleo-cloroplasto.

La mayoría de los complejos proteicos y las vías metabólicas de síntesis del cloroplasto contienen componentes codificados por el genoma nuclear y por el plastoma y en teoría todas las funciones cloroplásticas requieren la acción concertada de factores nucleares y plastídicos. Se requieren procesos regulatorios complejos para asegurar que la expresión de genes de proteínas codificadas por el núcleo esté correctamente coordinada con la expresión de proteínas codificadas por el plastoma.

El núcleo tiene control sobre el desarrollo del cloroplasto y a su vez, este último, envía señales al núcleo. Estas señales son conocidas como "el factor plastídico"

(Fig. I.5) (Rodermel, 2001; Vothknecht y Westhoff, 2001; Pfannschmidt, 2003). A diferencia de la mitocondria, el cloroplasto tiene un programa de desarrollo bien definido. Hasta ahora se postulaba que el núcleo inicia la diferenciación cloroplástica y provee de componentes clave para las maquinarias de transcripción y traducción requeridas para los estadios más tardíos del desarrollo, como la NEP polimerasa, proteínas ribosomales nucleares, etc. (Leon *et al.*, 1998). Sin embargo, bibliografía reciente demuestra que tanto el ARNm como la proteína PEP ya están presentes en la semillas secas en *Arabidopsis*, es decir que, los dos sistemas de transcripción plastídicos NEP y PEP se arman en paralelo durante la germinación y el desarrollo temprano de las plantas (Demarsy *et al.*, 2006).

La expresión de los genes fotosintéticos es regulada por varios factores externos e internos, de los cuales uno de los más importantes es la luz. La fotosíntesis funciona como un sensor de las señales lumínicas, y el estado redox de los componentes del transporte fotosintético de electrones junto con las moléculas solubles redox-activas actúan como parámetros de regulación. El estado redox de estos componentes afecta la expresión de genes cloroplásticos y nucleares representando un tipo de factor plastídico. Entonces, la fotosíntesis actuaría como un regulador dependiente de la luz, además de los conocidos fotorreceptores como los fitocromos y criptocromos. Muchos cambios en el ambiente de crecimiento de la planta hacen variar el potencial redox de los componentes de la cadena fotosintética de electrones, afectando así la eficiencia del transporte de electrones (Pfannschmidt, 2003).

Otras moléculas que se postulan como "factores plastídicos" son las porfirinas y los carotenoides. Las porfirinas son precursores de la síntesis de clorofila que sirven como señales plastídicas que regulan la expresión de genes nucleares fotosintéticos y no fotosintéticos (Susek y Chory, 1992; Kropat *et al.*, 1997; Rodermel, 2001; Strand *et al.*, 2003). Las plantas superiores usan Mg-protoporfirina IX como molécula de señal cloroplástica (Woodson y Chory, 2008). En *Arabidopsis*, los cloroplastos sin desarrollar que sufrieron daño fotooxidativo debido a la falta de carotenoides protectores, acumulan Mg-protoporfirina IX y ésta lleva a la represión de genes nucleares que codifican para proteínas relacionadas con la fotosíntesis (Woodson y Chory, 2008).

Los carotenoides son sintetizados en el cloroplasto y protegen al mismo del daño fotooxidativo atrapando la clorofila en estado excitado de triplete y el oxígeno singlete (Woodson y Chory, 2008).

Las especies reactivas del oxígeno mejor conocidas como ROS, que se generan a causa de estrés biótico o abiótico, también actúan como señales retrógradas que informan al núcleo sobre el daño cloroplástico para que aumente la síntesis de

enzimas antioxidantes y para que ajuste la maquinaria fotosintética para un aprovechamiento de la luz más eficiente (Woodson y Chory, 2008). En resumen, tanto los cloroplastos dañados como los inmaduros transmiten una señal para regular la expresión nuclear de genes de fotosíntesis. Esta regulación ocurre más frecuentemente a nivel transcripcional. El estado de desarrollo y/o metabólico de los plástidos no sólo afecta la expresión de genes nucleares sino también la de genes mitocondriales (Hess *et al.*, 1994; Hedtke *et al.*, 1999). La diferenciación celular y los patrones de morfogénesis de la hoja dependen del estado metabólico y de desarrollo del cloroplasto (Rodermel, 2001).

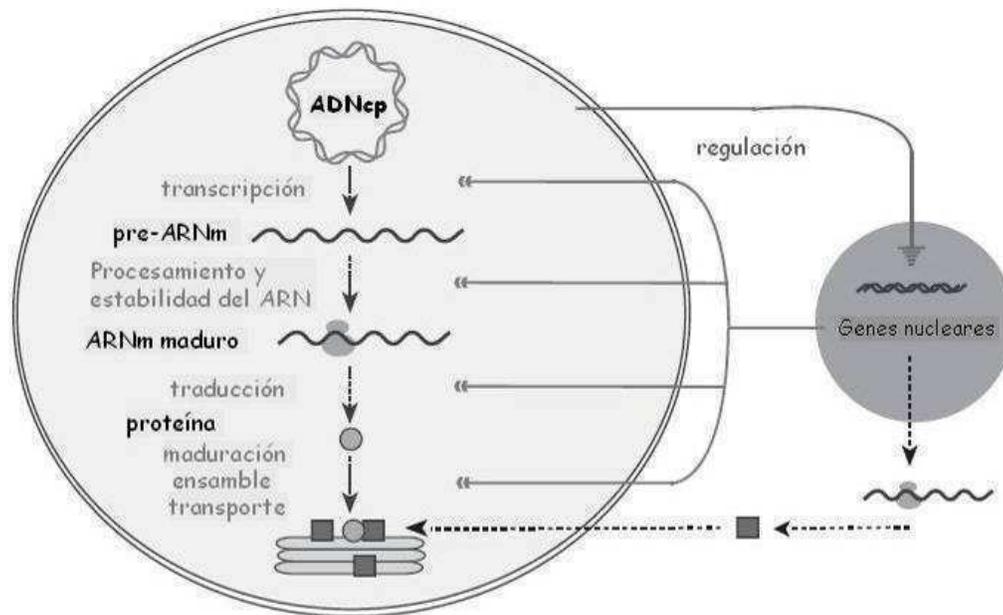


Figura I.5 Esquema de la interacción núcleo-cloroplasto. La síntesis de proteínas codificadas por el cloroplasto está regulada por factores nucleares desde el punto de vista de la expresión génica y la traducción hasta su final incorporación en las membranas tilacoides. Al mismo tiempo el cloroplasto indica al núcleo su estado de desarrollo. Esta señal influencia la expresión de genes nucleares (Tomado de Vothknecht y Westhoff, 2001).

I.2.4 Variabilidad plastómica y mutantes cloroplásticas.

La genética cloroplástica es altamente conservativa y se dispone de muy poca variabilidad natural o inducida (Clegg *et al.*, 1994). El estudio de la genética cloroplástica en plantas superiores se ha visto dificultado no solo por la falta de variabilidad, sino por falta de recombinación, por una segregación laxa y lenta de las potenciales variantes y la poliploidía.

Sin embargo, se han encontrado mutantes para genes localizados en el genoma cloroplástico que afectan a la maquinaria de traducción plastídica, a los

fotosistemas PSI, PSII, al complejo citocromo b_6f , a la fijación de carbono (Rubisco) o al complejo ATP sintasa (Börner y Sears, 1986). Estas mutantes aparecieron espontáneamente o fueron inducidas por mutágenos o por acción de genes nucleares mutadores. Las alteraciones observadas en el ADN cloroplástico incluyen mutaciones puntuales, deleciones, duplicaciones e inversiones. En las plantas superiores, las mutaciones que afectan a la fotosíntesis son generalmente reconocidas por alteración en los pigmentos clorofílicos que pueden visualizarse a simple vista o por mediciones de la fluorescencia (Börner y Sears, 1986). Las mutaciones que específicamente alteran la fotosíntesis han sido útiles para definir las funciones codificadas por el plastoma y sirven como material de disección a nivel bioquímico de las reacciones fotosintéticas, aunque pueden aparecer dificultades debido a que en muchos casos originan marcados efectos pleiotrópicos (Börner y Sears, 1986). Además, muchas manifestaciones fenotípicas en los pigmentos pueden ser originadas no sólo por mutaciones en el plastoma, sino también por cambios genéticos en cualquiera de los otros dos genomas de las plantas superiores, el mitocondrial o el nuclear, siendo por lejos las mutantes en este último las más numerosas.

Una mutante muy estudiada es la del gen plastídico *psbA*, que codifica para la proteína D1 del PSII y que confiere resistencia al herbicida atrazina (Hirschberg y McIntosh, 1983; Goloubinoff *et al.*, 1984; Rios *et al.*, 2003).

Hoy en día, la transformación de cloroplastos en *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton *et al.*, 1988) y en tabaco (Svab *et al.*, 1990), entre otras especies, ha permitido generar "knock-outs" de ORFs cuya funcionalidad era hasta hace unos años desconocida, y por genética reversa, dilucidar la función de estos genes (Bock y Sarwar Khan, 2004).

I.3 El gen mutador de cloroplastos de cebada.

Los genes nucleares mutadores de cloroplastos descritos hasta el momento se han hallado en: *Oenothera* (Epp, 1973; Sears, 1983), *Arabidopsis* (Redei y Plurad, 1973), *Petunia* (Potrykus, 1970), cebada (Hagemann y Scholz, 1962; Börner *et al.*, 1976; Prina, 1992/1996), maíz (Shumway y Weier, 1967; Walbot y Coe, 1979; Thompson, 1983) y *Solanum nigrum* (Arntzen y Duesing, 1984). Los hay de espectro reducido y de espectro amplio, que inducen diversas mutantes, como el de *Arabidopsis*, *Oenothera*, *Petunia* y cebada (Prina, 1992).

En el Instituto de Genética "Ewald A. Favret" se ha caracterizado un gen mutador de cloroplastos (*Cpm/cpm*) en cebada que induce mutaciones plastómicas con mayor eficiencia que la obtenida mediante la utilización de mutágenos químicos y físicos. Este gen fue originalmente caracterizado como inductor de una amplia

gama de mutantes clorofílicas de herencia materna (Prina, 1992) y es el primero en su tipo descrito en monocotiledóneas. Algunas de las mutantes clorofílicas aisladas han sido fenotípica y genéticamente descritas, mostrando tener diversidad en sus patrones de variegación y en su estabilidad genética (Prina, 1996). Se postula que, además de las mutantes clorofílicas, el gen mutador *cpm* estaría produciendo también variantes que afectan otros caracteres. Ya se han seleccionado dos familias derivadas del genotipo mutador de cloroplastos que son tolerantes a la atrazina (Prina *et al.*, 1997). Dichas familias presentan una mutación de punto en el gen *psbA* del PSII (Rios *et al.*, 2003), responsable de la tolerancia a herbicidas del grupo de las triazinas.

I.4 Las líneas citoplásmicas (LCs) originadas por el mutador de cloroplastos de cebada.

Las líneas citoplásmicas o LCs fueron visualmente seleccionadas a partir de un genotipo mutador de cloroplastos (*cpm cpm*) (Prina 1992; Prina 1996). Los fenotipos de cuatro de estas mutantes, la LC1, la LC2, la LC3 y la LC4 fueron descritos por primera vez en 1996 (Prina, 1996) desconociéndose en aquel momento las bases moleculares de las mismas. Las LCs fueron obtenidas por autofecundación y estabilizadas por cruzamientos (como madre) con plantas normales genéticamente estables (como padre) y por selección de familias estables en generaciones F₃-F₄. En esta tesis se trabajó con dos de estas LCs anteriormente descritas y además se llevaron a cabo algunos experimentos con LC9, línea no descrita previamente, que presenta un fenotipo virescente, es decir, verde claro al emerger que luego se vuelve normal cuando la hoja está completamente crecida. LC2 presenta una variegación posicional o discontinua del tipo albino/verde normal. La primera hoja es verde claro o albina cuando emerge pero se vuelve verde normal cuando se desarrolla por completo, conservando usualmente la punta blanca. Por otro lado, LC3 es una mutante del tipo *viridis* (verde claro homogéneo).

OBJETIVO GENERAL

En esta tesis se propone: 1) Estudiar fisiológica, bioquímica y molecularmente las LCs antes mencionadas con la finalidad de conocer más en profundidad parte de la variabilidad inducida por el mutador de cloroplastos de la cebada. 2) A partir de los resultados de estos análisis, postular genes candidatos responsables de los fenotipos. 3) De localizarse los genes responsables de las mutantes estudiadas, aportar al conocimiento de la genética cloroplástica y específicamente al de los mecanismos en que estos genes intervienen y mediante su secuenciación determinar qué tipo de cambios estaría induciendo el mutador en estudio en el ADN cloroplástico.

En la Sección II se analizará la mutante LC9 y en las Secciones III y IV se analizarán las mutantes LC2 y LC3, respectivamente.

II. ANÁLISIS DE LA LÍNEA CITOPLÁSMICA 9 (LC9)

II.1 INTRODUCCIÓN

La línea citoplásmica 9 (LC9) es una mutante de tipo virescente que además se caracteriza por tener una germinación ligeramente retrasada y un crecimiento más lento de las plántulas en las primeras etapas después de la germinación en comparación con la cebada normal.

En la literatura existen descripciones de mutantes virescentes (en maní, algodón, maíz, etc.), la mayoría de ellas debidas a mutaciones en genes nucleares (Benedict *et al.*, 1972; Chollet y Paolillo, 1972; Alberte *et al.*, 1976). Pero sólo unas pocas son de herencia materna. Una de ellas es la denominada Vir-c, una mutante virescente de tabaco cuyo fenotipo se asoció a la ausencia de un polipéptido de tilacoides no identificado hasta el momento y cuyo polimorfismo pudo observarse por RFLPs del ADNcp (Archer y Bonnett, 1987; Archer *et al.*, 1987).

Hipótesis:

La mutación que da origen al fenotipo LC9 produce una modificación del ADN del plastoma factible de ser detectada por RFLPs.

II.2 OBJETIVOS

- 1) Poner a punto un protocolo de extracción de ADNcp de buena calidad y sin contaminación con ADN nuclear.
- 2) Analizar el ADNcp de LC9 y de la cebada normal por RFLPs con el objeto de encontrar alguna diferencia en el plastoma de las mismas que podría ser causante del fenotipo mutante LC9.

II.3 MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1 Material vegetal.

Se utilizaron semillas de LC9, y se usó como control el genotipo MC169 GRAL (Grano alargado). Las semillas se sembraron en macetas con tierra o en hidroponía por el método sandwich descrito por Myhill y Konzak, 1967 y fueron crecidas dentro del invernáculo.

II.3.2 Métodos.

II.3.2.1 Extracción de ADN de cloroplasto.

Se utilizó el protocolo descrito a continuación, basado en "High salt extraction protocol" (Schuler y Zielinski, 1993). Se homogeneizaron entre 50-100 g de hojas con 400 ml de "High salt isolation buffer" (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0,1% BSA, 0,1% β mercaptoetanol) frío en una homogenizadora *Waring blender* (3 pulsos de 5 segundos). Se filtró el homogenato a través de 2 capas de gasa y luego a través de 6 capas más. Se centrifugó a 3.000 rpm 10 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 100 ml de "High salt isolation buffer" frío agitando con un pincel. Se centrifugó a 3.000 rpm 10 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 vol. de buffer 2x CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl) precalentado a 60 °C. El precipitado se deshizo con un pincel e incubó a 65 °C durante 45 minutos. Se extrajo con volúmenes iguales de cloroformo/isoamílico (24:1) centrifugando a 3000 rpm durante 5 minutos. Se agregó ARNasa (4 μ l/10 g de tejido) 30 minutos a 37 °C. Se repitió la extracción y se precipitó el ADN agregando 2/3 volúmenes de isopropanol frío. Se incubó a -20 °C como mínimo 30 minutos. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado se dejó secar al aire y luego se resuspendió en H₂O.

II.3.2.2 Cuantificación del ADN.

La cuantificación del ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% en 0,5x TBE (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 25 mM ácido bórico) teñidos con EtBr por comparación visual o densitométrica con ADN de fago Lambda de concentración conocida.

II.3.2.3 RFLPs de ADN de cloroplasto.

El ADNcp de la mutante LC9 y del control respectivo se digirieron con las siguientes enzimas de restricción: *Hind* III, *Eco* RI, *Pvu* II, *Sal* I, *Bam* HI, *Xho*I, *Bgl* II, *Cla* I, *Nco* I, *Nde* I, *Bst* XI, *Spe* I, *Kpn* I, *Eco* RV, *Xba* I, *Sac* I, *Hpa* II, *Bcl* I, *Dra* I, *Sma* I,

Bsu 36 I, *Nsi* I, *Ava* I, *Hae* II, *Hha* I, *Hinc* II, *Bcg* I, *Bsp* HI, *Eae* I, *Mfe* I, *Afl* II, *Bsa* I, *Sca* I, *Xmn* I. Las digestiones se realizaron sobre 0,5 µg de ADNcp en un volumen final de 30 µl y se corrieron en geles de agarosa 0,8% y 2% en buffer 0,5x TBE durante la noche a 28 voltios teñidos con EtBr o con *GelStar* (FMC). También se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida 4% (29:1) en buffer 1x TBE, pero en este caso se digirieron 0,1 µg de ADNcp. Los geles fueron posteriormente teñidos con AgNO₃ (Bassam *et al.*, 1991).

II.3.2.4 Aislamiento de membranas tilacoides.

El método de aislamiento de tilacoides se basó en el descrito por Guamet *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Con una tijera se cortaron en pequeños trozos las láminas de la primera hoja de varias plántulas y, luego se machacaron en mortero con 2 ml de buffer de homogenización frío (50 mM HEPES pH 7,4, 0,3 M sacarosa, 1 mM EDTA disódico, 5 mM MgCl₂, 1% BSA). Luego se filtró el homogenato a través de una capa de *Miracloth* (Calbiochem) y el contenido se dispuso en tubos en hielo. Se centrifugó a 3.000g durante 5 minutos a 4 °C. Se volcó el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados con 750 µl de buffer de lavado (10 mM HEPES pH 7,4, 5 mM sacarosa, 5 mM MgCl₂). Se centrifugó a 3.000g durante 5 minutos a 4 °C. Se volcó el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados en 100 µl de buffer de almacenamiento (10 mM HEPES pH 7,4, 5 mM sacarosa, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol). Se les dio un shock de nitrógeno líquido a los tubos y se guardaron a -70 °C.

II.3.2.5 Medición de clorofila y solubilización de las tilacoides.

Se tomaron 10 µl de tilacoides y se colocaron en 1 ml de dimetilformamida. Las muestras se centrifugaron brevemente y se midió absorbancia a 750 nm, 647 nm y 664,5 nm. La absorbancia a 750 nm tiene que dar alrededor de cero, si da mayor, el valor se resta a los valores de las mediciones a las otras longitudes de onda. Para calcular la cantidad de clorofila en las tilacoides se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Chl } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{17,9 \times A_{647} + 8,08 \times A_{664,5}}{10}$$

10

Para la solubilización se tomaron 10 volúmenes de tilacoides junto con 9 volúmenes de buffer de solubilización (133 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 4,3% SDS) y 1 volumen de 2-mercaptoetanol. Se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos como mínimo antes de sembrar los geles de SDS-PAGE.

II.3.2.6 Minigeles de SDS-PAGE.

Entre 1 y 5 µg de clorofila de cada muestra se sembraron en geles de acrilamida 13% de 0,75 mm. Los geles de concentración ("stacking") y de separación se prepararon según Scopes y Smith (1998).

Los geles se corrieron en una Miniprotean II o III de BIO-RAD a 15 mA constantes por gel en buffer de corrida 1x (0,125 M Tris, 0,96 M glicina, 0,5% SDS). Se usó como marcador molecular el *Precision Plus Protein Standards All Blue* de BIO-RAD.

II.3.2.7 Tinción de minigeles con Coomassie blue.

Se cubrió el gel con una solución de fijación de isopropanol (25% isopropanol, 10% ácido acético) y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se descartó la solución y se agregó la solución de tinción (10% ácido acético, 0,006% (p/v) Coomassie brilliant blue) y se dejó agitando durante toda la noche. Luego se destiñó con 10% ácido acético.

II.4 RESULTADOS

II.4.1 Análisis de polimorfismos en el ADN del cloroplasto entre la mutante LC9 y su línea madre MC169 GRAL.

Para la búsqueda de mutaciones en el plastoma de LC9 se aisló ADNcp del control (Fig. II.1) y de la mutante y se digirió con las siguientes enzimas de restricción: *Hind* III, *Eco* RI, *Pvu* II, *Sal* I, *Bam* HI, *Xho*I, *Bgl* II, *Cla* I, *Nco* I, *Nde* I, *Bst* XI, *Spe* I, *Kpn* I, *Eco* RV, *Xba* I, *Sac* I, *Hpa* II, *Bcl* I, *Dra* I, *Sma* I, *Bsu* 36 I, *Nsi* I, *Ava* I, *Hae* II, *Hha* I, *Hinc* II, *Bcg* I, *Bsp* HI, *Eae* I, *Mfe* I, *Afl* II, *Bsa* I, *Sca* I, *Xmn* I. El criterio para la elección de las enzimas fue que originaran entre 20 y 40 fragmentos (en la mayoría de los casos) de tamaños diferentes que se pudieran resolver en gels de agarosa y/o poliacrilamida. No se encontraron polimorfismos entre la mutante y el control (Fig. II.2).

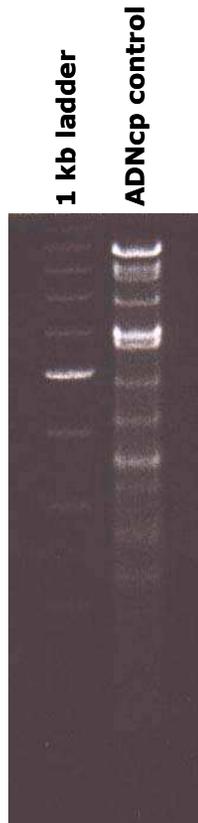


Figura II.1 Primera prueba de digestión de ADNcp de plántulas control digerido con *Hind* III y corrido durante la noche en un gel de agarosa 0,8% 0,5x TBE teñido con EtBr.

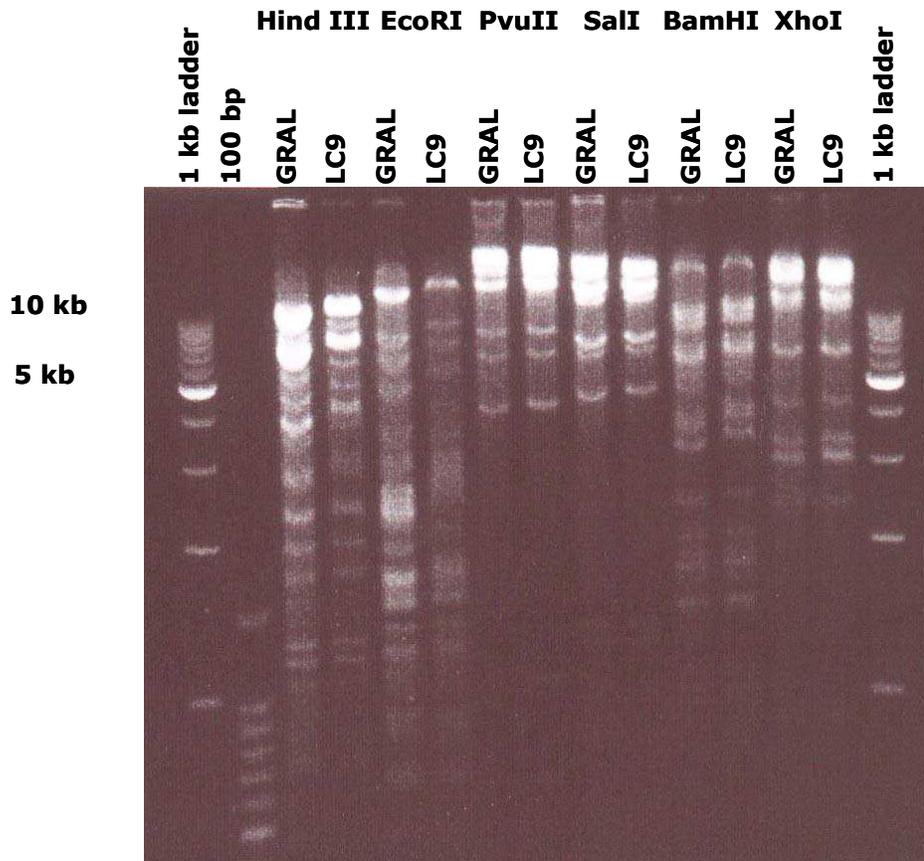


Figura II.2 Ejemplo de RFLPs de ADNcp de GRAL y LC9 con las enzimas *Hind III*, *Eco RI*, *Pvu II*, *Sal I*, *Bam HI* y *Xho I*. Digestiones corridas durante la noche en un gel de agarosa 0,8% 0,5x TBE teñido con EtBr.

II.4.2 Perfil de proteínas de tilacoides.

Este experimento se realizó con el objeto de hallar diferencias en el patrón proteico de LC9 respecto de su control y de esta manera poder dirigir la búsqueda de la mutación hacia alguno de los complejos fotosintéticos. Para ello se extrajeron tilacoides de GRAL y LC9, se solubilizaron en buffer de siembra y se sembraron 5 µg de clorofila en geles de SDS-PAGE. En la figura II.3 se puede observar el gel teñido con azul de Coomassie en donde no se observan diferencias en el patrón de bandas entre el control y LC9.

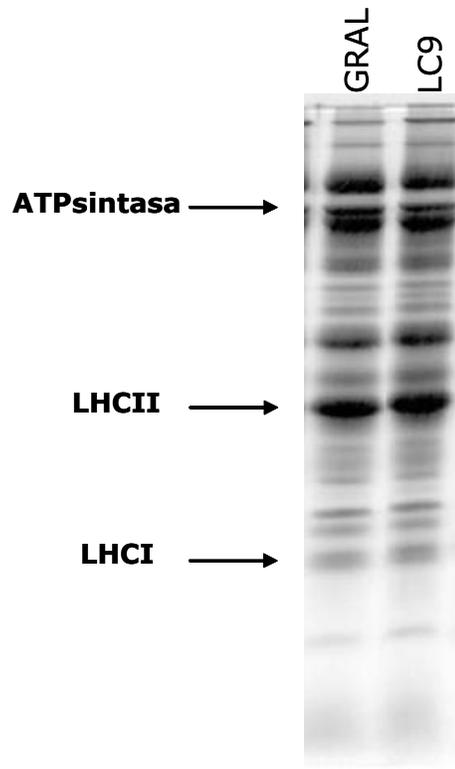


Figura II.3 Perfil de proteínas tilacoidales de LC9 y su control. Las flechas indican el complejo ATPasa y las antenas de los PSI y II.

II.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En un principio se pensó que los análisis de búsqueda de polimorfismos en el ADNcp podrían arrojar resultados positivos, ya que existía bibliografía del análisis de otros casos de genes mutadores apoyando esta posibilidad (Chiu *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1996; Palmer, 1986; Day y Ellis, 1984, 1985). Se comenzó por la búsqueda y prueba de distintos protocolos para el aislamiento de ADNcp de buena calidad y libre de ADN nuclear y mitocondrial hasta dar con el protocolo de alta concentración salina o fuerza iónica (Schuler y Zielinski, 1993). Este protocolo, en comparación con otros que hemos probado, tiene la ventaja de su sencillez y de la obtención de ADNcp de buena calidad, pero tiene la desventaja de necesitar mucho material vegetal de partida. Otros protocolos que no utilizaban buffers con alta fuerza iónica no nos permitieron obtener ADNcp libre de contaminación de ADN nuclear y/o mitocondrial.

En coincidencia con resultados previos (Colombo *et al.*, 2006), del análisis de cuatro líneas citoplásmicas aisladas a partir del mutador de cloroplastos de la cebada, que incluyó las otras dos líneas mutantes que se estudian en este trabajo, LC2 y LC3, la técnica de RFLPs no fue eficiente para la detección de cambios en el ADNcp de LC9. Estos resultados sugieren que el mutador en estudio no habría originado grandes rearrreglos o deleciones en el plastoma de LC9.

III. ANÁLISIS DE LA LÍNEA CITOPLÁSMICA 2 (LC2)

III.1 INTRODUCCIÓN

La línea citoplásmica 2 (LC2) se caracteriza por un efecto de variegación posicional, principalmente localizado en la punta de la lámina de la primera hoja (Prina, 1996; Prina *et al.*, 2003). El fenotipo más usual de la lámina de la primera hoja en los primeros días después de la emergencia es de tipo *albo-viridis* (Gustafsson, 1940), es decir, es albino en la parte superior y verde claro en el resto de la lámina. A los 10-12 días de la germinación cuando la lámina de la primera hoja está completamente crecida la mayoría de los tejidos son generalmente verde normal y solamente permanece una zona de tejido albino a verde claro en el extremo superior. En otras palabras, LC2 presenta un fenotipo de deficiencia clorofílica de tipo discontinuo y dependiente de la edad de la plántula (Fig. III.1). Observaciones previas y análisis de pigmentos de plántulas originadas en semillas cosechadas de plantas LC2 crecidas en cámara de cría a diferentes temperaturas, mostraron que una temperatura alta durante la formación de la semilla indujo una notable reducción del contenido de pigmentos en las plántulas (Prina *et al.*, 2003). Además por microscopía electrónica se observaron pequeños cloroplastos anormales en la punta de la lámina de la primera hoja de LC2, sin o con escasos ribosomas comparada con la normal (Prina *et al.*, 2003, Láinez y Maldonado, com. pers. 2005). Todas estas observaciones nos llevaron a pensar que en LC2 estaría afectada la traducción plastídica durante la embriogénesis o en el desarrollo temprano de las plántulas.



Figura III.1 Plántulas de la mutante LC2. (Prina 1996)

Hipótesis:

En base a las observaciones anteriores se postuló que el gen causante del fenotipo LC2 es un gen cloroplástico involucrado en la maquinaria de traducción plastídica. Se postuló como principal candidato al gen *infA*, que codifica para una proteína homóloga al factor de iniciación de la traducción IF1 de las bacterias.

III.2 OBJETIVOS

- 1) Analizar la mutante LC2 a nivel bioquímico y molecular con el objeto de determinar cual es el gen que da lugar al fenotipo de esta mutante.
- 2) Investigar qué tipo de cambios induce el mutador de cloroplastos en el ADN cloroplástico para contribuir a deducir su mecanismo de acción.

III.3 MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Se utilizaron semillas de LC2, y se usó como control el genotipo MC182. Las semillas se sembraron en macetas con tierra o en hidroponía por el método sandwich descrito por Myhill y Konzak (1967). Las condiciones de crecimiento se encuentran descritas en cada experimento.

III.3.2 Métodos.

III.3.2.1 Extracción de ADN total.

Para la extracción de ADN total se siguió un protocolo del laboratorio de Barbara Sears adaptado de Fang *et al.* (1992). Se molió el tejido en nitrógeno líquido y luego se agregaron 3 ml de buffer CTAB (1,4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 2% CTAB) por cada gramo de tejido fresco. La mezcla se incubó durante 30 a 45 minutos a 60 °C. Luego los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se hicieron entre 2 y 3 extracciones con cloroformo, agregando un volumen igual del mismo que de la muestra, mezclando y centrifugando a 3.000 rpm durante 10 minutos. Antes de la última extracción se agregó ARNasa y se incubó 30 minutos a 37 °C. La fase acuosa final se pasó a un tubo nuevo, se agregaron 0,2 volúmenes de 5 M NaCl y 0,75 volúmenes de isopropanol frío. Se mezclaron los tubos por inversión y se pusieron a -20 °C entre 1 y 2 hs. Luego se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C para precipitar el ADN. Se lavó el precipitado con etanol 70% y se resuspendió en agua.

En el caso de extracciones de ADN de escaso material vegetal, se utilizó el micrométodo de Dellaporta (1994).

III.3.2.2 Cuantificación del ADN.

La cuantificación del ADN se realizó según lo descrito en la Sección II y también por espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop.

III.3.2.3 Tratamiento con antibióticos.

Las semillas fueron embebidas en agua y en soluciones acuosas de los antibióticos estreptomicina y kanamicina en una concentración de 100 mg/l y 50 mg/l respectivamente y se agitaron a 100 rpm a 25 °C, durante 20 hs. Luego de la imbibición, fueron sembradas en hidroponía y crecidas durante 12 días en las mismas soluciones de antibióticos a una temperatura de 16 °C (oscuridad)/21 °C (luz) y con un fotoperíodo de 16 hs.

III.3.2.4 Determinación de pigmentos por espectrofotometría.

Se extrajeron pigmentos clorofílicos con acetona 80% según Maclachlan y Zalik (1963). Para ello se tomaron dos muestras de entre 500-700 mg de la lámina de la primera hoja. Las muestras fueron homogeneizadas en mortero usando arena y CaCO₃. Se realizaron cuatro extracciones con 150 ml de solución acuosa de acetona 80% por muestra. Las muestras se centrifugaron cada vez a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se juntaron todos los extractos y se midió el volumen final. Luego se hicieron las mediciones de absorbancia en espectrofotómetro y se calcularon clorofila a, clorofila b y carotenoides totales (Lichtenthaler 1987) con las siguientes fórmulas:

$$\text{Ca}$$

$$\text{Ca (mg/g de tejido fresco)} = \frac{(12,3 \times A_{663} - 0,86 \times A_{645}) \times \text{volumen}}{d \times 1.000 \times \text{peso}}$$

$$\text{Cb}$$

$$\text{Cb (mg/g de tejido fresco)} = \frac{(19,3 \times A_{645} - 3,6 \times A_{663}) \times \text{volumen}}{d \times 1.000 \times \text{peso}}$$

d= paso óptico

$$\text{carot. (mg/g de tejido fresco)} = \frac{(1.000 \times A_{470} - 1,82 \times \text{Ca} - 85,02 \times \text{Cb}) \times \text{volumen}}{d \times 1.000 \times 198 \times \text{peso}}$$

III.3.2.5 Métodos utilizados para el análisis del gen *infA*.

III.3.2.5.1 PCR para amplificar el gen *infA*.

Los oligonucleótidos para amplificar el gen *infA* (342 pb) de cebada se diseñaron en base a la secuencia de los genes vecinos *rps8* y *rp136* de trigo, arroz y maíz publicadas en el GenBank (NC_002762), GenBank (NC_001320) y GenBank (NC_001666) cuyas secuencias son:

rp136+: 5'-CCCCTGTCTTTGTTTATGCTTCG-3'

rps8-: 5'-CGAGAGGGTTTTATTGAAAGTGTTCCG-3'

Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 934 pb en el cual está incluido el gen *infA*. La reacción de PCR se hizo en un volumen final de 25 µl con: 2,5 µl de 10x buffer Taq, 2 µl de 25 mM MgCl₂, 1,25 µl de 10 mM c/nucleótido de mezcla de dNTPs, 0,8 µl de 10 µM oligonucleótido rpl36+, 0,8 µl de 10 µM oligonucleótido rps8-, 0,2 µl de 5 U/µl Taq Highway, 20 ng de ADN.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

94 °C	3 minutos	}	30 ciclos
94 °C	30 segundos		
58 °C	1 minuto		
72 °C	1 minuto		
72 °C	10 minutos		

III.3.2.5.2 Clonado de los fragmentos de PCR y secuenciación.

Los fragmentos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 0,8%, se cortaron del gel y se purificaron con el sistema *Gel extraction* de Qiagen. Luego, se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO siguiendo las indicaciones del sistema *TOPO TA Cloning* de Invitrogen. Se transformó *E. coli* DH5α por electroporación con el vector, las suspensiones de bacterias con medios líquidos SOC o LB se mantuvieron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 1 hora y luego se plaquearon 100 µl de las mismas en placas de LB con ampicilina 100 µg/ml, y se esparció sobre ellas 100 µl de IPTG 100 mM y 20 µl de X-gal 50 mg/ml. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se seleccionaron alrededor de 10 colonias blancas y se comprobó por PCR la presencia del inserto picando directamente las colonias. De las colonias que tenían el inserto se purificaron los plásmidos a partir de cultivos crecidos durante la noche con el sistema de miniprep de Qiagen. Se mandaron a secuenciar al Laboratorio de Alta Complejidad del IMYZA, INTA–Castelar entre 5 y 10 minipreps de cada genotipo y luego se sacó una secuencia consenso.

III.3.2.5.3 Alineamiento de secuencias.

Todos los alineamientos de secuencias de genes y proteínas se realizaron usando el ClustalW WWW Service at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (Chenna *et al.*, 2003).

III.3.2.5.4 Extracción de ARN total.

La extracción de ARN se realizó con *Trizol* (Invitrogen) siguiendo el protocolo especificado por el proveedor. Se molieron 500 mg de tejido en un mortero con nitrógeno líquido hasta que quedó como polvo. Se agregaron 5 ml de *Trizol* y se

siguió moliendo. Se incubó a temperatura ambiente 5 minutos hasta que la mezcla de *Trizol* y tejido se descongeló. Se pasó todo a un tubo y se agregó 1 ml de cloroformo. Se agitaron los tubos vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente (15-30 °C) entre 2 y 3 minutos. Se centrifugaron a ≤ 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se precipitó el ARN con 2,5 ml de isopropanol. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron a ≤ 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado con 5 ml de etanol 75%. Se mezclaron los tubos con vortex y se centrifugaron a ≤ 7.500 g durante 5 minutos a 4 °C. Se dejaron secar los precipitados unos minutos y luego se disolvieron en agua tratada con DEPC pipeteando e incubando durante 10 minutos a 55-60 °C.

III.3.2.5.5 Cuantificación del ARN.

Se chequeó la pureza del ARN y se cuantificó el ARN midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS Spectrometer. Se tomaron 2 μ l de ARN y se disolvieron en 1 ml de agua. La concentración se calculó aplicando la fórmula: concentración = $A_{260} \cdot 40 \mu\text{g/ml} \cdot 500$

III.3.2.5.6 Tratamiento del ARN con ADNasa.

El ARN destinado a RT-PCR se trató con ADNasa *RQ1* de Promega. Se tomaron 20 μ g de ARN, 20 μ l de 10x buffer ADNasa, 5 μ l de 1 U/ μ l ADNasa *RQ1*, 0,2 μ l de 40 U/ μ l *RNasin* de Promega, 2 μ l de 0,1 M DTT y agua tratada con DEPC hasta los 200 μ l. Se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Luego se desproteinizó la muestra con dos extracciones con 100 μ l de cloroformo. Se agitaron los tubos con vortex durante 1 minuto y luego se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 minutos. Al sobrenadante se agregó acetato de sodio pH 5,2 en una concentración final de 0,25 M y 3 volúmenes de etanol puro. Se incubaron los tubos durante toda la noche a -20 °C. Luego se centrifugaron durante 15 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. El precipitado se redisolvió en 5 μ l de agua tratada con DEPC.

III.3.2.5.7 RT-PCR sobre el transcrito del gen *infA*.

El ADNc se obtuvo utilizando la transcriptasa reversa *SuperScript III* (Invitrogen). Se tomó 1 μ l de ARN previamente tratado con ADNasa *RQ1* (Promega) del control y LC2, 0,4 μ l de 10 μ M oligonucleótido *infA* R, 1 μ l de la mezcla de 10 mM de c/nucleótido dNTPs y agua DEPC hasta un volumen de 13 μ l. Se incubó la mezcla a 65 °C durante 5 minutos y luego se puso en hielo por 1 minuto como mínimo. Luego se agregó 4 μ l de *5x First-Strand Buffer*, 1 μ l de 0,1 M DTT, 1 μ l de 40 U/ μ l

RNasin de Promega y 1 μ l de 200 U/ μ l *SuperScript III RT*. Se mezcló con pipeta e incubó 1 hora a 55 °C, 15 minutos a 65 °C y 10 minutos a 4 °C. Para amplificar el ADNc se usó 1 μ l del mismo en la reacción de PCR de amplificación del gen *infA* con Taq polimerasa de Invitrogen.

III.3.2.5.8 Clonado del ADNc de *infA* en LC2 y en el genotipo salvaje.

Los fragmentos amplificados por la Taq *Pfx* (Invitrogen) se corrieron en un gel de agarosa 0,8%, se aislaron y purificaron con el sistema *Gel extraction* de Qiagen. Luego se clonaron en el vector pCR4Blunt-TOPO siguiendo las indicaciones del sistema *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing* de Invitrogen. Se transformó *E. coli* DH5 α por electroporación con el vector y las suspensiones de bacterias en medios líquidos SOC (20 g/l bacto-triptona, 5 g/l bacto-extracto de levadura, 0,5 g/l NaCl, 20 mM glucosa) o LB (10 g/l bacto-triptona, 5 g/l bacto-extracto de levadura, 10g/l NaCl) se mantuvieron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 1 hora y luego se plaquearon 100 μ l de las mismas en placas de LB con ampicilina 100 μ g/ml. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se seleccionaron 10 colonias blancas y se comprobó por PCR la presencia del inserto picando directamente las colonias. De las colonias que tenían el inserto se purificaron los plásmidos a partir de cultivos crecidos durante la noche con el sistema miniprep de Qiagen. Luego, estos plásmidos se mandaron a secuenciar al Laboratorio de Alta Complejidad del IMYZA, INTA–Castelar. Se mandaron a secuenciar 3 minipreps de cada genotipo y luego se sacó una secuencia consenso.

III.3.2.6 Aislamiento de membranas tilacoides.

III.3.2.7 Medición de clorofila y solubilización de las tilacoides.

III.3.2.8 Minigeles de SDS-PAGE.

III.3.2.9 Tinción de minigeles con Coomassie blue.

Se realizaron como se describe en la Sección II.

III.3.2.10 Western blots.

La transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa se realizó en un Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de BIO-RAD en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol) a 100 V durante 90 minutos. Para verificar la transferencia se dejó la membrana 5 minutos en Ponceau S y se destiñó con agua durante 2 minutos.

Para hacer los western blots se bloqueó la membrana en 5% leche descremada durante 1 hora. Luego se enjuagó la misma dos veces y se hicieron un lavado de 15 minutos y dos de 5 minutos con buffer TTBS (20 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl,

0,05% Tween 20). La incubación con el anticuerpo primario (1% leche/TTBS) se hizo durante una hora a temperatura ambiente. Luego se enjuagó la membrana dos veces y se hicieron un lavado de 15 minutos y dos de 5 minutos con buffer TTBS. Se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa en una dilución 1:1.000 (1% leche/TTBS) (*ECL Western Blotting Analysis System* de Amersham) durante 1 hora. Finalmente se enjuagó la membrana dos veces y se hicieron un lavado de 15 minutos y cuatro de 5 minutos con buffer TTBS. Se incubó 1 minuto con los reactivos de detección (*ECL Western Blotting Analysis System* de Amersham), se expuso sobre papel autorradiográfico a distintos tiempos y se reveló con soluciones de revelado *GBX* de Kodak.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-D1 (PSII) gentilmente donado por Alice Barkan, Universidad de Oregon, USA Y anti-PSI (reconoce PSI-A/B, -D, -E, -L, -H, -C), gentilmente donados por H. V. Scheller, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhague, Dinamarca.

III.3.2.11 Experimento de complementación de un "knock-out" del gen *infA* en *E. coli*.

Una vez conocida la secuencia del gen *infA* de cebada, se diseñaron nuevos oligonucleótidos para levantar sólo el gen completo. Las secuencias de los oligonucleótidos son:

infA F: 5'-ATGACAGAAAAAAAAAATAGGAGAGAA-3'

infA R: 5'-CTAATCCTTTGAATCTTTGGTATCCTT-3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl con: 2,5 µl 10x buffer Taq 15 mM MgCl₂ (Qiagen), 0,5 µl de 10 mM c/nucleótido de una mezcla de dNTPs, 0,5 µl de 50 µM oligonucleótido *infA* F, 0,5 µl de 50 µM oligonucleótido *infA* R, 0,5 µl de 5 U/µl Taq polimerasa Qiagen, 20 ng de ADN.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

95 °C	5 minutos	
94 °C	30 segundos	} 30 ciclos
52 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	10 minutos	

Los fragmentos se aislaron de un gel de agarosa 1,5% y se purificaron con el sistema *Gel extraction* de Qiagen. Luego, se clonaron en un vector de expresión

que contiene un gen de resistencia a ampicilina y un promotor de arabinosa, el pBAD-TOPO TA de Invitrogen. Luego se transformó *E. coli* con estos plásmidos por electroporación. Se determinaron las colonias positivas por PCR picando directamente sobre cada colonia. Luego, se realizó una PCR con un oligonucleótido que hibrida con el plásmido, pBAD F (5'-GCTATGCCATAGCATTTTTATCC-3') y con el oligonucleótido infA R para ver cuales de las colonias positivas, tenían el inserto en la dirección correcta, usando las mismas condiciones de ciclado descritas más arriba. De estas colonias se hicieron minipreps para purificar los plásmidos. Los mismos, se mandaron a secuenciar para comprobar que las secuencias fuesen las correctas. Luego, se transformaron dos cepas knock-out del gen *infA* de *E. coli*, PFM1A conteniendo el plásmido pRK02 con el *infA* de *E. coli* y resistencia a tetraciclina y PFM1A conteniendo el plásmido pKO3 con el *infA* de *E. coli*, resistencia a cloramfenicol y con el origen de replicación sensible a temperaturas mayores a 37 °C (Croitoru *et al.*, 2004). Estas cepas y plásmidos son propiedad del grupo del profesor Leif Isaksson de la Universidad de Estocolmo, Suecia.

Las colonias conteniendo pBAD y pRK02, se repicaron sucesivamente en placas de LB con ampicilina 100 µg/ml y L-arabinosa 0,002%. Las colonias conteniendo pBAD y pKO3, se repicaron sucesivamente en placas de LB con ampicilina 100 µg/ml, L-arabinosa 0,002% y a 43 °C.

III.4 RESULTADOS

III.4.1 Tratamiento con antibióticos.

Para avanzar en la caracterización funcional de LC2, semillas de esta mutante y del control fueron embebidas en soluciones de kanamicina y estreptomina, antibióticos que interfieren con la traducción plástica en procariontes y por ende con la que se lleva a cabo en los plástidos (Harris *et al.*, 1989; Galili *et al.*, 1989; Kavanagh *et al.*, 1994; Yeh *et al.*, 1994). Como puede observarse en la figura III.2 las plántulas del control tratadas con ambos antibióticos sufrieron una pérdida drástica del color verde normal, pero sólo en la parte basal de la lámina. Por otro lado, las plántulas LC2 tratadas perdieron el color verde a lo largo de toda la lámina. Es decir, que en la parte superior, los genotipos fueron afectados diferencialmente por los antibióticos (Fig. III.2). Es interesante notar que adicionalmente, se observó un acortamiento de las vainas en LC2. En la Fig. III.3 se presentan los valores del contenido de pigmentos en la parte superior de la primera hoja que corroboran las observaciones de pérdida de color arriba mencionadas. Estos resultados junto con las observaciones previas de TEM e influencia de la temperatura durante la embriogénesis mencionadas en la introducción (Prina *et al.*, 2003) apoyaron la idea de que en LC2 ocurriría un retraso en la traducción plástica durante la embriogénesis y el desarrollo temprano de las plántulas.

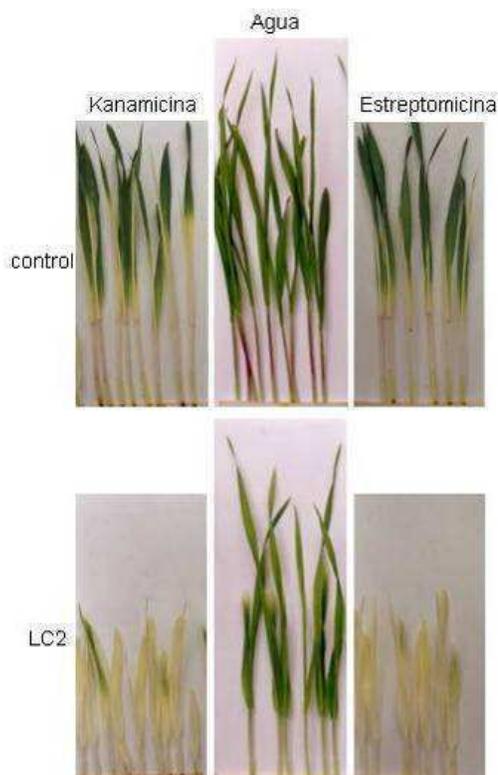


Figura III.2 Plántulas de cebada del control y de LC2 provenientes de semillas embebidas en agua (centro) o en soluciones de antibióticos: kanamicina o estreptomina. Las plántulas fueron cultivadas en hidroponía en la misma solución en la cual fueron embebidas. Las plántulas del control provenían de semillas cosechadas en el campo. Las plántulas de LC2 provenían de semillas cosechadas en invernáculo. La edad de las plántulas es de 10 días.

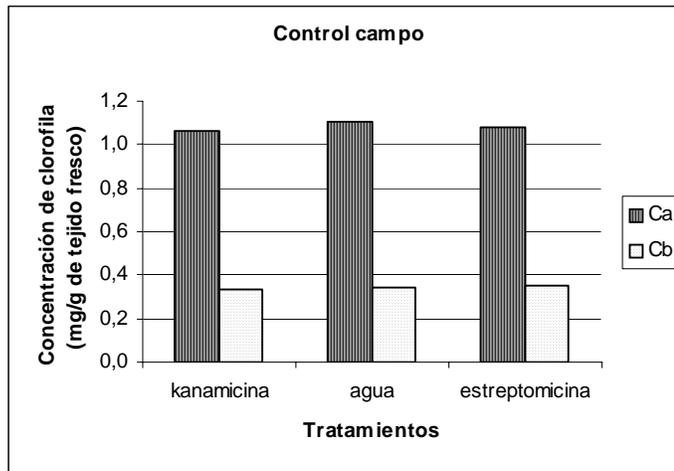
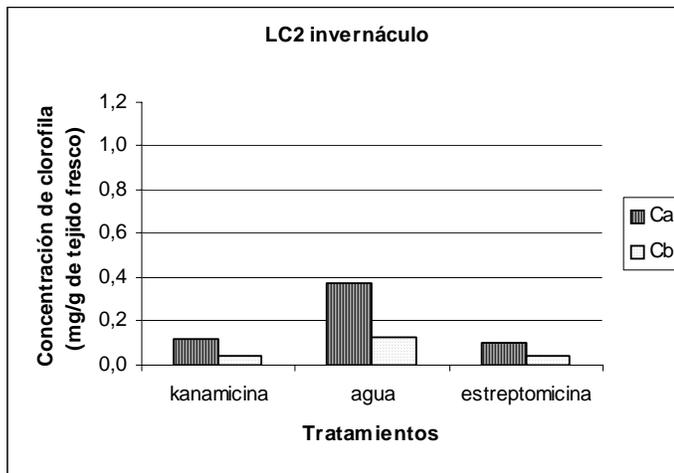


Figura III.3 Contenido de clorofila a y clorofila b en la mitad superior de la lámina de la primera hoja al día 12 después de la imbibición de las plántulas de la Fig. III.2.



III.4.2 El gen cloroplástico *infA* como candidato del fenotipo LC2.

En las bacterias, el paso limitante para la iniciación de la traducción es usualmente la formación de un complejo ternario de la subunidad ribosómica 30S con el ARNm y el ARNt-fMet (Pon y Gualerzi, 1984; Stern *et al.*, 1997; Kozak, 1999), el cual requiere la presencia de tres factores proteicos ("initiation factors" IF1, IF2 e IF3) para su correcto funcionamiento (Fig. III.4) (Boelens y Gualerzi, 2002; Laursen *et al.*, 2005). Haciendo un paralelismo con los conocimientos en bacterias, se cree que en la iniciación de la traducción plástica intervendrían también tres factores, homólogos a los bacterianos, de los cuales uno sólo se encuentra codificado por el ADN del plástido en varias especies, incluyendo la cebada (Stern *et al.*, 1997; Millen *et al.*, 2001). Por todo lo antedicho acerca de la mutante LC2, hipotetizamos que esta mutante podría corresponder al gen plástido *infA*, que codificaría para una proteína homóloga al "initiation factor 1" (IF1) de las bacterias.

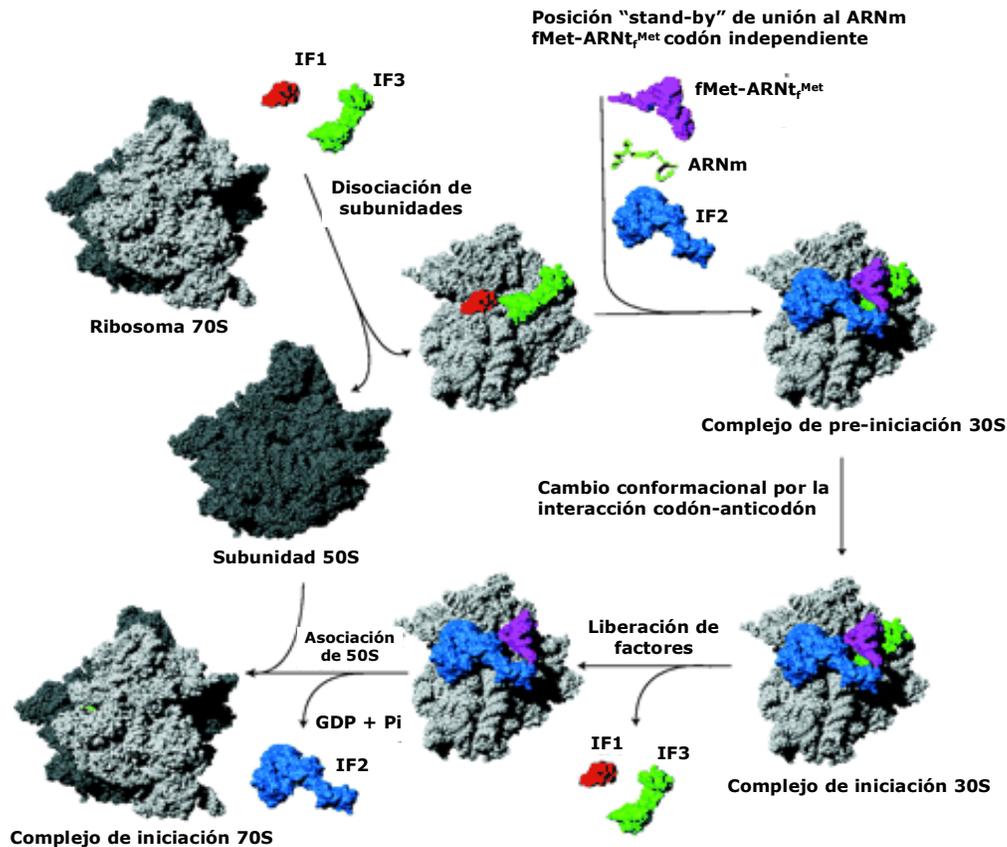


Figura III.4 Iniciación de la traducción en bacterias. Las subunidades ribosomales 30S y 50S se muestran en gris claro y gris oscuro respectivamente. Los factores iniciadores de la traducción IF1, IF2, e IF3, el ARNm, y el fMet-ARNt_{Met} se muestran en rojo, azul, verde, amarillo, y violeta, respectivamente. (Tomado de Laursen et al., 2005)

III.4.2.1 Secuenciación del gen *infA* en LC2.

Se diseñaron los oligonucleótidos rpl36+ y rps8- para amplificar la secuencia completa del gen *infA* de cebada, sobre la base de la secuencia publicada en trigo (GenBank NC_002762), maíz (GenBank NC_001666) y arroz (GenBank NC_001320). Estos oligonucleótidos amplificaron un fragmento de 934 pb. El gen *infA* de trigo tiene 342 pb. Se hicieron reacciones de PCR con este par de oligonucleótidos sobre ADN total de la cebada normal y de LC2 con una Taq polimerasa común. Se clonaron en el plásmido pCR 2.1-TOPO y se mandaron a secuenciar entre 5 y 10 clones de cada una para obtener una secuencia consenso de cada genotipo. La secuencia consenso del *infA* de la cebada control (GenBank AY488512), obtenida de la secuenciación de 11 clones independientes, mostró algunos cambios de base con respecto a la de trigo (GenBank NC_002762, región complementaria 76060..76401) (Fig. III.5). Sin embargo, la secuencia deducida de

la proteína IF1 de la cebada control resultó idéntica a la de trigo (Fig. III.7). Por otro lado, se encontró una mutación puntual en la secuencia del *infA* en las cinco colonias independientes de LC2 (GenBank AY488513) que consiste en una transición de T por C en la posición 157 (Fig. III.5), con el correspondiente cambio aminoacídico de serina a prolina en la posición 52 (Fig. III.6). La mutante LC9, aislada de la misma población de plantas de genotipo mutador que LC2 pero de fenotipo diferente, se usó como control adicional. La secuencia del *infA* de LC9, luego de secuenciar nueve colonias independientes, resultó idéntica a la de la cebada control (dato no mostrado).

Para ver si el cambio de C en lugar de T en LC2 podría ser corregido post-transcripcionalmente por un proceso de "editing", se realizó una RT-PCR a partir del ARN total del control y de LC2 y se amplificó el ADNc por PCR con una Taq polimerasa "proofreading". Los fragmentos se clonaron en el vector pCR4 Blunt-TOPO y se mandaron a secuenciar tres clones de cada genotipo. Las tres secuencias del *infA* de LC2 confirmaron la C en el nucleótido 157 (dato no mostrado).

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

control infA      ATGACAGAAAAAAAAAATAGGAGAGAAAAAAAAAACCCGAGAGAAGCAAAGTTACTTTT 60
LC2 infA         ATGACAGAAAAAAAAAATAGGAGAGAAAAAAAAAACCCGAGAGAAGCAAAGTTACTTTT 60
infA trigo      ATGACAGAAAAAAAAAATAGGAGAGAAAAAAAAAACCCGAGAGAAGCAAAGTAACTTTC 60
*****

control infA      GAAGGTTTAGTTACGGAAGCCCTACCCAATGGAATGTTCCGCGTTCGGCTAGAGAATGAC 120
LC2 infA         GAAGGTTTAGTTACGGAAGCCCTACCCAATGGAATGTTCCGCGTTCGGCTAGAGAATGAC 120
infA trigo      GAAGGTTTAGTTACGGAAGCCCTACCCAATGGAATGTTCCGCGTTCGGCTAGAGAATGAC 120
*****

control infA      ACCATCATCCTAGGCTATATTTT CAGGAAAGATCCGCTCTAGTTCATACGAATACTGATG 180
LC2 infA         ACCATCATCCTAGGCTATATTTT CAGGAAAGATCCGCTCTAGTTCATACGAATACTGATG 180
infA trigo      ACCATCATCCTAGGCTATATTTT CAGGAAAGATCCGCTCTAGTTCATACGAATACTGATG 180
*****

control infA      GGGGATAGGGTCAA AATTGAAGTAAGTCGTTATGATTCAAGCAAGGGACGTATAATTTAT 240
LC2 infA         GGGGATAGGGTCAA AATTGAAGTAAGTCGTTATGATTCAAGCAAGGGACGTATAATTTAT 240
infA trigo      GGGGATAGGGTCAA AATTGAAGTAAGTCGTTATGATTCAAGCAAGGGACGTATAATTTAT 240
*****

control infA      AGACTTCCCATAAAGGATTGAAAGCGTATCGAAGACTCGAAGGATAGCGAAGATTTGAAG 300
LC2 infA         AGACTTCCCATAAAGGATTGAAAGCGTATCGAAGACTCGAAGGATAGCGAAGATTTGAAG 300
infA trigo      AGACTTCCCATAAAGGATTGAAAGCGTATCGAAGACTCGAAGGATAGCGAAGATTTGAAG 300
*****

control infA      GATAGCGAAGATTTGAAGGATACCAAAGATTCAAAGGATTAG 342
LC2 infA         GATAGCGAAGATTTGAAGGATACCAAAGATTCAAAGGATTAG 342
infA trigo      GATAGCGAAGATTTGAAGGATACCAAAGATTCAAAGGATTAG 342
*****

```

Figura III.5 Alineamiento de las secuencias de los genes *infA* del control (GenBank AY488512), de la mutante LC2 (GenBank AY488513) y de la secuencia publicada en trigo (Genbank NC_002762). La mutación en LC2 en la posición 157 se encuentra marcada en rojo. "*" significa que todos los nucleótidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento.

```

control IF1      MTEKKNRREKKNPREAKVTFEGLVTEALPNGMFRVRLNDTI | LGYI SGKI R S S I RI LM 60
LC2 IF1         MTEKKNRREKKNPREAKVTFEGLVTEALPNGMFRVRLNDTI | LGYI SGKI R S S I RI LM 60
IF1 trigo      MTEKKNRREKKNPREAKVTFEGLVTEALPNGMFRVRLNDTI | LGYI SGKI R S S I RI LM 60
*****

control IF1      GDRVKI EVSRYDSSKGRI | YRLPHKDSKRI EDSKDSEDLKDSEDLKDTKDSKD 113
LC2 IF1         GDRVKI EVSRYDSSKGRI | YRLPHKDSKRI EDSKDSEDLKDSEDLKDTKDSKD 113
IF1 trigo      GDRVKI EVSRYDSSKGRI | YRLPHKDSKRI EDSKDSEDLKDSEDLKDTKDSKD 113
*****

```

Figura III.6 Alineamiento de las secuencias deducidas de las proteínas IF1 del control (GenBank AAR85888), de la mutante LC2 (GenBank AAR85889) y de trigo (GenBank NP_114292). El cambio de aminoácido en LC2 en la posición 52 se encuentra marcada en rojo. "*" significa que todos los aminoácidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento. "." significa que se observan sustituciones semi-conservadas.

III.4.3 Western blots de proteínas tilacoidales.

Este experimento se realizó con el fin de investigar si la síntesis de proteínas durante el desarrollo temprano de las plántulas LC2 está afectada. Para ello, se aislaron las membranas tilacoides de plántulas de 2 días después de la germinación crecidas a 18 °C en hidroponía tanto en agua como en solución de kanamicina, inhibidor de la traducción plástica.

Los geles de SDS-PAGE se sembraron en base a 1 µg de clorofila pero como las plántulas de LC2 tenían muy baja concentración de pigmentos se sembró el máximo volumen que permitía la calle del gel. Se realizaron los western blots contra la proteína D1 del PSII y contra proteínas del PSI (Fig. III.7). En ambos casos se observó la ausencia de proteínas en la mutante crecida tanto en agua como en solución de antibiótico. Por el contrario, se observó la presencia de proteínas en la cebada control crecida en ambas soluciones.

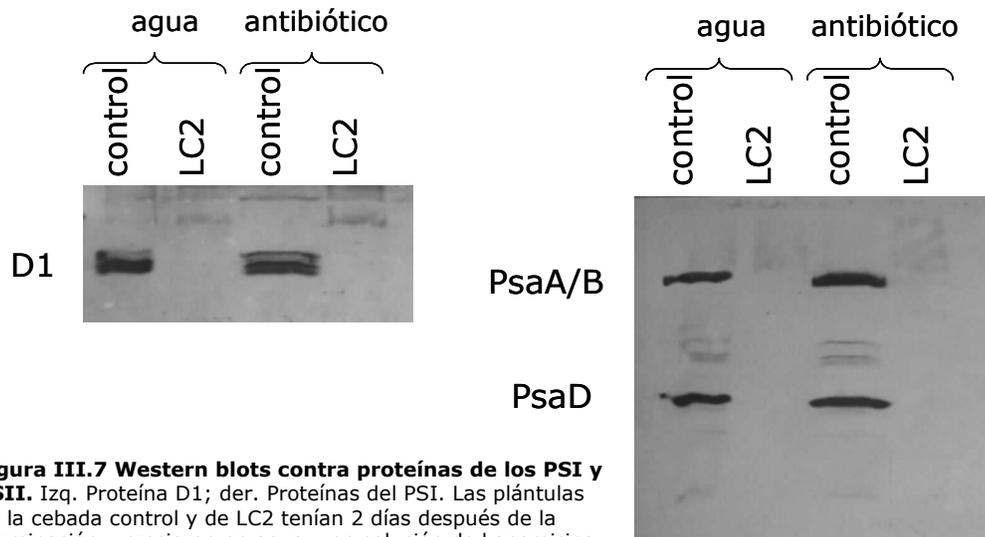


Figura III.7 Western blots contra proteínas de los PSI y PSII. Izq. Proteína D1; der. Proteínas del PSI. Las plántulas de la cebada control y de LC2 tenían 2 días después de la germinación y crecieron en agua y en solución de kanamicina.

III.4.4 Aislamiento de nuevas mutantes con fenotipo similar a LC2.

En mutantes del cloroplasto de la cebada no podemos recurrir a cruzamientos para producir recombinaciones, ni disponemos de tecnologías puestas a punto para su transformación, por lo que para comprobar más fehacientemente la asociación entre el fenotipo LC2 y la mutación hallada en el gen *infA*, se llevaron a cabo nuevas selecciones de plántulas con fenotipo LC2, las que designamos como "LC2-like". Previamente, se aislaron 15 casos de plántulas LC2-like a partir del mismo "pool" original desde donde se aisló por primera vez la mutante LC2. La secuenciación de las mismas arrojó resultados idénticos a los mostrados en la figura III.5 para LC2. Pero, dado que se aislaron del mismo "pool" mutador original que a su vez se formó con grupos de plantas con deficiencias clorofílicas diversas, se concluyó que las mismas podrían haber sido originadas en el mismo evento. Por lo tanto, la búsqueda de fenotipos LC2-like se orientó hacia familias de genotipo mutador que se originaron por cruzamientos utilizando el genotipo mutador como padre sobre madres de genotipo nuclear normal y por lo tanto también portadoras de plastoma normal. De esta manera se puede asegurar que las nuevas mutantes que se seleccionen sobre progenies derivadas de distintas plantas F₂ se originarán en eventos mutacionales independientes. En principio, sobre estos materiales sólo se aisló una planta con el mismo patrón de variegación posicional que LC2 (Fig. III.8), la que por cruzamientos recíprocos mostró tener también herencia materna. Sobre plántulas de esta mutante se repitió el proceso de amplificación, clonado y secuenciación del gen *infA* mencionado anteriormente. La secuencia del *infA* de esta nueva mutante (Genbank [AY743911](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/AY743911)), mostró un cambio de T por C pero esta vez en la posición 97 (Fig. III.9), correspondiendo a un cambio aminoacídico de fenilalanina por leucina en la posición 32 de la secuencia proteica deducida (Fig. III.10). En la figura III.11 se muestra un alineamiento de las secuencias de IF1 de la cebada control, las mutantes LC2 y LC2-like junto con secuencias de la proteína en otras especies.



Figura III.8 Plántulas de LC2-like.

```

CLUSTAL W(1.83) multiple sequence alignment
control infA      ATGACAGAAAAAAAAATAGGAGAGAAAAAAAAAACCCGAGAGAAGCAAAAGTTACTTTT 60
LC2-like infA    ATGACAGAAAAAAAAATAGGAGAGAAAAAAAAAACCCGAGAGAAGCAAAAGTTACTTTT 60
infA trigo       ATGACAGAAAAAAAAATAGGAGAGAAAAAAAAAACCCGAGAGAAGCAAAAGTTACTTTT 60
*****

control infA      GAAGGTTTAGTTACGGAAGCCCTACCCAATGGAATGTCCTCCGGTTCGGCTAGAGAATGAC 120
LC2-like infA    GAAGGTTTAGTTACGGAAGCCCTACCCAATGGAATGTCCTCCGGTTCGGCTAGAGAATGAC 120
infA trigo       GAAGGTTTAGTTACGGAAGCCCTACCCAATGGAATGTCCTCCGGTTCGGCTAGAGAATGAC 120
*****

control infA      ACCATCATCCTAGGCTATATTTTCAGGAAAGATCCGGTCTAGTTCTATACGAATACTGATG 180
LC2-like infA    ACCATCATCCTAGGCTATATTTTCAGGAAAGATCCGGTCTAGTTCTATACGAATACTGATG 180
infA trigo       ACCATCATCCTAGGCTATATTTTCAGGAAAGATCCGGTCTAGTTCTATACGAATACTGATG 180
*****

control infA      GGGGATAGGGTCAAATTTGAAGTAAAGTCGTTATGATTCAAGCAAGGGACGTATAATTTAT 240
LC2-like infA    GGGGATAGGGTCAAATTTGAAGTAAAGTCGTTATGATTCAAGCAAGGGACGTATAATTTAT 240
infA trigo       GGGGATAGGGTCAAATTTGAAGTAAAGTCGTTATGATTCAAGCAAGGGACGTATAATTTAT 240
*****

control infA      AGACTTCCCATAAAGGATTGGAAGCGTATCGAAGACTCGAAGGATAGCGAAGATTTGAAG 300
LC2-like infA    AGACTTCCCATAAAGGATTGGAAGCGTATCGAAGACTCGAAGGATAGCGAAGATTTGAAG 300
infA trigo       AGACTTCCCATAAAGGATTGGAAGCGTATCGAAGACTCGAAGGATAGCGAAGATTTGAAG 300
*****

control infA      GATAGCGAAGATTTGAAGGATACCAAAGATTCAAAGGATTAG 342
LC2-like infA    GATAGCGAAGATTTGAAGGATACCAAAGATTCAAAGGATTAG 342
infA trigo       GATAGCGAAGATTTGAAGGATACCAAAGATTCAAAGGATTAG 342
*****

```

Figura III.9 Alineamiento de las secuencias de los genes *infA* del control (GenBank AY488512), de la mutante LC2-like (Genbank AY743911) y de trigo (Genbank NC_002762). La mutación en LC2-like en la posición 97 se encuentra marcada en rojo. "*" significa que todos los nucleótidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento.

```

CLUSTAL W(1.83) multiple sequence alignment
control IF1      MTEKKNRREKKNPREAKVTFEGLVTEALPNGVIRVRENDTIILGYISGKIRSSSIRILM 60
LC2-like IF1    MTEKKNRREKKNPREAKVTFEGLVTEALPNGVIRVRENDTIILGYISGKIRSSSIRILM 60
IF1 trigo       MTEKKNRREKKNPREAKVTFEGLVTEALPNGVIRVRENDTIILGYISGKIRSSSIRILM 60
*****

control IF1      GDRVKI EVSRYDSSKGR IYRLPHKDSKRI EDSKSEDLKDSKDKDTKDSKDK 113
LC2-like IF1    GDRVKI EVSRYDSSKGR IYRLPHKDSKRI EDSKSEDLKDSKDKDTKDSKDK 113
IF1 trigo       GDRVKI EVSRYDSSKGR IYRLPHKDSKRI EDSKSEDLKDSKDKDTKDSKDK 113
*****

```

Figura III.10 Alineamiento de las secuencias deducidas de las proteínas IF1 del control (Genbank AAR85888), de la mutante LC2-like (Genbank AAU93687) y de trigo (Genbank NP_114292). El cambio de aminoácido en LC2-like en la posición 32 se encuentra marcada en rojo. "*" significa que todos los aminoácidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento. ":" significa que se observan sustituciones conservadas.

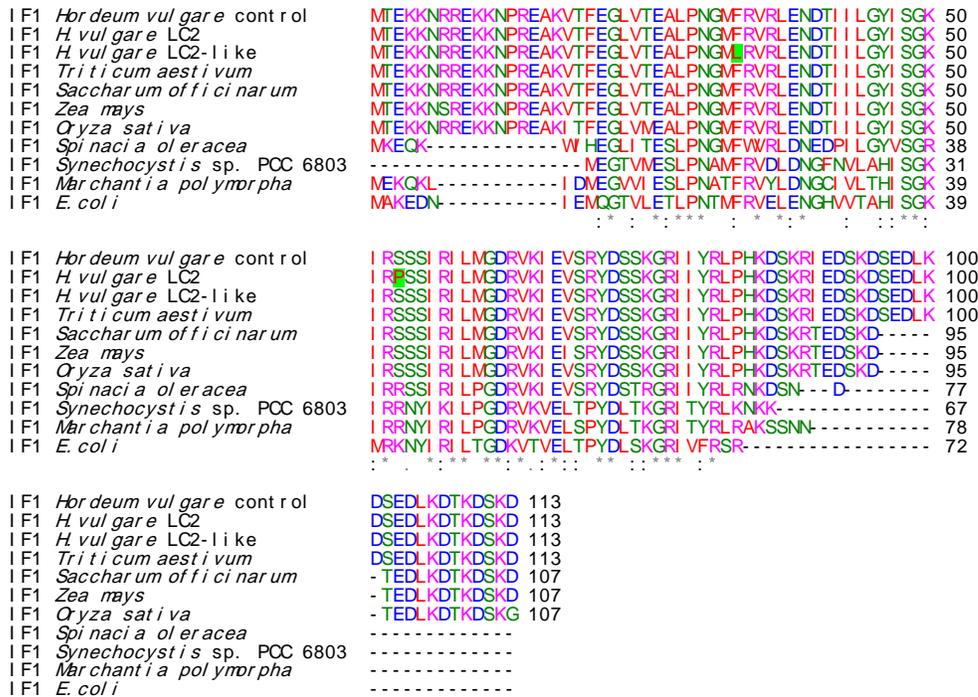


Figura III.11 Alineamiento de las secuencias de la proteína IF1 de la cebada control y mutantes y en comparación con otras especies. Los aminoácidos cambiados por las mutaciones se resaltan en verde. En azul se muestran los residuos ácidos; en rojo, los pequeños e hidrofóbicos; en verde, los que tienen grupos Hidroxilo + Amino + Básico-con carga; en rosa, los básicos. "*" significa que todos los aminoácidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento. "-" significa que se observan sustituciones semi-conservadas. ":" significa que se observan sustituciones conservadas. Las secuencias fueron tomadas del Genbank con los siguientes números de entrada: *Hordeum vulgare* MC182 (control) AAR85888, *Hordeum vulgare* LC2 AAR85889, *Hordeum vulgare* LC2-like AAU93687, *Triticum aestivum* NP_114292.1, *Oryza sativa* NP_039420.1, *Zea mays* NP_043058.1, *Saccharum officinarum* AAT44726.1, *Spinacia oleracea* CAA27212, *Synechocystis* sp. PCC 6803 BAA17329, *Marchantia polymorpha* NP_039334, y *Escherichia coli* K12 NP_415404.

Recientemente, se halló en un nuevo "pool" de mutador una plántula que presentaba una estría con el mismo fenotipo posicional que LC2. Se aisló ADN de la estría, se amplificó el gen *infA* por PCR y se mandó a secuenciar el producto de PCR. Se encontró una mutación puntual de A por G en el nucleótido 185 (Fig. III.12) que corresponde a un cambio aminoacídico de ácido aspártico por glicina en el residuo 61 (Fig. III.13). La herencia materna del fenotipo pudo comprobarse en las hijas de esta plántula estriada a la cual denominamos LC2-like 2.

```

CLUSTAL W(1.83) multiple sequence alignment
control infA      ATGACAGAAAAAAAAAATAGGAGAGAAAAAAAAAACCCGAGAGAAGCAAAAAGTTACTTTT 60
LC2-like 2 infA  ATGACAGAAAAAAAAAATAGGAGAGAAAAAAAAAACCCGAGAGAAGCAAAAAGTTACTTTT 60
infA trigo       ATGACAGAAAAAAAAAATAGGAGAGAAAAAAAAAACCCGAGAGAAGCAAAAAGTTACTTTT 60
*****

control infA      GAAGGTTTAGTTACGGAAGCCCTACCCAATGGAATGTTCCGCGTTCCGCTAGAGAATGAC 120
LC2-like 2 infA  GAAGGTTTAGTTACGGAAGCCCTACCCAATGGAATGTTCCGCGTTCCGCTAGAGAATGAC 120
infA trigo       GAAGGTTTAGTTACGGAAGCCCTACCCAATGGAATGTTCCGCGTTCCGCTAGAGAATGAC 120
*****

control infA      ACCATCATCCTAGGCTATATTTTCAGGAAAGATCCGGTCTAGTTCTATACGAATACTGATG 180
LC2-like 2 infA  ACCATCATCCTAGGCTATATTTTCAGGAAAGATCCGGTCTAGTTCTATACGAATACTGATG 180
infA trigo       ACCATCATCCTAGGCTATATTTTCAGGAAAGATCCGGTCTAGTTCTATACGAATACTGATG 180
*****

control infA      GGGGATAGGGTCAA AATTGAAGTAAAGTCGTTATGATTCAAGCAAGGACGTATAATTTAT 240
LC2-like 2 infA  GGGGATAGGGTCAA AATTGAAGTAAAGTCGTTATGATTCAAGCAAGGACGTATAATTTAT 240
infA trigo       GGGGATAGGGTCAA AATTGAAGTAAAGTCGTTATGATTCAAGCAAGGACGTATAATTTAT 240
*****

control infA      AGACTTCCCATAAGGATTGGAAGCGTATCGAAGACTCGAAGGATAGCGAAGATTTGAAG 300
LC2-like 2 infA  AGACTTCCCATAAGGATTGGAAGCGTATCGAAGACTCGAAGGATAGCGAAGATTTGAAG 300
infA trigo       AGACTTCCCATAAGGATTGGAAGCGTATCGAAGACTCGAAGGATAGCGAAGATTTGAAG 300
*****

control infA      GATAGCGAAGATTTGAAGGATACCAAAGATTCAAAGGATTAG 342
LC2-like 2 infA  GATAGCGAAGATTTGAAGGATACCAAAGATTCAAAGGATTAG 342
infA trigo       GATAGCGAAGATTTGAAGGATACCAAAGATTCAAAGGATTAG 342
*****

```

Figura III.12 Alineamiento de las secuencias de los genes *infA* del control (GenBank AY488512), de la mutante LC2-like 2 y de trigo (Genbank NC_002762). La mutación en LC2-like 2 en la posición 185 se encuentra marcada en rojo. "*" significa que todos los nucleótidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento.

```

CLUSTAL W(1.83) multiple sequence alignment
control IF1      MTEKKNRREKKNPREAKVTFEGLVTEALPNGMFRVRLNDTI | LGYI SGKI RSSSI RI LM 60
LC2-like 2 IF1  MTEKKNRREKKNPREAKVTFEGLVTEALPNGMFRVRLNDTI | LGYI SGKI RSSSI RI LM 60
IF1 trigo       MTEKKNRREKKNPREAKVTFEGLVTEALPNGMFRVRLNDTI | LGYI SGKI RSSSI RI LM 60
*****

control IF1      G R V K I E V S R Y D S S K G R I | Y R L P H K D S K R I E D S K D S E D L K D S E D L K D T K D S K D 113
LC2-like 2 IF1  G R V K I E V S R Y D S S K G R I | Y R L P H K D S K R I E D S K D S E D L K D S E D L K D T K D S K D 113
IF1 trigo       G R V K I E V S R Y D S S K G R I | Y R L P H K D S K R I E D S K D S E D L K D S E D L K D T K D S K D 113
*****

```

Figura III.13 Alineamiento de las secuencias deducidas de las proteínas IF1 del control (Genbank AAR85888), de la mutante LC2-like 2 y de trigo (Genbank NP_114292). El cambio de aminoácido en LC2-like 2 en la posición 61 se encuentra marcada en rojo. "*" significa que todos los aminoácidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento. "." significa que se observan sustituciones semi-conservadas.

Los cambios encontrados en las secuencias del gen *infA* en las mutantes se resumen en la tabla III.1.

Mutante	Cambios en el ADN	Cambios en la proteína
LC2	T→C en el nucleótido 157	Ser 52 Pro
LC2-like	T→C en el nucleótido 97	Phe 32 Leu
LC2-like 2	A→G en el nucleótido 185	Asp 61 Gly

Tabla III.1 Cambios encontrados en las secuencias nucleotídicas y proteicas del gen *infA*.

III.4.5 Experimento de complementación funcional de un “knock-out” del gen *infA* en *E. coli*.

El gen *infA* en bacterias es esencial (Cummings y Hershey, 1994) y a la proteína que codifica (IF1) se le atribuyen varias funciones como: Aumentar la tasa de disociación y asociación de los ribosomas 70S, a través de un efecto estimulador de la actividad de los factores IF2 e IF3 y favorecer la interacción entre el IF2 y la subunidad ribosomal 30S (Laurson *et al.*, 2005).

Con el objeto de investigar la diferente funcionalidad de las versiones salvaje y mutantes del IF1 de cebada, y dado el gran porcentaje de homología entre el IF1 de *E. coli* y el de cebada, se planteó un experimento de reemplazo del gen bacteriano, por el de la cebada normal y el de las mutantes LC2 y LC2-like en *E. coli*. Ello se hizo debido a la simplicidad experimental en bacterias ya que en cebada no se dispuso de un sistema de transformación de cloroplastos puesto a punto. Por otro lado, en *Nicotiana*, especie en la cuál está puesta a punto la transformación de cloroplastos, el *infA* es un pseudogen, sin funcionalidad aparente, localizado en el plastoma, mientras que, en *Arabidopsis thaliana*, el gen *infA* se encuentra en el núcleo, por lo cual, tiene un péptido señal a cloroplasto, y esto lo vuelve poco homólogo al de cebada.

Las cepas de *E. coli* “knock-out” del gen *infA* fueron gentilmente donadas por Victor Croitoru y Leif Isaksson de la Universidad de Estocolmo. Se utilizaron dos cepas “knock-out” portadoras de un plásmido con el gen *infA* salvaje de *E. coli*, ya que este gen es esencial para la supervivencia de la bacteria y con un gen de resistencia a tetraciclina o cloramfenicol. Los genes *infA* de la cebada control y mutantes fueron clonados en un vector de expresión bajo un inductor, la arabinosa, y conteniendo un gen de resistencia a ampicilina. Se transformaron ambas cepas con los tres plásmidos conteniendo el *infA* de cebada salvaje, el *infA* de LC2 y el *infA* de LC2-like. Luego, se hicieron repiques sucesivos en placas con arabinosa y ampicilina, y a 43 °C en el caso de la cepa cuyo plásmido original tenía el origen sensible a temperatura. Lamentablemente se obtuvieron muchos falsos positivos, es decir, cepas que supuestamente habían perdido el plásmido que contenía el *infA* de *E. coli*, por la susceptibilidad a la tetraciclina o al cloramfenicol pero cuando se realizaron reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos para el *infA* de *E. coli*, se obtuvieron los correspondientes productos de amplificación.

III.5 DISCUSIÓN

Los análisis moleculares realizados previamente en LC2 mediante RFLPs no habían detectado polimorfismos entre LC2 y el control en el 70% del plastoma, sugiriendo la ausencia de grandes cambios estructurales en su origen (Colombo *et al.*, 2006).

En los experimentos de imbibición de las semillas del control y de LC2 en antibióticos se vio que éstos sólo afectaron la parte inferior de la lámina de la primera hoja en el control, mientras que la parte superior presentó una pigmentación verde normal. De ello puede deducirse que la parte superior no necesita sintetizar ninguna proteína plastídica durante la germinación para tener un contenido de clorofila normal, es decir que en esa parte de la hoja de la cebada normal las proteínas codificadas por el plastoma ya se habrían sintetizado antes de la germinación. Cuando el mismo tratamiento se aplicó en LC2 el efecto fue más drástico ya que la hoja quedó casi completamente albina. Esto indica que la parte superior de la lámina de la primera hoja de LC2 no sintetizó antes de la germinación las proteínas plastídicas requeridas para tener un contenido de clorofila normal en la hoja completamente desarrollada. Estos resultados, publicados en Prina *et al.* (2003), sugieren que las plántulas LC2 tienen un retraso en la síntesis de proteínas plastídicas en la parte superior de la lámina de la primera hoja, proceso que en el caso de la cebada normal se produciría antes de la germinación. Este hecho se correlacionaría con un retraso o ausencia de la formación de ribosomas cloroplásticos en esa parte de la hoja observados por microscopía electrónica (Prina *et al.*, 2003).

Los resultados de los western blots contra proteínas de los dos fotosistemas en plántulas que se encontraban en estadios muy tempranos de desarrollo confirmaron lo observado en el experimento de análisis de pigmentos y de microscopía electrónica. Es decir, en la cebada normal la plántula emerge con una cantidad de proteínas sintetizadas durante la embriogénesis, o sea que al comienzo del desarrollo no necesita la síntesis de novo de proteínas. Sin embargo, en LC2, se observa ausencia de proteínas cloroplásticas en esta etapa inicial de crecimiento.

Para postular el gen candidato para la mutante LC2 se tuvo en cuenta que de los genes cloroplásticos supuestamente involucrados en la traducción plastídica, el único cuya función se encontró asociada con la regulación de ese proceso en bacterias es el *infA*, que codifica para el factor de iniciación de la traducción 1 (IF1). En las plantas superiores, se han localizado homólogos del gen bacteriano *infA* en el genoma plastídico, como es el caso de la cebada, y también se ha observado el mismo en algunas especies localizado en el genoma nuclear (Millen *et al.*, 2001). En las bacterias, el paso limitante para la iniciación de la traducción es

generalmente la formación de un complejo ternario 30S con el ARNm (Stern *et al.*, 1997) y para su correcto funcionamiento se requiere la presencia de tres factores iniciadores de la traducción (Boelens y Gualerzi, 2002). El IF1 es el menor en tamaño y el de función menos entendida de los tres factores, sin embargo, este factor es indispensable para la traducción de proteínas en bacterias (Croitoru *et al.*, 2004). Su función conocida es modular las interacciones 30S-IF2 y la asociación/disociación de las subunidades ribosomales (Boelens y Gualerzi, 2002; Kozak, 1983), mientras que otras funciones específicas están en discusión (Boelens y Gualerzi, 2002; Croitoru *et al.*, 2004; Dahlquist y Puglisi, 2000). Pertenece a la familia de las "oligonucleotide binding fold proteins", que también incluye a la proteína ribosomal S1 (Gribskov, 1992), el factor iniciador eucariótico eIF1A (Kyrpides y Woese, 1998) y a las "cold shock proteins" CspA y CspB (Sette *et al.*, 1997). IF1 ha mostrado tener semejanzas estructurales y funcionales con estas últimas (Laursen *et al.*, 2005). Además se ha demostrado que IF1 tiene actividad de chaperonina del ARN tanto *in vivo* como *in vitro* y que se une con gran afinidad al ARN contribuyendo a la reorganización del mismo durante la fase temprana de inicio de la traducción (Croitoru *et al.*, 2006). Además, IF1 es una proteína altamente conservada que tiene equivalentes funcionales en todos los organismos (Kyrpides y Woese, 1998), pero sin embargo a pesar de su ubicuidad, no se conocen mutantes del gen *infA* en plantas superiores y eran raras hasta hace poco, inclusive en bacterias (Croitoru *et al.*, 2004).

Como se vio en la figura III.5 las secuencias del gen *infA* de plántulas de LC2 y de la cebada normal difirieron en una base, es decir LC2 se habría originado por una mutación puntual, una transición T→C en el nucleótido 157, que corresponde a un cambio de aminoácido de serina a prolina en el residuo 52 (Landau *et al.*, 2007). Este residuo es altamente conservado en monocotiledóneas (Fig. III.11) y además está localizado en un segmento homólogo al de *E. coli* correspondiente a los residuos comprendidos entre 36-49, el cual ha sido señalado como probablemente importante para la función de IF1 que ha dado varias mutantes funcionales (Croitoru *et al.*, 2004). Asimismo, pudo observarse que la secuencia de la cebada normal coincide en su totalidad con la reportada previamente de la proteína IF1 en trigo.

Por otro lado, para probar la hipótesis de que el gen *infA* es el responsable del fenotipo LC2 se aislaron nuevas mutantes con fenotipo LC2 (LC2-like). Una mutante LC2-like fue obtenida a partir de generaciones segregantes de genotipo mutador obtenidas cruzando el genotipo mutador como padre. Esto fue hecho para garantizar que las mutantes observadas en cada "pool" fueran originadas en nuevos eventos mutacionales independientes. Se verificó la herencia materna de esta

mutante e interesantemente, el análisis de la secuencia del gen *infA* también mostró una mutación puntual. Esta mutación fue igualmente una transición T→C, pero en el nucleótido 97, que originó un cambio aminoacídico de fenilalanina por leucina en la posición 32 (Landau *et al.*, 2007), que también es un residuo altamente conservado en la proteína IF1 (Fig. III.12).

Ambas mutaciones encontradas tanto en la línea LC2 original, como en la nueva línea de fenotipo similar a LC2, fueron transiciones T→C en la primera posición del codón, lo cuál hace pensar que el "editing" de las mismas a nivel ARNm sea poco probable, ya que en los cloroplastos de las plantas superiores este fenómeno está mayormente restringido a conversiones C→U localizadas en la segunda posición del codón (Bock, 2000). De todas formas, para corroborar si el "editing" del ARNm podría restaurar la citosina a uracilo, se secuenció el ADNc de los transcriptos del gen *infA* de la cebada normal y de LC2 y se encontró que estos cambios de base estaban conservados a nivel ADNc.

La tercera mutante con fenotipo LC2 encontrada recientemente en un nuevo pool de mutador mostró también una mutación puntual en la secuencia del gen *infA*, pero esta vez se trató de una transición A→G en el nucleótido 185 produciendo un cambio aminoacídico de ácido aspártico por glicina en el residuo 61.

En un intento por analizar la funcionalidad del IF1 de la cebada normal y de los IF1 mutantes (de LC2 y LC2-like), se realizó un experimento de complementación en *E. coli*. Además de la simplicidad de trabajar con bacterias mencionada anteriormente, ya existían evidencias exitosas de complementación del IF2 en *E. coli* por el de una planta superior, poroto (Campos *et al.*, 2001). Las cepas de *E. coli* que se usaron para el experimento de complementación eran "knock-outs" del gen *infA* en el cromosoma bacteriano pero traían el gen en un plásmido ya que este gen es esencial para la supervivencia de la bacteria. La idea de este experimento fue clonar los genes *infA* de cebada normal y mutantes en plásmidos de expresión con distinta resistencia a antibióticos que la de los plásmidos de los "knock-outs", transformar las bacterias con estos vectores y luego seleccionar a través de sucesivos repiques en placas con selección favorable a los plásmidos que acarreaban los genes de cebada, con el objetivo de reemplazar el IF1 de *E. coli* por el de cebada y ver si la bacteria podía subsistir con la proteína de cebada normal y con las mutantes, y si se afectaba el crecimiento de la misma. Se obtuvieron muchos falsos reemplazos y en el caso de la cepa que contenía el gen *infA* de *E. coli* en un plásmido con origen de replicación sensible a alta temperatura, cuando se realizó la selección a la temperatura restrictiva para el mismo, nunca se logró perder el vector, por lo cual, no hubo selección posible.

De la observación del fenotipo LC2 podría deducirse que la probable disfunción del IF1 de la mutante se expresaría solamente en ciertas etapas del desarrollo como en la embriogénesis y en el desarrollo temprano de las plántulas. Hasta ahora, con algunas excepciones reportadas recientemente (Drescher *et al.*, 2000; Ahlert *et al.*, 2003; Kuroda y Maliga, 2003; Kode *et al.*, 2005), el rol central en el control del desarrollo temprano de los plástidos ha sido atribuido a los genes nucleares, mientras que, en cambio, a los genes cloroplásticos se les ha dado poca importancia en este proceso (Taylor *et al.*, 1987; Leon *et al.*, 1998; Mache *et al.*, 1997). Por otro lado, mutantes en genes nucleares que afectan a los ribosomas cloroplásticos han sido publicadas en cebada (Börner *et al.*, 1976) y en maíz (Walbot y Coe, 1979), pero en esos casos, los ribosomas cloroplásticos estaban ausentes en todo el ciclo de la planta. También han sido descritas otras mutantes en genes nucleares que afectan la traducción plastídica y el desarrollo temprano de los cloroplastos en arroz (Sugimoto *et al.*, 2004), tabaco (Ahlert *et al.*, 2003) y *Arabidopsis* (Pesaresi *et al.*, 2006; Albrecht *et al.*, 2006; Ruppel y Hangarter, 2007; Motohashi *et al.*, 2007), y en genes cloroplásticos (Legen *et al.*, 2007).

III.6 CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Los resultados sugieren que LC2, LC2-like y LC2-like 2 son mutantes del gen *infA*, y que el fenotipo LC2 puede asociarse a mutaciones en este gen, siendo la primera vez que un fenotipo mutante es atribuido al gen *infA* en plantas superiores.

Como perspectivas futuras quedan por analizar: 1) la funcionalidad de los alelos mutantes ya sea por nuevos ensayos de complementación en bacterias, como por ensayos in vivo en plantas de cebada, analizando en distintos ambientes controlados caracteres como la producción de pigmentos, el largo de la vaina y la eficiencia de la traducción de proteínas en los cloroplastos de las mutantes utilizando semillas originadas en cruza recíprocas para garantizar la isogenicidad de la genética nuclear del material probado; 2) la capacidad de retromutación de las mutantes sometidas nuevamente al genotipo mutador; 3) la selección de nuevas mutantes LC2-like a partir de familias de genotipo mutador manejadas de tal forma que se garantice la independencia de los eventos mutacionales; 4) sería también interesante poder analizar cómo se afecta la estructura y funcionalidad de la proteína IF1 con los cambios de aminoácidos encontrados en las mutantes.

IV. ANÁLISIS DE LA LÍNEA CITOPLÁSMICA 3 (LC3)

IV.1 INTRODUCCIÓN

IV.1.2 El fenotipo LC3.

Usualmente, a simple vista puede observarse que la mutante LC3 es deficiente en clorofila, ya que presenta un fenotipo de color verde claro homogéneo (*viridis*). Anteriormente se observó a campo y se corroboró por experimentos llevados a cabo en condiciones controladas en cámaras de cría que el color verde de las hojas LC3 se volvía aún más claro cuando las plantas crecían en un ambiente de alta temperatura para la cebada (Fig. IV.1). Por ello, los primeros análisis se orientaron a la determinación de pigmentos clorofílicos, fluorescencia de la clorofila y a las proteínas de los complejos tilacoidales por ser éstos los lugares en donde se encuentran anclados los pigmentos.

IV.1.3 Mutantes *viridis* de cebada.

Las mutantes de cebada de color verde claro homogéneo fueron designadas como *viridis* según la clasificación de Gustafsson (1940). En cebada, por cruzamientos dialélicos, se localizaron 42 mutantes en 32 genes (von Wettstein y Kristiansen, 1973). Todos los alelos mutantes resultaron ser de expresión recesiva y de herencia mendeliana y sólo unas pocas mutantes alcanzaron la madurez y produjeron semillas viables. Simpson y von Wettstein (1980) postularon que el efecto primario de la mutación en este tipo de mutantes estaría en la síntesis de alguna proteína tilacoidea cuya ausencia resultaría en una disminución del contenido de clorofila. Para examinar estas mutantes, los autores anteriormente mencionados, las agruparon en diferentes clases según el contenido de clorofila, la fluorescencia a temperatura ambiente y a baja temperatura, y la ultraestructura de los cloroplastos. Entre ellas encontraron mutantes del PSI y del PSII.

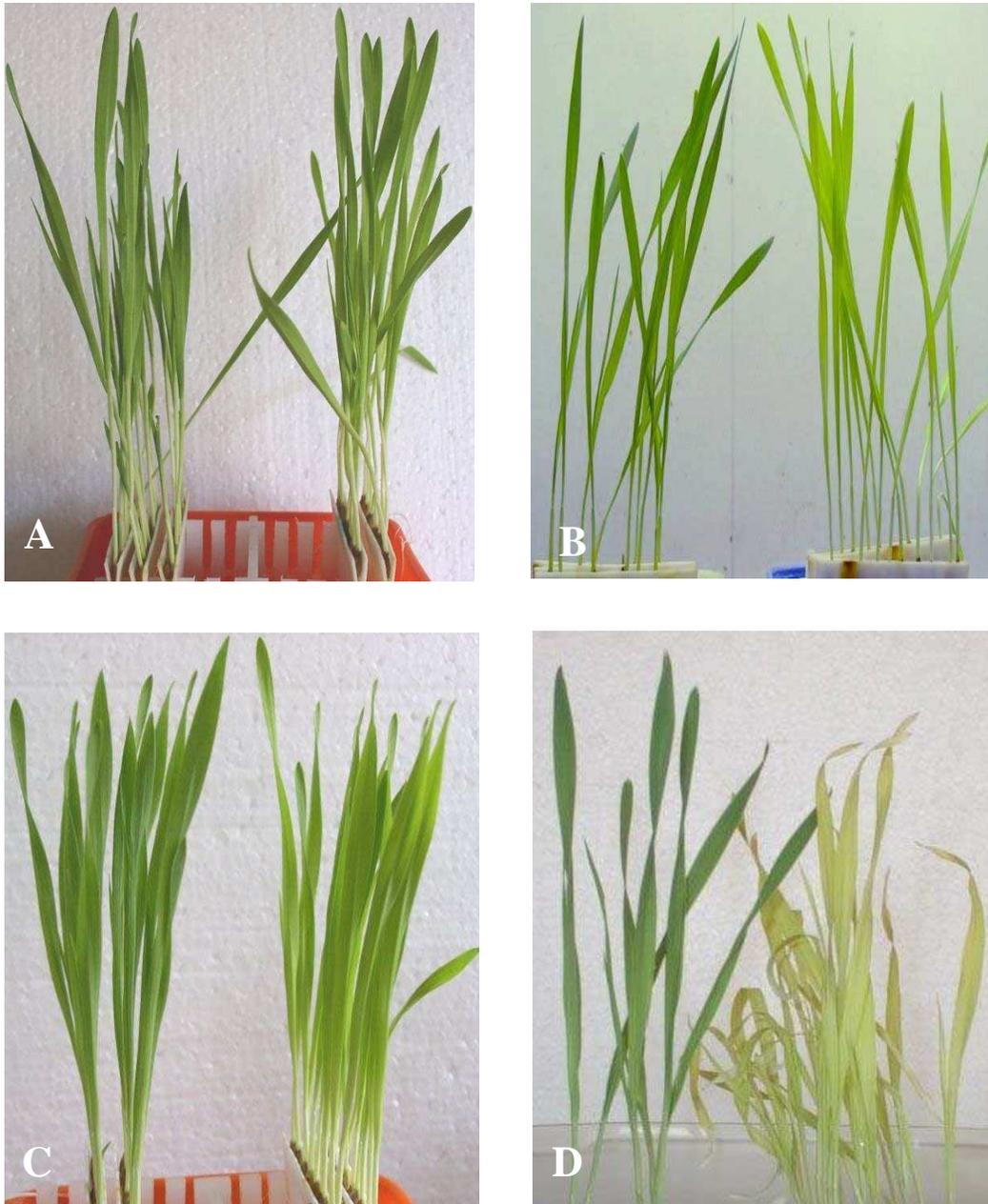


Figura IV.1 Plántulas del control (izquierda) y LC3 (derecha) a 6 días después de la germinación en diferentes condiciones de luz ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y temperatura. A, 18 °C y mezcla de luz fluorescente e incandescente. B, 32 °C y mezcla de luz fluorescente e incandescente. C, 18 °C y sólo luz fluorescente. D, 32 °C y sólo luz fluorescente.

IV.1.4 Mutantes sensibles a alta temperatura.

Las plántulas de cebada se vuelven cloróticas cuando crecen a temperaturas por encima de los 32 °C (Smillie *et al.*, 1978). Algunas mutantes de cebada sensibles a alta temperatura han sido descritas con anterioridad (Smillie *et al.*, 1978). Estas mutantes tenían una sensibilidad mayor al calor, mostrando ser afectadas en el desarrollo de los cloroplastos a temperaturas menores a aquellas que producen

clorosis en la cebada salvaje. Los autores observaron que la disminución de la clorofila era acompañada por una disminución en la actividad de las tilacoides aisladas indicando que los cloroplastos que se desarrollaban a altas temperaturas perdían funcionalidad a medida que la temperatura de crecimiento aumentaba. En una de estas mutantes la disminución del contenido de clorofila fue acompañada por una reducción en la actividad del PSI y del PSII. También se describieron mutantes de arveja sensibles a alta temperatura que resultaron ser mutantes del PSII (Stummann *et al.*, 1980). En todos estos casos, las mutaciones se encontraban en genes nucleares. Hasta el momento, no tenemos conocimiento de que en plantas superiores, se hayan reportado mutantes para genes localizados en el plastoma que sean sensibles a alta temperatura.

IV.1.5 Los fotosistemas.

IV.1.5.1 El fotosistema I (PSI).

El PSI (Fig. IV.2) es un complejo proteína-pigmento que se encuentra en las membranas tilacoides de algas, cianobacterias y cloroplastos de plantas superiores, principalmente en el estroma lamelar. El PSI cataliza la transferencia de electrones inducida por la luz desde la plastocianina (y/o citocromo c en ciertas cianobacterias) hasta la ferredoxina (llevando finalmente a la reducción del NADP). Este fotosistema está constituido por al menos 19 subunidades proteicas en plantas superiores. Hasta ahora se conocen 15 subunidades que forman el "core" (PSI-A a PSI-L, PSI-N a PSI-P) del PSI y su antena periférica, LHCI, consiste en 6 proteínas Lhca (Lhca1-6) (Jensen *et al.*, 2007). PSI-A y PSI-B forman el centro de reacción alrededor del cual se ensamblan todas las otras subunidades. PSI-C, PSI-D, PSI-H y PSI-E son componentes del dominio periférico del estroma. PSI-A, PSI-B y PSI-C están codificadas por el genoma del cloroplasto junto con PSI-I y PSI-J, mientras que las otras subunidades están codificadas por el genoma nuclear. PSI-F es otra subunidad de origen nuclear que se ubica en el lumen de las tilacoides donde media la rápida transferencia de electrones desde la plastocianina al P700 (Wollman *et al.*, 1999).

El evento inicial de ensamblaje del PSI es la formación de un complejo heterodimérico PSI-A/PSI-B, seguido de la asociación de PSI-C, la cual es requerida para la subsiguiente unión de PSI-D y PSI-E (Choquet y Vallon, 2000; Chitnis, 2001; Antonkine *et al.*, 2003; Fromme *et al.*, 2001). Además, PSI-D es esencial para la unión estable de PSI-C y PSI-E (Li *et al.*, 1991).

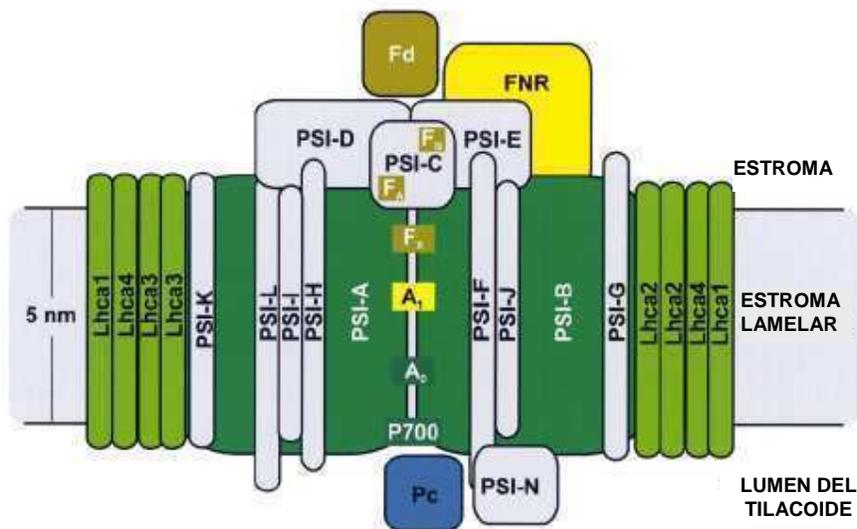


Figura IV.2 Modelo esquemático del PSI de plantas superiores. Fd: ferredoxina; FNR: NADP. oxidoreductasa; Pc: plastocianina (Tomado de Scheller et al., 2001)

IV.1.5.2 El fotosistema II (PSII).

El PSII (Fig. IV.3) es un multicomponente enzimático que oxida H_2O y reduce a la plastoquinona generando protones y oxígeno. En él se llevan a cabo dos procesos fundamentales para la fotosíntesis: 1) La primera separación de carga que permite el flujo de electrones en la cadena fotosintética, y 2) La hidrólisis del agua que libera protones, electrones y oxígeno. Estos dos procesos son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la vida sobre la Tierra ya que posibilita la conversión de energía solar en energía química y la existencia de una atmósfera rica en oxígeno, elemento necesario para la respiración (De Las Rivas, 2000). Este complejo se encuentra principalmente en la grana apilada y está compuesto por más de 27 subunidades algunas codificadas por el núcleo y otras por el cloroplasto. El centro de reacción del PSII contiene las subunidades D1, D2 y Cyt b559 las cuales unen cofactores involucrados en la transferencia de electrones. Los complejos antena del "core" del PSII son CP43 y CP47. Este fotosistema cuenta también con un complejo antena que es el LHCI. (Wollman *et al.*, 1999; Kirchhoff *et al.*, 2007, Okkels, 1992)

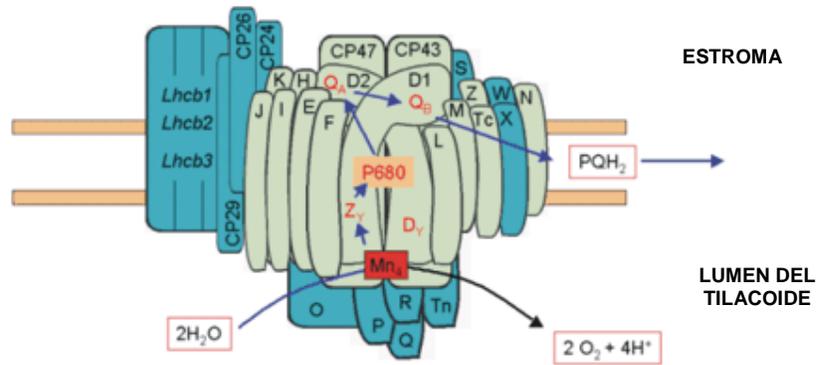


Figura IV.3 Modelo esquemático del PSII. En verde claro se muestran las proteínas codificadas por el cloroplasto y en azul, las codificadas por el núcleo (Tomado de la página web de la Dra. Eva-Mari Aro, Univ. de Turku, Finlandia: http://www.sci.utu.fi/biologia/tutkimus/projektit/kasvimol/aro/Photosynthetic_membrane_protein_complexes.html)

Hipótesis:

El fenotipo LC3 es causado por una mutación en un gen plastídico que codifica para una proteína involucrada en la fotosíntesis.

IV.2 OBJETIVOS

Analizar distintos aspectos de la mutante a nivel bioquímico y fisiológico dentro de las posibilidades que tenemos a nuestro alcance, con el objeto de encontrar el camino que nos lleve hasta la mutación causante del fenotipo observado.

IV.3 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Se utilizaron semillas de LC3 y como control el genotipo MC182. Las semillas se sembraron en macetas con tierra o en hidroponía por el método sandwich descrito por Myhill y Konzak (1967).

Las plántulas crecieron en cámaras de cría en condiciones de temperatura controlada. Se tomó como temperatura control 18 °C y como alta temperatura 32 °C. Las plántulas crecieron con un fotoperíodo de 16 hs. a temperatura constante. Las cámaras de cría utilizadas en los diferentes experimentos fueron: una Sanyo Versatile Environmental Test Chamber que cuenta solamente con tubos fluorescentes y una Conviron y/o Environmental, que posee una mezcla de tubos fluorescentes y lámparas incandescentes. En casi todos los experimentos, las plántulas crecieron bajo una intensidad de luz de 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a excepción del experimento en condiciones de baja intensidad de luz en el cual las plántulas crecieron a 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Todos los análisis se hicieron con tejido de la lámina de la primera hoja.

IV.3.2 Métodos.

IV.3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN total.

Se realizó como se detalla en la Sección III.

IV.3.2.2 Determinación del porcentaje de agua en tejido fresco.

El porcentaje de agua se determinó por diferencia de peso entre el tejido fresco y luego de haber permanecido en estufa a 105 °C durante 4 hs y media.

IV.3.2.3 Determinación de pigmentos.

IV.3.2.3.1 Determinación de pigmentos por espectrofotometría.

Se realizó como se detalla en la Sección III.

IV.3.2.3.2 Determinación de pigmentos por HPLC.

El análisis de pigmentos por HPLC se realizó de acuerdo a Lokstein *et al.* (2002). Se cortó tejido de la porción media de la lámina de la primera hoja de plántulas crecidas a 18 °C y a 32 °C a los 8 días después de la germinación. El tejido de primera hoja se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta el momento de realizar la medición de pigmentos. Los pigmentos fueron analizados por HPLC en un sistema de cromatografía Waters (600 E gradient module, 717 autosampler, 996 diode array detector) usando una columna analítica Waters

Spherisorb ODS2 (tamaño de partícula 5 μm ; 4.6 \times 250 mm). Los gradientes consistieron en acetonitrilo:agua:triethyl amina (900:100:1, solvente A) y acetato de etilo (solvente B) con 100% A por 16 min., 66,7% A/ 33,3% B por 6 min., 59,7% A/ 40,3% B por 12 min., 33,3% A/ 66,7% B por 0,2 min., 100% B por 2,5 min., y 100% A por 4,3 min. El flujo fue de 1 ml min^{-1} . Los pigmentos fueron identificados por sus tiempos de retención específicos y por su espectro de absorción y fueron cuantificados por comparación con estándares usando detección por "photodiode-array" a 440 nm.

IV.3.2.4 Medición de fluorescencia de la clorofila.

IV.3.2.4.1 Fluorescencia de la clorofila a temperatura ambiente.

La fluorescencia de la clorofila *in vivo* fue medida utilizando un fluorómetro PAM (pulse amplitude modulation) FMS 2, Hansatech en hojas de acuerdo a Lokstein *et al.* (2002). Se sembraron semillas de LC3 y MC182 en cámaras Conviron a 18 $^{\circ}\text{C}$ y 32 $^{\circ}\text{C}$. Las mediciones se realizaron a los 6 días después de la germinación y se hicieron por triplicado y a intensidades actínicas de 10, 15, 20, 25 y 40 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Los parámetros de fluorescencia fueron calculados de la siguiente manera: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ es la máxima eficiencia fotoquímica del PSII, en el estado de adaptación a la oscuridad. El quenching no fotoquímico fue cuantificado como $\text{NPQ} = (F_m/F_m') - 1$. El quenching fotoquímico fue cuantificado como $q_p = (F_m' - F_m)/(F_m' - F_0')$. Las densidades de flujo de fotones (PFDs) fueron medidas y ajustadas usando un sensor Li-Cor, LI-189A; Lincoln, NE, USA.

IV.3.2.4.2 Fluorescencia de la clorofila a 77 K.

Para este ensayo se aislaron tilacoides de las plántulas utilizadas para las mediciones de fluorescencia a temperatura ambiente.

Los espectros de emisión de fluorescencia 77 K fueron obtenidos por medio de un espectrofluorómetro Fluorolog FL-112 con un monocromador de emisión doble 1680 (Jobin-Yvon, Longjumeau, Francia). Las membranas tilacoides fueron suspendidas en 66% (v/v) glicerol/20 mM Tricina, pH 7,8 a una concentración final de clorofila de 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y fueron inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido. Las gotas congeladas fueron transferidas a un recipiente Dewar montado en el fluorómetro. La fluorescencia fue excitada a 440 nm.

IV.3.2.5 Análisis de proteínas.

IV.3.2.5.1 Aislamiento de membranas tilacoides.

IV.3.2.5.2 Medición de clorofila y solubilización de las tilacoides.

IV.3.2.5.3 Minigeles de SDS-PAGE.

IV.3.2.5.4 Tinción de minigeles con Coomassie blue.

IV.3.2.5.5 Western blots.

Todas estas técnicas se realizaron según se detalla en las Secciones II y III.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-D1 (PSII) y anti-Atp β (ATPasa) gentilmente donados por Alice Barkan, Universidad de Oregon, USA; anti-LHCII gentilmente donado por J. J. Guiamet, INFIVE, Universidad de La Plata; anti-PSI (reconoce PSI-A/B, -D, -E, -L, -H, -C), anti-PSI-F, anti-Lhca-1, -3, -4 y anti-Lhcb-1, -2, gentilmente donados por H. V. Scheller, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dinamarca.

IV.3.2.6 Análisis de ARN.

IV.3.2.6.1 Extracción de ARN total.

IV.3.2.6.2 Cuantificación del ARN.

IV.3.2.6.3 Tratamiento del ARN con ADNasa.

Se realizaron como en la Sección III.

IV.3.2.6.4 Northern blots.

Separación electroforética del ARN en gel de agarosa.

Se preparó un gel de 150 ml con 1,95 g de agarosa, 110,7 ml de agua DEPC, 15 ml de buffer 10x MEN (200 mM MOPS, 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA, pH 7 con NaOH). Se dejó gelificar por 30 minutos. Se sembraron entre 16 y 20 μ g de ARN en una relación 1:1.6 con el buffer de carga (50% formamida deionizada, 5,92% formaldehído, 1,625x MEN, 0,16 mg/ml bromuro de etidio, 0,1% SDS y agua DEPC). Como marcadores de peso molecular se usaron el *RNA markers* de Promega y el *High Range RNA marker* de Fermentas. Todas las muestras se incubaron 5 minutos a 65 °C e inmediatamente se colocaron en hielo por 3 a 4 minutos antes de sembrar. El buffer de corrida usado fue el 1x MEN. La corrida se realizó durante los primeros 30 minutos a 80 V constantes y luego durante aproximadamente unas 3 horas y media a 100 V a 4 °C.

Transferencia.

Se equilibró el gel en 10x SSC buffer y se dispuso sobre un puente de papel Whatman. Los bordes del gel se cubrieron con parafilm y sobre el gel se colocó la membrana de nylon, 6 piezas de papel Whatman, papeles de diario y un peso. La transferencia se hizo por capilaridad, durante 20 hs. en buffer 10x SSC. Luego, se

controló la presencia del ARN en la membrana y se realizó el "crosslinking" por exposición a la luz UV. La membrana se lavó dos veces en buffer 2x SSC.

Hibridación con sonda radiactiva.

Diez microlitros de sonda de ADN (10 µg/ul) se marcaron radiativamente con α dCTP³² con el sistema de marcado *HexaLabel DNA Labeling Kit* de Fermentas. Luego se pasó por una minicolumna MicroSpin G-25 de Amersham para remover los nucleótidos marcados no incorporados. La membrana se prehibridó durante 2 a 3 horas en 20 ml de buffer de hibridación (50% formamida deionizada, 250 mM NaCl, 7% SDS, 120 mM Na[PO₄] pH 7) a 52-55 °C. Luego de la prehibridación se agregó la sonda marcada al buffer de prehibridación y se incubó a la misma temperatura de hibridación durante toda la noche. Los lavados se hicieron a la temperatura de hibridación y con una duración de 20 minutos cada uno, de la siguiente forma: dos lavados con buffer 2x SSC/1% SDS, un lavado con 1x SSC/0,5% SDS y un lavado con 0,1x SSC/0,1% SDS. Finalmente las membranas se expusieron a las pantallas de detección de un PhosphoImager y se escanearon en el mismo equipo.

Sonda *psaC*: un fragmento de 1,6 kb del genoma cloroplástico de la cebada clonado en los sitios *Sst* I y *Pst* I de pBluescript en *E. coli* cepa XL1-blue. Se purificó de un cultivo de *E. coli* con el sistema de purificación de minipreps de Qiagen. Se realizó la digestión de 2 µg de fragmento en un volumen final de 20 µl con 2 µl de 10x buffer Y+ (Fermentas), 1 µl de *Sac* I (Fermentas) y 1 µl de *Pst* I (Fermentas) a 37 °C durante 2 hs.

Sonda *psaE*: un fragmento de ADNc de 650 pb clonado en los sitios *Hind* III y *Eco* RI de pTZ19R en *E. coli* cepa NM522. Se purificó de un cultivo de *E. coli* con el sistema de purificación de minipreps de Qiagen. Se realizó la digestión de 2 µg de fragmento en un volumen final de 20 µl con 2 µl de buffer 10x R+ (Fermentas), 1 µl de *Eco* RI (Fermentas) y 1 µl de *Hind* III (Fermentas) a 37 °C durante 2 hs.

Sonda *psaD*: se diseñó el siguiente par de oligonucleótidos en base a la secuencia de ADNc de *psaD* publicada en el Genbank para amplificar el gen sobre ADN total de cebada: *psaD* F 5'-CCCAAGGAGCAGGTCTTCGAG-3' y *psaD* R 5'-CGATGCTGCGGAAGTTCTGTC-3'. La PCR se hizo en un volumen final de 25 µl, 2,5 µl de 10x buffer Taq con 15 mM MgCl₂ (Qiagen), 0,5 µl de 10 mM dNTPs mix, 0,5 µl de 50 µM oligonucleótido *psaD* F, 0,5 µl de 50 µM oligonucleótido *psaD* R, 0,2 µl de 5 U/µl Taq polimerasa de Qiagen y 0,5 µl de 40 ng/µl ADN de cebada control MC182. El programa de ciclado fue:

95 °C	5 minutos	
94 °C	30 segundos	} 30 ciclos
60 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	10 minutos	

Los fragmentos se extrajeron de un gel de agarosa con el sistema *Gel extraction kit* de Qiagen.

Hibridación con sonda no radiactiva.

Las sondas de ADN se marcaron con Digoxigenina-11-dUTP "alkali labile" (Roche) por PCR. La reacción de PCR se describe a continuación: El volumen final de reacción fue de 40 µl; 4 µl buffer 10x Taq (Invitrogen), 1,2 µl de 50 mM MgCl₂, 1,6 µl de 10 µM oligonucleótido "forward", 1,6 µl de 10 µM oligonucleótido "reverse", 5 µl de 1 mM dATP, 5 µl de 1 mM dCTP, 5 µl de 1 mM dGTP, 3,3 µl de 1 mM dTTP, 1,7 µl de 1 nmol/µl DIG-11-dUTP, 0,3 µl de 5 U/µl Taq polimerasa de Invitrogen y 1 µl de 25 ng/µl ADN. Las membranas se prehibridaron durante 3hs como mínimo a 50 °C en 20 ml de High SDS Hyb buffer (7% SDS, 50% formamida deionizada, 5x SSC, 0,1% N-lauroylsarcosina, 2% blocking reagent, 50 mM fosfato de sodio pH 7, filtrado y autoclavado). A este buffer se le agregó 60 µg/ml esperma de salmón desnaturalizado o en su defecto ARNt de levadura en una concentración final de 500 µg/ml. La solución madre de bloqueo ("blocking solution") es 10% del reactivo de bloqueo ("blocking reagent", Boehringer) en buffer maleico (0,1 M ácido maleico, 0,15 M NaCl pH 7,5 con NaOH). Posteriormente, se agregó la sonda (20 ng/ml buffer de hibridación) marcada con digoxigenina previamente desnaturalizada durante 10 minutos a 95 °C a un nuevo volumen de 10 ml de buffer de hibridación. Se dejó la membrana hibridando a 50 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se hicieron dos lavados de 5 minutos cada uno en solución de lavado 2x (2x SSC, 0,1% SDS) a temperatura ambiente. Luego, dos lavados de 15 minutos a 50 °C en 0,1x solución de lavado (0,1x SSC, 0,1% SDS). Se equilibró la membrana 5 minutos en buffer de lavado [0,3% Tween 20 en buffer maleico (0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl pH 8 con NaOH)]. Se bloqueó en solución de bloqueo (1% solución madre) entre 30 y 60 minutos agitando suavemente. Luego se agregó el anticuerpo anti-DIG-AP (Roche) en una dilución 1:15.000 y se incubó 30 minutos. Se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno en solución de lavado y se equilibró la membrana en buffer de detección (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl) durante 5 minutos. Se sacó el exceso de buffer de detección, colocando el blot en una superficie de vidrio e incubando con 3-4 ml de *CDP-star* (Amersham)

durante 4 minutos. Se quitó el exceso de *CDP-star*, se envolvió la membrana en un film plástico y se expuso sobre film autorradiográfico a distintos tiempos.

Sonda *ycf3*: La reacción de PCR para el marcado de la sonda con digoxigenina se hizo sobre el ADNc de *ycf3* de la cebada control y las condiciones de ciclado fueron:

95 °C	1 minuto	} 30 ciclos
94 °C	4 minutos	
60 °C	2 minutos	
72 °C	2 minutos	
72 °C	10 minutos	

Sonda *atpF*: La reacción de PCR para el marcado de la sonda con digoxigenina se hizo sobre ADN total de la cebada control. Los oligonucleótidos que se usaron fueron: ATPFINS3: 5'-GTAAGATAGAGGATAGGCTCATTACTTATAC-3' y ATPFANT2: 5'-GACTTTTCTAATTGTTCCAACTAATAGAAGT-3' (Vogel *et al.* 1999).

Sonda *petB*: La reacción de PCR para el marcado de la sonda con digoxigenina se hizo sobre ADN total de la cebada control. Los oligonucleótidos que se usaron fueron: PETBINS3: 5'-GCTATCTTCAAGGCAAATCGACC-3' y PETBANT2: 5'-GCCTCGGTCATTATGTATTGAACC-3' (Vogel *et al.* 1999).

Las condiciones de ciclado para *atpF* y *petB* fueron:

94 °C	2 minutos	} 30 ciclos
94 °C	1 minuto	
60 °C	1 minuto	
72 °C	1 minuto	
72 °C	5 minutos	

IV.3.2.7 Métodos utilizados para el análisis del gen *ycf3*.

IV.3.2.7.1 PCR para amplificar el gen *ycf3*.

Para el gen *ycf3* del control y de la mutante LC3, se realizó la reacción en un volumen final de 20 µl. Se mezclaron 2 µl de 10x buffer Taq, 1,2 µl de 50 mM MgCl₂, 0,5 µl de 10 mM c/nucleótido de una mezcla de dNTPs, 0,5 µl de 10 µM oligonucleótido P1: 5'-TTATTCAAATTCAAAGCGCTTCGTA-3', 0,5 µl de 10 µM oligonucleótido P6: 5'-ATGCCTAGATCCCGTGTAATGGAA-3', 0,2 µl de 5 U/µl Taq

polimerasa Invitrogen y 20 ng de ADN. Los oligonucleótidos P1 y P6 se diseñaron en base a la secuencia del gen de trigo publicada en el GenBank (NC_002762).

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

95 °C	5 minutos	
94 °C	1 minuto	} 30 ciclos
60 °C	30 segundos	
72 °C	2 minutos	
72 °C	10 minutos	

IV.3.2.7.2 Secuenciación de *ycf3*.

Para secuenciar el gen *ycf3* entero (2 kb), se diseñaron los siguientes oligonucleótidos internos:

P0: 5'-CTAAGTTTCAAACCCTAATTTTTAT-3'

P2: 5'-TTTTTTTAGTTGTATCGACCCAGTCGC-3'

P3: 5'-GCCCGGAAATAATATTCCAAAGCCT-3'

P4: 5'-CACCAATGAATTCTATTAATGCTA-3'

La amplificación por PCR para secuenciación se realizó con una Taq polimerasa "proofreading", Taq Pfx de Invitrogen. La reacción se hizo en un volumen final de 50 µl con: 10 µl de 10x buffer, 1 µl de 50 mM MgSO₄, 1,6 µl de 10 µM oligonucleótido P1, 1,6 µl de 10 µM oligonucleótido P6, 1,6 µl de 10 mM cada nucleótido de una mezcla de dNTPs, 1 µl de 5 U/µl Taq Pfx, 20 ng de ADN.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

95 °C	5 minutos	
94 °C	15 segundos	} 30 ciclos
55 °C	30 segundos	
68 °C	1 minuto	

IV.3.2.7.3 Clonado del gen *ycf3*.

Los fragmentos amplificados por la Taq Pfx se corrieron en un gel de agarosa 0,8%, se aislaron y purificaron con el sistema *Gel extraction* de Qiagen. Luego se clonaron en el vector pCR4Blunt-TOPO siguiendo las indicaciones del *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing* de Invitrogen. Se transformó *E. coli* DH5α por electroporación con el vector y las suspensiones de bacterias en medios líquidos SOC (20 g/l bacto-triptona, 5 g/l bacto-extracto de levadura, 0,5 g/l NaCl, 20 mM glucosa) o LB (10 g/l bacto-triptona, 5 g/l bacto-extracto de levadura, 10 g/l NaCl) se mantuvieron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 1 hora y luego se

plaquearon 100 µl en placas de LB con ampicilina 100 µg/ml. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se seleccionaron alrededor de 10 colonias blancas y se comprobó por PCR la presencia del inserto picando directamente las colonias. De las colonias que tenían el inserto se purificaron los plásmidos a partir de cultivos crecidos durante la noche con el sistema de miniprep de Qiagen. Luego, estos plásmidos se mandaron a secuenciar. Se secuenciaron al menos 3 minipreps de cada genotipo y luego se sacó una secuencia consenso.

IV.3.2.7.4 RT-PCR sobre los transcritos del gen *ycf3*.

Se realizó como en la Sección III para el gen *infA* con la diferencia de que en este caso se utilizó en la reacción el oligonucleótido P1.

IV.3.2.7.5 Clonado de los ADNc de *ycf3* en la mutante LC3 y en el genotipo normal o salvaje MC182.

Los fragmentos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 0.8%, se cortaron del gel y se purificaron con el sistema *Gel extraction* de Qiagen. Luego, se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO del sistema *TOPO TA Cloning Kit* de Invitrogen. Se transformó *E. coli* TOP10 químicamente competente de Invitrogen con el vector y las suspensiones de bacterias con medios líquidos SOC o LB se mantuvieron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 1 hora y luego se plaquearon 100 µl de las mismas en placas de LB con 100 µg/ml ampicilina, y se esparció sobre ellas 100 µl de 100 mM IPTG y 20 µl de 50 mg/ml X-gal. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se seleccionaron alrededor de 10 colonias blancas y se comprobó por PCR la presencia del inserto picando directamente las colonias. De las colonias que tenían el inserto se purificaron los plásmidos a partir de cultivos crecidos durante la noche con el sistema de miniprep de Qiagen. Se mandaron a secuenciar al menos 3 minipreps de cada genotipo y luego se sacó una secuencia consenso.

IV.3.2.7.6 Puesta a punto de un anticuerpo contra la proteína Ycf3 de cebada.

Se encargó la producción de un anticuerpo policlonal contra la proteína Ycf3 de cebada a la empresa GenScript Corp. El antisuero se produjo en conejos a partir de un péptido sintético de 15 aminoácidos (EAMRLEIDPYDRSYC). Para determinar la dilución óptima de trabajo del anticuerpo para western blot se realizó un dot blot de la siguiente manera: se diluyó el péptido sintético en buffer TBS (20 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl) en una concentración final de 20 ng/µl. Se sembraron 50 µl por pocillo de 7 diluciones seriadas 1/5 del péptido partiendo de la concentración inicial de 20 ng/µl en una placa de 96 pocillos. Se probaron tanto el antisuero contra Ycf3

como el suero preimmune en las diluciones 1:8.000, 1:20.000 y 1:40.000, por replicado. El anticuerpo mostró una buena performance con las primeras dos diluciones. Las 3 diluciones fueron negativas frente al suero preimmune.

IV.3.2.8 Métodos utilizados para el análisis del gen *ycf4*.

IV.3.2.8.1 PCR para amplificar el gen *ycf4* para secuenciación.

Los oligonucleótidos para amplificar el gen *ycf4* (557 pb) de cebada se diseñaron en base a la secuencia del gen de trigo publicada en el GenBank (NC_002762) cuyas secuencias son:

ycf4 F: 5'-ATGAATTGGCGATCAGAACACATATGGG-3'

ycf4 R: 5'-TCAAATACTTCAATTGGTACGCGCAAG-3'

La amplificación por PCR para secuenciación se realizó con una Taq polimerasa "proofreading", Taq *Pfx* de Invitrogen. La reacción se hizo en un volumen final de 50 µl con: 10 µl de 10x buffer, 1 µl de 50 mM MgSO₄, 1,6 µl de 10 µM oligonucleótido *ycf4* F, 1,6 µl de 10 µM oligonucleótido *ycf4* R, 1,6 µl de 10 mM c/nucleótido de una mezcla de dNTPs, 1 µl de 5 U/µl Taq *Pfx*, 20 ng de ADN.

Las condiciones de ciclado fueron:

95 °C	5 minutos	} 30 ciclos
94 °C	15 segundos	
60 °C	30 segundos	
68 °C	1 minuto	

IV.3.2.8.2 Clonado del gen *ycf4*.

Los fragmentos amplificados por la Taq *Pfx* se corrieron en un gel de agarosa 0.8%, se aislaron y purificaron con el sistema *Gel extraction* de Qiagen. Luego se clonaron en el vector pCR4Blunt-TOPO siguiendo las indicaciones del *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing* de Invitrogen. Se transformó *E. coli* DH5α por electroporación con el vector y las suspensiones de bacterias en medios líquidos SOC o LB se mantuvieron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 1 hora y luego se plaquearon 100 µl en placas de LB con 100 µg/ml ampicilina. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se seleccionaron alrededor de 10 colonias blancas y se comprobó por PCR la presencia del inserto picando directamente las colonias. De las colonias que tenían el inserto se purificaron los plásmidos a partir de cultivos crecidos durante la noche con el sistema de miniprep de Qiagen. Se mandaron a secuenciar al menos 3 minipreps de cada genotipo y luego se sacó una secuencia consenso.

IV.3.2.8.3 Alineamiento de secuencias.

Se realizó como se detalla en la Sección III.

IV.3.2.9 Análisis de Microscopía electrónica.

Se cortaron pequeños segmentos de 2 mm de las láminas de la primera hoja y se fijaron durante la noche en glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato 0,1 M pH 7,2 a 4 °C. Luego, se fijaron en tetróxido de osmio 1% en agua durante 2 hs. a 4 °C. Las muestras fueron luego deshidratadas en concentraciones graduales de etanol y embebidas en resina de Spurr. Las secciones ultrafinas para microscopía electrónica fueron montadas en grillas, teñidas con citrato de plomo seguido de acetato de uranilo, y examinadas en un microscopio de transmisión electrónica Zeiss EM109T.

IV.4 RESULTADOS

IV.4.1 Observación del fenotipo de LC3 en diferentes condiciones de luz y temperatura.

La figura IV.1 muestra plántulas del control y de LC3 a los 6 días después de la germinación crecidas en dos temperaturas diferentes. Se consideró como temperatura normal de crecimiento de la cebada 18 °C y como temperatura alta 32 °C. Los ambientes lumínicos consistieron en una combinación de luz fluorescente e incandescente o sólo luz fluorescente a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica en ambas cámaras. Como se ve en la figura IV.1, el fenotipo *viridis* de LC3 fue más pronunciado a 32 °C en ambos ambientes lumínicos, mostrando el mayor daño cuando las plántulas crecieron a 32 °C bajo sólo luz fluorescente.

IV.4.2 Determinación del porcentaje de agua en tejido fresco.

Este experimento se realizó con el objeto de hacer una estimación del daño por alta temperatura en la mutante. Se utilizaron para ello las láminas de la primera hoja del control y de la mutante LC3, a los 3, 6, y 9 días después de la germinación a una temperatura constante de 32 °C en una cámara Conviron. En este experimento se incluyeron progenies de la generación F₂ provenientes de cruzamientos recíprocos, es decir, control x LC3 (el control como madre) y LC3 x control (LC3 como madre). El daño de la alta temperatura sobre las plántulas de citoplasma LC3 se manifestó por una rápida disminución del contenido de agua a partir del 6^{to} día después de la germinación, mientras que en el control los valores se mantuvieron constantes (Fig. IV.4).

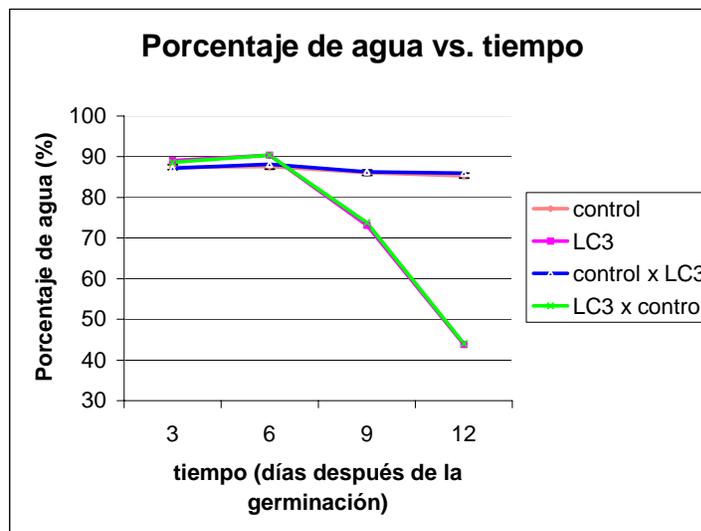


Figura IV.4 Porcentaje de agua en función del tiempo en plántulas del control, LC3, y las F₂ de los cruzamientos recíprocos control x LC3 y LC3 x control crecidas a 32 °C de temperatura constante.

IV.4.3 Análisis de pigmentos clorofílicos.

El fenotipo LC3 se observa a simple vista como una mutante *viridis* o verde claro homogéneo, sin embargo, se cuantificaron los pigmentos clorofílicos para tener datos más precisos sobre la deficiencia clorofílica manifestada por la mutante.

IV.4.3.1 Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría.

Las determinaciones de clorofila a (Ca), clorofila b (Cb) y carotenoides se hicieron originalmente por espectrofotometría (ver Materiales y Métodos). Se extrajeron pigmentos de la lámina de la primera hoja, del control y de LC3, a los 3, 6, y 9 días después de la germinación de plántulas crecidas a una temperatura constante de 18 °C o de 32 °C en una cámara Conviron y también se incluyeron progenies de la generación F₂ provenientes de cruzamientos recíprocos.

A 18 °C se observó en LC3 un contenido inicial de Ca menor que en el control (Fig. IV.5). El contenido de Ca disminuyó con el tiempo para ambos genotipos, LC3 y el control. Sin embargo, el contenido de Cb no varió significativamente con la edad de las plántulas tanto en el control como en LC3. El contenido de Cb en LC3 fue ligeramente menor que el del control en todos los estadios de las plántulas. Los valores de carotenoides fueron semejantes a los del control. (Fig. IV.5).

A 32 °C durante el período de 3 a 6 días después de la germinación se observó un incremento de Ca y Cb en plántulas del control, pero se observó una progresiva disminución del contenido de ambas clorofilas en plántulas de LC3 (Fig. IV.6). Los carotenoides se mantuvieron relativamente constantes en ambos genotipos (Fig. IV.6).

En la figura IV.7 se observa la concentración de pigmentos en plántulas de la generación F₂ provenientes de los cruzamientos recíprocos, control x LC3 (el control como madre) y LC3 x control (LC3 como madre) crecidas a 32 °C. Allí puede observarse un resultado muy similar al de la figura IV.6.

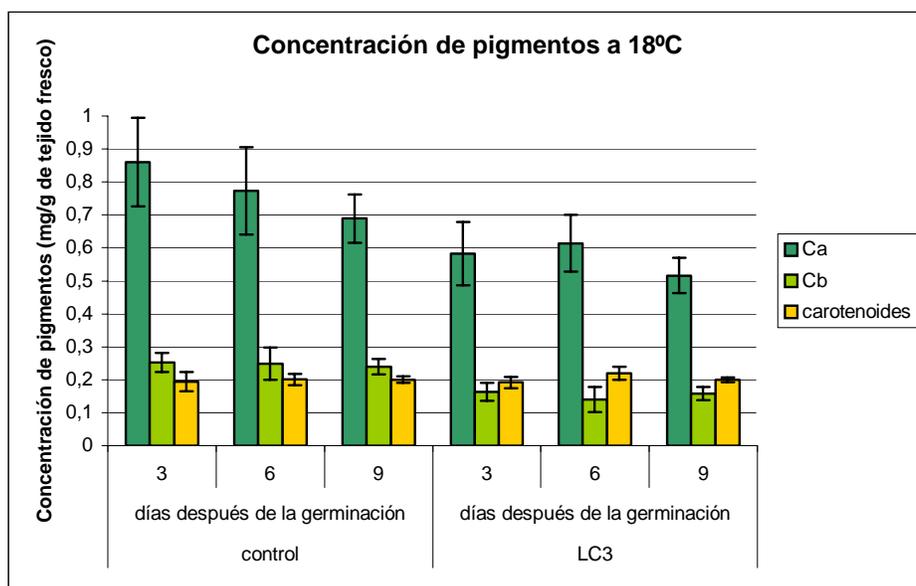


Figura IV.5 Concentración de Ca, Cb y carotenoides obtenidos por espectrofotometría, de plántulas del control y LC3 de 3, 6 y 9 días después de la germinación, crecidas a 18 °C de temperatura constante.

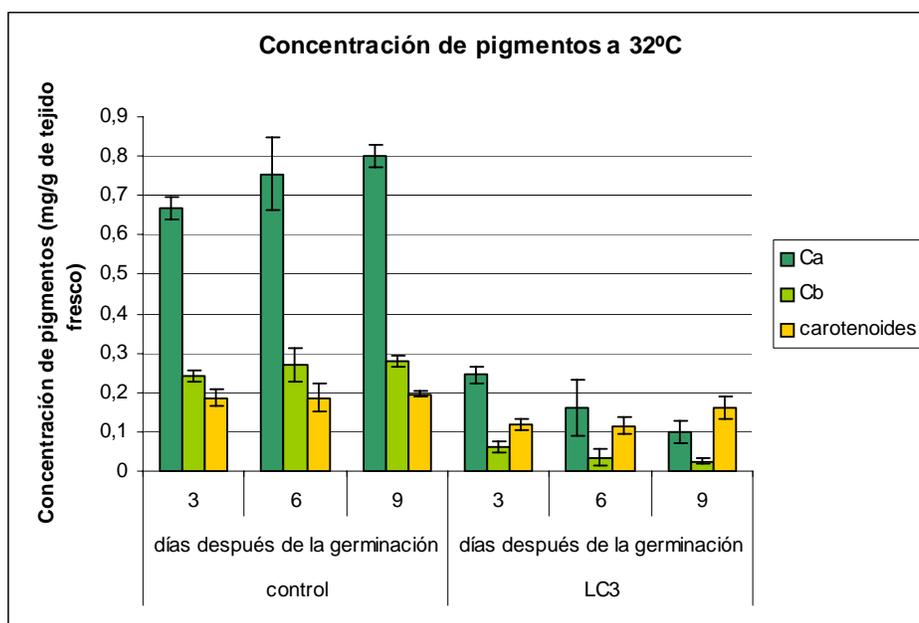


Figura IV.6 Concentración de Ca, Cb y carotenoides obtenidos por espectrofotometría, de plántulas del control y LC3 de 3, 6 y 9 días después de la germinación, crecidas a 32 °C de temperatura constante.

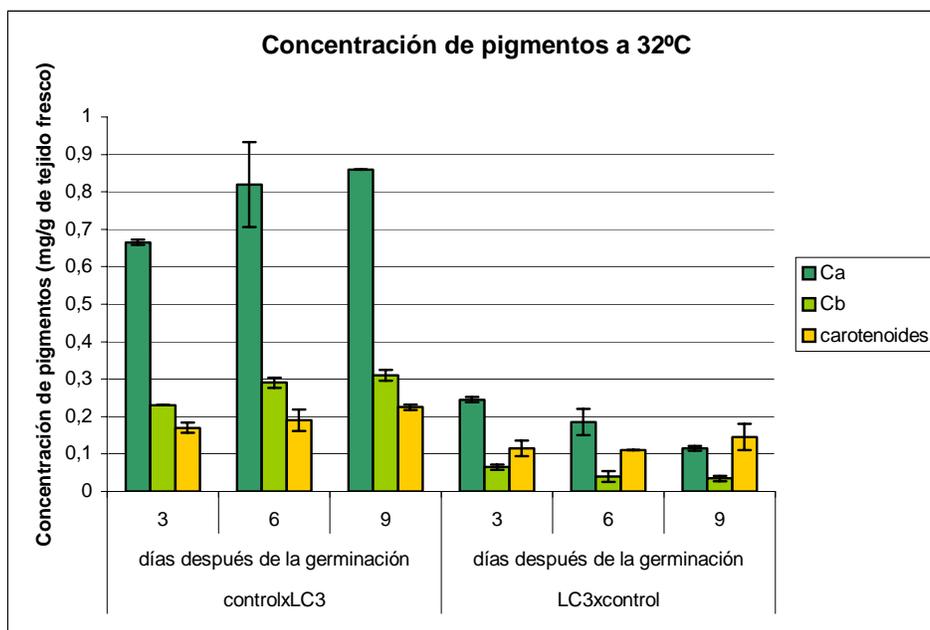


Figura IV.7 Concentración de Ca, Cb y carotenoides obtenidos por espectrofotometría, de plántulas de los recíprocos control x LC3 y LC3 x control de 3, 6 y 9 días después de la germinación, crecidas a 32 °C de temperatura constante.

IV.4.3.2 Cuantificación de pigmentos por HPLC.

Este análisis se realizó en colaboración con el Dr. Heiko Lokstein del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Humboldt, Berlín, Alemania.

Además de Ca y Cb, se pudieron determinar carotenoides incluyendo a las xantinas: neoxantina, luteína, violaxantina, anteraxantina y zeaxantina. Estas tres últimas (V+A+Z) pertenecen a lo que se conoce como el ciclo de las xantofilas, que actúa como protector del aparato fotosintético frente al exceso de luz, es decir, es otro mecanismo de disipación de la energía con el que cuentan las plantas superiores. Cuando hay un exceso de luz la violaxantina es convertida primero en anteraxantina y luego en zeaxantina (Fig. IV.8). Esta reacción se revierte en condiciones de baja luz (Demmig-Adams y Adams, 1996). La determinación de estas xantinas da idea a cerca del estado de estrés en que puede encontrarse una planta.

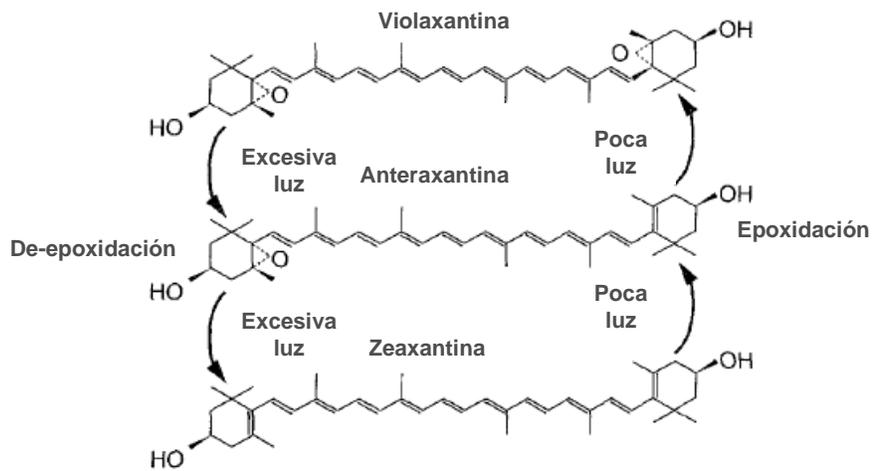


Figura IV.8 Esquema del ciclo de las xantofilas y su regulación por la cantidad de luz.
 Adaptado de Demmig-Adams y Adams, 1996

El contenido de pigmentos de hojas de la mutante LC3 y el control crecidos a 18 °C y 32 °C se muestra en la Tabla IV.1. El contenido de clorofila total (Ca+b) se vio apenas reducido en hojas del control a 32 °C y en la mutante LC3 crecida a 18 °C comparados con el control a 18 °C, pero en la mutante a 32 °C fue considerablemente reducido. Se observó además un incremento de la relación Ca/b en LC3 a 32 °C en comparación con el control a ambas temperaturas y con LC3 a 18 °C.

El contenido de pigmentos del ciclo de las xantofilas (V+A+Z) se encontró aumentado en relación a la Ca en el orden: control a 18 °C < control a 32 °C < LC3 a 18 °C < LC3 a 32 °C, este último conteniendo aproximadamente el doble de V+A+Z del control a 18 °C en relación a la Ca. Mientras que en el control a ambas temperaturas el contenido de A fue menor al 10% y no se encontró Z, en LC3 a 18 °C el contenido de A aumentó aunque no se detectó Z. Además, en LC3 a 32 °C más del 50% del pool total del ciclo de las xantofilas se encontró como A+Z.

La mutante a 32 °C mostró una marcada disminución de β-caroteno, neoxantina y luteína. Estas últimas xantofilas se encuentran generalmente unidas a los LHCs, aunque también pueden encontrarse como pigmentos libres.

Tabla IV.1 Contenido de pigmentos de la cebada control y la mutante LC3 a los 8 días después de la germinación crecidas a 18 °C y 32 °C en una cámara Conviron a 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

	Ca+ b ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Ca/ b	VAZ/Ca	Z+0.5A/VAZ	neoxantina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	luteína ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	β -caroteno ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Control 18 °C	50,0	2,8	0,06	0,03	1,4	3,6	2,3
LC3 18 °C	42,8	2,9	0,11	0,07	1,4	3,5	1,9
Control 32 °C	35,6	3,0	0,07	0,03	1,0	3,2	1,7
LC3 32 °C	10,3	4,0	0,13	0,45	0,3	1,8	0,3

IV.4.4 Mediciones de fluorescencia de la clorofila.

Estos análisis se realizaron en colaboración con el Dr. Heiko Lokstein del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Humboldt, Berlín, Alemania.

La fluorescencia de la clorofila se utiliza como herramienta de diagnóstico de la estructura y función del aparato fotosintético. En circunstancias normales hasta el 3% de la luz absorbida por las moléculas de clorofila se re-emite como fluorescencia. A temperatura ambiente la mayor parte de la fluorescencia es emitida por la clorofila a (Wilson *et al.*, 2006).

Para determinar si la deficiencia clorofílica de LC3 era un defecto general, por ejemplo relacionado a la síntesis de pigmentos o a defectos en proteínas específicas que contienen clorofila, se midieron espectros de emisión de fluorescencia a 77 K y a temperatura ambiente, de plántulas crecidas a 18 °C y 32 °C de temperatura constante.

IV.4.4.1 Espectros de emisión de fluorescencia a 77 K.

En este caso las mediciones se realizaron sobre suspensiones de tilacoides de plántulas del control y de la mutante LC3 crecidas a 18 °C o a 32 °C de temperatura constante. En los espectros de emisión de fluorescencia a 77 K (Fig. IV.9) se observaron tres características principales: Una banda de fluorescencia que tuvo su pico máximo cerca de los 685 nm, que corresponde a la emisión del complejo antena CP43 del PSII y del LHCI. Otro pico menos pronunciado con un máximo a 695 nm que corresponde a las emisiones combinadas del centro de reacción del PSII y del complejo antena CP47. Y el pico más pronunciado de las tilacoides del control se observó cerca de los 735 nm, que corresponde a la emisión del PSI. Cuando los espectros de emisión de fluorescencia a 77 K se normalizaron a 685 nm, se observó en LC3 una considerable disminución de la longitud de onda del pico correspondiente al PSI con relación al correspondiente al PSII, siendo este

efecto más pronunciado en las plántulas crecidas a 32 °C que en las crecidas a 18 °C. Además se observó un corrimiento de 5 nm hacia el azul de la longitud de onda del pico correspondiente al PSI hacia los 730 nm aproximadamente.

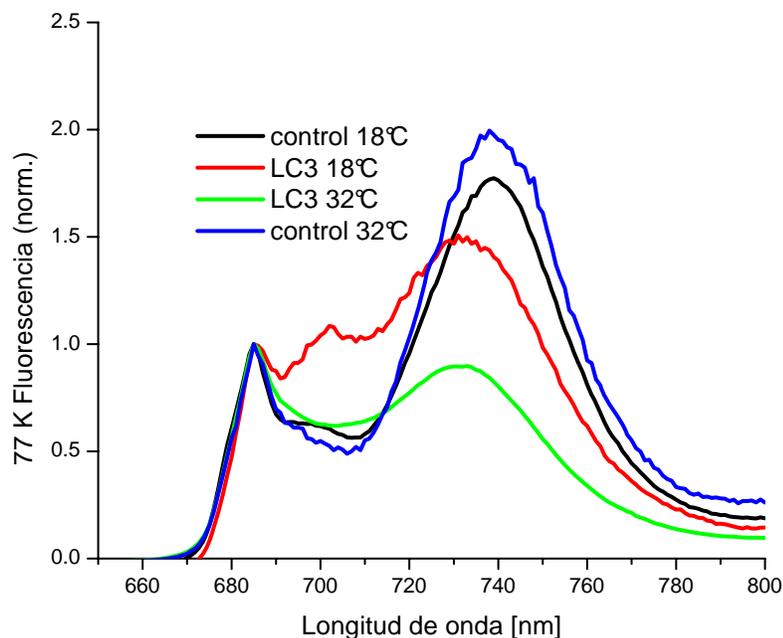


Figura IV.9 Espectro de emisión de fluorescencia a 77 K de tilacoides provenientes de plántulas del control y LC3 crecidas a 18 °C y a 32 °C.

IV.4.4.2 Espectros de emisión de fluorescencia a temperatura ambiente.

Para investigar el efecto en el espectro de emisión de fluorescencia a 77 K y para determinar cómo la deficiencia de PSI podría afectar a la eficiencia fotosintética y al transporte de electrones, se analizó la fluorescencia a temperatura ambiente, en hojas de plántulas del control y de la mutante LC3 crecidas a 18 °C o a 32 °C de temperatura constante. En la figura IV.10 se muestran como ejemplos los espectros de fluorescencia de la clorofila en función del tiempo a una luz actínica de $40 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Además de estas condiciones de luz actínica se realizaron mediciones a 10, 15, 20, 25 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Puede observarse en el panel D de la figura IV.10 como se afecta el patrón de fluorescencia en plántulas LC3 crecidas a 32 °C en comparación con los otros casos.

El parámetro F_v/F_m (en donde F_v significa fluorescencia variable y F_m , fluorescencia máxima) es una estima de la máxima eficiencia fotoquímica del PSII y su disminución es indicativa de daño por fotoinhibición. Los valores de F_v/F_m para una gran variedad de plantas no estresadas adaptadas a la oscuridad es de 0,75-0,85 (Azcón-Bieto *et al.*, 2000).

Los valores de F_v/F_m para el control y la mutante crecidas a 18 °C fueron de 0,812 y 0,755 respectivamente. Cuando las plántulas del control crecieron a 32 °C, el F_v/F_m disminuyó levemente a 0,777, pero en la mutante LC3 se redujo drásticamente a 0,361, indicando una falla seria del PSII.

Cuando la energía absorbida por el PSII excede a la que puede ser usada para el transporte fotoquímico de electrones, el exceso de energía puede disiparse en forma de calor a través del "quenching" no fotoquímico (NPQ). Si la capacidad fotoquímica y no fotoquímica está excedida, los centros de reacción del PSII se dañan y esto lleva a la fotoinhibición (Wilson *et al.*, 2006).

La respuesta del "quenching" fotoquímico (cuantificado como qP) en función de la intensidad de la luz actínica (AL) para las plantas de ambos genotipos crecidas a diferentes temperaturas se muestra en la Fig. IV.11A. El control y la mutante respondieron de manera radicalmente diferencial a los aumentos de intensidad de AL: Las plántulas del control mostraron una disminución gradual del qP en función de la AL a ambas temperaturas casi idéntica. En cambio, las plántulas de LC3 crecidas a 18 °C mostraron una gran disminución del qP ya a intensidades de AL moderadas. Y las plántulas de LC3 crecidas a 32 °C mostraron no tener quenching fotoquímico, es decir, no mostraron actividad fotosintética.

El desarrollo del NPQ en plántulas del control y de la mutante crecidas a diferentes temperaturas en función de la AL se muestra en la Fig. IV.11B. El mayor incremento en el NPQ con la intensidad de AL se observó en plántulas control crecidas a 18 °C, mientras que un incremento menor se observó en plántulas control crecidas a 32 °C y en plántulas de LC3 crecidas a 18 °C. Las plántulas de LC3 crecidas a 32 °C sin embargo, mostraron una capacidad altamente disminuida para desarrollar NPQ.

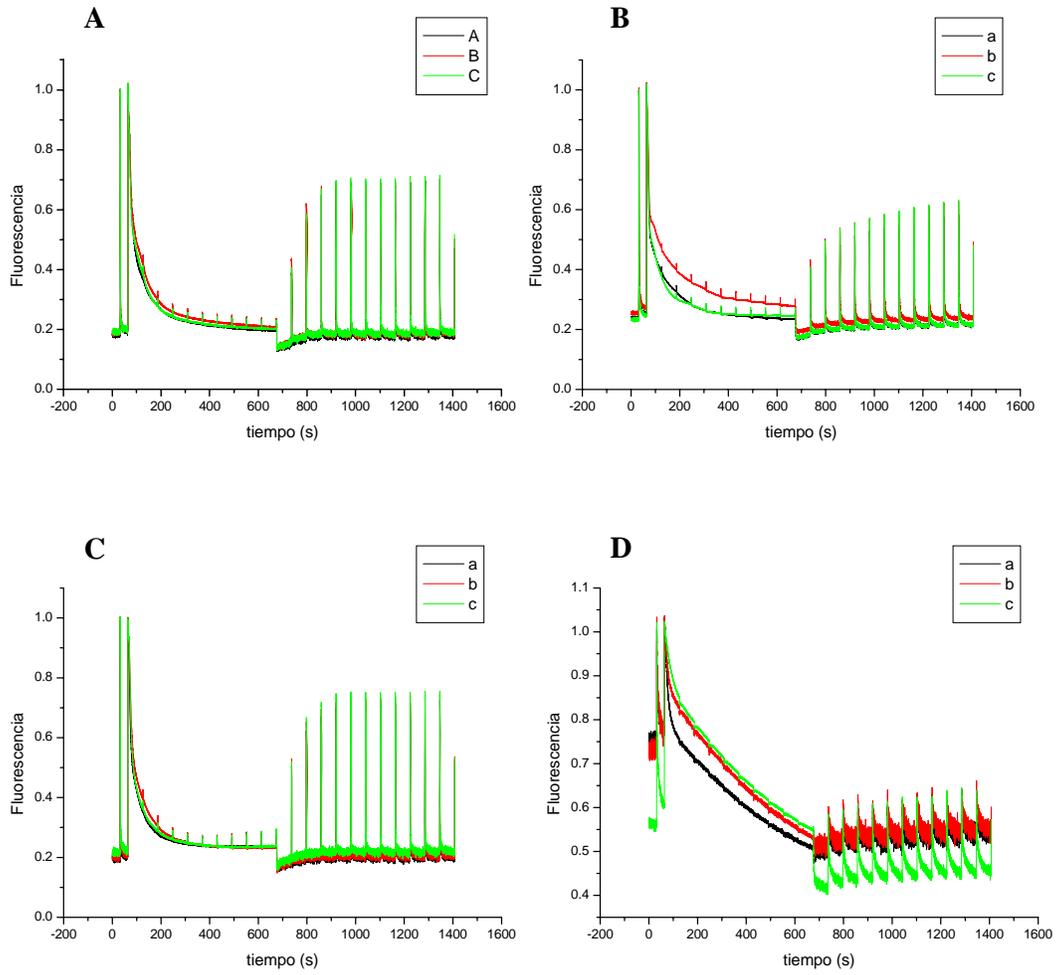


Figura IV.10 Gráficos de la fluorescencia de la clorofila vs. tiempo a $40 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz actínica. A: plántulas de la cebada control a 18 °C; B: plántulas de LC3 a 18 °C; C: plántulas de la cebada control a 32 °C; D: plántulas de LC3 a 32 °C. Referencias: a, b y c son triplicados.

A

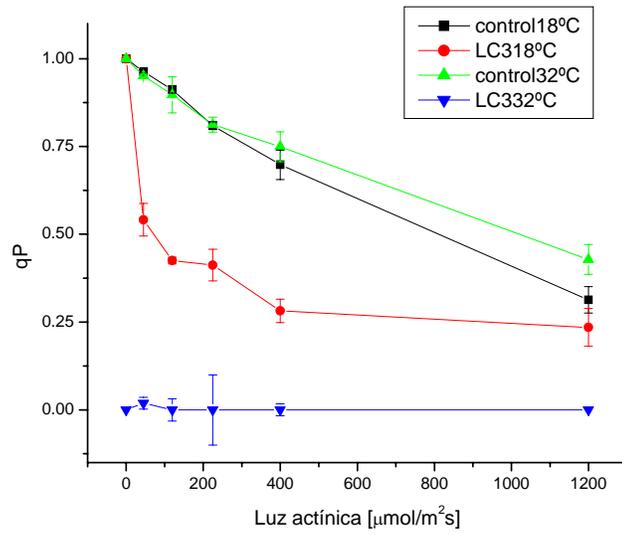
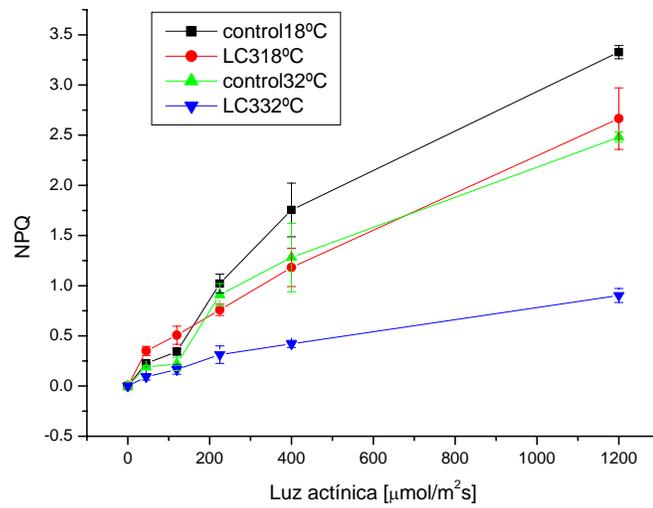


Figura IV.11 A: qP (quenching fotoquímico) y B: NPQ (quenching no fotoquímico) en función de la intensidad de luz actínica de plántulas del control y de LC3 crecidas a 18 °C y a 32 °C.

B



IV.4.5 Microscopía electrónica.

Esta técnica se realizó en colaboración con la Lic. Verónica Láinez del Laboratorio de Embriología Vegetal DBGE, FCEN, UBA, con el objeto de observar las características estructurales y ultraestructurales del cloroplasto de LC3. Los cortes para microscopía se realizaron sobre plántulas de 6 días después de la germinación crecidas en las siguientes condiciones de luz y temperatura:

- 1) 18 °C de temperatura constante en una cámara Sanyo (sólo luz fluorescente) 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- 2) 32 °C de temperatura constante en una cámara Sanyo (sólo luz fluorescente) 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- 3) 18 °C de temperatura constante en una cámara Conviron (mezcla de luz fluorescente e incandescente) 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- 4) 32 °C de temperatura constante en una cámara Conviron (mezcla de luz fluorescente e incandescente) 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
- 5) 18 °C de temperatura constante en una cámara con sólo 2 lámparas incandescentes 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En plántulas que crecieron en la condición 1, en LC3, se observaron numerosos cloroplastos con importantes alteraciones en su estructura: la grana apareció desorganizada, y numerosas vesículas ocuparon toda la superficie del cloroplasto o en muchos casos sólo un sector del mismo, en general zonas periféricas (Fig. IV.12C).

En la condición 2 todos los cloroplastos LC3 desarrollaron características anormales: de forma irregular o esférica en muchos casos, con pequeñas formaciones de grana dispuestas en forma discreta y desorganizada en toda la superficie del cloroplasto. Abundantes plastoglóbulos agrupados y numerosas vesículas ocuparon la mayor parte de la superficie del cloroplasto y no se observaron tilacoides estromáticos. (Fig. IV.12A).

En la condición 3 los cloroplastos de LC3 mostraron características similares a las del tratamiento a 18°C en la cámara Sanyo, aunque un mayor número mostró características propias de un cloroplasto normal con un importante desarrollo del sistema de endomembranas. No se observó, sin embargo, en ningún caso la presencia de gránulos de almidón. En algunos cloroplastos, vesículas dispuestas en sectores periféricos, acompañaban el desarrollo de las membranas (Fig. IV.13C). Algunos cloroplastos mostraban vesículas ocupando toda su superficie.

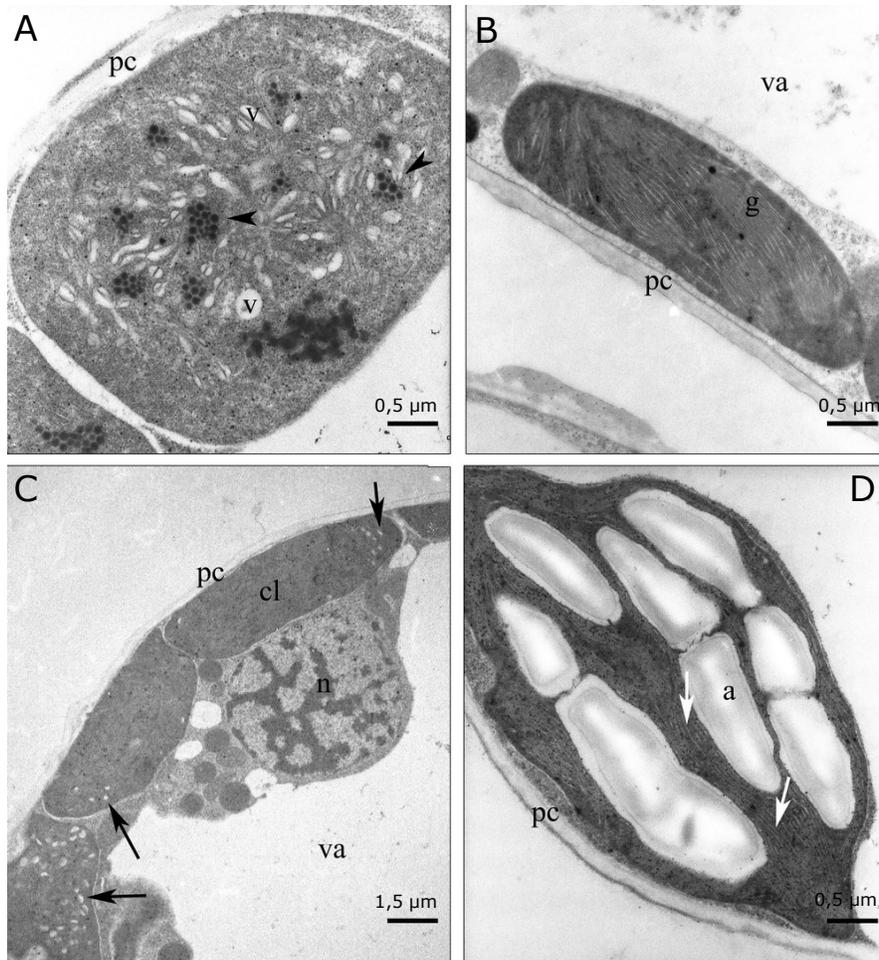


Figura IV.12 Fotografías de TEM de LC3 y la cebada control crecidas en la cámara Sanyo (sólo luz fluorescente) a 32 °C, A y B, respectivamente; y a 18 °C, C y D, respectivamente. pc: pared celular; v: vesícula; g: grana; va: vacuola; cl: cloroplasto; n: núcleo; a: almidón. Las puntas de flecha negra señalan los plastoglóbulos. Las flechas negras señalan las vesículas y las flechas blancas señalan la grana.

En la condición 4 los cloroplastos de LC3 se mostraron compactos, poco elongados, con el estroma muy denso. Las membranas tilacoides aparecieron totalmente desorganizadas mostrando sólo algunas formaciones discretas de grana. Se observaron plastoglóbulos dispuestos en grupos y algunas vesículas (Fig. IV.13A).

En todos los tratamientos, los cloroplastos de la cebada control mostraron la típica forma elongada, con desarrollo del sistema de endomembranas y la presencia de gránulos de almidón (Fig. IV.13B y D; fig. IV.12D).

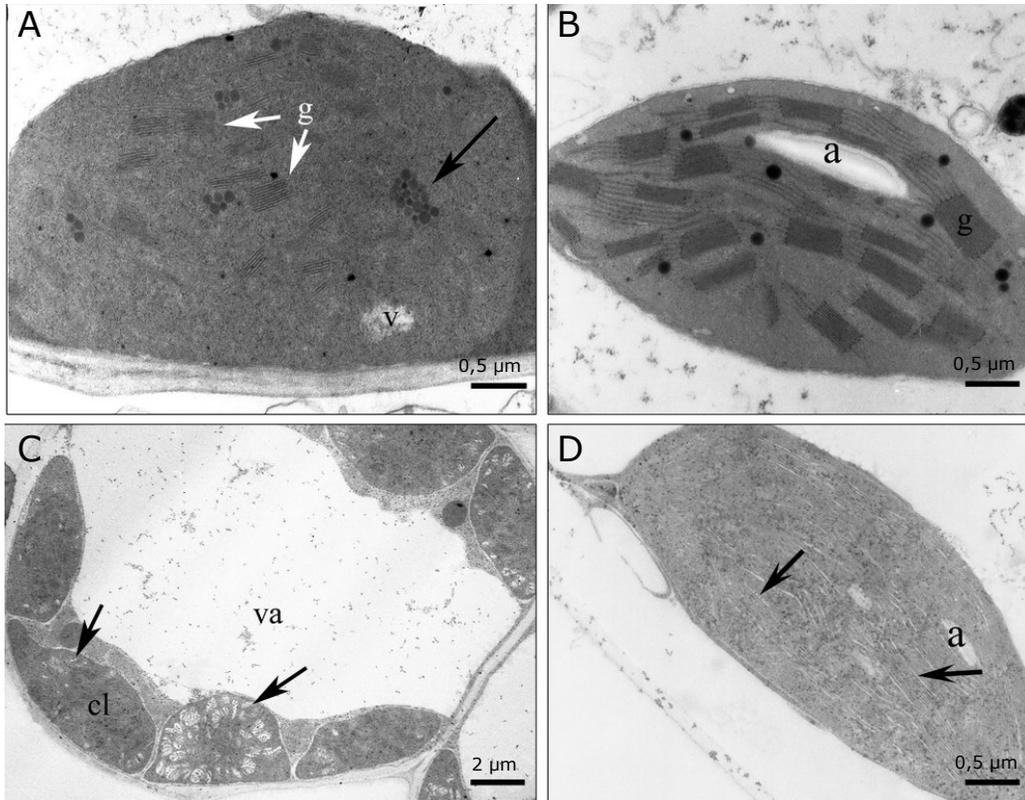


Figura IV.13 Fotografías de TEM de LC3 y la cebada control crecidas en la cámara Conviron (mezcla de luz fluorescente e incandescente) a 32 °C, A y B, respectivamente; y a 18 °C, C y D, respectivamente. g: grana; a: almidón; v: vesículas; cl: cloroplastos; va: vacuola. La flecha negra señala plastoglóbulos.

A diferencia de las condiciones anteriores, en la condición 5, tanto en el control como en LC3 los cloroplastos mostraron mayor desarrollo de endomembranas (Fig. IV.14A y C). En LC3 se observó la formación de grana en apilamientos más altos (Fig. IV.14B) que en los cloroplastos del control (Fig. IV.14D) y un menor desarrollo de tilacoides estrómáticos. Se observaron numerosas vesículas, en su mayor parte, asociadas a tilacoides estromáticos (inserción, fig. IV.14A).

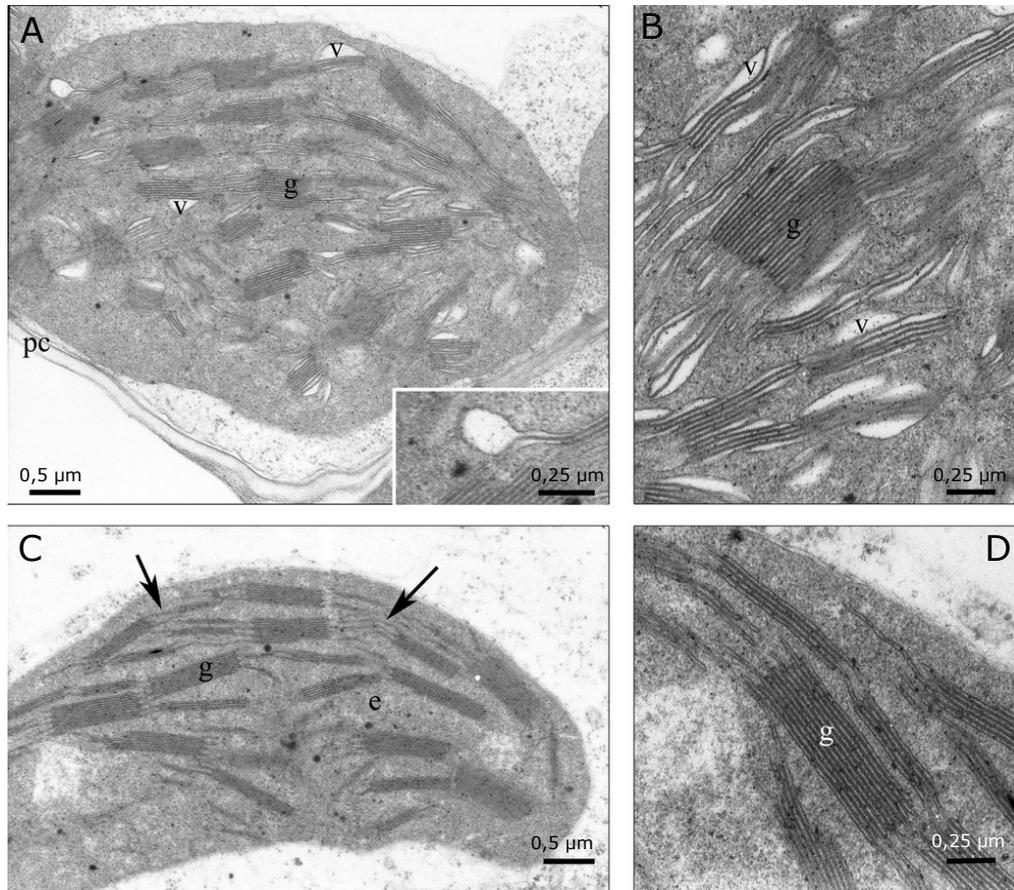


Figura IV.14 Fotografías de TEM de LC3 y la cebada control crecidas en una cámara con sólo dos lamparitas y poca luz a 18 °C. A, cloroplasto de LC3 con detalle de vesícula estromática; B, detalle de las tilacoides del cloroplasto de LC3; C, cloroplasto del control y D, detalle de las tilacoides del cloroplasto del control. g: grana; v: vesícula; e: estroma. Las flechas señalan las tilacoides estromáticas.

IV.4.6 Análisis de proteínas tilacoideas.

Los análisis de proteínas de las tilacoideas se realizaron con el objeto de detectar diferencias entre LC3 y el control que dieran indicios de posibles genes afectados en la mutante. Para ello se aislaron las tilacoideas de ambos genotipos crecidos en diferentes condiciones de luz y temperatura, se solubilizaron las proteínas y se corrieron en minigeles de SDS-PAGE en base a la cantidad de clorofila contenida en las muestras. Luego se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa con el objeto de practicar Western blots con antisueros contra componentes de los distintos complejos proteicos de las tilacoideas.

IV.4.6.1 Proteínas del PSII.

A los 3, 6 y 9 días después de la germinación se extrajeron las tilacoideas de plántulas crecidas a 18 °C o a 32 °C de temperatura constante y a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica.

Se corrieron cantidades iguales de clorofila en minigeles de SDS-PAGE que se hicieron por duplicado. Un gel fue teñido con Coomassie blue y el otro fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. Sobre estas membranas se realizaron Western blots con distintos anticuerpos primarios. En el caso de las proteínas D1 (PSII, codificada por el cloroplasto) y LHCI (Light Harvesting Complex I, codificadas por el núcleo), las plántulas fueron crecidas en dos cámaras de cría: una Conviron que tiene una mezcla de luz fluorescente e incandescente, y una Sanyo, que tiene sólo luz fluorescente. En el Western blot contra estas proteínas de plántulas que provenían del primer ambiente, luz mixta, no se observaron diferencias entre la mutante y el control a ambas temperaturas. Sin embargo, en el segundo ambiente, sólo luz fluorescente, se observó la disminución de estas proteínas en LC3 a 32 °C (Fig. IV.15). Este mismo resultado se observó con la proteína D1 en plántulas de la generación F_2 provenientes de los cruzamientos recíprocos, control x LC3 (el control como madre) y LC3 x control (LC3 como madre), crecidas a 32 °C con luz únicamente fluorescente (Fig. IV.16). Los geles teñidos con Coomassie blue réplica de estos Western blots mostraron un patrón de proteínas tilacoideas alterado en LC3 respecto del control. A los 9 días el patrón de plántulas de citoplasma LC3 se deformó completamente y disminuyó la intensidad de las bandas (Fig. IV.17).

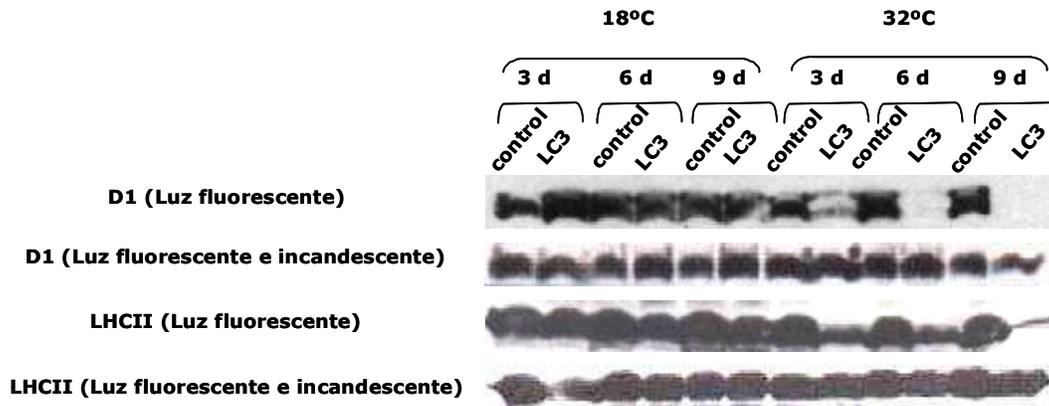


Figura IV.15 Western blots de extractos de proteínas de tilacoides del control y LC3 con antisueros contra D1 y LHCII. Se sembraron cantidades iguales de clorofila (1 μg) por calle. Los homogenatos de tilacoides fueron extraídos de plántulas de 3, 6 y 9 días después de la germinación crecidas a 18 °C o a 32 °C bajo dos ambientes lumínicos diferentes a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

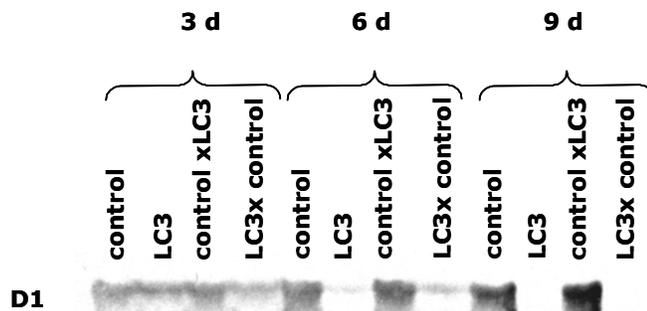


Figura IV.16 Western blots de extractos de proteínas de tilacoides del control, LC3, control x LC3 y LC3 x control con antisuero contra D1. Se sembraron cantidades iguales de clorofila (1 μg) por calle. Los homogenatos de tilacoides fueron extraídos de plántulas de 3, 6 y 9 días después de la germinación crecidas a 32 °C bajo sólo luz fluorescente a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

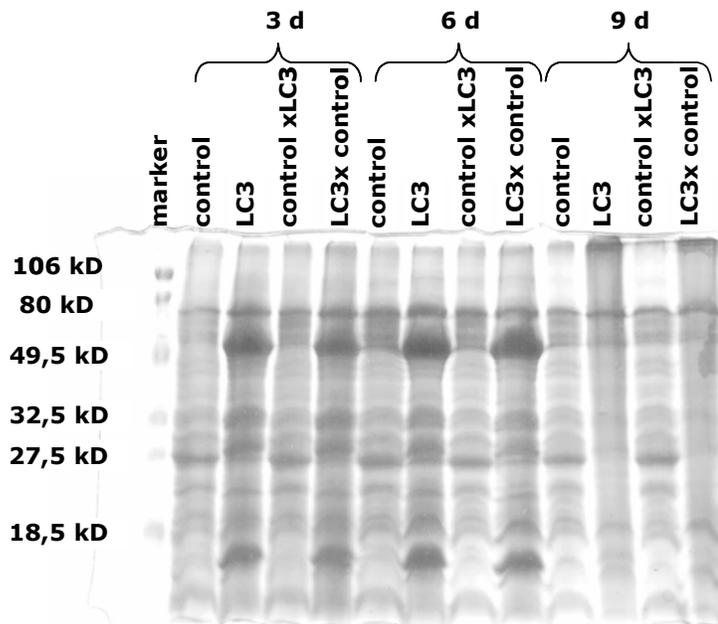


Figura IV.17 SDS-PAGE correspondiente al western blot de la fig. IV.19

IV.4.6.2 Proteínas del complejo ATP sintasa.

El Western blot contra la subunidad β , no mostró diferencias entre el control y la mutante a ambas temperaturas en plántulas crecidas en la cámara Sanyo (Fig. IV.18).

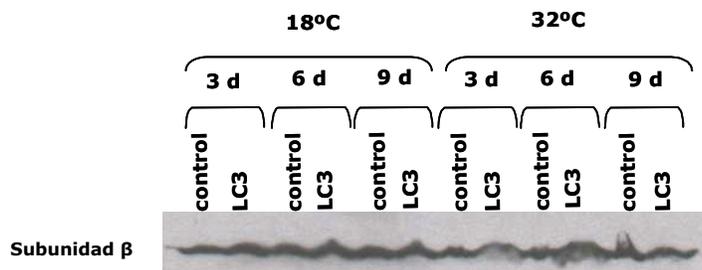


Figura IV.18 Western blot de extractos de proteínas de tilacoides del control y LC3 con antisuero contra la subunidad β de la ATPasa. Se sembraron cantidades iguales de clorofila (1 μg) por calle. Los homogenatos de tilacoides fueron extraídos de plántulas de 3, 6 y 9 días después de la germinación crecidas a 18 °C o a 32 °C bajo sólo luz fluorescente a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

IV.4.6.3 Proteínas del PSI.

En este caso, las plántulas crecieron en la cámara Conviron (luz mixta). Se extrajeron tilacoides de plántulas crecidas a 18 °C y a 32 °C de temperatura constante a los 3, 6 y 9 días después de la germinación a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica. Se sembraron geles de SDS-PAGE sobre la base de cantidades iguales de clorofila.

Cuando se realizaron western blots con un antisuero contra el PSI que reconoce PSI-A/B (cloroplásticas), PSI-D, PSI-E, PSI-L, PSI-H (nucleares) y PSI-C (cloroplástica), las diferencias que se encontraron entre LC3 y el control fueron las siguientes: Se observó que PSI-D apareció en la mutante como una banda débil en el día 3 después de la germinación pero luego fue aumentando hasta alcanzar niveles similares al control en el día 9 a 18 °C mientras que a 32 °C fue casi indetectable. PSI-C y PSI-E no fueron detectables en LC3 a ambas temperaturas comparado con el control (Fig. IV.19). También se notó la ausencia de PSI-F a ambas temperaturas (Fig. IV.20).

Haciendo diluciones a partir de 1 μg de clorofila de tilacoides aisladas de plántulas crecidas a 18 °C a los 3 días después de la germinación, se pudo observar que en LC3 la cantidad de PSI-A/B y PSI-D correspondió a aproximadamente 1/4-1/8 μg del control. Pero en el caso de PSI-E y PSI-C, la cantidad en 1 μg de clorofila de LC3 fue mucho menos de 1/16 del control (Fig. IV.21).

Sin embargo, cuando plántulas del control y de la mutante fueron crecidas en condiciones de baja intensidad lumínica, suministrada por sólo dos lamparitas

incandescentes ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) PSI-D, PSI-C y PSI-E aparecieron en los mismos niveles que en el control (Fig. IV.22).

En los Western blots realizados con anticuerpos contra Lhca1, Lhca3, Lhca4 (LHCI) y Lhcb1 y Lhcb2 (LHCII) no se observaron grandes diferencias entre LC3 y el control (Fig. IV.23).

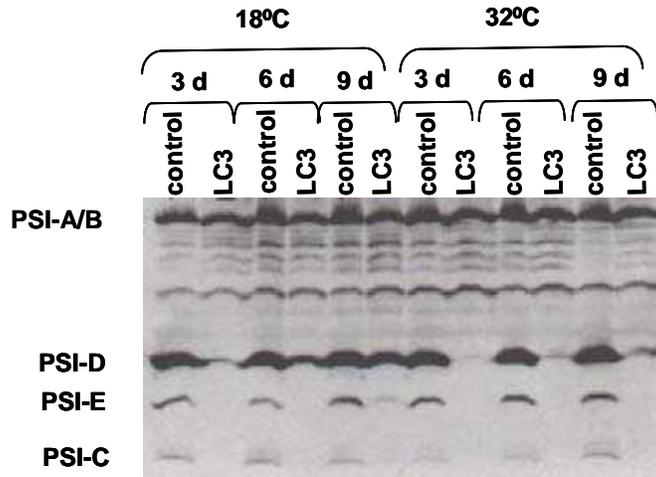


Figura IV.19 Western blot de extractos de proteínas de tilacoides del control y LC3 con antisuero contra PSI. Se sembraron cantidades iguales de clorofila ($1 \mu\text{g}$) por calle. Los homogenatos de tilacoides fueron extraídos de plántulas de 3, 6 y 9 días después de la germinación crecidas a 18°C o a 32°C bajo una mezcla de luz fluorescente e incandescente a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A la izquierda se detallan los péptidos reconocidos.

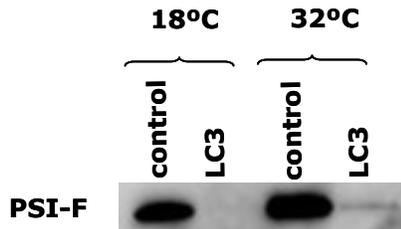


Figura IV.20 Western blot de extractos de proteínas de tilacoides del control y LC3 con antisuero contra PSI-F. Se sembraron cantidades iguales de clorofila ($1 \mu\text{g}$) por calle. Los homogenatos de tilacoides fueron extraídos de plántulas de 5 días crecidas a 18°C y a 32°C bajo una mezcla de luz fluorescente e incandescente a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

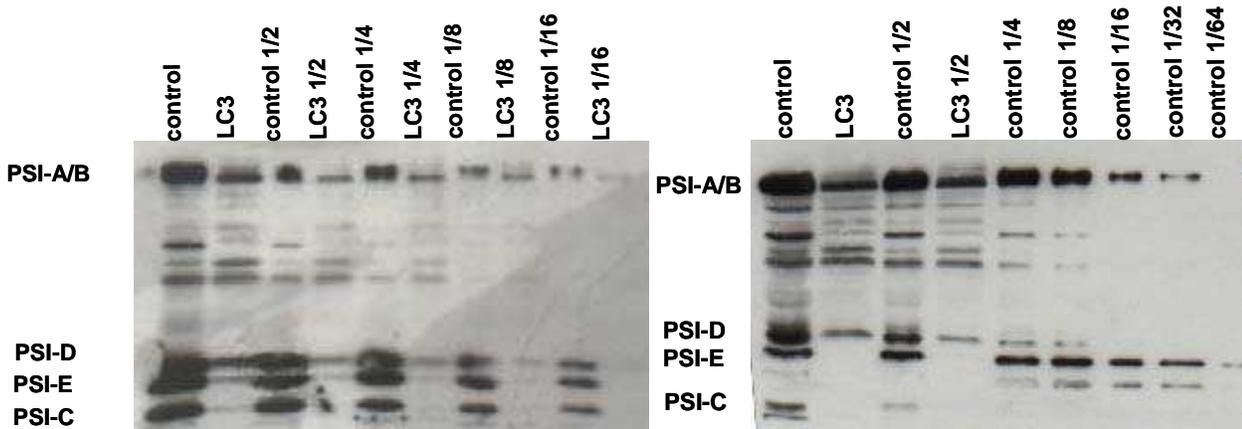


Figura IV.21 Western blot de diluciones de extractos de proteínas de tilacoides del control y LC3 con antisuero contra PSI. Las calles 1 y 2 se sembraron con $1 \mu\text{g}$ de clorofila de proteínas tilacoides del control y LC3, y sucesivas diluciones al medio de ambas muestras (izq.) o del control (der.). Las plántulas tenían 3 días después de la germinación a 18°C ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

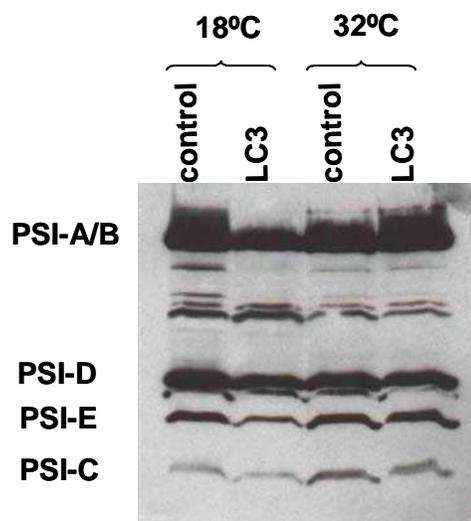


Figura IV.22 Western blot de extractos de proteínas de tilacoides del control y LC3 crecidas a baja intensidad de luz con antisuero contra PSI. Se sembraron cantidades iguales de clorofila (1,5 μg) por calle. Los homogenatos de tilacoides fueron extraídos de plántulas de 9 días después de la germinación a 18 °C y a 32° bajo luz unicamente incandescente ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

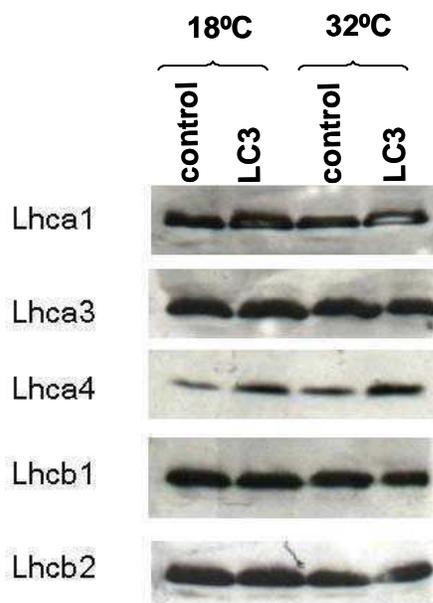


Figura IV.23 Western blot de extractos de proteínas de tilacoides del control y LC3 con antisueros contra componentes del LHCI y LHCII. Se sembraron cantidades iguales de clorofila (1 μg) por calle. Los homogenatos de tilacoides fueron extraídos de plántulas de 5 días después de la germinación a 18 °C y a 32° bajo una mezcla de luz fluorescente e incandescente ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

IV.4.7 Análisis de la expresión de genes del PSI.

Con el objeto de evaluar más en detalle a los genes *psaD*, *psaE* y *psaC* que codifican para las proteínas PSI-D, PSI-E y PSI-C respectivamente, se realizaron Northern blots con sondas marcadas radiactivamente específicas para cada gen (Fig. IV.24). A los 7 días después de la germinación, se extrajo ARN de plántulas crecidas a 18 °C y a los 6 días de plántulas crecidas a 32 °C. Ambas crecieron en una cámara Conviron a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los ensayos se realizaron por triplicado y finalmente las membranas fueron hibridadas con sonda del 18S ARNr para normalizar los resultados. En el caso del gen *psaC* no se observaron diferencias significativas entre LC3 y el control a ambas temperaturas. En el caso de los genes *psaE* y *psaD* los datos de los triplicados no pudieron unirse en un mismo gráfico por las diferencias en los rangos de las escalas. Es por ello que en la figura IV.24 se muestra en cada caso uno de los triplicados. En los dos genotipos se observó la misma tendencia: mayor expresión a 18 °C que a 32 °C para ambos genes. Además en LC3 se observó mayor expresión que el control a 18 °C. Esto último podría estar sugiriendo alguna regulación de la expresión por parte del núcleo debido a la ausencia de proteína en el cloroplasto.

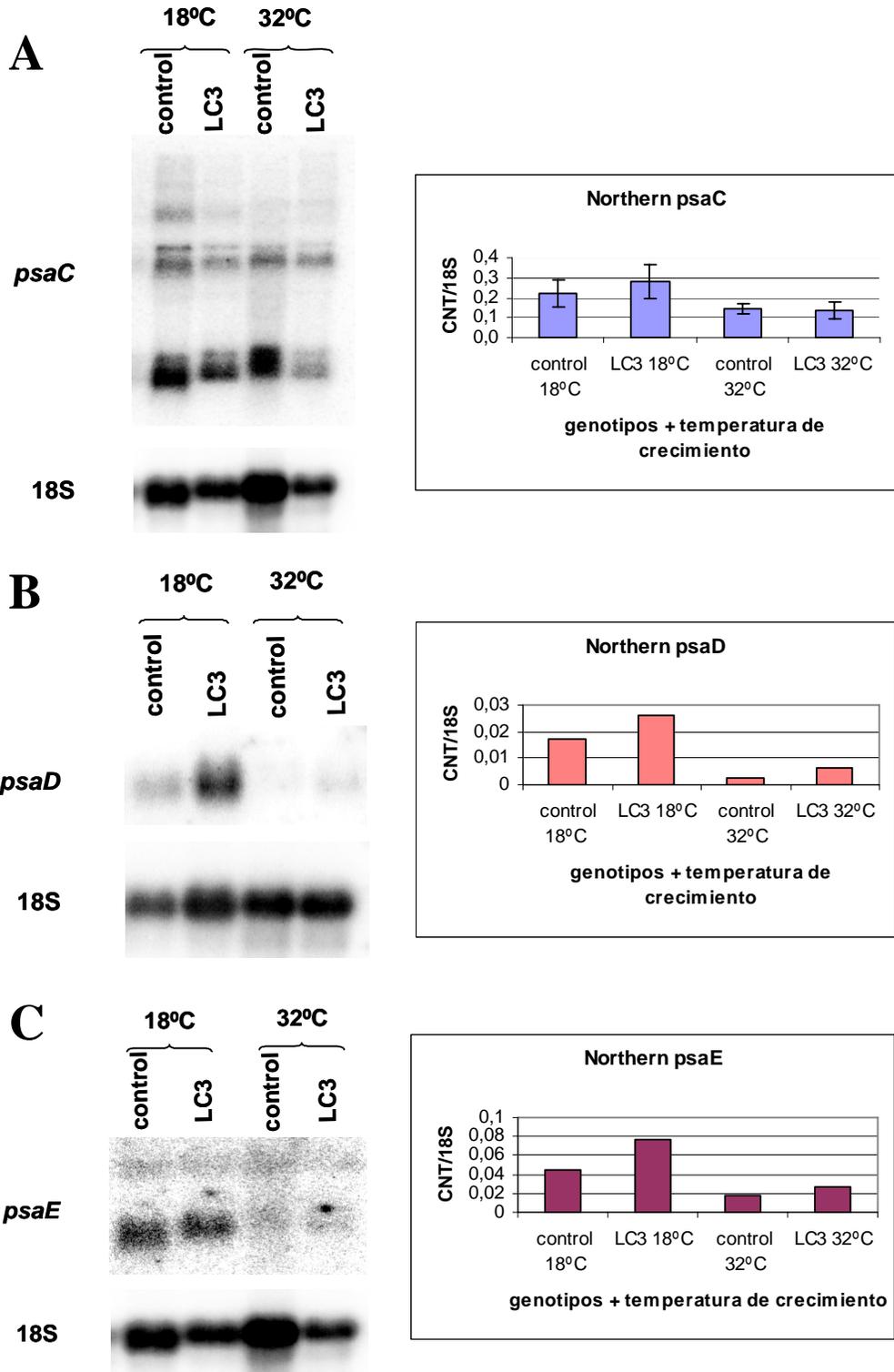


Figura IV.24 Northern blots de genes del PSI. A, sonda *psaC*; B, sonda *psaD*; C, sonda *psaE*. Las plántulas del control y de LC3 fueron crecidas a 18 °C y 32 °C de temperatura constante bajo una mezcla de luz fluorescente e incandescente a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se utilizó la sonda contra el 18S para normalizar los blots. Los gráficos expresan la cantidad de cpm (cuentas por minuto) por mm^2 sobre las cpm del blot con sonda 18S.

IV.4.8 Los genes del cloroplasto *ycf3* e *ycf4* como candidatos del fenotipo LC3.

Los resultados mostrados anteriormente nos llevaron a pensar que LC3 podría tener afectado el ensamblaje del PSI. Existen dos genes cloroplásticos, *ycf3* e *ycf4* (hypothetical chloroplast open reading frame) involucrados en el ensamblaje del PSI (Boudreau *et al.*, 1997). Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar estos genes sobre la base de la secuencia de trigo publicada en el Genbank (NC002762). *ycf3* es un gen de 2 kb que contiene 3 exones y 2 intrones mientras que *ycf4* es una única secuencia codificante de 558 pb. Ambos genes de la cebada control y de la mutante fueron amplificados por PCR, clonados y secuenciados. La secuencia del gen *ycf4* de cebada resultó tener la misma cantidad de bases que la de trigo, con algunas bases diferentes, y no se encontraron diferencias en este gen entre LC3 y el control (Fig. IV.25). En el caso del gen *ycf3* de cebada, resultó estar compuesto por 3 exones de 124 pb, 230 pb y 159 pb separados por 2 intrones de 758 pb y 722 pb teniendo el gen en total 1995 pb. Se encontraron dos cambios en el intrón 1 del gen *ycf3* de LC3 comparado con el control y con la secuencia de trigo (Fig. IV.26). Una mutación puntual que consiste en una sustitución de T→C en el nucleótido 528 y una inserción de una T en el nucleótido 150. Para investigar si estas mutaciones en el intrón 1 podrían dar origen a un "splicing" o procesamiento defectuoso del transcripto primario de *ycf3*, se llevaron a cabo Northern blots y RT-PCR con ARN aislado de plántulas del control y de LC3 crecidas a 18 °C. Se usó como sonda para los Northern blots el producto sin intrones de la RT-PCR de la cebada control de 513 pb. La banda de 600 pb observada en el control probablemente representa el transcripto completamente procesado de *ycf3* (Fig. IV.27). Sin embargo, la mutante mostró un patrón de expresión diferente. El transcripto maduro parece estar ausente en LC3 (Fig. IV.27). Conjuntamente, la RT-PCR mostró dos bandas en LC3, una de 500 pb correspondiente al transcripto sin intrones de 513 pb confirmada por secuenciación, y otra de aproximadamente 1,2 kb la cual, luego de su aislamiento y secuenciación, correspondió a un transcripto intermedio más grande de *ycf3* que contiene los tres exones más el intrón 1 (Fig. IV.28).

Además, el análisis de la secuencia de *ycf3* reveló un sitio de "editing" en el exón 2 tanto en el control como en la mutante, como fue visto anteriormente en maíz. Sin embargo, no se observó "editing" en el exón 1 en el nucleótido 44, que en maíz (Ruf *et al.*, 1994; Ruf y Kössel, 1997) y en trigo es una citosina. En cambio, en la secuencia de cebada se encontró directamente una timina (Fig. IV.29). También es interesante recalcar que el "editing" en el exón 2 pudo verse en la secuencia del transcripto de LC3 que contiene el intrón 1 (Fig. IV.29).

Para comprobar que el defecto en el "splicing" es específico del transcripto de *ycf3* de LC3, se analizaron dos unidades transcripcionales adicionales conteniendo intrones, *atpF* y *petB*. No se encontraron alteraciones en el patrón de transcripción de estos dos genes en la mutante (Fig. IV.30).

```

CLUSTAL W(1.83) multiple sequence alignment

control ycf 4 ATGAATTGGCGATCAGAACACATATGGGTAGAACTTCTAAAAGGTTCTCGAAAAAGGAGT 60
LC3 ycf 4 ATGAATTGGCGATCAGAACACATATGGGTAGAACTTCTAAAAGGTTCTCGAAAAAGGAGT 60
ycf 4 trigo ATGAATTGGCGATCAGAACACATATGGGTAGAACTTCTAAAAGGTTCTCGAAAAAGGAGT 60
*****

control ycf 4 AATTTTTCTGGGCTGTATTCTTTTTCTAGGTTCACTAGGATTCATTATTGGTTGGGACT 120
LC3 ycf 4 AATTTTTCTGGGCTGTATTCTTTTTCTAGGTTCACTAGGATTCATTATTGGTTGGGACT 120
ycf 4 trigo AATTTTTCTGGGCTGTATTCTTTTTCTAGGTTCACTAGGATTCATTATTGGTTGGGACT 120
*****

control ycf 4 TCCAGTTATCTTGGTAAGAATATTATATCTATACTTCCATCTCAAGAAATTCITTTTTTT 180
LC3 ycf 4 TCCAGTTATCTTGGTAAGAATATTATATCTATACTTCCATCTCAAGAAATTCITTTTTTT 180
ycf 4 trigo TCCAGTTATCTTGGTAAGAATATTATATCTATACTTCCATCTCAAGAAATTCITTTTTTT 180
*****

control ycf 4 CCGCAGGGGTCGTGATGTCTTCTACGGAATCGCAGGCTATTTCATTAGCTCCTACTCG 240
LC3 ycf 4 CCGCAGGGGTCGTGATGTCTTCTACGGAATCGCAGGCTATTTCATTAGCTCCTACTCG 240
ycf 4 trigo CCGCAGGGGTCGTGATGTCTTCTACGGAATCGCAGGCTATTTCATTAGCTCCTACTCG 240
*****

control ycf 4 TGGTGTACTATTTTGTGGAATGTAGGTAGTGGTTATGACCGATTGATAGAAAAGAGGGA 300
LC3 ycf 4 TGGTGTACTATTTTGTGGAATGTAGGTAGTGGTTATGACCGATTGATAGAAAAGAGGGA 300
ycf 4 trigo TGGTGTACTATTTTGTGGAATGTAGGTAGTGGTTATGACCGATTGATAGAAAAGAGGGA 300
*****

control ycf 4 ATAGTTTGCATTTTTCGTTGGGATTCCCTGGAATAAAACGTCGCGTCTTCTCTCGATT 360
LC3 ycf 4 ATAGTTTGCATTTTTCGTTGGGATTCCCTGGAATAAAACGTCGCGTCTTCTCTCGATT 360
ycf 4 trigo ATAGTTTGCATTTTTCGTTGGGATTCCCTGGAATAAAACGTCGCGTCTTCTCTCGATT 360
*****

control ycf 4 CTTATCGGGATATCCAATCAATTAGAATTCAGGTTAAAGAGGGTCTTTATCCTCGTGT 420
LC3 ycf 4 CTTATCGGGATATCCAATCAATTAGAATTCAGGTTAAAGAGGGTCTTTATCCTCGTGT 420
ycf 4 trigo CTTATCGGGATATCCAATCAATTAGAATTCAGGTTAAAGAGGGTCTTTATCCTCGTGT 420
*****

control ycf 4 ATTCTTTATATGAAATCCGGGGCCAGGGATCATTCCCTTGACTCGTACTGATGATAAG 480
LC3 ycf 4 ATTCTTTATATGAAATCCGGGGCCAGGGATCATTCCCTTGACTCGTACTGATGATAAG 480
ycf 4 trigo ATTCTTTATATGAAATCCGGGGCCAGGGATCATTCCCTTGACTCGTACTGATGATAAA 480
*****

control ycf 4 TTTTTTACTCCACGAGAAATTGAACAAAAAGCTGCCGAATTGGGCTATTTCTTGGCGTA 540
LC3 ycf 4 TTTTTTACTCCACGAGAAATTGAACAAAAAGCTGCCGAATTGGGCTATTTCTTGGCGTA 540
ycf 4 trigo TTTTTTACTCCACGAGAAATTGAACAAAAAGCTGCCGAATTGGGCTATTTCTTGGCGTA 540
*****

control ycf 4 CCAATTGAAGTATTTTGA 558
LC3 ycf 4 CCAATTGAAGTATTTTGA 558
ycf 4 trigo CCAATTGAAGTATTTTGA 558
*****

```

Figura IV.25 Alineamiento de las secuencias del gen *ycf4* del control, LC3 y trigo (Genbank NC_002762). "*" significa que todos los nucleótidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento.

CLUSTAL W(1.82) multiple sequence alignment

control ycf 3	ATGCCTAGATCCCGTGTAATGGAAATTTCAITGATAAGACCTTCTCAATTATAGCCAAT	60	control ycf 3	TGGAGGCATACAAAGGCTTGGAAATTTATTTTCGGGCACCTAGAAGCAAAACCCCTTCCT	1073
LC3 ycf 3	ATGCCTAGATCCCGTGTAATGGAAATTTCAITGATAAGACCTTCTCAATTATAGCCAAT	60	LC3 ycf 3	TGGAGGCATACAAAGGCTTGGAAATTTATTTTCGGGCACCTAGAAGCAAAACCCCTTCCT	1074
trigo ycf 3	ATGCCTAGATCCCGTGTAATGGAAATTTCAITGATAAGACCTTCTCAATTATAGCCAAT	60	trigo ycf 3	TGGAGGCATACAAAGGCTTGGAAATTTATTTTCGGGCACCTAGAAGCAAAACCCCTTCCT	1070

exon 1					
control ycf 3	ATTTTATTGGGAATAATTCGGACAACCTCAGGAGAAAAAAGGCATTTACITATTATAGA	120	control ycf 3	ACCGCAAGCTTTTAAATAATGGCCGTGATCTGTCAATTCGTCGACTATCTCCACTATA	1133
LC3 ycf 3	ATTTTATTGGGAATAATTCGGACAACCTCAGGAGAAAAAAGGCATTTACITATTATAGA	120	LC3 ycf 3	ACCGCAAGCTTTTAAATAATGGCCGTGATCTGTCAATTCGTCGACTATCTCCACTATA	1134
trigo ycf 3	ATTTTATTGGGAATAATTCGGACAACCTCAGGAGAAAAAAGGCATTTACITATTATAGA	120	trigo ycf 3	ACCGCAAGCTTTTAAATAATGGCCGTGATCTGTCAATTCGTCGACTATCTCCACTATA	1130

control ycf 3	GATGGTGGGATTTGACTCTTTTTTTTTTTCGCTTTTTTTAGACCTACCTATACCTCAGT	179	control ycf 3	GAAAGCAAAAAA- GAGAGGATCAAATTTTCTAGTAAACTGAAAAA- GGGCTTTC	1191
LC3 ycf 3	GATGGTGGGATTTGACTCTTTTTTTTTTTCGCTTTTTTTAGACCTACCTATACCTCAGT	180	LC3 ycf 3	GAAAGCAAAAAA- GAGAGGATCAAATTTTCTAGTAAACTGAAAAA- GGGCTTTC	1192
trigo ycf 3	GATGGTGGGATTTGACTCTTTTTTTTTTTCGCTTTTTTTAGACCTACCTATACCTCAGT	176	trigo ycf 3	GAAAGCAAAAAAAGAGAGGATCAAATTTTCTAGTAAACTGAAAAAAGGGCTTTC	1190

control ycf 3	CTTAGGAAAAAGAAAGGGGTGGCATAGAGAGAACCAATTTGTAAGCAAGCAAAACC	239	control ycf 3	TACATAGGGATCGTAAAAACAACGATTTTCCCTATCAGCTGAGGAAGGAAGCACCT	1251
LC3 ycf 3	CTTAGGAAAAAGAAAGGGGTGGCATAGAGAGAACCAATTTGTAAGCAAGCAAAACC	230	LC3 ycf 3	TACATAGGGATCGTAAAAACAACGATTTTCCCTATCAGCTGAGGAAGGAAGCACCT	1252
trigo ycf 3	CTTAGGAAAAAGAAAGGGGTGGCATAGAGAGAACCAATTTGTAAGCAAGCAAAACC	246	trigo ycf 3	TACATAGGGATCGTAAAAACAACGATTTTCCCTATCAGCTGAGGAAGGAAGCACCT	1250

control ycf 3	ACGCTTCGGGAAGGTGAGGCGAACTAACAATTCCTCGTCGTGTATCCTCGATTGATGC	299	control ycf 3	CAOGAGAATCAAAAAACGAAGAAGTATGGCCTATACTACTACTCTATGGATAAAGTTTC	1311
LC3 ycf 3	ACGCTTCGGGAAGGTGAGGCGAACTAACAATTCCTCGTCGTGTATCCTCGATTGATGC	300	LC3 ycf 3	CAOGAGAATCAAAAAACGAAGAAGTATGGCCTATACTACTACTCTATGGATAAAGTTTC	1312
trigo ycf 3	ACGCTTCGGGAAGGTGAGGCGAACTAACAATTCCTCGTCGTGTATCCTCGATTGATGC	296	trigo ycf 3	CAOGAGAATCAAAAAACGAAGAAGTATGGCCTATACTACTACTCTATGGATAAAGTTTC	1310

intron 2					
control ycf 3	GGCTTCAGATACCTCAATTGTAGATTTGAGTATTGAGGAAAGGTTACACCTACAGGATA	359	control ycf 3	TCAAATTTGATAGAGAAAGCACCGTAAAGATCAATTAGTGAAGGACTGGTGCATCAACT	1371
LC3 ycf 3	GGCTTCAGATACCTCAATTGTAGATTTGAGTATTGAGGAAAGGTTACACCTACAGGATA	360	LC3 ycf 3	TCAAATTTGATAGAGAAAGCACCGTAAAGATCAATTAGTGAAGGACTGGTGCATCAACT	1372
trigo ycf 3	GGCTTCAGATACCTCAATTGTAGATTTGAGTATTGAGGAAAGGTTACACCTACAGGATA	356	trigo ycf 3	TCAAATTTGATAGAGAAAGCACCGTAAAGATCAATTAGTGAAGGACTGGTGCATCAACT	1370

control ycf 3	TGGTATGGTATGGATTACAGGCCA- - - - CTCTATTAGTATCCGTAGCAGCATAGGGG	413	control ycf 3	AAAAAAACTGCTTACTTATCCATGATATGGGCAAAAATTTAGGAATCGCCTTATGTAA	1431
LC3 ycf 3	TGGTATGGTATGGATTACAGGCCA- - - - CTCTATTAGTATCCGTAGCAGCATAGGGG	414	LC3 ycf 3	AAAAAAACTGCTTACTTATCCATGATATGGGCAAAAATTTAGGAATCGCCTTATGTAA	1432
trigo ycf 3	TGGTATGGTATGGATTACAGGCCAATCCTACTCTATTAGTATCCGTAGCAGCATAGGGG	416	trigo ycf 3	AAAAAAACTGCTTACTTATCCATGATATGGGCAAAAATTTAGGAATCGCCTTATGTAA	1430

intron 1					
control ycf 3	AGAAAAGCACTACACCTAGAAATAGGAATCAACAAGAAAAAACCTTTGGTAGAAATTAAC	473	control ycf 3	TAGAGCCGATCCACTAAGGGATTAAGCAGCGGTGATGATCAGATCCAAAGATAGTAAAG	1491
LC3 ycf 3	AGAAAAGCACTACACCTAGAAATAGGAATCAACAAGAAAAAACCTTTGGTAGAAATTAAC	474	LC3 ycf 3	TAGAGCCGATCCACTAAGGGATTAAGCAGCGGTGATGATCAGATCCAAAGATAGTAAAG	1492
trigo ycf 3	AGAAAAGCACTACACCTAGAAATAGGAATCAACAAGAAAAAACCTTTGGTAGAAATTAAC	476	trigo ycf 3	TAGAGCCGATCCACTAAGGGATTAAGCAGCGGTGATGATCAGATCCAAAGATAGTAAAG	1490

control ycf 3	CCITTCCTGATCGGATCAGGCTGGGAAGATGGTGGATACCAACAACCAACAGGTCAGGT	533	control ycf 3	TTCTTTTTTCTTTCTTATGG- - - - AAAAAAGTCITTTTCAAGGATTCTATAGAGATTC	1546
LC3 ycf 3	CCITTCCTGATCGGATCAGGCTGGGAAGATGGTGGATACCAACAACCAACAGGTCAGGT	534	LC3 ycf 3	TTCTTTTTTCTTTCTTATGG- - - - AAAAAAGTCITTTTCAAGGATTCTATAGAGATTC	1547
trigo ycf 3	CCITTCCTGATCGGATCAGGCTGGGAAGATGGTGGATACCAACAACCAACAGGTCAGGT	536	trigo ycf 3	TTCTTTTTTCTTTCTTATGGTATGGAAAAAGTCITTTTCAAGGATTCTATAGAGATTC	1550

control ycf 3	TTGTACTTTGATACCCCTATACCATCAAAGATCGTTGAAGTAGCTAATTCCTCTAAAT	593	control ycf 3	ATATATGAAACGGGATAGTTACCTTTAGAAAAATTTGAAAGGAGGCTCTATATCTATCT	1606
LC3 ycf 3	TTGTACTTTGATACCCCTATACCATCAAAGATCGTTGAAGTAGCTAATTCCTCTAAAT	594	LC3 ycf 3	ATATATGAAACGGGATAGTTACCTTTAGAAAAATTTGAAAGGAGGCTCTATATCTATCT	1607
trigo ycf 3	TTGTACTTTGATACCCCTATACCATCAAAGATCGTTGAAGTAGCTAATTCCTCTAAAT	596	trigo ycf 3	ATATATGAAACGGGATAGTTACCTTTAGAAAAATTTGAAAGGAGGCTCTATATCTATCT	1610

control ycf 3	AGGAGGCGTGGAAACAAAGAAATTTGGAGCTATCGTTTTCTCTAGCATTAAATAGAA	653	control ycf 3	ATGCTTCATTCTCTGAGGTTGGAAAAAAGATCAAACATAATTATTGAAAAAATTAGGG	1666
LC3 ycf 3	AGGAGGCGTGGAAACAAAGAAATTTGGAGCTATCGTTTTCTCTAGCATTAAATAGAA	654	LC3 ycf 3	ATGCTTCATTCTCTGAGGTTGGAAAAAAGATCAAACATAATTATTGAAAAAATTAGGG	1667
trigo ycf 3	AGGAGGCGTGGAAACAAAGAAATTTGGAGCTATCGTTTTCTCTAGCATTAAATAGAA	656	trigo ycf 3	ATGCTTCATTCTCTGAGGTTGGAAAAAAGATCAAACATAATTATTGAAAAAATTAGGG	1670

control ycf 3	TTCAATGGTGTGAAGAAAAACCTCTTGTGGAAAGGTGGCTAGAGATTTCTTGGAAAAAT	713	control ycf 3	TTTGAACCTTAGGTAAITTAATTTCTTCTGCTTA- ACACAAGAACAATTTGGATCGATTT	1725
LC3 ycf 3	TTCAATGGTGTGAAGAAAAACCTCTTGTGGAAAGGTGGCTAGAGATTTCTTGGAAAAAT	714	LC3 ycf 3	TTTGAACCTTAGGTAAITTAATTTCTTCTGCTTA- ACACAAGAACAATTTGGATCGATTT	1726
trigo ycf 3	TTCAATGGTGTGAAGAAAAACCTCTTGTGGAAAGGTGGCTAGAGATTTCTTGGAAAAAT	716	trigo ycf 3	TTTGAACCTTAGGTAAITTAATTTCTTCTGCTTAGACCAAGAACAATTTGGATCGATTT	1730

control ycf 3	ACCAAGCCCTTTCCGGTTCATAATGAGACGGACTAATCTATTTTGATTCATAGATTAA	773	control ycf 3	TGATAAATGAAATTCAGTTAAGATAGGGGAAATTAAGATAGCAATTTCTGAGCCGATGA	1785
LC3 ycf 3	ACCAAGCCCTTTCCGGTTCATAATGAGACGGACTAATCTATTTTGATTCATAGATTAA	774	LC3 ycf 3	TGATAAATGAAATTCAGTTAAGATAGGGGAAATTAAGATAGCAATTTCTGAGCCGATGA	1786
trigo ycf 3	ACCAAGCCCTTTCCGGTTCATAATGAGACGGACTAATCTATTTTGATTCATAGATTAA	775	trigo ycf 3	TGATAAATGAAATTCAGTTAAGATAGGGGAAATTAAGATAGCAATTTCTGAGCCGATGA	1790

control ycf 3	GATTATTTCCGCTTAGTACTATTATGTACAGAAAGGAGGAGGCCGATGAGATGAAAACCTC	833	control ycf 3	GGTAGGAACTCTCAAGTACGGTCTAAGGGGAAAGAACTGCTATTCCGACCGAGGAGAA	1845
LC3 ycf 3	GATTATTTCCGCTTAGTACTATTATGTACAGAAAGGAGGAGGCCGATGAGATGAAAACCTC	834	LC3 ycf 3	GGTAGGAACTCTCAAGTACGGTCTAAGGGGAAAGAACTGCTATTCCGACCGAGGAGAA	1846
trigo ycf 3	----- TTTCCCTTAGTACTATTATGTACAGAAAGGAGGAGGCCGATGAGATGAAAACCTC	830	trigo ycf 3	GGTAGGAACTCTCAAGTACGGTCTAAGGGGAAAGAACTGCTATTCCGACCGAGGAGAA	1850

control ycf 3	ATGTACGGTTTTGAAACGGAGATTTTTGAATAGAATGAACGACCGTAAACGGATGTTGGC	893	control ycf 3	CAGGCCATTCTAGAGGGTGATTGGAAATTCGGGAAGCTTGGTTGATCAAGCTGCTGAA	1905
LC3 ycf 3	ATGTACGGTTTTGAAACGGAGATTTTTGAATAGAATGAACGACCGTAAACGGATGTTGGC	894	LC3 ycf 3	CAGGCCATTCTAGAGGGTGATTGGAAATTCGGGAAGCTTGGTTGATCAAGCTGCTGAA	1906
trigo ycf 3	ATGTACGGTTTTGAAACGGAGATTTTTGAATAGAATGAACGACCGTAAACGGATGTTGGC	890	trigo ycf 3	CAGGCCATTCTAGAGGGTGATTGGAAATTCGGGAAGCTTGGTTGATCAAGCTGCTGAA	1910

exon 3					
control ycf 3	TCAATCCGAAAGAAATTTAGCGGAAGCTTTGCAAAAATTTATTTGAAGCTACGCGACTAGA	953	control ycf 3	TATTGGAAACAAGCTATAGCGCTTACTCCGGAAATTTATATTTGAAGCACAACCTGTTTG	1965
LC3 ycf 3	TCAATCCGAAAGAAATTTAGCGGAAGCTTTGCAAAAATTTATTTGAAGCTACGCGACTAGA	954	LC3 ycf 3	TATTGGAAACAAGCTATAGCGCTTACTCCGGAAATTTATATTTGAAGCACAACCTGTTTG	1966
trigo ycf 3	TCAATCCGAAAGAAATTTAGCGGAAGCTTTGCAAAAATTTATTTGAAGCTACGCGACTAGA	950	trigo ycf 3	TATTGGAAACAAGCTATAGCGCTTACTCCGGAAATTTATATTTGAAGCACAACCTGTTTG	1970

control ycf 3	AATCGATCCCTATGATCGAAGTTATATACTCTATAAACATAGGCCCTTATACACACAAGCAA	1013	control ycf 3	AAGATTACGAAGCGCTTTGAATTTGAATAA	1995
LC3 ycf 3	AATCGATCCCTATGATCGAAGTTATATACTCTATAAACATAGGCCCTTATACACACAAGCAA	1014	LC3 ycf 3	AAGATTACGAAGCGCTTTGAATTTGAATAA	1996
trigo ycf 3	AATCGATCCCTATGATCGAAGTTATATACTCTATAAACATAGGCCCTTATACACACAAGCAA	1010	trigo ycf 3	AAGATTACGAAGCGCTTTGAATTTGAATAA	2000

exon 2					

Figura IV.26 Alineamiento de las secuencias del gen *ycf3* del control, LC3 y trigo (Genbank NC_002762). Los exones están resaltados de amarillo. Las mutaciones están resaltadas de rojo. El triángulo muestra el sitio de editing en el exón 2 de C a T. Los asteriscos significan que todos los nucleótidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento.

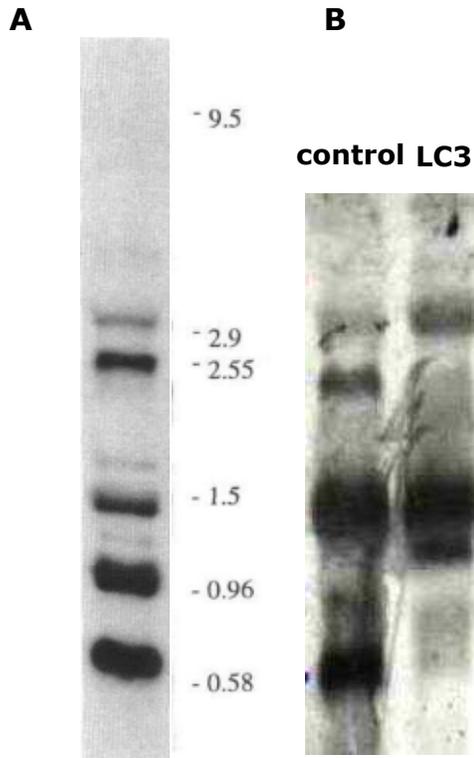


Figura IV.27 Northern blot del gen *ycf3*. A, patrón de transcripción del gen *ycf3* de cebada con una sonda complementaria al exón 2 (Hess et al., 2004). B, patrón de transcripción del gen *ycf3* del control y de LC3 con una sonda complementaria a los 3 exones en plántulas de 7 días del control y de la mutante LC3. Las calles fueron sembradas con 20 µg de ARN por calle.

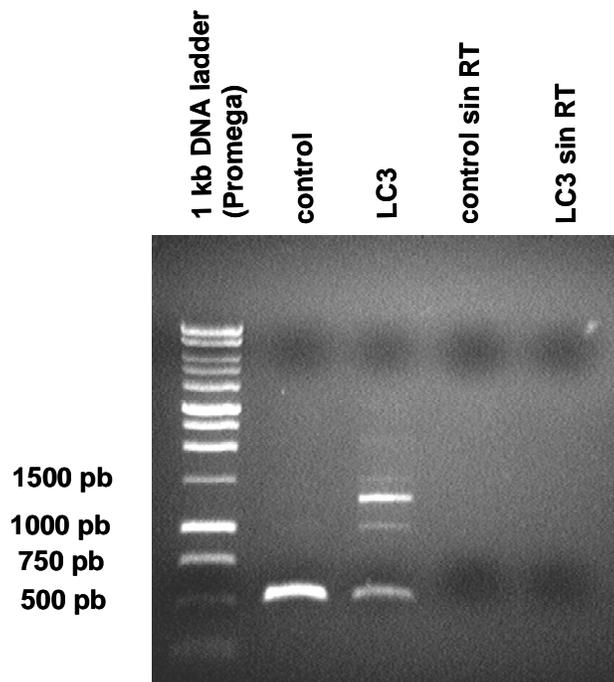


Figura IV.28 RT-PCR del gen *ycf3* con ARN del control y de LC3. El tamaño de los fragmentos está indicado en pb según el marcador de peso molecular calle 1; control, calle 2; LC3, calle 3; ARN del control sin transcriptasa reversa (RT), calle 4 y ARN de LC3, calle 5, sin RT, como controles negativos.

CLUSTAL W(1.82) multiple sequence alignment

```

control ycf3 ADN      ATGCCTAGATCCCGTGTAAATGGAAATTTCAATTGATAAGACCTTCTCAATTATAGCCAA 59
LC3 ycf3 ADNc        ATGCCTAGATCCCGTGTAAATGGAAATTTCAATTGATAAGACCTTCTCAATTATAGCCAA 34
*****
control ycf3 ADN      TATTTTATTGCGAATAAATCCGACAACCTCAGGAGAAAAAAGGCATTTACTTATTATAG 119
LC3 ycf3 ADNc        TATTTTATTGCGAATAAATCCGACAACCTCAGGAGAAAAAAGGCATTTACTTATTATAG 94
*****
control ycf3 ADN      AGATCGTGGATTTTGAAGCTTTTTTTTTTTCCTTTTTTTTAGACCTACCTATACCTCAG 178
LC3 ycf3 ADNc        AGATCGTGGATTTTGAAGCTTTTTTTTTTTCCTTTTTTTTAGACCTACCTATACCTCAG 154
*****
control ycf3 ADN      TCTTAGGAAAAAGAAAAGGGGTTGCCATAGAGAGAACCAAAATTTGTAAGCAAGCAAACC 238
LC3 ycf3 ADNc        TCTTAGGAAAAAGAAAAGGGGTTGCCATAGAGAGAACCAAAATTTGTAAGCAAGCAAACC 214
*****
control ycf3 ADN      CAGCCTTCGGGAAGGTGAGGCGAACTAACAAATCCTTCGGTGGTGTATCCTCGATTGATG 298
LC3 ycf3 ADNc        CAGCCTTCGGGAAGGTGAGGCGAACTAACAAATCCTTCGGTGGTGTATCCTCGATTGATG 274
*****
control ycf3 ADN      CCGCTTCAGATACTTCAATTGTAGATTTGAGTATTGAGCGAAAGGTTACACCTACAGGAT 358
LC3 ycf3 ADNc        CCGCTTCAGATACTTCAATTGTAGATTTGAGTATTGAGCGAAAGGTTACACCTACAGGAT 334
*****
control ycf3 ADN      ATGGTATGGTATGGATTACAGGCCACTCTATTAGTATCCGTAGGCAGCATAGGGGAGAAA 418
LC3 ycf3 ADNc        ATGGTATGGTATGGATTACAGGCCACTCTATTAGTATCCGTAGGCAGCATAGGGGAGAAA 394
*****
control ycf3 ADN      AGCACTACACCTAGAAATAGGAATCAACAAGAGAAAAACTTTGGTAGAAATTAACCCCTT 478
LC3 ycf3 ADNc        AGCACTACACCTAGAAATAGGAATCAACAAGAGAAAAACTTTGGTAGAAATTAACCCCTT 454
*****
control ycf3 ADN      CCTGATCGGTATCAGGGCTGGGAAGAAATGGTTGGGATAACAAACAACCACTCAGGTTTGA 538
LC3 ycf3 ADNc        CCTGATCGGTATCAGGGCTGGGAAGAAATGGTTGGGATAACAAACAACCACTCAGGTTTGA 514
*****
control ycf3 ADN      CTTTGGATACCCCTATAAACCATAAAGATCGTTGAAGTAGCTAATTCTCTAAATAGGAG 598
LC3 ycf3 ADNc        CTTTGGATACCCCTATAAACCATAAAGATCGTTGAAGTAGCTAATTCTCTAAATAGGAG 574
*****
control ycf3 ADN      GGGTTGAGAACAAAGAAATATTGGAGCTATCGTTTTCTCTAGCATTAAATAGAATTCAT 658
LC3 ycf3 ADNc        GGGTTGAGAACAAAGAAATATTGGAGCTATCGTTTTCTCTAGCATTAAATAGAATTCAT 634
*****
control ycf3 ADN      TGGTGTAAAGAAAACTCTTGTGGGAAGGTTGGCTAGAGATTTCTTGGAAAAATACAG 718
LC3 ycf3 ADNc        TGGTGTAAAGAAAACTCTTGTGGGAAGGTTGGCTAGAGATTTCTTGGAAAAATACAG 694
*****
control ycf3 ADN      CCCCTTTCCGTTTCAATAGAGCGGGACTAATTCTATTTTATTCTATAGATTAAAGATTA 778
LC3 ycf3 ADNc        CCCCTTTCCGTTTCAATAGAGCGGGACTAATTCTATTTTATTCTATAGATTAAAGATTA 754
*****
control ycf3 ADN      TTTCCCTTACTACTATTATGTACAGAAGGGAGGAGCCGATGAGATGAAAACCTCATGTA 838
LC3 ycf3 ADNc        TTTCCCTTACTACTATTATGTACAGAAGGGAGGAGCCGATGAGATGAAAACCTCATGTA 814
*****
control ycf3 ADN      CCGTTTTGGAACGGAGATTTTTTGAATAGAATGAACGACCGTAACGGATGTTGGCTCAAT 898
LC3 ycf3 ADNc        CCGTTTTGGAACGGAGATTTTTTGAATAGAATGAACGACCGTAACGGATGTTGGCTCAAT 874
*****
control ycf3 ADN      COGAAGGAAATATGCGGAAGCTTTCGAAAATTTATGAAAGCTACCGGACTAGAAATCG 958
LC3 ycf3 ADNc        COGAAGGAAATATGCGGAAGCTTTCGAAAATTTATGAAAGCTACCGGACTAGAAATCG 934
*****
control ycf3 ADN      ATCCCTATGATCGAAGTTATATACTCTATAACATAGGCCCTTATACACACAAGCAATGGAG 1018
LC3 ycf3 ADNc        ATCCCTATGATCGAAGTTATATACTCTATAACATAGGCCCTTATACACACAAGCAATGGAG 994
*****
control ycf3 ADN      AGCATACAAGGCTTTGGAATATTATTTCCGGGCACTAGAACGAAAACCCCTTCTTACCGG 1078
LC3 ycf3 ADNc        AGCATACAAGGCTTTGGAATATTATTTCCGGGCACTAGAACGAAAACCCCTTCTTACCGG 1054
*****
control ycf3 ADN      AAGCTTTTAAATAATATGGCGGTGATCTGTCAATACGTCGACTATCT-CCACTATAGAAA 1137
LC3 ycf3 ADNc        AAGCTTTTAAATAATATGGCGGTGATCTGTCAATACGTCGACTATCT-CCACTATAGAAA 1112
*****
control ycf3 ADN      GACAAAAAAGAGAGGATCAAATTTTCTAGTAAATCTGGAAAAAAGGGCTTTCTACATA 1197
LC3 ycf3 ADNc        -----GGTGATTCGCAAAATTCGCGAAGCTTGGTTGATCAAGCTGCTGAATATT 1162
*****
control ycf3 ADN      GGGATCGTAAAAACAACGATTTTTTCCCTATCAGGTGTAGGAAGGAAGGACACTTCAAGAG 1257
LC3 ycf3 ADNc        GGAACA-ACCTATAGCGCTTACTCGGGA-AATTATATTGAAGCAAAAAC----- 1212
*****

```

Figura IV.29 Alineamiento de las secuencias de ADN del gen *ycf3* del control y de la secuencia de ADNc de la banda de 1,2 kb aislada de la RT-PCR de LC3. Los exones 1 y 2 están resaltados de amarillo. El exón 3 está resaltado de verde. Las mutaciones están resaltadas de rojo. ∇: sitio de editing en el exón 2 C→T. "*" significa que todos los nucleótidos son idénticos en todas las secuencias del alineamiento.

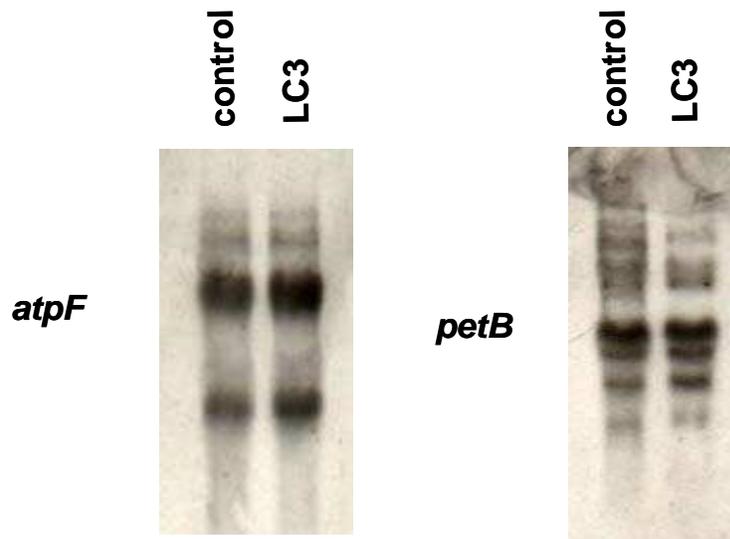


Figura IV.30 Northern blot de los genes *atpF* y *petB* con ARN de plántulas del control y de LC3. Las calles fueron sembradas con 20 µg de ARN por calle de plántulas de 7 días. Las sondas fueron sintetizadas según Vogel *et al.* 1999.

Dada la sensibilidad a alta temperatura manifestada por LC3 y los resultados de Northern blot, RT-PCR y de la secuenciación del gen *ycf3*, se pensó que el "splicing" defectuoso de este gen en la mutante podría estar influenciado por la temperatura. Para tener un primer indicio sobre esta hipótesis, se utilizó un programa, *RNA fold de Vienna RNA Secondary Structure Prediction*, que predice la estructura secundaria del ARN y en el cual se puede variar el parámetro temperatura. Se introdujeron las secuencias del intrón 1 de la cebada control y de la mutante LC3 y se le pidió al programa que predijera la estructura secundaria de los mismos a las temperaturas de crecimiento de las plántulas en los distintos experimentos, es decir, a 18°C y a 32°C. En ambos casos, el intrón 1 de LC3 mostró una configuración diferente de la del control (Fig. IV.31).

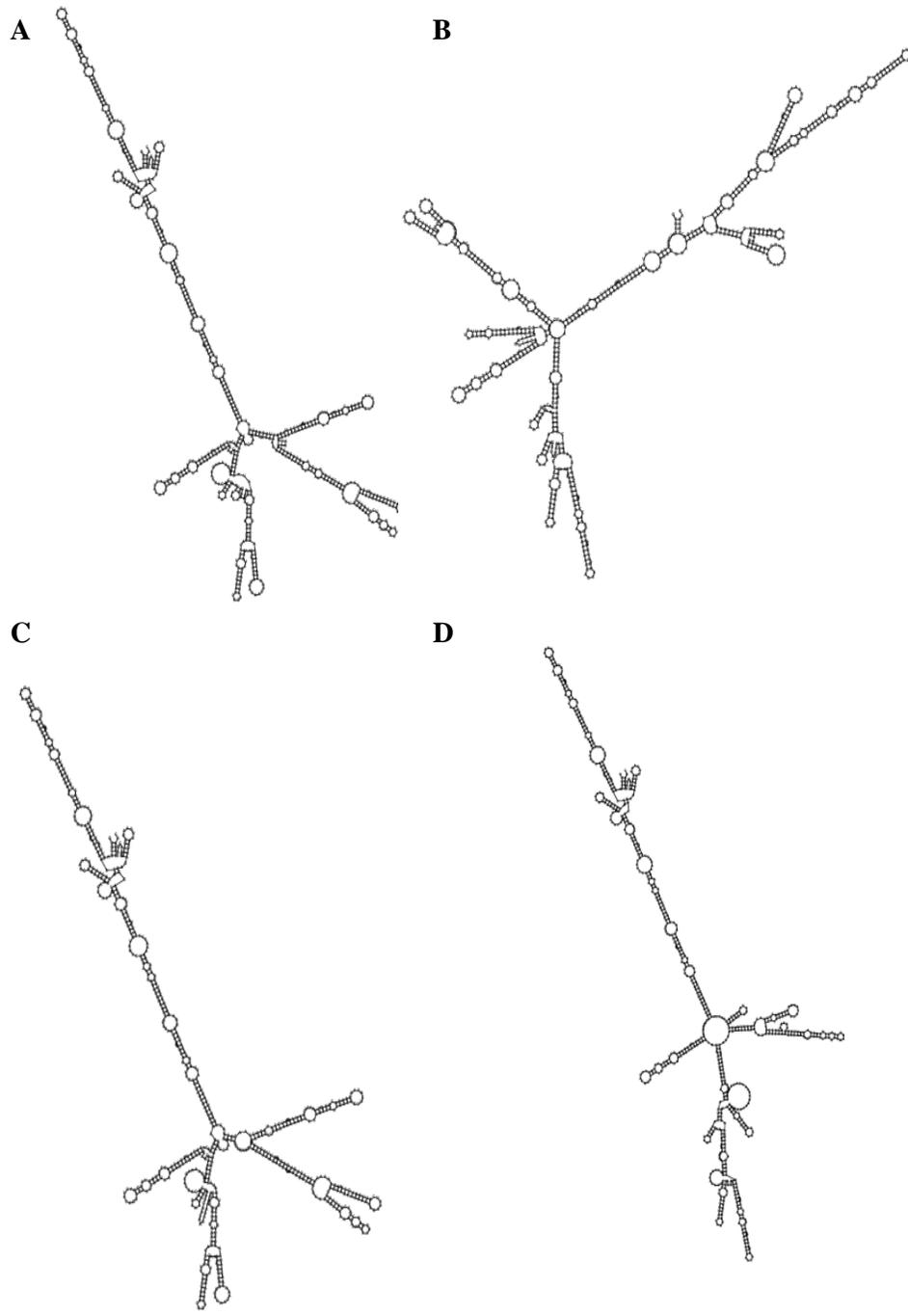


Figura IV.31 Predicción de la estructura secundaria del intrón 1 del gen *ycf3*. A, del control a 18°C; B, de LC3 a 18°C; C, del control a 32°C; D, de LC3 a 32°C.

Luego de observar estas predicciones realizadas por el programa "RNA fold", se repitió la RT-PCR sobre el gen *ycf3* con ARN aislado de plántulas de cebada normal y de LC3 crecidas durante 7 días a 32 °C. Los resultados confirmaron que el "splicing" se afectó en mayor medida a alta temperatura en la mutante, ya que no se observó ARN maduro (513 pb) pero sí ARN inmaduro conteniendo al intrón 1 (1,272 kb) en mayor cantidad y también se observó una banda débil alrededor de los 2 kb que correspondería al transcripto del gen entero conteniendo los dos intrones (Fig. IV.32). También se observaron dos bandas débiles en la cebada control a la altura de 1,2 kb que corresponderían a los transcriptos inmaduros conteniendo cada uno, uno de los dos intrones. Es decir, la banda que se encuentra entre 1,2 y 1,5 kb corresponde al transcripto que contiene al intrón 1, mientras que la banda que se encuentra a 1,2 kb, corresponde al transcripto que contiene al intrón 2.

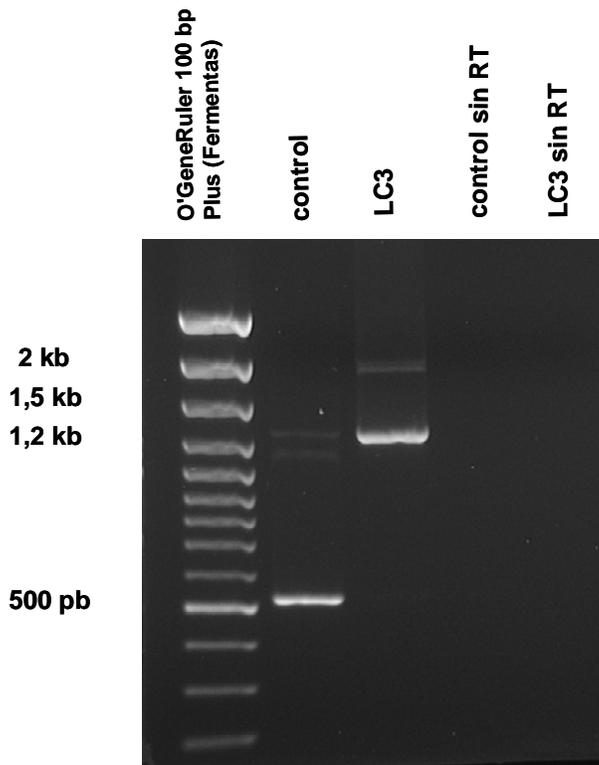


Figura IV.32 RT-PCR del gen *ycf3* con ARN del control y de LC3 de plántulas crecidas a 32 °C. El tamaño de los fragmentos esta indicado en la calle 1. control, calle 2; LC3, calle 3; ARN de control, calle 4 y ARN de LC3, calle 5, sin transcriptasa reversa (RT), como controles negativos.

La Figura IV.33 muestra las reacciones de RT-PCR del control y LC3 a ambas temperaturas para una mejor comparación de los resultados.

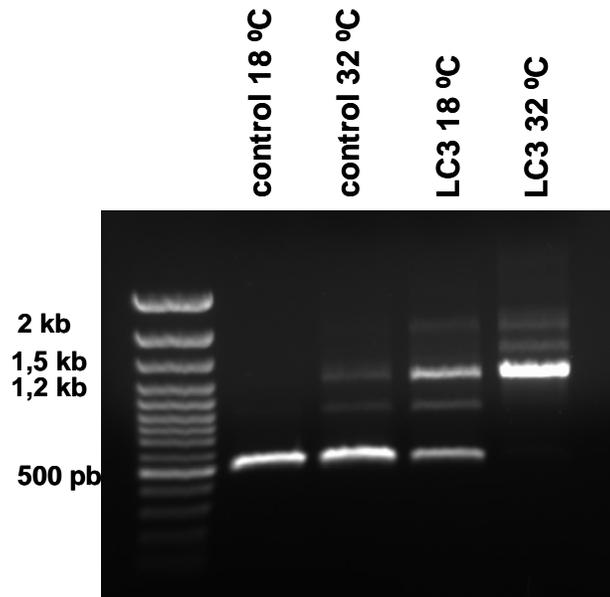


Figura IV.33 RT-PCR del gen *ycf3* sobre ARN de plantas del control y de LC3 crecidas a 18 y 32 °C.

Con el objeto de determinar la presencia o ausencia de la proteína Ycf3 en LC3 se encargó la producción de un anticuerpo contra esta proteína de cebada. Luego de varias pruebas de diluciones del anticuerpo en distintos western blots se eligió como dilución de trabajo 1:3.000. Como muestras se utilizaron tanto proteínas totales como tilacoides solubilizados en distintas concentraciones. Se muestra aquí el mejor western que se obtuvo hasta el momento sembrando 5 μ g de clorofila de tilacoides de plántulas de la cebada control y de LC3 crecidas a 18 °C y a 32 °C (Fig. IV.34).

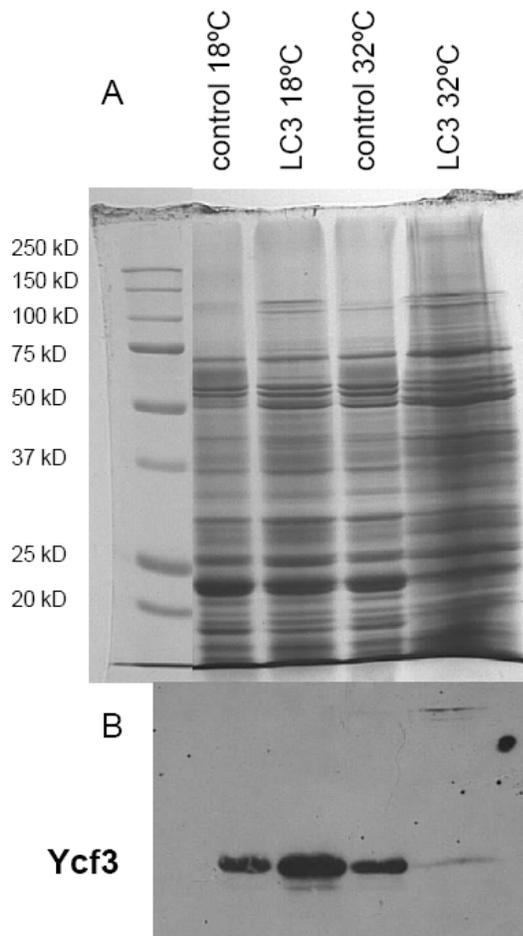


Figura IV.34 Western blot contra Ycf3. A: Tinción de Coomassie blue del gel que se utilizó para el western blot. Se sembraron 5 μ g de clorofila de proteínas tilacoidales de plántulas de 6 días después de la germinación a 18 °C y 32 °C. B: Western blot del mismo gel contra la proteína Ycf3.

El peso molecular teórico de la proteína en base a su composición aminoacídica es de 20 kD sin embargo, comparando las membranas de blotting en las cuales se usó un marcador de peso molecular preteñido, se observó siempre la banda correspondiente a Ycf3 entre los 37 kD y los 25 kD. Es interesante destacar que en la figura IV.34 se observó una baja intensidad de la banda Ycf3 en LC3 a 32 °C a pesar de la sobrecarga proteica de este material observada en el gel de SDS. Sin embargo, en LC3 a 18 °C se observó una mayor intensidad de la banda comparada con el control a ambas temperaturas.

IV.5 DISCUSIÓN

IV.5.1 Análisis de composición relativa de pigmentos y de fluorescencia de la clorofila.

La línea citoplásmica 3 (LC3) es una mutante cloroplástica de fenotipo verde claro homogéneo (*viridis*) y sensible a alta temperatura (Prina, 1996; Prina *et al.*, 1996). A simple vista, se pudo deducir que LC3 tenía menor cantidad de clorofila que el control; lo cual fue comprobado mediante la medición de pigmentos por espectrofotometría a distintos tiempos donde, efectivamente, la mutante mostró tener menor cantidad de clorofila que el control, sobre todo, menor cantidad de clorofila a (Fig. IV.5). Este efecto se intensificó a 32 °C (Fig. IV.6). Además, cuando se midieron pigmentos en la F₂ de cruzamientos recíprocos del control con LC3, se demostró claramente la herencia materna del fenotipo LC3 (Fig. IV.7).

El análisis de pigmentos más exhaustivo y preciso se realizó por HPLC (Tabla IV.1). Por medio de esta técnica se pudo también obtener datos de los componentes del ciclo de las xantofilas que actúan como protectoras del aparato fotosintético a través de mecanismos de disipación y extinción de energía. El contenido reducido de Ca+b en la mutante, en particular, cuando creció a 32 °C es indicativo de degradación de los componentes proteicos unidos a clorofila del aparato fotosintético debida al severo estrés fotooxidativo inducido por el mal funcionamiento del PSI. Sin embargo, las relaciones Ca/b en la mutante parecen contradecirse con los resultados de los Western blot (Fig. IV.23) ya que la Cb se encuentra exclusivamente en los LHCs de los dos fotosistemas. La mayoría de la Cb se encuentra unida a las proteínas Lhcb1 y Lhcb2. La relación Ca/b se vió drásticamente aumentada sólo en la mutante crecida a 32 °C. Claramente, el PSI (en particular el "core" del complejo) está reducido en la mutante a 32 °C, pero esto debería llevar a una relación Ca/b disminuida ya que el centro de reacción del PSI contiene exclusivamente Ca.

Los resultados del contenido de pigmentos del ciclo de las xantofilas indican que la mutante sufre de estrés fotooxidativo. Esto se ve reflejado en el estado de depoxidación de V+A+Z: en el control a ambas temperaturas la A (sin Z) representa menos del 10% del pool total de V+A+Z, mientras que en LC3 ya se encuentra una cantidad aumentada de A (sin Z) a 18 °C y a 32°C más del 50% del V+A+Z total se encuentran convertidos en A+Z.

Algo difícil de explicar fue el incremento observado en la cantidad de luteína en relación a la Ca, en la mutante a 32°C. La luteína es la xantofila dominante en el LHCII, sin embargo, podría encontrarse como pigmento libre retenido en la

membrana lipídica luego de la degradación de proteínas y clorofila. No se observó una reducción significativa de neoxantina en relación a la Ca.

Otro ensayo que demostró el deterioro de esta mutante a alta temperatura fue la medición del porcentaje de agua contenido en el tejido fresco de plántulas crecidas a 32 °C (Fig. IV.4). El experimento mostró un deterioro prematuro en LC3 y también se pudo confirmar la herencia materna del fenotipo, incluyendo en el análisis a la F₂ de los cruzamientos recíprocos.

Asimismo, las mediciones de la fluorescencia de la clorofila a temperatura ambiente en plántulas LC3 crecidas a 32 °C mostraron una drástica reducción del qP, e inclusive ello ocurrió en plántulas LC3 crecidas a 18 °C y a intensidades de luz actínica relativamente bajas (Fig. IV.11A). Ello indicaría que el PSI no puede re-oxidar el "pool" de plastoquinona (PQ), y que el PSI no transporta electrones, es decir, está inactivo, sobre todo a 32 °C. El NPQ resultó reducido en la mutante con respecto al control, inclusive a 18 °C (Fig. IV.11B), lo que indica que LC3 es más propensa que el control a la fotoinhibición.

Además, los espectros de emisión de fluorescencia a 77 K mostraron una considerable disminución de la longitud de onda del pico correspondiente al PSI con relación al correspondiente al PSII, siendo este efecto más pronunciado en las plántulas crecidas a 32 °C que en las crecidas a 18 °C (Fig. IV.9). También se observó un corrimiento de 5 nm hacia el azul de la longitud de onda del pico correspondiente al PSI hacia los 730 nm aproximadamente, que estaría indicando una composición de subunidades alterada y/o un armado incorrecto del PSI en la mutante a ambas temperaturas. Este efecto de corrimiento del pico del PSI hacia el azul también se observó en mutantes deficientes de PSI (Simpson y von Wettstein, 1980; Schaffner *et al.*, 1995; Stöckel *et al.*, 2006) y que carecen de PSI-F (Haldrup *et al.*, 2000), polipéptido también ausente en LC3. Por lo tanto, estos datos de fluorescencia sugieren que el efecto primario de la mutación estaría en el PSI. Estas observaciones fueron luego corroboradas por análisis de proteínas.

IV.5.2 Análisis de proteínas involucradas en la maquinaria fotosintética.

A nivel molecular, el primer acercamiento a LC3 fue el análisis de las proteínas que constituyen la maquinaria fotosintética. Para ello, se aislaron las membranas tilacoides, a partir de ellas se solubilizaron las proteínas y se corrieron en minigeles de SDS-PAGE para luego realizar Western blots con anticuerpos contra los distintos complejos proteicos. Los análisis de las proteínas del PSII (Fig. IV.15) demostraron que la calidad de la luz exagera la sensibilidad a alta temperatura de la mutante LC3, es decir que el ambiente de luz únicamente fluorescente es más agresivo para LC3 que el de luz mixta, fluorescente e incandescente, que resultó ser más

“amigable” para LC3. Además, los experimentos realizados con progenies provenientes de cruzamientos recíprocos confirmaron que los efectos observados se relacionan con diferencias genéticas de herencia materna.

Cuando se midió el espectro lumínico en la cámara de cría Sanyo (sólo luz fluorescente) se observó que carecía del componente espectral rojo lejano. El rojo lejano es absorbido preferencialmente por el PSI. En particular, bajo condiciones de luz limitadas, la falta de rojo lejano puede resultar en un desbalance de la entrada de energía de excitación en ambos fotosistemas (Allen y Pfannschmidt, 2000; Glick *et al.*, 1986). La entrada de energía de excitación insuficiente al PSI (relativa al PSII) lleva a la sobre reducción del intersistema de la cadena de transporte de electrones provocando daño por fotoinhibición al PSII. Este fenómeno ya había sido observado previamente en mutantes deficientes de PSI (Stöckel y Oelmüller, 2004; Stöckel *et al.*, 2006).

Para el análisis de la integridad del PSI a nivel proteico, las plántulas crecieron en una cámara con mezcla de luz fluorescente e incandescente (Conviron), ya que este ambiente lumínico resultó más favorable para LC3. Los Western blots contra el PSI demostraron que de las subunidades menores analizadas (PSI-C, -D y -E) sólo se acumuló PSI-D como una banda débil al principio, pero que aumentó con el tiempo a 18 °C (Fig. IV.19). Para analizar la correspondiente expresión de estas subunidades se realizaron Northern blots con sondas específicas. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de ARNm de estos genes entre el control y la mutante a 18 °C o a 32 °C, por lo cual, se descartaron problemas en estos genes a nivel transcripcional. Sin embargo, se observaron efectos drásticos en la función y ensamblaje del PSI. Usualmente el PSI es más estable a alta temperatura que el PSII (Al-Khatib y Paulsen, 1999; Takeuchi y Thornber, 1994; Berry y Björkman, 1980). Esta observación podría indicar que la lesión primaria que da origen al fenotipo LC3 ocurre en el PSI. Las lesiones observadas a nivel del PSII son más probablemente efectos secundarios adquiridos por un PSI funcionalmente defectuoso resultando en un transporte de electrones fotosintético comprometido. Las tilacoides de LC3 mostraron tener significativamente menor cantidad de PSI-C, PSI-D y PSI-E que las del control. Las diferencias fueron más pronunciadas a alta temperatura. Una reducción de las subunidades PSI-C, PSI-D y PSI-E puede llevar a una desestabilización de PSI-A y PSI-B: En cianobacterias y en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* la falta de PSI-C y/o PSI-D así como de PSI-E se asoció con desestabilización del heterodímero PSI-A/PSI-B (Takahashi *et al.*, 1991). Por lo tanto, una disminución de estas subunidades extrínsecas puede esperarse que resulte en una disminución también de PSI-A y PSI-B. En la mutante LC3 la cantidad de PSI-A/PSI-B fue aproximadamente 1/4 a 1/8 de los niveles del control.

La misma reducción fue observada para PSI-D. Sorprendentemente, la cantidad de PSI-C y de PSI-E en LC3 correspondieron a mucho menos que 1/16 de los niveles del control (Fig. IV.21). Aparentemente, la mutante retuvo más cantidad de PSI-A/PSI-B que de las subunidades de menor peso molecular. Una observación similar fue hecha previamente en una mutante mitocondrial de maíz NCS6 por Jiao *et al.* (2005). Esta mutante es heteroplásmica para una delección del gen *cox2* en el ADN mitocondrial, que codifica para la subunidad 2 del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La mutante homoplásmica produce aborto de las semillas. Las plantas NCS6 tienen crecimiento lento y desarrollan rayas verdes y amarillas en las hojas, en los sectores amarillos mostraron una actividad del PSI reducida y una disminución de las proteínas PSI-A/B, PSI-C, PSI-D y PSI-E. Pero, al igual que en LC3, las subunidades extrínsecas PSI-C y PSI-E se encontraron en menor cantidad que las del "core" PSI-A/B, aunque en este caso, PSI-D también se encontró en menor cantidad que PSI-A/B. También se encontraron reducidos los transcritos para las proteínas del PSI antes mencionadas.

Otro resultado interesante se obtuvo cuando las plántulas de LC3 crecieron a baja intensidad de luz incandescente ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 18 °C y a 32 °C de temperatura constante. Las tres subunidades del PSI, PSI-C, PSI-D y PSI-E, que habían sido casi indetectables en plántulas de LC3 crecidas bajo una mezcla de luz fluorescente e incandescente a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a esas mismas temperaturas, estuvieron presentes en niveles similares al control (Fig. IV.22), sugiriendo que estos polipéptidos serían sintetizados en LC3 y no serían afectados a muy bajas intensidades de luz pero que serían degradados a intensidades medias. El PSI, en un estado intermedio de ensamblaje, sería afectado primariamente por la intensidad de la luz y en segundo lugar, por la temperatura.

Al momento se conocen algunas proteínas involucradas en el ensamblaje del PSI (Stöckel y Oelmüller, 2004) de las cuales sólo dos son codificadas por el cloroplasto. Se trata de dos "hypothetical chloroplast open reading frames", *ycf3* y *ycf4*, que codifican para dos chaperoninas involucradas en el ensamblaje del PSI (Boudreau *et al.*, 1997). En el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* la disrupción de los genes *ycf3* y *ycf4* resultó en una deficiencia severa de PSI (Boudreau *et al.*, 1997), notándose la ausencia de las subunidades del PSI, PSI-A, PSI-C, PSI-D y PSI-F, mientras que PSI-E fue detectada como una banda muy débil en los Western blots. El mismo grupo de investigadores (Naver *et al.*, 2001) demostró luego que la proteína Ycf3 es necesaria para el ensamblaje del PSI, actuando como una chaperonina que interactúa con las subunidades PSI-A y PSI-D. Estos autores también generaron una mutante *ycf3* que tiene 3 aminoácidos cambiados en la región conservada amino terminal de la proteína Ycf3, que es

sensible a temperatura y que no acumula PSI cuando crece a una temperatura por encima de la restrictiva. En plantas superiores, el gen *ycf3* fue totalmente inactivado en tabaco para conocer su función (Ruf *et al.*, 1997). Esta mutante mostró un fenotipo verde pálido y las plántulas se pusieron blancas a los pocos días bajo condiciones de luz estándar. El fenotipo resultó mucho menos severo bajo condiciones de escasa luz en las cuales las plantas eran algo más claras y casi indistinguibles de las plantas control. Este efecto beneficioso de la escasa luz es parecido al observado en LC3. Sin embargo, las mutantes de tabaco tuvieron crecimiento lento, fenómeno que no se observa en LC3 en la cual el crecimiento es similar al de la cebada control. Otro resultado que los autores observaron y que coinciden con LC3 es la ausencia de las proteínas del PSI, PSI-C, PSI-D y PSI-F en los Western blots. También, al igual que en LC3, se vio afectado el PSII cuando se midió la fluorescencia a temperatura ambiente, como consecuencia del daño fotooxidativo causado por la ausencia de aceptores de electrones funcionales más allá del PSII. Cuando analizaron los transcritos de algunos genes cloroplásticos del PSI como *psaC* y *psaA/B*, observaron que no había diferencias entre la mutante *ycf3* y el control. En el caso de LC3, el Northern blot para el gen *psaC* tampoco mostró diferencias entre la mutante y el control (Fig. IV.24A).

Existe otro caso en la literatura de una mutante de cebada deficiente en PSI, la *viridis-zb*⁶³, cuya mutación es nuclear y letal (Nielsen *et al.*, 1996). Las plantas contienen alrededor de un 2% de PSI activo que parece contener todas las subunidades, los niveles de transcritos de todos los genes del PSI son normales y las subunidades PSI-A, PSI-B y PSI-C se sintetizan en cantidades normales. Los autores llegaron a la conclusión de que se trataba de un problema de ensamblaje del PSI que podría deberse a la ausencia de algún componente tipo chaperonina.

IV.5.3 Determinación de la base molecular de LC3.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para LC3, se hipotetizó que el fenotipo de esta mutante podía deberse al mal funcionamiento de algunas de las chaperoninas codificadas por el cloroplasto mencionadas anteriormente. Para ello, se amplificaron las secuencias de *ycf3* y *ycf4* por PCR, se clonaron los fragmentos y se procedió a la secuenciación de los mismos. Las secuencias de *ycf4* del control y de LC3 fueron idénticas. Sin embargo, se encontraron dos alteraciones en el gen *ycf3* de LC3 comparado con el control (Fig. IV.26).

Las secuencias de *ycf3* están altamente conservadas desde las cianobacterias hasta las plantas superiores, consistiendo en tres exones y dos intrones del grupo II en las últimas (Maier *et al.*, 1995). En LC3 no se encontraron mutaciones en la secuencia codificante del gen *ycf3* pero sí, en el intrón 1 (Fig. IV.26). Los Northern

blots para el gen *ycf3* mostraron un patrón de transcripción diferente en LC3 con respecto al control (Fig. IV.27). El patrón de transcripción de la cebada control fue similar al descrito por Hess *et al.*, 1994; una banda de 600 pb fue adjudicada al transcripto completamente procesado de *ycf3*. En LC3 no se encontró una banda correspondiente a ese transcripto. En contraste con el control, en los experimentos de RT-PCR se observaron dos bandas en LC3 una de las cuales luego de secuenciada, demostró corresponder a un transcripto inmaduro conteniendo a los tres exones más el intrón 1, lugar en el cual se encontraron las mutaciones en LC3. (Fig. IV.28). Esta diferencia de resultados entre las dos técnicas puede deberse a que la RT-PCR es mucho más sensible que el Northern blot.

Los resultados de predicción de la estructura secundaria del intrón 1 del gen *ycf3* de LC3 mostraron una clara diferencia en comparación con el control tanto a 18 °C como a 32 °C (Fig. IV.31). Existen antecedentes de "splicing" de genes con intrones de grupo II sensibles a temperatura como en el caso del gen de cloroplasto *ndhB* (Karcher y Bock, 2002). Estas predicciones dieron un buen indicio de que el "splicing" de *ycf3* en LC3 podría afectarse de acuerdo a la temperatura de crecimiento de las plántulas. Una primera aproximación por RT-PCR en este sentido arrojó un resultado positivo sobre esta hipótesis, es decir, que a diferencia de lo observado en la RT-PCR (Fig. IV.28) en donde las plántulas habían crecido a 18 °C, se observó ausencia total de ARN maduro y presencia de un ARN inmaduro conteniendo al intrón 1 en plántulas de LC3 crecidas a 32 °C (Fig. IV.32).

Para comprobar que la falla en el "splicing" fue específica para los transcriptos de *ycf3*, se analizaron dos unidades transcripcionales que contienen intrones, *atpF* y *petB*. No se encontraron diferencias entre el control y la mutante en los patrones de transcripción de estos genes (Fig. IV.30). Por lo tanto, estos resultados claramente indican que el gen *ycf3* de LC3 tiene un "splicing" defectuoso. Esta falla en el "splicing" podría dar una proteína Ycf3 defectuosa o una cantidad de proteína insuficiente que afectaría al ensamblaje del PSI, y como consecuencia los componentes del PSI serían más susceptibles al daño por ciertas condiciones de luz y temperatura. El western blot contra la proteína Ycf3 mostró una banda muy débil en el caso de la mutante crecida a 32 °C (Fig. IV.34) lo cual coincide con la ausencia de mensajero maduro *ycf3* en LC3 a alta temperatura. Sin embargo, en la mutante crecida a 18 °C parecería observarse una mayor cantidad de esta proteína en comparación con las calles del control a ambas temperaturas, a pesar de que se esperaría una menor cantidad de proteína Ycf3 ya que la mutante a 18 °C muestra un "splicing" defectuoso. Esto podría deberse a una carga proteica mayor de esta muestra en relación a las del control. No obstante, la presencia de Ycf3 en LC3 no sería tan sorprendente ya que pudo observarse algo de mensajero maduro en la

RT-PCR en LC3 a 18 °C (Fig. IV.28). A pesar de que pudo observarse la presencia de esta chaperonina en la mutante crecida a 18 °C, la cantidad de la misma podría ser insuficiente para el correcto ensamblaje del PSI a esta temperatura ya que algunos polipéptidos de este fotosistema se encuentran ausentes también a 18 °C (Fig. IV.19).

IV.5.4 Análisis de microscopía electrónica.

Las fotografías de microscopía electrónica mostraron, así como los Western blots contra el PSII, la cuantificación de pigmentos y la observación del fenotipo de LC3 a simple vista, que la peor condición de crecimiento para la mutante es la de luz solamente fluorescente y a 32 °C. Los cloroplastos de LC3 en estas condiciones mostraron una grana completamente desorganizada, llena de vesículas o tilacoides hinchadas con plastoglobulos. Estas características ya habían sido observadas en mutantes de cebada sensibles a alta temperatura (Smillie *et al.*, 1978). A medida que la temperatura de crecimiento aumentaba también se observaba el aumento de la desorganización y orientación al azar de la grana (Smillie *et al.*, 1978).

En la condición de crecimiento de baja intensidad de luz ($10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 18 °C en la mutante se observó una pequeña proporción de regiones de membrana estromática que no forman parte del "stacking", es decir, que hay una alta proporción de regiones de membrana con "stacking". Esto posiblemente se deba a que la baja intensidad de luz tiende a ser compensada por aumento en la síntesis de LHCI, que son los principales complejos de "stacking" de las tilacoides y se acumulan mayormente en las regiones de membranas con "stacking". Las mutantes del PSI pueden tener una relación alta de tilacoides con "stacking" a tilacoides sin "stacking", porque los complejos PSI se hallan principalmente en la membrana estromática y con pocos complejos PSI habría menos regiones de membrana estromática. Las vesículas que se observan en LC3 son en realidad tilacoides con "stacking" hinchadas. Este tipo de tilacoides es típico de cloroplastos de hojas mantenidas en la oscuridad o sea no activos en términos fotosintéticos (Murakami y Packer, 1970). Con la exposición a la luz, la acidificación del lumen tilacoidal lleva al desplazamiento de cationes desde el lumen y esto produce un colapso osmótico en el espacio lumenal (Murakami y Packer, 1970). En la oscuridad, las tilacoides se hinchan cuando los cationes vuelven a entrar al lumen. En LC3 la capacidad fotosintética alterada podría llevar a una hinchazón mayor de las tilacoides debido a que existe menor acidificación por el reducido flujo de electrones.

IV.6 CONCLUSIÓN y PERSPECTIVAS

La mutante LC3 es claramente una mutante del PSI. El fenotipo observado estaría originado en el gen *ycf3*. La sensibilidad a alta temperatura muy probablemente se origine en un "splicing" sensible a la temperatura a causa de la o las mutaciones encontradas en el intrón 1. Este "splicing" defectuoso produce proteína Ycf3 insuficiente a ambas temperaturas, afectando al ensamblaje del PSI, con todas las consecuencias observadas.

Como perspectivas futuras quedaría pendiente un estudio de la funcionalidad del gen *ycf3* defectuoso. Para ello lo ideal sería hacer un ensayo de complementación, pero la transformación de cloroplastos en cebada no se encuentra disponible por ahora. Se podría realizar un ensayo de transcripción y "splicing" *in vitro*. También sería interesante evaluar como se afecta la expresión de otros genes en LC3 a las dos temperaturas analizadas en este trabajo por medio de microarreglos.

Otra cuestión que podría estudiarse es el intrón 1 en sí y el efecto de la temperatura observado en LC3. Para ello podrían realizarse ensayos con ARNasa para ver la estructura secundaria del mismo o también se podría tratar de encontrar modificaciones en los sitios de unión de factores de "splicing" de intrones de grupo II como los ya conocidos en maíz CFM2, CRS1, etc. (Asakura y Barkan, 2007).

V. CONCLUSIÓN GENERAL

El análisis de las mutantes LC2, LC3 y LC9, originadas por el mutador de cloroplastos de la cebada, nos ha permitido llegar a los genes candidatos que explicarían el fenotipo en dos de los tres casos presentados en esta tesis:

- Para la mutante LC9 no se hicieron postulaciones sobre posibles genes candidatos, sin embargo, de acuerdo a los resultados del análisis de RFLPs puede concluirse que esta línea mutante no porta grandes rearrreglos o deleciones en el plastoma.

- En el caso de la mutante LC2, se concluyó que se trata de una mutante del gen plastídico *infA*, siendo la primera vez que un fenotipo mutante es atribuido a este gen en plantas superiores. Además, el fenotipo LC2 se vió estrechamente asociado a mutaciones en el gen *infA* como claramente se demostró mediante el aislamiento de nuevas mutantes tipo LC2 (LC2-like).

- Sobre la mutante LC3 se realizaron estudios diversos a partir de cuyos resultados se postularon como responsables los *loci ycf3* e *ycf4*, que codifican para dos chaperoninas involucradas en el ensamblaje del PSI. En el primero de ellos se encontraron dos mutaciones puntuales localizadas en el intrón 1. Además, se determinó que la eficiencia de "splicing" de este intrón varió con la temperatura.

En todos los casos estudiados las mutaciones fueron puntuales, mayormente, transiciones T→C o A→G. Estos resultados son informativos en cuanto al mecanismo de acción del mutador de cloroplastos y a ellos se suman los resultados de análisis de mutantes tolerantes a atrazina seleccionadas a partir del mutador, en las cuales se encontró otra transición de tipo A→G en el gen *psbA* (Rios et al., 2003).

Es interesante destacar que la capacidad del genotipo mutador de originar mutaciones puntuales aumenta la chance de obtener genotipos viables, a diferencia de los fenotipos drásticos que se originan cuando se silencia al gen candidato por completo, como en el caso del gen *ycf3* en tabaco (Ruf et al., 1997).

Tanto por la importancia económica de los caracteres regulados por la genética del plastoma (genes determinantes de eficiencia de fotosíntesis, resistencia a herbicidas, etc), como por el interés científico de conocer la genética de los plástidos y los mecanismos de comunicación entre este genoma con el nuclear y el mitocondrial, resulta de gran interés estudiar los mecanismos de generación y estabilización de mutaciones plastídicas. El gen mutador nuclear estudiado en este trabajo se presenta como una herramienta muy promisoriosa para hacer un análisis funcional exhaustivo del plastoma de las plantas superiores.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Ahlert D, Ruf S, Bock R (2003) Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *PNAS USA* 100: 15730-15735.
- Al-Khatib K, Paulsen GM (1999) High-temperature effects on photosynthetic processes in temperate and tropical cereals. *Crop Sci* 39: 119-125
- Alberte RS, Hesketh JD, Kirby JS (1976) Comparisons of photosynthetic activity and lamellar characteristics of virescent and normal green peanut leaves. *Z Pflanzenphysiol* 77: 152-159.
- Albrecht V, Ingenfeld A, 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.
- Allen JF, Pfannschmidt T (2000) Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 1351-1359.
- Antonkine ML, Jordan P, Fromme P, Krauss N, Golbeck JH, Stehlik D (2003) Assembly of protein subunits within the stromal ridge of photosystem I. Structural changes between unbound and sequentially PSI-bound polypeptides and correlated changes of the magnetic properties of the terminal iron sulfur clusters. *J Mol Biol* 327: 671-697.
- Archer EK, Bonnett H (1987) Characterization of a virescent chloroplast mutant of tobacco. *Plant Physiol* 83: 920-925.
- Archer EK, Hakansson G, Bonnett H (1987) The phenotype of a virescent chloroplast mutation in tobacco is associated with the absence of a 37.5 kD thylakoid polypeptide. *Plant Physiol* 83: 926-932.
- Arntzen CJ, Duesing JH (1984) Chloroplast-encoded herbicide resistance. In: *Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals*, Miami Winter Symp. Vol. 20, K. Downey (Ed.) pp. 273-294.
- Asakura Y, Barkan A (2007) A CRM domain protein functions dually in group I and group II intron splicing in land plant chloroplasts. *Plant Cell* 19: 3864–3875.
- Azcón-Bieto J, Fleck I, Aranda X, Xambó A (2000) Fotosíntesis en un ambiente cambiante. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, Capítulo 13, Azcón-Bieto J. y Talón M. (Eds.), Edicions Universitat de Barcelona, McGraw-Hill Interamericana, pp. 203-216.
- Azevedo J, Courtois F, Lerbs-Mache S (2006) Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 34 (2): 436–444.

- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196:80-83.
- Baumgartner BJ, Rapp JC, Mullet JE (1989) Plastid transcription activity and DNA copy number increase in barley chloroplast development. *Plant Physiol* 89: 1011-1018.
- Benedict CR, McCree KJ, Kohel RJ (1972) High photosynthetic rate of a chlorophyll mutant of cotton. *Plant Physiol* 49: 968-971.
- Berry J, Björkman O (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 491-543.
- Birky CW Jr (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. *Annu Rev Genet* 35:125-48.
- Bock R (2000) Sense from nonsense: How the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie* 82: 549-557.
- Bock R, Sarwar Khan M (2004) Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol* 22 (6): 311-318.
- Boelens R, Gualerzi CO (2002) Structure and function of bacterial initiation factors. *Curr Protein Pept Sci* 3: 107-119.
- Boudreau E, Takahashi Y, Lemieux C, Turmel M, Rochaix J-D (1997) The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex. *EMBO J* 16: 6095-6104.
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.
- Börner T, Schumann B, Hagemann R (1976) Biochemical studies on a plastid ribosome-deficient mutant of *Hordeum vulgare*. In: *Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria*. T Bücher, W Neupert, W Sebald, S Werner (Eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 41-48.
- Börner T, Sears BB (1986) Plastome mutants. *Plant Mol Biol Rep* 4 (2): 69-92.
- Campos F, García-Gómez BI, Solórzano RM, Salazar E, Estevez J, León P, Alvarez-Buyllas ER, Covarrubias AA (2001) A cDNA for nuclear-encoded chloroplast translational initiation factor 2 from a higher plant is able to complement an *infB* *Escherichia coli* null mutant. *J Biol Chem* 276 (30): 28388-28394.
- Chang TL, Stoike LL, Zarka D, Schewe G, Chiu WL, Jarrell DC, Sears BB (1996) Characterization of primary lesions caused by the plastome mutator of *Oenothera*. *Curr Genet* 30: 522-530.

- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD, 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3497-500.
- Chitnis PR (2001) Photosystem I: Function and physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 593-626.
- Chiu W-L, Johnson EM, Kaplan SA, Blasko K, Sokalsky M, Wolfson R, Sears BB (1990) *Oenothera* chloroplast DNA polymorphisms associated with plastome mutator activity. *Mol Gen Genet* 221: 59-64.
- Chollet R, Paolillo DJ (1972) Greening in a virescent mutant of maize. I. Pigment, ultrastructural, and gas exchange studies. *Z Pflanzenphysiol* 68: 30-44.
- Choquet Y, Vallon O (2000) Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 82: 615-634.
- Colombo N, Ríos RD, Prina AR (2006) Plastome analysis of barley chloroplast mutator-induced mutants. *J Basic Appl Genet* 17 (1): 5-9.
- Courtois F, Merendino L, Demarsy E, Mache R, Lerbs-Mache S (2007) Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145: 712-721.
- Croitoru V, Bucheli-Witschel M, Hägg P, Abdulkarim F, Isaksson LA (2004) Generation and characterization of functional mutants in the translation initiation factor IF1 of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 271: 534-544.
- Croitoru V, Semrad K, Prenninger S, Rajkowitsch L, Vejen M, Laursen BS, Sperling-Petersen HU, Isaksson LA (2006) RNA chaperone activity of translation initiation factor IF1. *Biochimie* 88: 1875-1882.
- Cummings HS, Hershey JWB (1994) Translation initiation factor IF1 is essential for cell viability in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176(1): 198-205.
- Dahlquist KD, Puglisi JD (2000) Interaction of translation initiation factor IF1 with the *E. coli* ribosomal A site. *J Mol Biol* 299: 1-15.
- Day A, 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, Ellis THN (1985) Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr Genet* 9: 671-678.
- De Las Rivas J (2000) La luz y el aparato fotosintético. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, Capítulo 9, Azcón-Bieto J y Talón M (Eds.), Edicions Universitat de Barcelona, McGraw-Hill Interamericana, pp. 131-153.
- Dellaporta S (1994) Plant DNA Miniprep and Microprep: Versions 2.1-2.3. En: *The Maize Handbook*. Freeling M, Walbot V (Eds.), Springer-Verlag N.Y., Inc. pp. 522-525.

- Demarsy E, Courtois F, Azevedo J, Buhot L, Lerbs-Mache S (2006) Building-up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiol* 142: 993-1003.
- Demmig-Adams B, Adams WW, III (1996) The role of the xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1(1): 21-26.
- Drescher A, Ruf S, Calsa T Jr, Carrer H, Bock R (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* 22(2): 97-104.
- Epp MD (1973) Nuclear gene-induced plastome mutations in *Oenothera hookeri* I. Genetic Analysis. *Genetics* 75: 465-483.
- Fang G, Hammar S, Grumet R (1992) A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 56: 52-54.
- Fromme P, Jordan P, Krauss N (2001) Structure of photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1507: 5-31.
- Galili S, Fromm H, Aviv D, Edelman M, Galun E (1989) Ribosomal protein S12 as a site for streptomycin resistance in *Nicotiana* chloroplasts. *Mol Gen Genet* 218: 289-292.
- Glick RE, McCauley SW, Gruissement W, Melis A (1986) Light quality regulates expression of chloroplast genes and assembly of photosynthetic membrane complexes. *PNAS USA* 83: 4287-4291,
- Goloubinoff P, Edelman M, Hallick RB (1984) Chloroplast-coded atrazine resistance in *Solanum nigrum*: *psbA* loci from susceptible and resistant biotypes are isogenic except for a single codon change. *Nucleic Acid Res* 12: 5489-5496.
- Gounaris K, Barber J, Harwood JL (1986) The thylakoid membranes of higher plant chloroplasts. *Biochem J* 237: 313-326.
- Gribskov M (1992) Translational initiation factors IF-1 and eIF-2 alpha share an RNA-binding motif with prokaryotic ribosomal protein S1 and polynucleotide phosphorylase. *Gene* 119: 107-111.
- Gruissement, W (1989) Chloroplast gene expression: How plants turn their plastids on. *Cell* 56: 161-170.
- Guiamet JJ, Tyystjärvi E, Tyystjärvi T, John I, Kairavuo M, Pichersky P, and Noodén LD (2002) Photoinhibition and loss of photosystem II reaction center proteins during senescence of soybean leaves. Enhancement of photoinhibition by the "stay-green" mutation *cytG*. *Physiol. Plant.* 115: 468-478
- Gustafsson, Å (1940) The mutation system of the chlorophyll apparatus. *Lunds Univ Årsskr N F Avd 2* (36): 1-10.
- Hagemann R, Scholz F (1962) Ein Fall Gen-induzierter Mutationen des Plasmotyps bei Gerste. *Züchter* 32: 50-59.

- Haldrup A, Simpson DJ, Scheller HV (2000) Down-regulation of the PSI-F Subunit of Photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 275: 31211-31218
- Harris EH, Burkhart BD, Gillham NW, Boynton JE (1989) Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: Correlation of genetic and Physical Maps of the chloroplast genome. Genetics 123: 281-292.
- Hedtke B, Wagner I, Börner T, Hess WR (1999) Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast affect mitochondrial gene and transcript levels. Plant J 19 (6): 635-643.
- Hedtke B, Börner T, Weihe A (2000) One RNA polymerase serving two genomes. EMBO Rep 1 (5): 435-440.
- Hess WR, Müller A, Nagy F, Börner T (1994) Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal. Mol Gen Genet 242: 305-312.
- Hirschberg J, McIntosh L (1983) Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. Science 222: 1346-1349.
- Jensen PE, Bassi R, Boekema EJ, Dekker JP, Jansson S, Leister D, Robinson C, Scheller HV (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I. Biochim Biophys Acta 1767(5): 335-52.
- Jiao S, Thornsberry JM, Elthon TE, and Newton KJ (2005) Biochemical and molecular characterization of photosystem I deficiency in the NCS6 mitochondrial mutant of maize. Plant Mol Biol 57: 303-313.
- Kanno A, Hirai A (1993) A transcription map of the chloroplast genome from rice (*Oryza sativa*). Curr Genet 23: 166-174.
- Karcher D, Bock R (2002) Temperature sensitivity of RNA editing and intron splicing reactions in the plastid *ndhB* transcript. Curr Genet 41: 48-52.
- Kavanagh TA, O'Driscoll KM, McCabe PF, Dix PJ (1994) Mutations conferring lincomycin, spectinomycin, and streptomycin resistance in *Solanum nigrum* are located in three different chloroplast genes. Mol Gen Genet 242: 675-680.
- Kirchhoff H, Haase W, Haferkamp S, Schott T, Borinski M, Kubitscheck U, Rögner M (2007) Structural and functional self-organization of Photosystem II in grana thylakoids. Biochim Biophys Acta 1767: 1180-1188.
- Kode V, Mudd EA, Iamtham S, Day A (2005) The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. Plant J 44(2): 237-244.
- Kozak M (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in Procaryotes, Eucaryotes, and Organelles. Microbiol Rev 47: 1-45.

- Kropat J, Oster U, Rüdiger W, Beck CF (1997) Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. PNAS USA 94: 14168-14172.
- Kuroda H, Maliga P (2003) The plastid *clpP1* protease gene is essential for plant development. Nature 425: 86-89.
- Kutschera U, Niklas KJ (2005) Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. Theory Biosci 124: 1-24.
- Kyrpidides NC, Woese CR (1998) Universally conserved translation initiation factors. PNAS USA 95: 224-228.
- Landau A, Díaz Paleo A, Civitillo R, Jaureguiualzo M, Prina AR (2007) Two *infA* gene mutations independently originated from a mutator genotype in barley. J Hered 98(3): 272-276.
- Laursen BS, Sorensen HP, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 69(1): 101-23.
- 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.
- Leon P, Arroyo A, Mackenzie S (1998) Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 453-480.
- Li N, Zhao J, Warren P V, Warden J T, Bryant D A, Golbeck J H (1991) PsaD Is Required for the Stable Binding of PsaC to the Photosystem I Core Protein of *Synechococcus sp.* PCC 6301. Biochemistry 30: 7863-7872.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. Methods Enzymol 148: 350-382.
- Liere K, Börner T (2006) Transcription of plastid genes. In: Regulation of Transcription in Plants, KD Grasser (Ed.), Blackwell Publishing Ltd., pp. 184-224.
- Lokstein H, Tian L, Polle J, DellaPenna D (2002) Xanthophyll biosynthetic mutants of *Arabidopsis thaliana*: Altered nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence is due to changes in photosystem II antenna size and stability. Biochim Biophys Acta 1553: 93-103.
- López-Juez E, Pyke KA (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. Int J Dev Biol 49: 557-577.
- Mache R, Zhan DX, Lerbs-Mache S, Harra KH, Villain P, Gauvins S (1997) Nuclear control of early plastid differentiation. Plant Physiol Biochem 35: 199-203.
- Maclachlan S, Zalik S (1963) Plastid structure, chlorophyll concentration and free amino-acid composition of a chlorophyll mutant of barley. Can J Bot 41: 1053-1062.

- Maier RM, Neckermann K, Igloi GL, Kössel H (1995) Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol* 251: 614–628
- Martin W, Herrmann RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol* 118: 9-17.
- McFadden GI (2001) Chloroplast origin and integration. *Plant Physiol* 125: 50–53.
- Millen RS, Olmstead RG, Adams KL, Palmer JD, Lao NT, Heggie L, Kavanagh TA, Hibberd JM, Gray JC, Morden CW, Calie PJ, Jermiin LS, 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.
- Mogensen HL (1996) The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Am J Bot* 83(3): 383-404.
- 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.
- Murakami S, Packer L (1970) Protonation and chloroplast membrane structure. *J Cell Biol* 47: 332-351
- Myhill RR, Konzak CF (1967) A new technique for culturing and measuring barley seedlings. *Crop Sci* 7: 275–277.
- Naver H, Boudreau E, Rochaix J-D (2001) Functional Studies of Ycf3: Its role in assembly of photosystem I and interactions with some of its subunits. *Plant Cell* 13: 2731-2745
- Nielsen VS, Scheller HV, Møller BL (1996) The photosystem I mutant *viridis-zb*⁶³ of barley (*Hordeum vulgare*) contains low amounts of active but unstable photosystem I. *Physiol Plant* 98: 637-644.
- 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, Tsunewaki K (2000) Chinese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) chloroplast genome: complete sequence and contig clones. *Plant Mol Biol Rep* 18: 243-253.
- 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, Tsunewaki K (2002) Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol Genet Genomics* 266: 740-746.

- Okkels JS (1992) Molecular analysis of barley chloroplast proteins. In: Biotechnology in Agriculture, Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology, Vol. 5, Chapter 8, PR Slewry (Ed.), CAB International pp. 153-179.
- Palmer JD (1986) Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Methods Enzymol* 118: 167-186.
- Pesaresi P, Masiero S, Eubel H, Braun HP, Bhushan S, Glaser E, Salamini F, Leister D (2006) Nuclear photosynthetic gene expression is synergistically modulated by rates of protein synthesis in chloroplasts and mitochondria. *Plant Cell* 18:970-991.
- Pfannschmidt T (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* 8 (1): 33-41.
- Pon CL, 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(2): 203-207.
- Potrykus I (1970) Mutation und Rückmutation extrachromosomal vererbter Plastidenmerkmale von *Petunia*. *Z. Pflanzenzüchtung* 63: 24-40.
- 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: 385-389.
- Prina AR, Maldonado S, Arias MC, Colombo N, Rios RD, Acevedo A, Otegui M (1996) Mutator induced variability in barley. In: *Barley Genetics VII*, Vol. 2, Slinkart A, Scoles G, Rossnagel B (Eds.), Univ. of Saskatchewan Canada, pp. 552-554.
- Prina AR, Saione H, Rios R (1997) Selección de tolerancia al herbicida atrazina sobre plantas de cebada portadoras de un gen mutador de los cloroplastos. *Actas del XXVIII Congreso Argentino de Genética*. San Miguel de Tucumán, pp. 160.
- Prina AR, Arias MC, Lainez V, Landau A, Maldonado S (2003) A cytoplasmically inherited mutant controlling early chloroplast development in barley seedlings. *Theor Appl Genet* 107: 1410-1418.
- Ravi V, Khurana JP, Tyagi AK, Khurana P (2008) An update on chloroplast genomes. *Pl Syst Evol* 271: 101-122.
- Redei GP, 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, Prina AR (2003) Isolation and molecular characterization of atrazine tolerant barley mutants. *Theor Appl Genet* 106: 696-702.
- Robertson D, Laetsch WM (1974) Structure and function of developing barley plastids. *Plant Physiol* 54: 148-159.

- Rochaix J-D (2006) The role of nucleus-and chloroplast-encoded factors in the synthesis of the photosynthetic apparatus. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 23, The Structure and Function of Plastids, Chapter 7, RR Wise and JK Hooper (Eds.), Springer, pp. 145-165.
- Rodermel S (2001) Pathways of plastid-to-nucleus signalling. *Trends Plant Sci* 6(10): 471-478.
- Ruf S, Zeltz P, Kössel H. (1994) Complete RNA editing of unspliced and dicistronic transcripts of the intron-containing reading frame IRF170 from maize chloroplasts. *PNAS USA* 91: 2295-2299.
- Ruf S, Kössel H. (1997) Tissue-specific and differential editing of the two *ycf3* editing sites in maize plastids. *Curr Genet* 32: 19-23.
- Ruf S, Kössel H, Bock R (1997) Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *J Cell Biol* 139: 95-102.
- 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.
- Schaffner C, Laasch H, Hagemann R (1995) Detection of point mutations in chloroplast genes of *Antirrhinum majus* L. I. Identification of a point mutation in the *psaB* gene of photosystem I plastome mutant. *Mol Gen Genet* 249: 533-544.
- Scheller HV, Jensen PE, Haldrup A, Lunde C, Knoetzel J (2001) Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1507: 41-60.
- Schuler M, Zielinski R (1993) *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* CRC Press, Elsevier.
- Scopes RK, Smith JA (1998) Analysis of proteins. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Chapter 10, , FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith, K Struhl (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., pp. 10.0.1-10.0.20.
- Sears BB (1983) Genetics and evolution of the chloroplast. In: *Stadler Symposium*, Vol. 15, JP Gustafsson (Ed.) Univ. Missouri Press pp. 119-139.
- Sette M, van Tilborg P, Spurio R, Kaptein R, Paci M, Gualerzi CO, Boelens R (1997) The structure of the translational initiation factor IF1 from *E. coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J* 16: 1436-1443.
- Shumway LK, Weier TE (1967) Chloroplast structure of *iojap* maize. *Amer J Bot* 54: 773-780.
- Simpson DJ, Wettstein D von (1980) Macromolecular physiology of plastids XIV. *Viridis* mutants in barley: genetic, fluoroscopic and ultrastructural characterisation. *Carlsberg Res Commun* 45: 283-314.

- Smillie R, Henningsen KW, Bain JM, Critchley C, Fester T, Wettstein D von (1978) Mutants of barley heat-sensitive for chloroplast development. *Carlsberg Res Commun* 43: 351-364.
- Stern DB, Higgs DC, Yang J (1997) Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci* 2 (8): 308-315.
- Stöckel J, Oelmüller R (2004) A novel protein for photosystem I biogenesis. *J Biol Chem* 279 (11): 10243-10251.
- Stöckel J, Bennewitz S, Hein P, Oelmüller R (2006) The evolutionarily conserved tetratricopeptide repeat protein pale yellow green7 is required for photosystem I accumulation in *Arabidopsis* and copurifies with the complex. *Plant Physiol* 141: 870-878.
- Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* 421: 79-83.
- Stummann BM, Veierskov B, Jacobsen SE, Henningsen KW (1980) Two temperature-sensitive photosystem II mutants of pea. *Physiol Plant* 49: 135-140.
- 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, Sugiura M (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol Biol* 32: 315-326.
- Sugiura M, Hirose T, Sugita M (1998) Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu Rev Genet* 32: 437-459.
- Susek RE, Chory J (1992) A tale of two genomes: role of a chloroplast signal in coordinating nuclear and plastid genome expression. *Aust J Plant Physiol* 19: 387-399.
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *PNAS USA* 87: 8526-8530.
- Takahashi Y, Goldschmidt-Clermont M, Soen S-Y, Franzén LG, Rochaix J-D. (1991) Directed chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: insertional inactivation of the *psaC* gene encoding the iron sulfur protein destabilizes photosystem I. *EMBO J* 10: 2033-2040.
- Takeuchi TS, Thornber JP (1994) Heat-induced alterations in thylakoid membrane protein composition in barley. *Aust J Plant Physiol* 21: 759-70.
- Taylor WC, Barkan A, Martienssen RA (1987) Use of nuclear mutants in the analysis of chloroplast development. *Dev Genet* 8: 305-320.

- Thompson D, Walbot V, Coe EH, Jr. (1983) Plastid development in *iojap*-and chloroplast mutator-affected maize plants. *Amer J Bot* 70: 940-950.
- Tsuchiya T (1987) Gene analysis and linkage studies in barley. *Barley Genetics V*: 175-187.
- Vogel J, Börner T, Hess WR (1999) Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in the three higher plant mutants. *Nucleic Acids Res* 27 (19): 3866-3874.
- Vothknecht UC, Westhoff P (2001) Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1541: 91-101.
- Walbot V, Coe EH, Jr. (1979) Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. *PNAS USA* 76: 2760-2764.
- Waters M, Pyke K (2005) Plastid development and differentiation. In: *Annual Plant Reviews, Vol. 13, Plastids, Chapter 2*, SG Møller (Ed.), Blackwell Publishing Ltd., pp. 30-59.
- Wettstein D von, Kristiansen K (1973) Stock list for nuclear gene mutants affecting the chloroplast. *Barley Genet Newslett* 3: 113-117.
- Wilson KE, Ivanov AG, Öquist G, Grodzinski B, Sarhan F, Huner NPA (2006) Energy balance, organellar redox status, and acclimation to environmental stress. *Can J Bot* 84: 1355-1370.
- Wollman F-A, Minai L, Nechushtai R (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1411: 21-85.
- Woodson JD, Chory J (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet* 9 (5): 383-395.
- Yeh KC, To KY, Sun SW, Wu MC, Lin TY, Chen CC (1994) Point mutations in the chloroplast *16S rRNA* gene confer streptomycin resistance in *Nicotiana glauca*. *Curr Genet* 26: 132-135.