

UCH-FC
Biotecnología
M 828
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

DIRECTOR DE MEMORIA:
DRA. LEE MEISEL
LABORATORIO DE GENETICA MOLECULAR VEGETAL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS

**MOVIMIENTO DEPENDIENTE DE LUZ DE
PLASTIDIOS, MITOCONDRIAS Y NÚCLEO EN
CÉLULAS VEGETALES**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



ANDREA MARISEL MORALES ANABALÓN
SANTIAGO DE CHILE, Agosto 2003



“MOVIMIENTO DEPENDIENTE DE LUZ DE PLASTIDIOS, MITOCONDRIAS Y NUCLEO EN CÉLULAS VEGETALES”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

SRTA. ANDREA MARISEL MORALES ANABALON

Directora de Memoria de Título
Dra. Lee Ann Meisel

Handwritten signature of Lee Ann Meisel in blue ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Miguel Allende Connelly
Presidente de la Comisión

Handwritten signature of Miguel Allende Connelly in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Víctor Argandoña Cortés

Handwritten signature of Víctor Argandoña Cortés in blue ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Agosto_____2003.

A mis dos madres

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a muchas personas al momento de finalizar este trabajo, cada una de ellas sabrá porque se encuentra en esta lista.

Dra. Lee Meisel, Dr. Herman Silva, Dr. Ariel Orellana, Dra. Liliana Cardemil y Dr. Victor Argandoña.

Anita, Consuelo, Daniela, Rodrigo y Carolinas.

Lorenas, Francisca, Alex, Polo, Andrés, Marcelo, Roberto, Susana, Viviana, Ricardo y Armando.

A mi familia

También quiero agradecer especialmente a la fábrica Cemento Melón, por creer en mí y brindarme ayuda económica para desarrollar mis estudios.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiii
1 INTRODUCCION	1
1.1 Fotorreceptores en plantas	2
1.2 Movimiento de organelos	7
1.3 Proteína fluorescente Verde	9
1.4 Hipótesis	11
1.5 Objetivo General	11
1.6 Objetivos Específicos	11
2 MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1 Material microbiológico y condiciones de cultivo	12
2.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento	12
2.2.1 Crecimiento de tabaco y Arabidopsis en tierra	12
2.2.2 Crecimiento de Arabidopsis en condiciones estériles	13
2.3 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	14

2.4	Transformación de <i>E.coli</i> DH5 α	15
2.5	Extracción de ADN Plasmidial (Miniprep de 10 minutos)	16
2.6	Digestión con endonucleasas de restricción	16
2.7	Electroforesis en geles de agarosa	17
2.8	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	17
2.9	Ligación de fragmentos de ADN	17
2.10	Diseño de vectores para marcar plastidios, mitocondrias y núcleo con proteínas fluorescentes	18
2.10.1	Clonamiento de los genes que codifican para proteínas fluorescentes (amarilla y cyan) en vectores de expresión en plantas	22
2.10.2	Clonamiento del gen que codifica para el péptido señal de RecA río arriba de los genes que codifican para las proteínas fluorescentes (amarilla y cyan)	24
2.10.3	Clonamiento del gen que codifica para la proteína fluorescente roja río abajo del gen que codifica para el péptido de RecA	25
2.10.4	Clonamiento del gen que codifica para el péptido señal de CoxIV fusionado al gen que codifica para la proteína fluorescente (amarilla y cyan)	25
2.11	Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium</i>	28
2.12	Transformación de <i>Agrobacterium</i>	28
2.13	Transformación de epidermis de cebolla mediante biobalística	29

2.14	Infiltración de hojas de tabaco con <i>Agrobacterium</i>	29
2.15	Transformación de <i>Arabidopsis</i> mediante inmersión floral	30
2.16	Selección de semillas transformadas, determinación de la eficiencia de transformación y del número de inserciones de T-ADN	31
2.17	Visualización de las diferentes proteínas fluorescentes dirigidas a distintos organelos	32
2.17.1	Visualización de organelos en catáfilos de cebolla	32
2.17.2	Visualización de plastidios, mitocondrias y núcleo en epidermis de tabaco	32
2.18	Estudio del comportamiento de plastidios, mitocondrias y núcleo en respuesta a luz de distintas longitudes de onda	33
3	RESULTADOS	36
3.1	Diseño de un sistema para evaluar el comportamiento de plastidios, mitocondrias y núcleo frente a luz de diferentes longitudes de onda	36
3.1.1	Construcción de vectores para transformación de tejidos vegetales	36
3.1.2	Visualización de plastidios, mitocondrias y núcleo en catáfilos de cebolla	39
3.1.3	Visualización de plastidios, mitocondrias y núcleo en epidermis de tabaco	43

3.2	Estudio del movimiento evasivo de plastidios, mitocondrias y núcleo en respuesta a luz de distintas longitudes de onda	46
3.3	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
4	DISCUSIÓN	54
5	CONCLUSIONES	60
6	BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Espectros de excitación-emisión de proteínas fluorescentes	10
Figura 2:	Vectores de expresión en plantas	18
Figura 3:	Secuencia de los genes que codifican para los péptidos señales que dirigen proteínas a mitocondrias y plastidios en plantas	21
Figura 4:	Vectores para obtener genes de proteínas fluorescentes	22
Figura 5:	Partidores para amplificar <i>RecA</i>	25
Figura 6:	Partidores utilizados para el clonamiento de C/YFP fusionadas a <i>coxIV</i>	27
Figura 7:	Esquemas de irradiación de la luz sobre los distintos organelos ..	35
Figura 8:	Vectores de expresión en plantas que codifican para proteínas fluorescentes dirigidas a plastidios, mitocondrias o sin destinación	38
Figura 9:	Imágenes de epifluorescencia de catáfilos de cebolla que acumulan proteínas fluorescente en distintos organelos	42
Figura 10:	Imágenes de epidermis de tabaco que acumulan proteínas fluorescentes en distintos compartimientos celulares	45
Figura 11:	Velocidad de evasión de plastidios mitocondrias y núcleo frente a luz de diferentes longitudes de onda	49
Figura 12:	Respuesta de plastidios, mitocondrias y núcleo a luz de diferentes longitudes de onda	50
Figura 13:	Plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que acumulan la proteína fluorescente amarilla en las mitocondrias	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Filtros de microscopio de epifluorescencia utilizados en este trabajo	34
Tabla 2:	Vectores diseñados y construidos para la transformación de tejidos vegetales con distintas proteínas fluorescentes	37
Tabla 3:	Vectores utilizados para transformar catáfilos de cebolla por biobalística.....	40
Tabla 4:	Vectores utilizados para la transformación de epidermis de tabaco mediante agroinfiltración	43
Tabla 5:	Eficiencia de transformación.....	51
Tabla 6:	Proporción de plantas resistentes: sensibles a kanamicina en la segunda generación de autocruce de plantas transformadas	52

ABREVIATURAS

Amp^R Secuencia que codifica para el gen que otorga resistencia a ampicilina en bacterias

ATP Adenosina trifosfato

CoxIV Secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína citocromo oxidasa IV de *Saccharomyces cerevisiae* y también se denomina así al péptido.

cry1 Gen de CRY1 mutado

CRY1 Proteína cryptocromo 1

cry2 Gen de CRY2 mutado

CRY2 Proteína cryptocromo 2

DMSO Dimetilsulfoxido

dNTPs Mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)

DsRed Proteína fluorescente roja

ECFP Proteína fluorescente cyan

EDTA Ácido etilendiamino tetra-acético

EGFP Proteína fluorescente verde

EYFP Proteína fluorescente amarilla

FAD Flavina adenina dinucleotido

FMN Flavina mononucleotido

GUS β -glucuronidasa

LB Extremo izquierdo del T-ADN del plasmidio Ti de *Agrobacterium*

LexA Secuencia que codifica para el factor de transcripción LexA y también la proteína.

LOV dominios proteicos regulados por luz, oxígeno y voltaje

MES Ácido 2-N morfoino etanosulfónico

MS Mezcla de sales Murashige & Skoog

NaAc Acetato de sodio

NLS secuencia de destinación al núcleo

NOST Terminador de la transcripción del gen nopalina sintetasa

Nph1 gen que codifica para fototropina 1

NPH1 Proteína non photosintetic hypocotyl response 1 (PHOT1)

Npl1 gen que codifica para fototropina 2

NPL1 Proteína non photosintetic hypocotyl response like 1 (PHOT2)

NPTII Secuencia que codifica para el gen que otorga resistencia a kanamicina, en plantas y bacterias

Ori Origen de replicación de plasmidios en bacterias

P35S Promotor constitutivo en plantas derivado del virus del mosaico de la coliflor 35S

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

Pfr conformación de fitocromos que absorbe luz roja lejana

PHOT1 proteína fototropina1 (NPH1)

PHOT2 proteína fototropina2 (NPL1)

PHY proteína fitocromo

PIPES Titerazina-N-N'bis (2-ácido etanosulfónico)

Pr Conformación de fitocromos que absorbe luz roja

RB Extremo derecho del T-ADN del plasmidio Ti de *Agrobacterium*

RecA Secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína recombinasaA de *Arabidopsis thaliana* y también se denomina así al péptido.

SDS Dodecil sulfato de sodio

TRIS (hidroximetil)-aminometano

UV-A Luz ultravioleta en el rango 350-400nm

UV-B luz ultravioleta en el rango 290-350nm

RESUMEN

A diferencia de los animales las plantas no pueden desplazarse para responder a los estímulos que constantemente reciben del entorno. No obstante, las plantas han desarrollado numerosos procesos a nivel celular que buscan aprovechar estímulos favorables y evadir estímulos adversos. Entre las señales que diariamente reciben los vegetales uno de los más estudiados es la energía radiante. Frente a la luz, las plantas germinan, desarrollan su tejido foliar, abren sus flores, sintetizan pigmentos como la clorofila, realizan fotosíntesis, principal fuente energética de la planta, etc.

A pesar de lo anterior, la luz no siempre es beneficiosa para los vegetales. Se ha demostrado que a altas intensidades produce daños principalmente a nivel de la maquinaria fotosintética presente en los cloroplastos; por eso estos organelos se mueven dentro de la célula vegetal evadiendo la luz azul de alta intensidad, fenómeno conocido como respuesta de evasión a la luz, que les permite minimizar el fotodaño. También es conocido que longitudes de onda muy pequeñas, en el rango de la luz UV, producen mutaciones en el material genético, las plantas mediante el movimiento de los organelos pueden evitar el daño en el ADN.

En este trabajo analizamos la respuesta de los tres organelos con genoma que hay en la célula vegetal (plastidios, mitocondrias y núcleo) frente a estímulos de luz de diferentes longitudes de onda, durante periodos determinados e intensidad constante. Para visualizar los organelos utilizamos la tecnología de las proteínas fluorescentes, que se excitan en diferentes longitudes de onda del espectro de luz.

Hemos determinado que tanto plastidios como mitocondrias evaden la luz amarilla (520-550nm), la luz UV-A, la luz azul de 426 a 446nm y la luz azul de 465 a 495nm; mientras que el núcleo evade la luz UV-A y la luz azul de 426 a 446nm. Ninguno de estos tres organelos responde a la luz verde (500-520nm). Al comparar estas longitudes de onda con las utilizadas para excitar las proteínas fluorescentes, encontramos que las longitudes de onda utilizadas para excitar las proteínas fluorescentes cian (CFP), verde (GFP) y roja (DsRed) son las mismas que producen una respuesta evasora de plastidios, mitocondrias y núcleo, por lo tanto, es importante tener en cuenta que resultados obtenidos con este tipo de proteínas puede estar afectado por la manera de observarlas. Hemos demostrado que la única proteína fluorescente que permite el análisis del movimiento es la proteína fluorescente amarilla (YFP), que utiliza luz verde para excitarse.

SUMMARY

Unlike animals, plants cannot move to respond to environmental stimuli. For this reason, plants have developed many processes at the cellular level that allow them to benefit from favorable stimuli while evading adverse stimuli. One of the stimuli most studied in plants is the light. In the light, plants germinate, develop leaves, synthesize chlorophyll, perform photosynthesis, etc.

But this light is not always beneficial for the plants. It has demonstrated that light of high intensities produces damage to the photosynthetic machinery of the chloroplasts. The chloroplasts display a type of movement, known as avoidance response, that allows them to diminish the negative effects of high light intensities. It is known that short wavelengths of light, in the range of UV, produce mutations in the genome. Organelle movement helps to avoid DNA damage.

The present work analyzes the avoidance response of the three organelles that there is in plants (plastids, mitochondria and nucleus) to stimuli of different light wavelengths. In order to visualize the organelles we have used fluorescent proteins that are excited at different wavelengths of light. During this analysis we have determined that plastids, mitochondria and nuclei display an avoidance response to UV-A and blue light (426-446nm). At higher blue light wavelength (465-495nm) and yellow light (520-550nm) only the plastids and mitochondria display an avoidance response, whereas organelles don't display an avoidance response to green light (500-520nm).

Analyzing the wavelengths that affect organelles avoidance response and comparing them with the light necessary to excite the different fluorescent proteins, the light that is used to excite the fluorescent protein (cyan, green and red) produce an organelle avoidance response. Therefore we conclude that it is important to consider that results obtained of bearing with these types of proteins can be affected by light used for observation. We have demonstrated that under our experimental conditions, the only fluorescent protein that appears to be optimal for the analysis of movement is the yellow fluorescent protein, that is excited by light green.

1 INTRODUCCION

Las plantas y animales están sometidos a estímulos abióticos (luz, temperatura, lluvias, etc.) y bióticos (parásitos, patógenos, etc.) que constantemente les presenta su entorno. Cuando estos estímulos impiden el normal desarrollo de los seres vivos, hablamos de estímulos estresantes. Frente a ellos, una planta o un animal puede responder, ya sea, contrarrestándolos o evadiéndolos. Por el contrario, existen estímulos que son vitales para el desarrollo de los seres vivos y frente a éstos también es necesario responder.

Las plantas a diferencia de los animales no pueden desplazarse frente a un estímulo determinado, por lo tanto, han desarrollado diferentes mecanismos que les permiten responder en forma adecuada. Por ejemplo, frente a la luz, principal fuente de energía para las plantas, éstas presentan muchas respuestas diferentes de acuerdo al estado de desarrollo en que se encuentren, por ejemplo, una planta recién germinando al verse enfrentada a la luz, deja de elongar el hipocotilo, expande los cotiledones y comienza a desarrollar los cloroplastos para hacer la fotosíntesis, en un proceso conocido como fotomorfogénesis, luego las hojas van a crecer en dirección de la luz para optimizar los procesos fotosintéticos (Lin 2000). Otras funciones que dependen de la luz son: el control del fotoperíodo (Briggs y Huala 1999), tiempo de floración, fototropismos, regulación del ritmo circadiano y apertura de estomas (Kinoshita y cols 2001). Debido a su naturaleza sesil, las plantas constantemente se adaptan a los cambios de calidad, cantidad y dirección de

luz. La mayoría de los estudios fisiológicos sobre la respuesta de las plantas a la luz han sido realizados sobre luz azul y roja. Al nivel celular se conoce la existencia de receptores de luz que inician las distintas respuestas.

1.1 Fotorreceptores en plantas

Los fotorreceptores que se conocen actualmente responden a luz azul, ultravioleta-A (UV-A) y luz roja/roja lejana. Entre los receptores que responden a la luz azul están los criptocromos (Gressel 1979), que son proteínas con homología a enzimas reparadoras de daños causados por la luz en bacterias (ADN fotoliasa). Se conoce dos criptocromos, criptocromo 1 (CRY1) y criptocromo 2 (CRY2), siendo este último regulado negativamente por la luz azul. Estos fotorreceptores participan en los procesos mencionados de fotomorfogénesis y su función ha sido estudiada en *Arabidopsis thaliana* (Ahmad y cols 1998).

Se ha determinado que CRY1 es una proteína de 681 aminoácidos (Ahmad y cols 1998) que se localiza en el núcleo y se expresa más o menos constitutivamente (Lin y cols 1996). CRY1, como ya se mencionó, presenta un 30% de identidad en su secuencia aminoacídica con una enzima ADN fotoliasa bacteriana (Sancar 1994). Sin embargo, la purificación de CRY1, desde bacterias donde ha sido clonado el gen, no presenta actividad *in vitro* en procesos de reparación del ADN. Por lo tanto el rol de CRY1 en plantas sería distinto al de reparar daños en el ADN (Lin y cols 1995, Malhotra 1995). Se ha

demostrado que CRY1 se une a dos cromóforos, FAD (flavina adenina dinucleótido) y pterina que responden a luz azul y luz UV-A respectivamente (Lin y cols 1995, Malhotra 1995, Ahmad y cols 2002). Análisis de plantas mutantes *cry1* han demostrado que este fotorreceptor participa en la respuesta a luz azul y a luz UV-A. Al nivel fisiológico, las respuestas inducidas por CRY1 incluyen la inhibición de la elongación del hipocotilo en respuesta a la luz de 380nm a 500nm, especialmente a altas intensidades (Ahmad y cols 2002)

CRY2 es una proteína que presenta una homología del 78% al nivel aminoacídico con CRY1, se descubrió en una búsqueda en genotecas de cADN utilizando una sonda de *Cry1* (Lin y cols 1998, Hoffman y cols 1996). La proteína CRY2 es degradada en presencia de luz azul (Lin y cols 1998, Ahmad y cols 1998), sus funciones se sobreponen con las de CRY1, produciéndose variaciones muy finas como la intensidad de la luz a la que se expone la planta (Ahmad y cols 1998). CRY2 es una proteína que se localiza en el núcleo (Cashmore y cols 1999, Guo y cols 1999, Kleiner y cols 1999), participa en los procesos de de-etiolación de plántulas en respuesta a la luz azul y también esta implicada en regular el tiempo de floración (Lin y cols 1998).

Para analizar la existencia de otros fotorreceptores implicados en la respuesta de inhibición de la elongación del hipocotilo en respuesta a la luz se construyeron plantas de *Arabidopsis* mutantes en ambos genes (*cry1cry2*), demostrándose que sólo CRY1 y CRY2 están regulando esta respuesta, mientras otros fotorreceptores como los fitocromos estarían participando más

abajo en la cascada de señalización de la respuesta, ya que además hay evidencias de interacción entre CRY2 y los fitocromos *in vivo* e *in vitro* (Ahmad y cols 1998).

El estudio de la respuesta de los criptocromos frente a la longitud de onda de excitación, ha demostrado que presentan dos picos, uno cercano a 420nm, que se corresponde a la excitación del cromóforo pterina y otro a 450nm, longitud de onda de excitación de FAD, el otro cromóforo presente en los criptocromos (Ahmad y cols 2002). Además recientemente se ha demostrado que al utilizar luz monocromática, la proteína CRY2 no es degradada con luz de 400nm, 450nm y 500nm, lo que se contrapone con que esta proteína se degrada en luz azul de un amplio espectro de longitud de onda (Ahmad y cols 2002).

Otro tipo de fotorreceptores que se conoce son proteínas denominadas fototropinas. Las fototropinas son flavoproteínas que en presencia de luz azul se fosforilan, activando de esta manera una cascada de señalización en la cual estaría implicada la liberación de calcio al citoplasma, que culminaría en las respuestas que presentan las plantas a la luz azul (Stoelzle y cols 2003). Estas proteínas fueron descubiertas haciendo búsquedas en plantas mutantes de *Arabidopsis*, donde se encontró un mutante *nph1* (non phototropic hypocotyl 1) que presentaba un fenotipo de pérdida de la respuesta fototrópica frente a luz azul (Liscum y Briggs 1995).

Este fotorreceptor, NPH1, ahora también denominado PHOT1 (phototropin1) es una proteína de 120kDa , que se encuentra asociada a la membrana plasmática (Huala y cols 1997) y contiene en el carboxilo terminal un dominio serina/treonina kinasa, en el amino terminal presenta dos dominios repetidos de 110 aminoácidos que son dominios conservados entre proteínas reguladas por luz, oxígeno y voltaje, denominados LOV1 y LOV2 donde se unen no covalentemente dos moléculas del cromóforo flavina mononucleótido (FMN). Durante el proceso de excitación con luz azul estos cromóforos se unen a la proteína, lo que produce un cambio conformacional que activa la actividad kinasa presente en ella, produciéndose autofosforilación, que inicia una vía de transducción de señales para la luz azul (Kagawa y cols 2001). Entre las funciones descritas para NPH1 se encuentra mediar la apertura estomática (Kinoshita y cols 2001) y dirigir los cloroplastos hacia la luz, que se conoce como respuesta de acumulación de estos organelos, lo que les permite captar la luz para realizar los procesos fotosintéticos (Sakai y cols 2001). También, como ya se mencionó, este fotorreceptor participa de la respuesta fototrópica de las plantas a la luz azul (Sakai y cols 2001).

Otra fototropina, descrita por homología a NPH1, es NPL1 (non phototropic hypocotyl like 1), actualmente renombrada fototropina 2 (PHOT2). PHOT2 es una proteína que presenta las mismas características estructurales que NPH1 (Kagawa y cols 2001, Kinoshita y cols 2001), cuyas funciones son prácticamente las mismas que las de PHOT1. Sin embargo, en la respuesta de

los cloroplastos frente a la luz azul, este fotorreceptor es el encargado de señalizar la presencia de un exceso de ella, produciendo una respuesta evasiva de los cloroplastos, que se alejan de un punto en la célula que se ha excitado con luz azul de alta intensidad, con el objeto de evitar daños en los complejos fotosintéticos (Jarillo y cols 2001, Kagawa y cols 2000, Kagawa y cols 2001, Kasahara y cols 2002).

A nivel intracelular, los diferentes organelos responden frente a estos estímulos luminosos, por ejemplo, los cloroplastos se disponen azarosamente dentro de la célula vegetal si la cantidad de luz a la que están sometidos es escasa, respuesta que se atribuye a los fotorreceptores PHOT1 y PHOT2, a diferencia de lo que hacen frente a altas intensidades de luz, donde se ubican ordenadamente y en forma paralela a la dirección de incidencia de la luz, a modo de transmitir la luz y de esa manera evitar la sobreexcitación de la cadena transportadora de electrones, que puede producir especies reactivas dañinas para la célula vegetal (Sakai y cols 2001).

Además de los receptores que son capaces de responder a la luz azul, existen receptores que censan la luz roja y roja lejana, estos son denominados fitocromos. Los fitocromos son una familia de genes y en *Arabidopsis* encontramos *PhyA*, *PhyB*, *PhyC*, *PhyD* y *PhyE* (Vierstra 1993). Estos son fotorreceptores que responden a luz roja-roja lejana. Se sabe que existen dos tipos de fitocromos, de tipo I, que se acumulan en oscuridad y de tipo II, que se acumulan tanto en luz como oscuridad (Gilmartin y cols 1990). Los fitocromos

más estudiados son aquellos codificados por los genes *PhyA*, fitocromo A, que corresponde a fitocromos del tipo I y *PhyB*, fitocromo B, que corresponde a fitocromos del tipo II. Se ha demostrado que las funciones de estos dos receptores son diferentes (Nagatani y cols 1993), mientras la proteína PHYA desencadena la respuesta de inhibición de la elongación del hitpocotilo en respuesta a la luz roja lejana, (Nagatani y cols 1993), PHYB se encarga de iniciar esta misma respuesta, pero bajo condiciones de luz roja y blanca (Reed y cols 1993). Las funciones de los otros fitocromos no están clarificados, sólo se ha demostrado en algunos casos que pueden estar participando de las mismas respuestas. Los fitocromos existen en dos conformaciones fotoconvertibles, las que absorben luz roja (Pr) y las que absorben luz roja lejana (Pfr), sintetizándose la forma Pr, que bajo la estimulación de la luz roja se transforma en Pfr y luz roja lejana reconvierte la proteína a la forma Pr (Shinomura y cols 1994).

1.2 Movimiento de organelos

No solamente los cloroplastos son capaces de moverse dentro de la célula, también se ha descrito el movimiento de otros organelos, por ejemplo, otros plastidios, mitocondrias y núcleo. Utilizando la estrategia de marcar *in vivo* mediante la transformación con la proteína fluorescente verde, se ha visto que las mitocondrias se mueven en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Logan y Leaver 2000) y en células en cultivo de tabaco. Este movimiento es dependiente del citoesqueleto de actina, ya que, al tratar células en cultivo de

tabaco transformadas con la proteína fluorescente verde, con drogas que afectan la dinámica del citoesqueleto de actina (latrunculina B) el movimiento se detiene, a diferencia del tratamiento con colchicina (desestabilizador del citoesqueleto de microtúbulos) que no produce la detención del movimiento de los organelos, aunque la distribución de éstos si se ve afectada (Van Gestel y cols 2002).

También se ha utilizado la estrategia de la proteína fluorescente verde para analizar el movimiento que presenta el núcleo en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, demostrándose que éste también es dependiente de la integridad del citoesqueleto de actina, pero no de microtúbulos, ya que, al tratar las plantas con latrunculina B se observó una detención del movimiento nuclear, mientras que el uso de colchicina no tuvo efectos (Chytilova y cols 2000).

A la fecha nada se ha publicado acerca de la dependencia del movimiento de mitocondrias y núcleo a la luz. Haciendo una homología con los cloroplastos, las mitocondrias también poseen cadenas transportadoras de electrones que se podrían sobreexcitar por la luz. Esto nos hace pensar que es posible que las mitocondrias estén entonces respondiendo a la luz, para evitar ser sobreexpuestas. Además, se ha demostrado que longitudes de onda menores al visible, como la luz UV-B, provocan daños en las moléculas de ADN, que posteriormente introducirán mutaciones en el genoma (Ries y cols 2000). Tanto plastidios como mitocondrias y núcleo poseen genomas, se puede esgrimir

como razón para el movimiento el escape éstos organelos al daño producido por la luz de estas longitudes de onda.

Para comprobar esta hipótesis, durante el transcurso de esta tesis se ha trabajado para marcar *in vivo* los organelos con genoma, mediante el uso de la tecnología de proteínas fluorescentes.

1.3 Proteína fluorescente Verde

La proteína fluorescente verde (GFP) es una proteína de la medusa *Aequorea victoria* que tiene la característica absorber luz azul y emitir luz verde sin la utilización de ningún cofactor (Heim y cols 1994, Tsien 1998). Esta proteína ha sido intensamente utilizada para la determinación de la ubicación subcelular de proteínas, mediante la fusión, o la observación de distintos tipos de organelos y su movimiento dentro de células y tejidos (Tirlapur y cols 1999, Hanson. y cols 2001). La GFP es una proteína pequeña, de 27kDa, que permite la fusión a otras proteínas, por cualquiera de sus extremos, ya sea amino o carboxilo terminal, sin variar su capacidad de fluorecer en respuesta a la luz azul. Actualmente existe una gran gama de mutantes de esta proteína, que varían en sus espectros de excitación/emisión de la luz (Figura 1), por ejemplo, la proteína fluorescente cian (CFP) se excita con luz en el rango de los 436nm y emite luz cian (480nm) y la proteína fluorescente amarilla (YFP) se excita con luz verde (510nm) y emite luz amarilla (530nm) (Tsien y cols 1998). Además de la proteína fluorescente verde extraída de la medusa *Aequora victoria*, en la

actualidad existen proteínas fluorescentes con distintos espectros de excitación/emisión que han sido extraídas de otros organismos, como por ejemplo, la proteína fluorescente roja (DsRed2), extraída de corales.

Durante el desarrollo de esta tesis se analizará también la utilidad de las distintas proteínas fluorescentes como marcadores para estudiar la respuesta de plastidios, mitocondrias y núcleo a la luz de distintas longitudes de onda, como una aproximación para encontrar el marcador *in vivo* más inocuo para el tejido en estudios de este tipo.

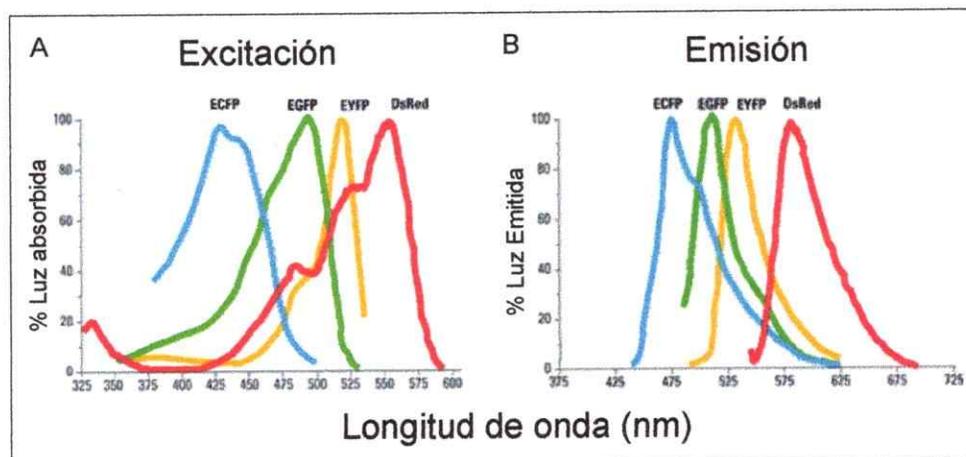


Figura 1: Espectros de excitación-emisión de proteínas fluorescentes.

Los gráficos muestran los espectros de excitación (A) y emisión (B) de las proteínas fluorescentes cyan, en azul (ECFP), verde en verde (EGFP), amarilla (EYFP) y roja (DsRed). Adaptada de www.clontech.com

1.4 Hipótesis

En la célula vegetal el movimiento de plastidios, mitocondrias y núcleo, es inducido por luz de diferentes longitudes de onda.

1.5 Objetivo General

Determinar si plastidios, mitocondrias y núcleo se mueven en respuesta a la luz de diferentes longitudes de onda.

1.6 Objetivos Específicos

1. Diseñar un sistema para evaluar el comportamiento de plastidios, mitocondrias y núcleo frente a estímulos de luz de diferentes longitudes de onda, en tejidos vegetales.
2. Analizar los efectos de la luz de diferentes longitudes de onda sobre el movimiento de plastidios, mitocondrias y núcleo.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material microbiológico y condiciones de cultivo

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron las bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α y *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101

Cultivos líquidos de las bacterias se crecieron en medio LB (bacto triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%) suplementado con él o los antibióticos correspondientes, de acuerdo al experimento realizado (ampicilina 200 μ g/ml, kanamicina 100 μ g/ml, rifampicina 10 μ g/ml, gentamicina 100 μ g/ml). El crecimiento se realizó con agitación constante a 37°C por 16 horas para *E. coli* y a 23°C por 48 horas para *Agrobacterium*. Cultivos en medio sólido se realizaron en placas de LB agar 1,5% durante 16 horas a 37°C para *E. coli* y durante 48 horas a 28°C para *Agrobacterium* (Sambrook y cols 1989).

2.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para los experimentos desarrollados durante esta tesis se utilizaron cebollas (*Allium cepa*), que se obtienen directamente del supermercado al momento de necesitarlas para llevar a cabo los experimentos, tabaco (*Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi NN) y *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia.

2.2.1 Crecimiento de tabaco y *Arabidopsis* en tierra

Las semillas son puestas en vasos de 20ml en una mezcla 3:2 tierra de hoja de litre: vermiculita, previamente esterilizada por calor húmedo durante noventa

minutos. Los vasos que contienen las semillas se dejan por dos días a 4°C, para sincronizar la germinación de éstas, luego de lo cual se ponen a 23°C con ciclos de luz de 16 horas. Alrededor de la segunda semana para *Arabidopsis* y tercera para tabaco, las plantas han germinado. Una vez que aparece la primera inflorescencia en *Arabidopsis*, esta es cortada para permitir que crezcan más inflorescencias, pasados aproximadamente dos meses las plantas son adultas. Las plantas de tabaco deben ser cambiadas a maceteros más grandes pasados un mes de su germinación y al cabo de tres meses son plantas adultas. Estas plantas deben ser sometidas a un régimen de riego de tres veces a la semana, agregando fertilizante si es necesario, lo que depende de la salud que se observa en la planta.

2.2.2 Crecimiento de Arabidopsis en condiciones estériles

Las semillas se esterilizan lavándolas con una solución de etanol 70%, seguido de un lavado con cloro al 37% y tres sucesivos lavados con agua destilada estéril, posteriormente se siembran en placas de 1/2X MS agar pH 5,7 (mezcla de sales Murashige y Skoog 0,22%, tampón MES 0,05%, y agar 0,9%) suplementadas con sacarosa 1% y con 50µg/ml de kanamicina como medio selectivo. Las placas se colocan a 4°C en oscuridad por 48 horas, para sincronizar la germinación, luego se ponen a 23°C con ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad por 7 a 10 días. Pasado este tiempo las plantas que han crecido en el medio selectivo deben ser traspasadas a tierra, para ello se colocan en vasos de 20ml que contienen una mezcla de tierra de litro :

vermiculita estéril (esterilizada con calor húmedo por 90 minutos) en una proporción 3:2 muy húmeda y se traspasan a una cámara de crecimiento manteniendo las condiciones de luz y temperatura descritas previamente, con régimen de riego de tres veces por semana, hasta obtener semillas, lo que dura aproximadamente dos meses.

2.3 Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

El método utilizado es el descrito por Inoue (1991), que consiste en crecer un cultivo pequeño (3ml) de *E. Coli* DH5 α en medio LB, durante 16 horas a 37°C con agitación constante, 1ml de este cultivo se utiliza como preinóculo de un cultivo de 250ml que se crece a 23°C con agitación constante hasta una densidad óptica (D.O.) de 0.6 a 600 nm. Alcanzada esta D.O.₆₀₀, el cultivo se enfría por 10 minutos en hielo y se centrifuga a 2500g por 10 minutos a 4°C. El pellet, donde se encuentran las bacterias es resuspendido en 80ml de tampón TB frío a pH 6,7 (Pipes 10mM, CaCl₂ 15mM, KCl 250mM), donde se incuba por 10 minutos en hielo y se centrifuga nuevamente a 2500g por 10 minutos a 4°C. El pellet bacteriano se resuspende en 20mL de tampón TB frío, se agrega DMSO a una concentración final de 7% y se alícuota en tubos de 1,5ml preenfriados, en volúmenes de 200 μ l. Las alícuotas se congelan en nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C hasta su uso.

2.4 Transformación de *E.coli* DH5 α

El método de transformación utilizado también ha sido descrito por Inoue (1991) y consiste en mezclar 50 μ l de células competentes (Inoue), que han sido previamente descongeladas en hielo, utilizando entre 0,5 y 2 μ l de un vector de interés, ya sea proveniente de una ligación o una preparación mediante extracción desde bacterias. Esta mezcla se deja en hielo por 30 minutos y posteriormente se pone a 37°C por 5 minutos, luego de los cuales se vuelve a poner en hielo por otros 5 minutos. Se agrega 1ml de medio de crecimiento LB, y se dejan proliferar por 1 hora a 37°C, pasado este tiempo, se centrifuga la suspensión a 10000g por 1 minuto, se descarta el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 μ l para permitir la resuspensión de las bacterias, estas se siembran en placas de LB-agar que contienen un antibiótico de selección pertinente al vector en uso.

2.5 Extracción de ADN Plasmidial (Miniprep de 10 minutos)

Bacterias que contienen el vector de interés, crecidas en medio líquido a partir de una colonia única fueron centrifugadas a 10000g por 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante, dejando 50µl aproximadamente para resuspender las células, luego se agregó 300µl de TENS (Tris-HCl pH 7,4 10mM, EDTA pH 8,0 1mM, NaOH 0,1N, SDS 0,5%) y se agitó en vórtex por 5 segundos. Posteriormente se agregó 150µl de NaAc pH 4,7 3M y se agitó nuevamente en vórtex. Se centrifugó a 10000g por 2 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se mezcló con 900µl de etanol 100% a temperatura ambiente (por inversión del tubo, 3 veces) y se centrifugó a 10000g por 2 minutos. El pellet se lavó con etanol 80% preenfriado a -20°C, luego éste se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua con RNAsa 10µg/ml, dejándolo a 37°C por 30 minutos y se almacenó a -20°C. (modificado de Zhou y cols 1990).

2.6 Digestión con endonucleasas de restricción

Aproximadamente 500ng de ADN son digeridos en un volumen final entre 10 y 20µl, con 1 a 5 unidades de enzima, agregando el tampón correspondiente y dejando por 2 horas a 37°C o a la temperatura recomendada para la enzima.

2.7 Electroforesis en geles de agarosa

Geles de agarosa entre 0,8-1% se hicieron en tampón TBE 0,5X (Tris 450mM, EDTA pH 8,0 1mM, ácido bórico 0,2%) y 0,5µg/ml de bromuro de etidio y se corrieron en cámaras BIORAD, en el mismo tampón a un voltaje de 50V o 100V por 30 a 60 minutos. Las muestras para ser cargadas en el gel se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25%, "xylene cyano" 0,25% y glicerol 30% en agua). Volúmenes entre 1 y 20µl de cada muestra se corrieron en los distintos geles.

2.8 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Entre 10 y 100pg de ADN se mezclaron con 100ng de cada uno de los partidores, dNTPs 2mM, MgCl₂ o MgSO₄ 2mM, 1 a 5 unidades de enzima (Taq Polimerasa o Pfu polimerasa) en el tampón correspondiente en un volumen final de 25 o 100µl dependiendo del experimento. Se utilizó un termociclador MJ Research INC. modelo PTC-100TM.

2.9 Ligación de fragmentos de ADN

Las ligaciones se realizaron agregando una cantidad de inserto tres veces mayor que la cantidad de vector, siendo aproximadamente la cantidad de vector entre 10 y 50ng, en un volumen final de 5µl, con el tampón apropiado, 2 unidades de T4 ADN ligasa y 0,5µl de ATP 100mM. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo durante 16 horas a 16°C, en un baño de agua.

2.10 Diseño de vectores para marcar plastidios, mitocondrias y núcleo con proteínas fluorescentes

Para marcar las mitocondrias y plastidios con proteínas fluorescentes (amarilla, cian y roja), se diseñaron estrategias para transformar tejidos vegetales por distintos mecanismos, con los genes que codifican para estas proteínas destinados a los organelos.

Se utilizaron para lograr este objetivo vectores que poseen secuencias que permiten la expresión de proteínas en tejidos vegetales, como son pBI221, pBI121 y pEL103 (figura 2).

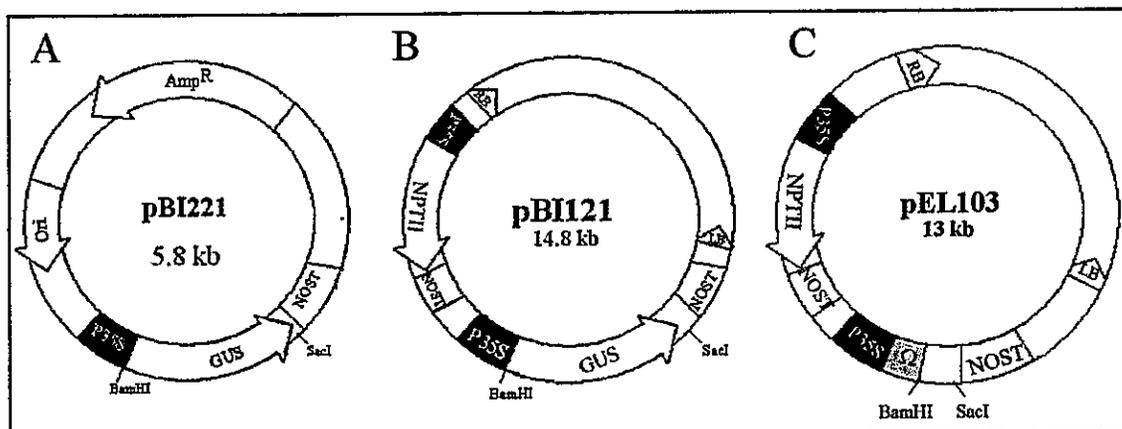


Figura 2: Vectores de expresión en plantas.

Estos vectores se utilizan para clonar las proteínas fluorescentes y dirigirlas a plastidios y mitocondrias en plantas. **A** pBI221, este vector se puede utilizar para transformar tejidos vegetales mediante bombardeo de partículas de ADN, presenta un promotor 35S, seguido del gen GUS y un terminador de la nopalina sintetasa y otorga resistencia a ampicilina **B** y **C** Vectores binarios, que poseen una región que se inserta en el genoma de la planta transformada, al utilizar *Agrobacterium*. Esta región es la que se ubica entre los extremos RB y LB, donde se encuentra el gen que otorga resistencia a kanamicina en las plantas seguido del promotor 35S-GUS- terminador NOS en pBI121 y promotor 35S-secuencia omega-terminador NOS en pEL103.

El vector pBI221 (figura 2A) es un vector que tiene como base el vector pUC19, donde se ha integrado la secuencia del promotor del virus del mosaico de la

coliflor (P35S), que permite la expresión constitutiva de genes que se encuentran bajo su regulación en tejidos vegetales, seguido del gen que codifica para la enzima β -glucoronidasa y río abajo de éste se encuentra la secuencia que codifica para el terminador de la nopalina sintetasa. Este es un vector que se utiliza para la transformación de tejidos vegetales mediante el bombardeo de partículas de ADN, el que puede integrarse en el genoma del tejido transformado, o bien quedar como plasmidio en la célula, pero de todas maneras permitir la expresión de los genes que lleva por un período de tiempo al menos. A partir de tejidos transformados por este mecanismo es posible obtener plantas transgénicas, pero en nuestro caso solo se utilizará como un método de expresión transiente.

El vector pBI121 (figura 2B) es un vector binario, es decir, puede replicarse en dos sistemas distintos, en este caso en *E.coli* y *Agrobacterium*. pBI121 tiene como base parte del vector pBIN19, en donde se integró un fragmento que posee una secuencia de ADN flanqueada por los extremos repetidos invertidos (RB y LB) que utiliza *Agrobacterium* para insertar el fragmento de ADN ubicado entre estos extremos en el genoma de la planta que infecta. Entre los extremos repetidos invertidos (RB y LB) se encuentra el gen de la nopalina sintetasa que aporta resistencia al antibiótico kanamicina, bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (P35S), este gen se utiliza como marcador de selección para las plantas que sean transformadas utilizando este vector o derivados de él. Además se encuentra otra secuencia promotora 35S seguida

de la secuencia que codifica para el gen de la β -glucuronidasa y río abajo de ésta, la secuencia del terminador de la nopalina sintetasa. Con este vector se transforma *Agrobacterium* y mediante éste se transforman tejidos vegetales, Existiendo distintos protocolos que producen tejidos vegetales transformados, los que pueden dar origen a plantas transgénicas, pero también es posible utilizar este método como un método de transformación transiente.

pEL103 (figura 2C) es un vector binario derivado del vector pBI121, al que se ha extraído el gen que codifica para la β -glucoronidasa y en su lugar se ha insertado la secuencia de una región potenciadora de la transcripción (omega Ω).

Para dirigir las proteínas fluorescentes a los plastidios se utilizó la propiedad que presentan las células vegetales de sintetizar proteínas que son codificadas en el núcleo y ser destinadas a estos organelos, así se encontró que existen secuencias que codifican para péptidos capaces de dirigir proteínas a los plastidios. La secuencia utilizada para este trabajo corresponde a la secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína RecA (recombinasaA) (figura 3A), que es una proteína homóloga a la proteína recombinasaA de bacterias y que se ha demostrado, es capaz de dirigir otras proteínas fusionadas a él, a los plastidios (Cerutti y cols 1992).

Para dirigir las proteínas fluorescentes a mitocondrias se hizo uso de un método similar al utilizado para plastidios, en este caso se utilizó la secuencia que

codifica para el péptido señal de la proteína citocromo oxidasa IV (figura 3B), que se ha demostrado es capaz de dirigir otras proteínas fusionadas a él, a las mitocondrias. (Kohler y cols 1997)

A	RecA
1	atggattcac agctagtctt gtctctgaag ctgaatccaa gcttcactcc
51	tctttctcct ctcttccctt tcactccatg ttctttcttt tcgccgtcgc
101	tccggttttc ttcttgctac tcccgccgcc tctattctcc ggttaccgtc
151	tacgccgcga agaaactctc ccacaaaatc agttctgaat tcgatgacag
201	aatcaacggc gctctctctc ccgacgctga ttcccgttcc ctcgaccgcc
251	aaaaggcttt agaggcagct atgga
B	CoxIV
1	atggtgtcac tacgtcaatc tataagattt ttcaagccag ccacaagaac
51	tttgtgaagc tctagatata tgcttcagca aaaaccgaa

Figura 3: Secuencia de los genes que codifican para los péptidos señales que dirigen proteínas a mitocondrias y plastidios en plantas.

A Secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína Recombinasa A (RecA) de *Arabidopsis thaliana* y es capaz de dirigir proteínas fusionadas a él hasta los plastidios. **B** Secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína citocromo oxidasa IV de *Saccharomyces cerevisiae* y es capaz de dirigir proteínas fusionadas a él a las mitocondrias en plantas.

Para marcar el núcleo se utilizó un vector donado por Naohiro Kato (pNK607), que tiene como base el vector pEL103, donde se insertó el fragmento que contiene la secuencia que codifica para YFP fusionada a la secuencia que codifica para un represor de la transcripción bacteriano denominado LexA y una secuencia NLS, de destinación al núcleo (Kato y cols 2002).

codifica para el péptido señal de la proteína citocromo oxidasa IV (figura 3B), que se ha demostrado es capaz de dirigir otras proteínas fusionadas a él, a las mitocondrias (Kohler y cols 1997).

```
A RecA
  1 atggattcac agctagtctt gtctctgaag ctgaatccaa gcttcaactcc
  51 tctttctcct ctcttccctt tcactccatg ttctttcttt tcgccgctgc
 101 tccggttttc ttcttgctac tcccgccgcc tctattctcc ggttaccgtc
 151 tacgccgcga agaaactctc ccacaaaatc agttctgaat tcgatgacag
 201 aatcaacggc gctctctctc ccgacgctga ttcccgcttc ctcgaccgcc
 251 aaaaggcttt agaggcagct atgga

B CoxIV
  1 atggtgtcac tacgtcaatc tataagattt ttcaagccag ccacaagaac
  51 tttgtgaagc tctagatata tgcttcagca aaaaccgaa
```

Figura 3: Secuencia de los genes que codifican para los péptidos señales que dirigen proteínas a mitocondrias y plastidios en plantas.

A Secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína Recombinasa A (RecA) de *Arabidopsis thaliana* y es capaz de dirigir proteínas fusionadas a él hasta los plastidios. **B** Secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína citocromo oxidasa IV de *Saccharomyces cerevisiae* y es capaz de dirigir proteínas fusionadas a él a las mitocondrias en plantas.

Para marcar el núcleo se utilizó un vector donado por Naohiro Kato (pNK607), que tiene como base el vector pEL103, donde se insertó el fragmento que contiene la secuencia que codifica para YFP fusionada a la secuencia que codifica para un represor de la transcripción bacteriano denominado LexA y una secuencia NLS, de destinación al núcleo (Kato y cols 2002).

Los genes que codifican para las proteínas fluorescentes se insertaron entonces en este vector, quedando los genes en orientación contraria al de la β -glucosidasa, del vector. Se utilizó esta estrategia debido a que los extremos que se liberan al digerir con las enzimas XbaI y NheI son compatibles. Posteriormente el vector pBluescript SK+ que contenía los genes de las proteínas fluorescentes fue cortado con las enzimas BamHI y SacI, liberando un fragmento de 712pb, que se insertó en el vector pBI221, dando origen a los vectores pAMA6 y pAMA7 (figura 8F).

Para construir vectores que puedan integrarse en *Agrobacterium* y mediante éste transformar tejidos vegetales se utilizó el vector binario pEL103. Este vector fue digerido con las enzimas XbaI y SacI, donde se insertaron los genes que codifican para las proteínas fluorescentes cian y amarillo, obtenidas desde los vectores pECFP-C1 y pEYFP-C1 (figura 4), que previamente habían sido digeridos con las enzimas NheI y SacI, dando origen a los vectores pAMA4 y pAMA5 (figura 8D).

2.10.2 Clonamiento del gen que codifica para el péptido señal de RecA río arriba de los genes que codifican para las proteínas fluorescentes (amarilla y cyan)

La secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína RecA, que es una recombinasa que se encuentra en *Arabidopsis* y se dirige a plastidios, fue amplificada por PCR utilizando los partidores LM116 y LM117 (figura 5) desde un genoteca de cADN de *Arabidopsis thaliana*, con ciclos de un minuto de denaturación inicial a 94°C, seguido de treinta ciclos de un paso de denaturación a 94°C por treinta segundos, un paso de alineamiento a 55°C por treinta segundos y un paso de extensión a 72°C por cuatro minutos. Los partidores poseen secuencias para enzimas de restricción en sus extremos, así el amplificado queda flanqueado por los sitios de restricción para las enzimas BamHI en 5' y BglII en 3'. Se amplificó un fragmento de 300pb, que fue clonado en el vector pGEM-T, desde este vector se extrajo la secuencia del péptido señal de RecA cortando con las enzimas BamHI y BglII. Por otra parte los vectores pAMA6 y pAMA7 (figura 8E y F) fueron digeridos con BamHI y en ellos se insertó la secuencia que codifica para el péptido señal de RecA. Fue necesario determinar la orientación de la inserción de la secuencia de RecA, ya que éste pudo integrarse en cualquiera de las dos direcciones, por ser los extremos de los fragmentos compatibles, esto se hizo mediante análisis con enzimas de restricción, datos no mostrados.

LM116	5'	cgg	gat	cca	tgg	att	cac	agc	tag	tct	tgt	c	3'	31pb
LM117	5'	gaa	gat	ctt	cca	tag	ctg	cct	cta	aag	cct	t	3'	31pb

Figura 5: Partidores para amplificar RecA

Estos partidores han sido diseñados con sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI, en el partidor sentido LM116 y BglII en el partidor antisentido LM117 (marcados en la secuencia). Amplifican un fragmento de 300pb que contiene la secuencia completa del péptido señal de la proteína Recombinasa A desde una genoteca de cADN de *Arabidopsis thaliana*.

**2.10.3 Clonamiento del gen que codifica para la proteína fluorescente roja
río abajo del gen que codifica para el péptido de RecA**

El vector pAMA6 (figura 8E) fue digerido con las enzimas AgeI y SacI al igual que el vector pDsRed2-C1 (figura 4C). Con esto se liberó el gen de la proteína fluorescente cyan y roja respectivamente, las que fueron intercambiadas, generándose el vector pAMA11.

**2.10.4 Clonamiento del gen que codifica para el péptido señal de CoxIV
fusionado al gen que codifica para la proteína fluorescente (amarilla y
cyan)**

Se amplificó desde el vector pCK coxIV GFP (donado por Ian Small), mediante PCR, el gen que codifica para el péptido señal de la proteína Citocromo oxidasa IV de *Saccharomyces cerevisiae* (que ya se ha demostrado es capaz de destinar proteínas a las mitocondrias en plantas (Kohler R. y cols 1997)) utilizando los partidores LM128 y LM129 (figura 6A) con un programa de PCR de treinta ciclos que constan de un paso de denaturación a 94°C por treinta segundos, un paso de alineamiento a 60°C por treinta segundos y un paso de extensión a 72°C por treinta segundos. Los partidores agregan en el extremo 5'

la secuencia que reconoce la enzima BamHI y en el extremo 3' parte de la secuencia amino terminal de las proteínas fluorescentes (amarilla y cyan) de Clontech. En otro evento de PCR se amplificó la secuencia que codifica para los genes de las proteínas fluorescentes amarilla (EYFP) y cyan (ECFP) utilizando los partidores LM130 y LM131 (figura 6B) con un programa de PCR que consta de dos minutos de denaturación inicial a 94°C seguido de treinta ciclos en los que la denaturación es a 94°C por 30 segundos, seguida de el alineamiento a 68°C por treinta segundos y un paso de extensión a 72°C por dos minutos treinta segundos, finalmente un solo paso de extensión final, a 72°C por diez minutos. Los partidores en el extremo 5' presentan parte de la secuencia que codifica para el extremo carboxilo terminal del péptido señal de coxIV y en el extremo 3' agrega una secuencia que reconoce la enzima de restricción SacI. Posteriormente, y utilizando los productos de los PCR antes mencionados, se realizó una tercer evento de amplificación, con los partidores LM128 y LM131, con un programa de PCR que consta de un paso de denaturación inicial a 94°C por dos minutos, seguido de treinta ciclos que constan de un paso de denaturación a 94°C por treinta segundos, un paso de alineamiento a 50°C por treinta segundos y un paso de extensión a 72°C por dos minutos, seguido de un único paso de extensión final a 72°C por diez minutos, lo que dio origen a un producto de fusión entre la secuencia que codifica para el péptido señal de coxIV y las secuencias que codifican para las proteínas fluorescentes (EYFP y ECFP). Estas fusiones fueron clonadas en el

vector pGEM-T, desde donde fueron escindidas utilizando las enzimas de restricción BamHI y SacI.

A						
Cox IV:						
Sentido	LM128	5'	AG	<u>GGA TCC</u>	AAA ATG GTT TCA CTA CGT CAA TCT ATA AGA	3' 38pb
Antisentido	LM129	5'	TT GCT CAC CAT	GGG TTT TTTG	CTG AAG CAG ATA TCT	3' 35pb
B						
C/YFPs						
Sentido	LM130	5'	AG CAA AAA CCC	ATG GTG AGC AAG	GGC GAG GAG CTG T	3' 36pb
Antisentido	LM131	5'	<u>ACG AGC TCA</u>	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GA		3' 32pb

Figura 6: Partidores utilizados para el clonamiento de C/YFP fusionadas a coxIV

Estos partidores agregan sitios de corte para BamHI en el partidor sentido de CoxIV LM128 y SacI en el partidor antisentido de C/YFP LM131 (Subrayados). Se utilizan para amplificar la secuencia que codifica para el péptido señal de la citocromo oxidasa IV de *Saccharomyces cerevisiae* los partidores LM128 y LM129 y para amplificar la secuencia que codifica para CFP o YFP de los vectores de Clontech los partidores LM130 y LM131. En rojo se observan las secuencias de las proteínas fluorescentes que se alinean en cada partidor y en azul se observan las secuencias de coxIV que se complementan entre los partidores para producir la fusión de los genes amplificados. Esta fusión permitirá la destinación de las proteínas fluorescentes a las mitocondrias.

El vector pBI221 fue digerido con las enzimas BamHI y SacI, donde se insertó las fusiones explicadas previamente, que permitirán la acumulación de las proteínas fluorescentes cian y amarilla en las mitocondrias.

Se utilizó el vector binario pBI121 de Clontech (figura 2B), para construir vectores que permitiesen la transformación de *Agrobacterium* y mediante éste, la transformación de tejidos vegetales. El vector pBI121 fue digerido con las enzimas BamHI y SacI, donde se insertó las fusiones explicadas previamente. Los vectores binarios aquí construidos, al igual que en el caso anterior, permiten la acumulación de las proteínas fluorescentes amarilla y cian en las mitocondrias.

2.11 Preparación de células competentes de Agrobacterium

Se utilizó el método descrito por Chen y cols (1994), que consiste en crecer un cultivo bacteriano de 3ml hasta fase log (aproximadamente 36 horas) a 28°C en medio LB. Se inocularon 2ml de éste en 50ml de medio LB fresco y se crecieron a 28°C hasta obtener una D.O._{600nm} de 0,5. Una vez obtenida ésta D.O., las bacterias se enfrían en hielo por 10 minutos y se centrifugan a 3000g por 5 minutos, luego se resuspenden en 1ml de CaCl₂ 20mM y se hacen alícuotas de 200µl en tubos de 1,5ml preenfriados y por último se almacenan a -80°C hasta su uso.

2.12 Transformación de Agrobacterium

Para transformar Agrobacterium se utilizó el método también descrito por Chen y cols (1994), donde 100µl de células competentes se mezclan con 1µl de ADN de interés a una concentración de 1µg/µl y se congelan en nitrógeno líquido por 5 minutos, luego se descongelan a 37°C y se mantienen a esta temperatura durante 25 minutos. Pasado este periodo se agrega 1ml de medio LB y se incuban por 3 horas a 28°C con agitación suave. Finalmente se centrifuga la mezcla durante 1 minuto a 10000g, descartando la mayoría del sobrenadante y resuspendiendo las bacterias en el sobrenadante residual (aproximadamente 50µl) para plaquearlas en placas que contengan LB-agar más los antibióticos para la selección (gentamicina 100µg/ml y rifampicina 10µg/ml, resistencias

aportadas por la cepa de *Agrobacterium*, y kanamicina 100µg/ml, resistencia aportada por el vector utilizado para la transformación).

2.13 Transformación de epidermis de cebolla mediante biobalística.

Se cortan catáfilos de cebolla en cuadrados de aproximadamente 3cm de lado y se colocan en una placa que contiene agar (sirve de soporte y permite mantener la humedad de la cebolla). Por otra parte se prepara el ADN para el bombardeo, mezclando partículas de Tungsteno (150µg) con el ADN de interés (5-8µg) y se efectúa el disparo a una presión de 100psi en una atmósfera de vacío de 30mmHg. Después las cebollas se colocan a 22°C por 36 horas y se puede ver la acumulación de las proteínas después de ese tiempo. Adaptado del protocolo descrito por Sheen y cols 1995.

2.14 Infiltración de hojas de tabaco con *Agrobacterium*

Se crece la cepa GV3101 de *Agrobacterium* transformada con el vector de interés, en medio LB selectivo (con antibióticos) durante 48 horas. aproximadamente, a 25-28°C, luego se retira el medio por centrifugación, y las bacterias se resuspenden en igual volumen de agua y se infiltran hojas de tabaco de distintas edades, utilizando para esto una jeringa de 1ml y haciendo presión de la solución de bacterias sobre la cara abaxial de la hoja (Naohiro Kato, comunicación personal).

2.15 Transformación de Arabidopsis mediante inmersión floral

Inflorescencias de plantas silvestres ecotipo Columbia en estado adulto de aproximadamente de 10cm de largo se sumergen en una solución de transformación (ver abajo) por 15 segundos con agitación constante, posteriormente se colocan en posición horizontal en oscuridad por 16 horas, cubiertas con plástico para mantener la humedad, pasado este tiempo se sacan las plantas de la oscuridad a la cámara de crecimiento a 23°C, con ciclos de luz 16 horas y 8 horas de oscuridad. Se riegan por 2 semanas, luego de lo cual se dejan secar para colectar las semillas.

Solución de transformación

Esta solución se fabrica a partir de un cultivo de *Agrobacterium* que contenga el vector de interés que se ha crecido bajo las siguientes condiciones: Un preinóculo se crece a 28°C por 30 horas (día y medio o por 2 días a 24°C) en LB suplementado con gentamicina 100µg/ml, kanamicina 100µg/ml y rifampicina 10µg/ml con agitación constante y buena aireación. Se inocula con 100µl de este precultivo un cultivo de 250ml de LB con los antibióticos necesarios en un matraz de 1l y se deja crecer por 16 horas a una temperatura entre 25 y 28°C hasta alcanzar una D.O._{600nm} entre 0,6-0,8. Luego el cultivo se centrifuga y el pellet bacteriano se resuspende en una solución que contiene Silwett L-77 (detergente) al 0,05% y sacarosa al 5% (Clough y Bent 1998).

2.16 Selección de semillas transformadas, determinación de la eficiencia de transformación y del número de inserciones de T-ADN

Las semillas de las plantas sometidas al método de transformación descrito previamente, deben ser cuantificadas para determinar los porcentajes de eficiencia de transformación obtenidos. Las semillas son esterilizadas como se describe previamente y se siembran en placas de MS-agar suplementado con 50µg/ml de kanamicina, como medio selectivo. Aquellas plantas capaces de sobrevivir en presencia del antibiótico son traspasadas a tierra para obtener de ellas la próxima generación de semillas. La eficiencia de la transformación (TE) se calcula determinando el porcentaje de semillas que son resistentes a kanamicina del total de semillas que se ponen a germinar.

Para obtener líneas homocigotas con una sola inserción se debe sembrar tres generaciones de las plantas transgénicas, ya que mediante el análisis de las proporciones mendelianas se deduce que una línea presenta solo una inserción de ADN y si ésta es homocigota. Para esto, se siembra al menos 100 semillas que han sido colectadas de plantas seleccionadas en kanamicina (T₁). La proporción obtenida de plantas resistentes: sensibles obtenidas en esta generación (T₂) es un indicador del número de inserciones de T-ADN existente en cada línea de plantas, si esta proporción es 3:1 resistentes:sensibles, se acepta tener una línea que contiene solo una inserción de ADN. Sembrando semillas obtenidas a partir de plantas de la generación T₃, que tienen esta segregación (3:1).

2.17 Visualización de las diferentes proteínas fluorescentes dirigidas a distintos organelos

Para todos los experimentos de visualización de los organelos se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus modelo IX70 acoplado a una cámara digital Sony CXC-390 3CCD. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron utilizando los objetivos UPLAN FI 20X/0.5 Ph1 y PLAN 100X/1.25 oil y los filtros UM31044v2, U-N31001, UN31040 y U-MNG.

2.17.1 Visualización de organelos en catáfilos de cebolla

Catáfilos de cebolla transformados mediante biobalística con distintos vectores de interés se pusieron en portaobjetos, montados en agua y se observaron en el microscopio de epifluorescencia con los filtros correspondientes a la excitación de la proteína a observar.

2.17.2 Visualización de plastidios, mitocondrias y núcleo en epidermis de tabaco

Hojas de tabaco transformadas mediante agroinfiltración, como se describe previamente, fueron cortadas en trozos pequeños, montadas en agua en un portaobjeto, preocupándose que el lado abaxial de la hoja quede hacia el cubreobjetos, ya que aquí se encuentran las células de la epidermis que ha sido transformada. Las muestras se observaron en el microscopio de epifluorescencia, utilizando los filtros respectivos a cada proteína fluorescente.

2.18 Estudio del comportamiento de plastidios, mitocondrias y núcleo en respuesta a luz de distintas longitudes de onda

Una muestra de tabaco, previamente infiltrado con una solución de *Agrobacterium* que contiene el vector con el gen que codifica para la proteína fluorescente amarilla (EYFP) dirigida a plastidios, mitocondrias o núcleo se ubica en el microscopio de epifluorescencia, donde se busca una célula de la epidermis que exprese la proteína fluorescente amarilla, utilizando para esto el filtro UN31040. Una vez encontrada la célula, se enfoca en un plano de organelos y se toma una imagen, que se considera a tiempo 0. Posteriormente se hace incidir luz de distintas longitudes de onda (una a la vez), para lo que se utiliza los filtros UMNW2, UM31044v2, UN31001, UN31040 y UMNG, que presentan picos de excitación desde el UV-A a la luz amarilla (Tabla 1), durante 15 segundos, luego de los cuales se observa la fluorescencia emitida por la célula, con el filtro para observar fluorescencia amarilla y se reenfoca el plano de fluorescencia, si esto es necesario. Se hace incidir luz de la longitud de onda en estudio por un nuevo periodo de 15 segundos, repitiendo los pasos de observar la fluorescencia emitida y reenfocar, si lo amerita. Esto se hace luego por 30 segundos y finalmente 1 minuto, con lo que se consigue en total, someter a la célula a 2 minutos de exposición a luz de determinada longitud de onda (figura 7B). Cada vez que es necesario reenfocar, se toman datos de la distancia a la que se ha desplazado el foco de la fluorescencia. Con esto es posible graficar el desplazamiento por evasión que sufre la fluorescencia que

proviene de los plastidios, mitocondrias o núcleo. Una variante a este experimento consiste en medir el desplazamiento de la fluorescencia, pero hacer incidir la luz siempre en el mismo plano de enfoque, que se define por ser aquel en que la fluorescencia se encuentra enfocada a tiempo 0 (figura 7A).

Tabla 1: Filtros de microscopio de epifluorescencia utilizados en este trabajo

Filtro	Rango Excitación	Color Excitación	Rango de Emisión	Color de Emisión	Proteínas fluorescentes observables
UMWU2	350-390 nm	UV-A	Sobre 400nm ^a	Todos ^b	----
UM31044v2	426-446 nm	Azul	460-500 nm	Cyan	CFP
UN31001	465-495 nm	Cyan	515-555 nm	Verde	GFP
UN31040^c	500-520 nm	Verde	540-580 nm	Amarillo	YFP
UMNG	530-550nm	Amarillo	Sobre 590nm ^a	Rojo	RFP

^a filtros Long Pass

^b Al ser este un filtro Long pass permite el paso de todas las longitudes de onda de la luz dentro del rango visible, sobre 400nm.

^c Filtro usado para la observación de la proteína fluorescente amarilla

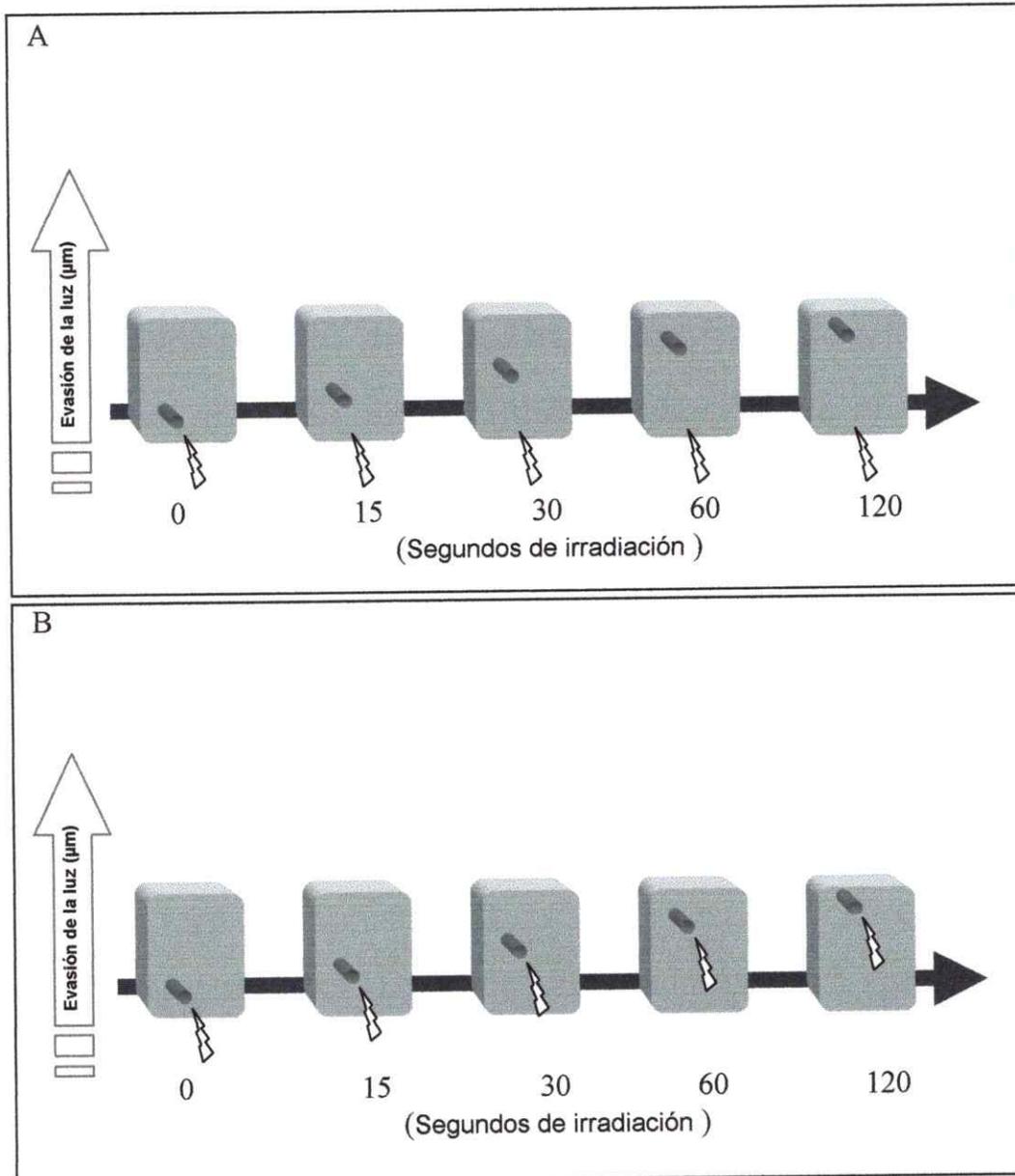


Figura 7: Esquemas de irradiación de la luz sobre los distintos organelos

Estos esquemas representan el estímulo luminoso al que están siendo sometidas las células en los distintos tratamientos con luz de diferentes longitudes de onda. El cubo representa la célula en tratamiento, el cilindro dentro del cubo es el organelo en observación (plastidios, mitocondrias o núcleo), el rayo muestra desde donde incide la luz y en que lugar respecto de los organelos, la flecha de la izquierda representa la respuesta de evasión esperada para el experimento y los números abajo indican el tiempo que ha sido sometida la célula al estímulo de luz. En **A** se grafica el tipo de experimento en que la luz incide siempre sobre un mismo punto de la célula, en **B** se observa el experimento en que la luz incide siempre en el organelo estudiado.

3 RESULTADOS

3.1 Diseño de un sistema para evaluar el comportamiento de plastidios, mitocondrias y núcleo frente a luz de diferentes longitudes de onda

Los objetivos que se han planteado para esta tesis nos llevan a buscar las herramientas que nos permitan visualizar *in vivo* los organelos con genoma de la célula vegetal. Por esto hemos recurrido a la tecnología de las proteínas fluorescentes, pero debido a que estas mismas necesitan luz para emitir fluorescencia, es necesario determinar cual de las proteínas fluorescentes puede ser utilizada para la visualización de los organelos sin interferir en la respuesta que ellos presenten frente a los distintos estímulos luminosos. Para ello hemos diseñado vectores con las distintas proteínas fluorescentes con que contamos en el laboratorio, a modo de determinar cual de ellas nos permite analizar el movimiento en respuesta a la luz de diferentes longitudes de onda.

Una vez determinada la proteína fluorescente a utilizar, se realizó el experimento descrito previamente (Figura 7), el cual nos permite analizar el comportamiento de plastidios, mitocondrias y núcleo frente a luz de diferentes longitudes de onda.

3.1.1 Construcción de vectores para transformación de tejidos vegetales

Durante este trabajo se construyeron varios vectores para transformación de plantas, que permiten marcar células vegetales *in vivo* con diferentes proteínas

fluorescentes. Las construcciones se resumen en la tabla 2, y un esquema de cada uno de ellos se muestra en la figura 8.

Tabla 2: Vectores diseñados y construidos para la transformación de tejidos vegetales con distintas proteínas fluorescentes

Nombre del vector	Base en el vector	Señal de destinación	Proteína fluorescente	Acumulación
pAMA2	pBI121 ^a	coxIV	Cyan	Mitocondrias
pAMA3	pBI121 ^a	coxIV	Amarilla	Mitocondrias
pAMA4	pEL103 ^a	—	Cyan	Citoplasma, Núcleo
pAMA5	pEL103 ^a	—	Amarilla	Citoplasma, Núcleo
pAMA6	pBI221 ^b	coxIV	Cyan	Mitocondrias
pAMA7	pBI221 ^b	coxIV	Amarilla	Mitocondrias
pAMA8	pBI221 ^b	—	Cyan	Citoplasma, Núcleo
pAMA9	pBI221 ^b	—	Amarilla	Citoplasma, Núcleo
pAMA10	pBI221 ^b	RecA	Cyan	Plastidios
pAMA11	pBI221 ^b	RecA	Roja	Plastidios
pAMA12	pBI221 ^b	RecA	Amarilla	Plastidios

^a Los vectores pBI121 y pEL103 son vectores binarios, que permiten la transformación de *Agrobacterium* y mediante la utilización de éste, la transformación de tejidos vegetales, aunque no se descarta el uso del vector para otros métodos de transformación, como biobalística.

^b El vector pBI221 permite transformar tejidos vegetales mediante biobalística.

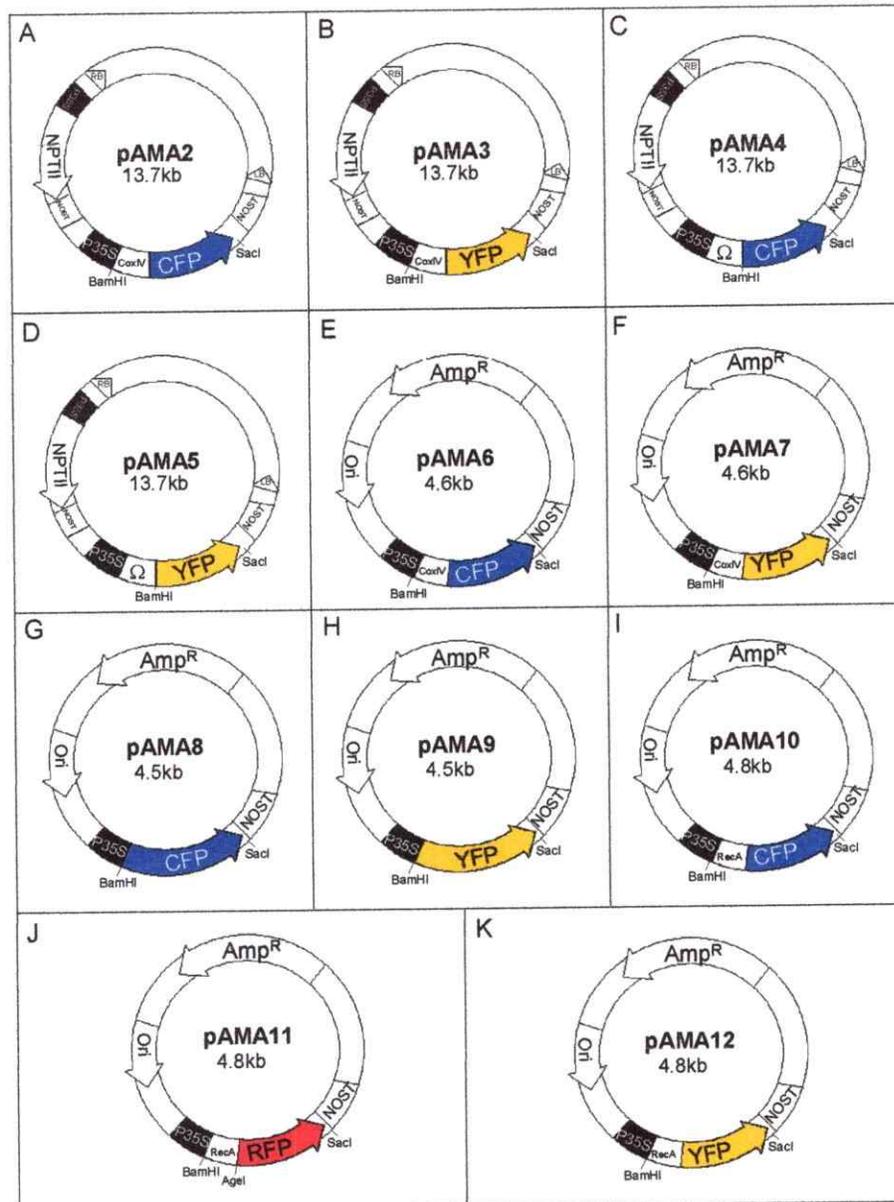


Figura 8: Vectores de expresión en plantas que codifican para proteínas fluorescentes dirigidas a plastidios, mitocondrias o sin destinación.

Estos vectores se construyeron durante el desarrollo de esta tesis, y se utilizaron para transformar tejidos vegetales por diversos mecanismos. Se puede ver que existen dos tipos de vectores, unos con esqueleto del vector pBI221 (E-J), que permiten la transformación de tejidos vegetales mediante técnicas de biobalística y los otros (A-D) son vectores binarios con esqueleto del vector pBI121 en A y B o pEL103 (igualmente derivado de pBI121) en C y D. Los esquemas muestran los sitios de corte que se utilizaron para el clonamiento, además de las características importantes de cada vector, donde **P35S** es el promotor del virus del mosaico de la coliflor, **NPTII** es el gen que otorga resistencia a kanamicina en plantas, **Amp^R** es el gen que aporta resistencia a ampicilina en bacterias, **NOST** es la secuencia terminadora del gen nopalina sintetasa, **RB** y **LB** son las secuencias que codifican para los extremos repetidos invertidos del T-ADN, Ω es una secuencia potenciadora de la traducción en plantas, **ORI** es la secuencia del origen de replicación del plasmidio en bacterias, **RecA** es la secuencia que codifica para el péptido señal que dirige las proteínas a plastidios, **CoxIV** es la secuencia del péptido señal que dirige las proteínas a mitocondrias, **CFP** es el gen para la proteína fluorescente cian, **RFP**, el gen para la proteína fluorescente roja e **YFP** es el gen para la proteína fluorescente amarilla.

3.1.2 Visualización de plastidios, mitocondrias y núcleo en catáfilos de cebolla

Una manera de testear nuestra capacidad para visualizar los distintos tipos de proteínas fluorescentes en los plastidios y las mitocondrias es llevar a cabo un rápido método de transformación transiente que nos permite discernir si observamos el patrón de fluorescencia esperado, que ya ha sido descrito en la literatura (Scott y cols 1999, Kohler y cols 1997). El proceso de transformación por bombardeo de partículas de ADN es un proceso que permite obtener resultados dos días después de tener confirmado el término del clonamiento, ya que sólo se necesita una preparación del ADN (midiprep o miniprep), que luego se utiliza para disparar y posteriormente visualizar con el microscopio de epifluorescencia.

Para este experimento se utilizaron los vectores construidos a partir de pBI221 (se muestran en la tabla 3), además de algunos controles.

Tabla 3: Vectores utilizados para transformar catáfilos de cebolla por biobalística

Señal de destinación	Proteína fluorescente	Destinación	Vector
RecA	Amarilla (EYFP)	Plastidios	pAMA12
RecA	Cyan (ECFP)	Plastidios	pAMA10
RecA	Roja (DsRed2)	Plastidios	pAMA11
coxIV	Amarilla (EYFP)	Mitocondrias	pAMA9
coxIV	Cyan (ECFP)	Mitocondrias	pAMA8
coxIV	Verde	Mitocondrias	pCK coxIV-GFP
---	Amarilla (EYFP)	Sin destinación	pAMA7
---	Cyan (ECFP)	Sin destinación	pAMA6

Además de los constructores descritos en la tabla 3, se realizó el protocolo de transformación de catáfilos de cebolla solamente con agua, a modo de control de los patrones de autofluorescencia obtenidos por el proceso invasivo de transformación utilizado.

Los resultados obtenidos, que se observan en la figura 9, muestran que los constructos realizados con la proteína fluorescente amarilla presentan el patrón esperado de fluorescencia (figura 9A, 9D y 9G), al igual que los construidos con la proteína fluorescente roja (figura 9C), en cambio, el patrón obtenido para la proteína fluorescente cyan (figura 9B, 9E y 9H) es difícil de analizar. En el caso de la proteína fluorescente cyan dirigida a mitocondrias (figura 9E), se ve un patrón aglomerado y es difícil observar la fluorescencia. Para el caso de los plastidios (figura 9B), lo que se puede ver es que el nivel de fluorescencia es

como los estrómulos, que se observan muy bien para las proteínas fluorescentes amarilla y roja. Los controles muestran que no existe un patrón de fluorescencia como el del obtenido con las proteínas fluorescentes en el caso de usar agua. Para el caso de las proteínas fluorescentes que no presentan destinación, se observa que la fluorescencia se ubica en el citoplasma, pero también es posible encontrarla en el núcleo, lo que está de acuerdo con lo descrito en la literatura, ya que las proteínas fluorescentes son lo suficientemente pequeñas (27kDa) como para atravesar libremente la membrana nuclear (Kohler y cols 1997).

A partir de los resultados obtenidos es posible determinar el tamaño de los organelos presentes en estas células, siendo las mitocondrias de un tamaño promedio de $0,5\mu\text{m}$, con formas más o menos esféricas, y con velocidades y tipos de movimiento muy distintos, siendo unas muy rápidas mientras otras se mueven lentamente, e incluso es posible observar mitocondrias que no están moviéndose en una célula, estos resultados pueden verse en la película 1 anexada a esta tesis.

Los plastidios muestran tamaños entre 4 y $8\mu\text{m}$, con la presencia de estrómulos que unen dos o más plastidios y otros que solamente se ven salir de uno de ellos tan largos como de hasta $35\mu\text{m}$. Las formas que muestran estos organelos son diversas, pudiéndose observar en la figura plastidios de forma esférica y ovalada, con prolongaciones hacia otros organelos. El movimiento que

muy bajo y es difícil observar estructuras como los estrómulos, que se observan muy bien para las proteínas fluorescentes amarilla y roja (figura 9A y 9C). Los controles muestran que no existe un patrón de fluorescencia como el del obtenido con las proteínas fluorescentes cuando usamos agua (figura 9I-9L). Para el caso de las proteínas fluorescentes que no presentan destinación, se observa que la fluorescencia se ubica en el citoplasma (figura 9G y 9H), pero también es posible encontrarla en el núcleo, lo que está de acuerdo con lo descrito en la literatura, ya que las proteínas fluorescentes son lo suficientemente pequeñas (27kDa) como para atravesar libremente la membrana nuclear (Kohler y cols 1997).

A partir de los resultados obtenidos es posible determinar el tamaño de los organelos presentes en estas células, siendo las mitocondrias de un tamaño promedio de $0,5\mu\text{m}$, con formas más o menos esféricas y con velocidades y tipos de movimiento muy distintos, siendo unas muy rápidas mientras otras se mueven lentamente, e incluso es posible observar mitocondrias que no están moviéndose en una célula, estos resultados pueden verse en la película 1 anexada a esta tesis.

Los plastidios muestran tamaños entre 4 y $8\mu\text{m}$, con la presencia de estrómulos que unen dos o más plastidios y otros que solamente se ven salir de uno de ellos tan largos como de hasta $35\mu\text{m}$. Las formas que muestran estos organelos son

diversas, pudiéndose observar en la figura 9 (A-C) plastidios de forma esférica y ovalada, con prolongaciones hacia otros organelos.

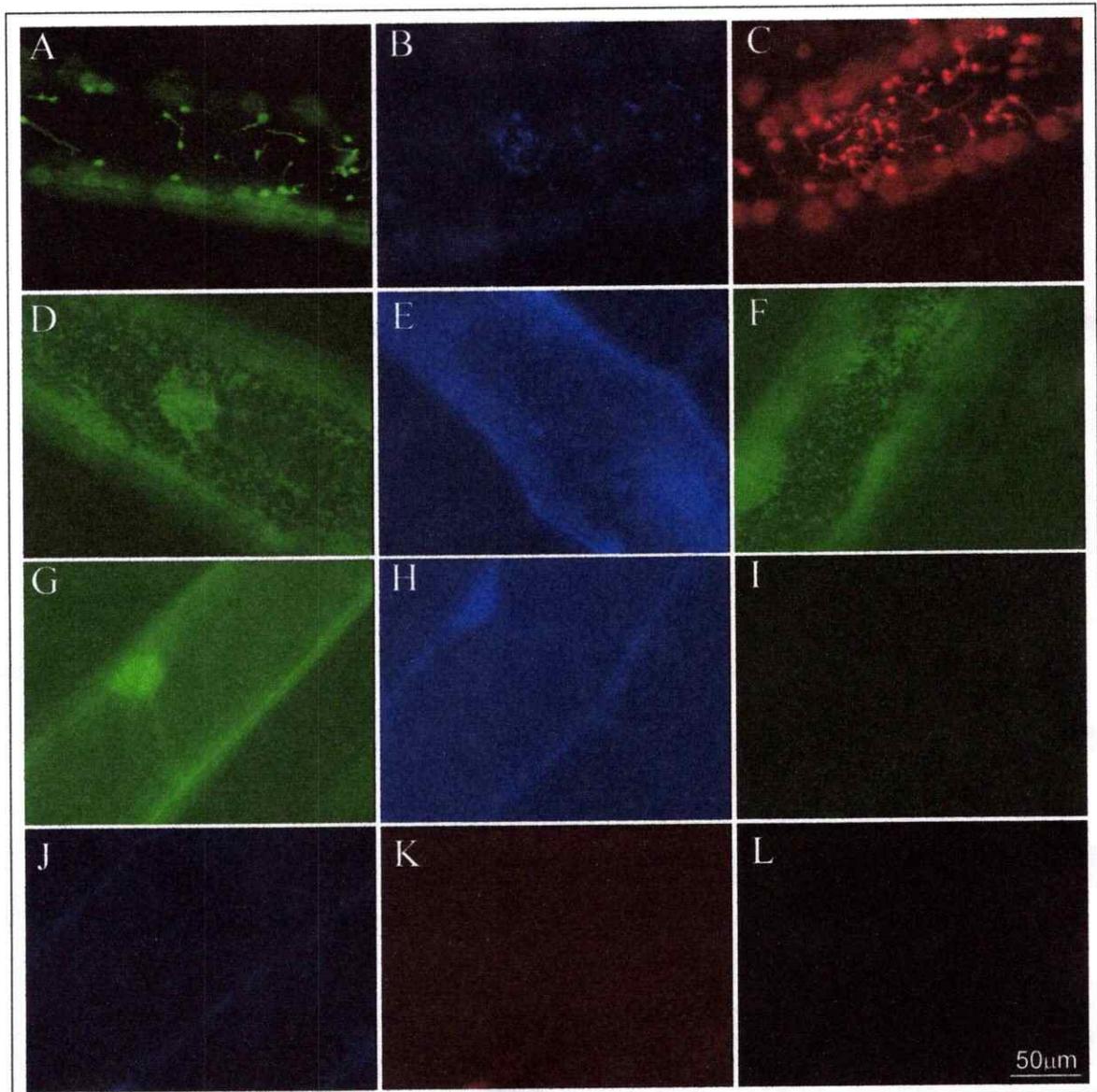


Figura 9: Imágenes de epifluorescencia de catáfilos de cebolla que acumulan proteínas fluorescente en distintos organelos.

Estas imágenes muestran los resultados de la transformación de catáfilos de cebolla realizados con los constructos que permiten la acumulación de las proteínas fluorescentes en **A-C** plastidios, siendo: **A** proteína fluorescente amarilla (pAMA12), **B** proteína fluorescente cian (pAMA10) y **C** proteína fluorescente roja (pAMA11). En **D-F** se observa el patrón de fluorescencia de las proteínas fluorescentes amarilla (pAMA9), cian (pAMA8) y verde (pCK/coxIV-GFP como control positivo) respectivamente, que se acumulan en las mitocondrias. En **G** se observa la fluorescencia de la proteína amarilla (pAMA7) y en **H** la fluorescencia de la proteína fluorescente cian (pAMA6) que se acumula en el citoplasma y núcleo, porque no llevan destinación. **I-L** son imágenes control que muestran la autofluorescencia del tejido que ha sido bombardeado con agua como control, para el filtro UN31040 (amarillo) en **I**, UM31044v2 (cian) en **J**, UMNG (rojo) en **K** y UN31001 (verde) en **L**.

3.1.3 Visualización de plastidios, mitocondrias y núcleo en epidermis de tabaco

El proceso de agroinfiltración es utilizado en este estudio como un método de transformación transiente. El proceso de transformación y detección de la expresión de las proteínas transformadas por este método tarda aproximadamente 6 días a partir del momento en que se obtienen las colonias de *Agrobacterium* transformadas. De este modo se puede comprobar que las bacterias están transformadas y las proteínas fluorescentes se acumulan en los organelos correspondientes.

En este punto se utilizaron cepas de *Agrobacterium* que contienen vectores binarios, dirigidos a distintos organelos como control, además de los construidos en esta tesis, los cuales se detallan en la tabla 4.

Tabla 4: Vectores utilizados para la transformación de epidermis de tabaco mediante agroinfiltración

Proteína fluorescente	Señal de destinación	Destinación	Vector
Amarilla (EYFP)	RecA	Plastidios	pDUA1
Amarilla (EYFP)	coxIV	Mitocondrias	pAMA3
Amarilla (EYFP)	LexA	Núcleo	pNK607
Amarilla (EYFP)	—	Sin destinación	pAMA5
Cyan (ECFP)	coxIV	Mitocondrias	pAMA2
Cyan (ECFP)	—	Sin destinación	pAMA4

Como control se infiltró tejido de epidermis de tabaco con *Agrobacterium* sin vector. Los resultados, mostrados en la figura 10 muestran los mismos patrones encontrados en el caso de transformación por biobalística. La expresión y visualización de la proteína fluorescente amarilla, tanto en el control del núcleo, como en los constructos testeados (a plastidios, mitocondrias y sin destinación) responden a lo esperado.

La marcación utilizando la proteína fluorescente cyan (figura 10E y 10F), donde es muy difícil observar un patrón definido de fluorescencia, nos muestra que hay fluorescencia y ésta es específica, ya que en el control de transformación con la cepa de *Agrobacterium* sin vector (figura 10H) no se encuentra nunca un patrón similar. Los tamaños observados para los plastidios en estas células están entre 5 y 7,5 μm , con movimientos muy lentos, las formas que se observan son más bien esféricas. Los estrómulos o prolongaciones de los plastidios son más cortos que los vistos en catáfilos de cebolla, encontrándose algunos de hasta 20 μm .

Los tamaños observados para las mitocondrias son similares a los vistos en catáfilos de cebolla, de 0,5 μm en promedio. Este tipo de células presenta distintas formas de las mitocondrias, ovaladas y también se puede ver que tienden a formar estructuras que se estrangulan o se fusionan, lo que puede ser un artefacto de la película debido al rápido movimiento que presentan estos organelos. Es interesante es observar que las mitocondrias a veces se

desplazan sobre líneas o en filas dentro de la célula (película 2, anexada a esta tesis).

El núcleo en estas células es de forma esférica, con un diámetro de alrededor de $15\mu\text{m}$ y su movimiento es lento. Su ubicación es habitualmente central en la célula.

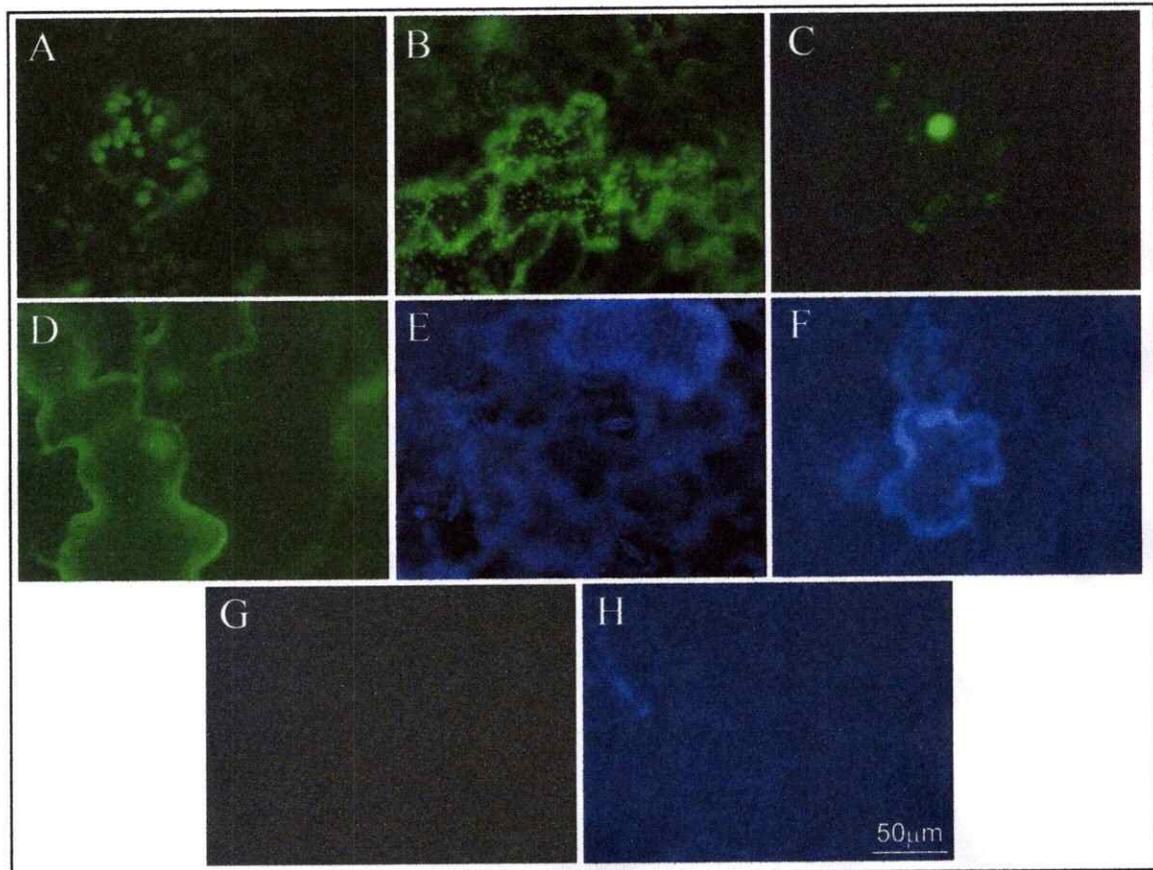


Figura 10: Imágenes de epidermis de tabaco que acumulan proteínas fluorescentes en distintos compartimientos celulares

Estas son imágenes de microscopía de epifluorescencia que muestran los patrones observados al transformar epidermis de tabaco. **A** muestra el patrón de la proteína fluorescente amarilla que se acumula en los plastidios (pDUA1), **B** muestra el patrón de fluorescencia que presentan los tejidos transformados que acumulan la proteína fluorescente amarilla en las mitocondrias (pAMA3), en **C** se observa la proteína fluorescente amarilla que se acumula en el núcleo (pNK607) y en **D** la proteína fluorescente amarilla que no lleva una señal de destinación (pAMA5). En **E** se observa el patrón obtenido al marcar las mitocondrias con la proteína fluorescente cyan (pAMA2), en **F** se muestra la proteína fluorescente cyan sin destinación (pAMA4). **G** y **H** son los controles de la fluorescencia emitida por el tejido al ser infiltrado con la cepa de *Agrobacterium* sin transformar, que muestra los niveles de fluorescencia debida solo a la presencia de la bacteria en el tejido, en **G** se ve la fluorescencia utilizando el filtro para ver la proteína fluorescente amarilla y en **H** se observa la fluorescencia con el filtro para observar la proteína fluorescente cyan.

3.2 Estudio del movimiento evasivo de plastidios, mitocondrias y núcleo en respuesta a luz de distintas longitudes de onda

El procedimiento experimental consistió en utilizar tejido de epidermis de tabaco transformado por el método de agroinfiltración, capaz de acumular la proteína fluorescente amarilla en plastidios, mitocondrias y núcleo, individualmente y hacer incidir luz sobre este tejido, como se describe en materiales y métodos (figura 7). Los resultados obtenidos, que se grafican en la figura 11, nos dicen que las mitocondrias, plastidios y núcleo son capaces de responder a la luz de las distintas longitudes de onda de manera diferencial. A modo de control, utilizamos la luz verde (entre 500 y 520nm), que se utiliza para excitar a la proteína fluorescente amarilla y determinamos que ninguno de los organelos en estudio evade el foco de incidencia de esta luz, por lo tanto, podemos utilizar el tejido que presenta la acumulación de la proteína fluorescente amarilla en plastidios, mitocondrias y núcleo.

Cuando utilizamos la luz UV para iluminar el tejido, encontramos que los tres organelos en estudio evaden, a tiempos tan cortos como 15 segundos, el foco de incidencia de la luz, pero el movimiento de evasión se hace más lento y al cabo de 120 segundos podemos encontrar un daño generalizado en el tejido que está siendo iluminado. Tanto para el caso de irradiar siempre el organelo como para el caso de irradiar sobre un punto constante en la célula, el resultado fue similar.

Para el uso de luz azul (entre 426 y 446nm) se observa, al igual que en el caso anterior, los tres organelos en estudio evaden el lugar de irradiación a mayor velocidad que en el caso del uso de luz UV-A y además este escape dura más en el tiempo, aunque pasados 120 segundos, también es posible observar daño en el tejido utilizado. Estos resultados, al igual que en el caso anterior se repiten independientemente del tipo de experimento (irradiar sobre el organelo ó sobre un punto constante en la célula).

Cuando se realizó el experimento utilizando luz azul (entre 465 y 495nm) se encontró que los plastidios evaden este tipo de luz a distancias pequeñas, alrededor de 10 μ m si se hace incidir la luz directamente sobre el organelo (figura 11B), a diferencia de los que sucede cuando se irradia un punto constante en la célula, donde hay una respuesta apenas perceptible (Figura 10A). Se puede decir que las velocidades de evasión son sostenidas en el tiempo, para ambos tratamientos. Las mitocondrias también responden a este tipo de luz, observándose una respuesta distinta de la que se encuentra con los plastidios, la velocidad de respuesta de las mitocondrias es menor que la vista con los plastidios, pero es sostenida en el tiempo. Al igual que con los plastidios, la respuesta evasiva de las mitocondrias a este tipo de luz es mayor cuando la luz irradia directamente sobre el organelo (figura 10C y 10D). El núcleo no presenta respuesta de evasión a esta luz azul (465-495nm) (figura 10E y 10F).

Al utilizar luz amarilla (entre 530 y 550nm) se observa que los plastidios (figura 10A y 10B) y las mitocondrias (figura 10C y 10D) evaden el sitio de irradiación de la luz, siendo este dependiente del punto irradiado. Para ambos, se observa una mayor respuesta cuando se irradia directamente sobre el organelo. El núcleo no presenta respuesta frente a este tipo de luz.

La figura 12 nos muestra un ejemplo de cómo se observa en el microscopio la respuesta de los organelos a 500-520nm (luz verde) y 426-446nm (luz azul) para cada uno de los organelos en estudio, se puede observar en la figura que a 500-520nm ningún organelo evade el plano de incidencia de la luz, mientras a 426-446nm las respuestas son evasivas para cada uno de ellos.

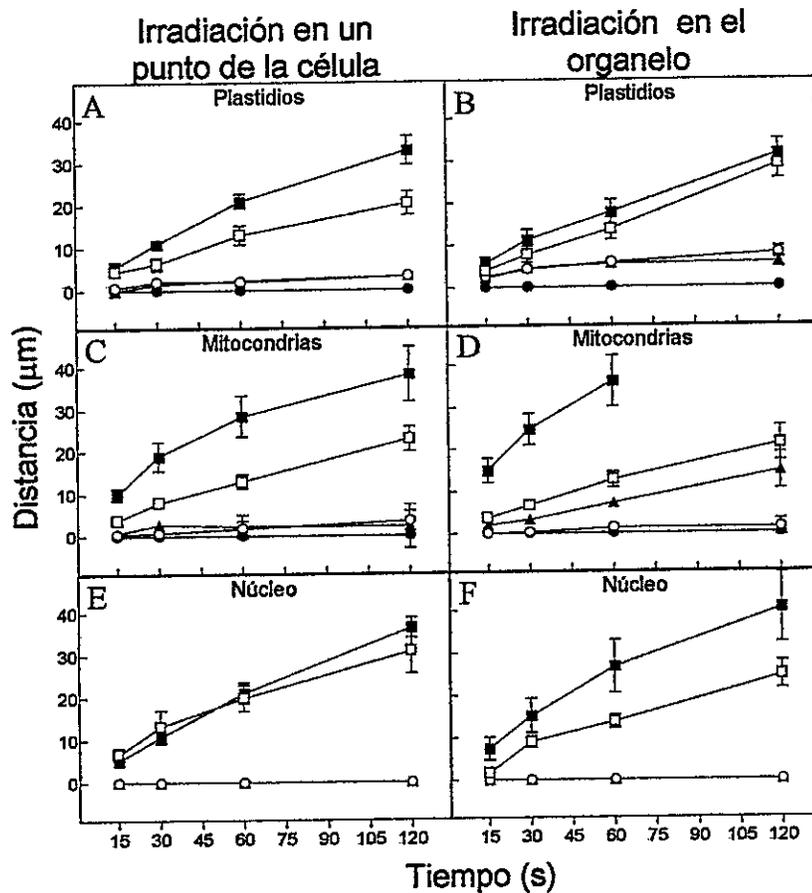


Figura 11: Velocidad de evasión de plastidios, mitocondrias y núcleo frente a luz de diferentes longitudes de onda

La pendiente de cada gráfico indica la velocidad con que los organelos responden a los estímulos de luz a que se ven enfrentados. **A-E** representan el tipo de experimentos en que se hace incidir luz sobre un punto constante de la célula, **B-F** muestran los resultados de incidir la luz siempre sobre el plano de enfoque de la fluorescencia emitida por la proteína fluorescente amarilla que se acumula en los organelos. **A** y **B** comparan la respuesta de los plastidios a cada tratamiento, **C** y **D** comparan la respuesta de las mitocondrias, **E** y **F** comparan la respuesta del núcleo. Se muestra la respuesta a luz UV (350-380nm) □, a luz azul (426-446nm) ■, a luz azul entre 465-495nm ▲, a la luz verde (500-520nm) ● y a la luz amarilla (530-550nm) ○. Note que para el núcleo no se observa movimiento de evasión con las luces de 465-485nm, 500-520nm ni 530-550nm.

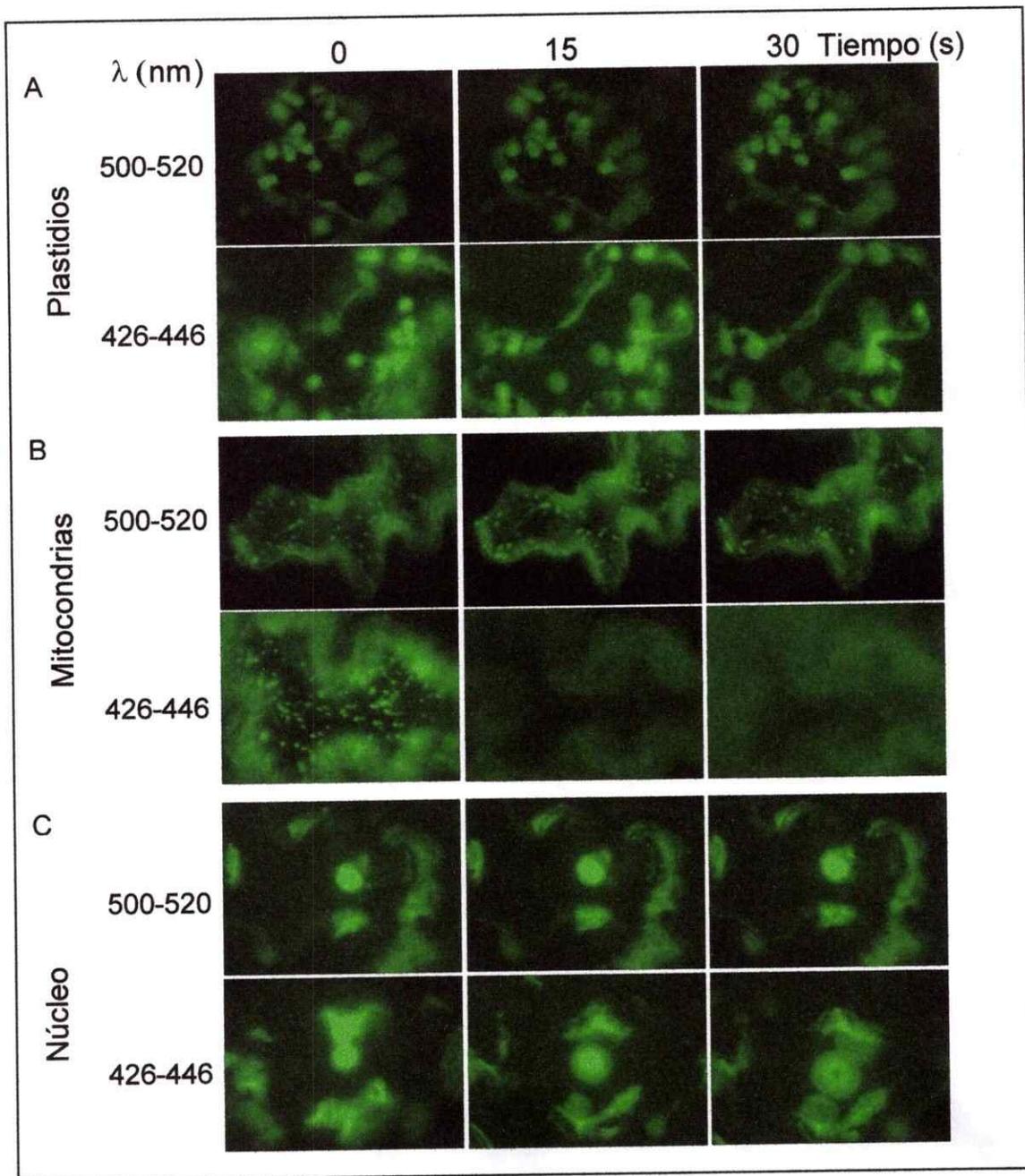


Figura 12: Respuesta de plastidios, mitocondrias y núcleo a luz de diferentes longitudes de onda

Imágenes de microscopía de epifluorescencia que muestran las respuestas que presentan estos organelos a luz de dos diferentes longitudes de onda, cuando los organelos se irradian con luz verde (500-520nm) no se observa una respuesta de movimiento en el eje z inducida por la luz, en cambio si se irradia los organelos o la célula con luz azul (426-446nm) se puede observar una respuesta de evasión en el eje z. La figura esta dividida en tres paneles, A-C, que corresponden a plastidios (A), mitocondrias (B) y núcleo (C), la parte superior de cada panel muestra las imágenes obtenidas al irradiar el organelo con luz verde (500-520nm) y la parte inferior de cada panel muestra imágenes obtenidas al irradiar los organelos con luz azul (426-446nm), los tiempos de exposición a la luz se detallan en la parte superior de la figura.

3.3 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Los resultados pueden resumirse en función de la eficiencia conseguida en la transformación, los cuales fueron negativos para el vector pAMA2. Éstos no se repitieron, debido a que siempre se encontró que los patrones de fluorescencia que se producían al utilizar este vector eran difusos o poco claros, por lo tanto, lo que se observa en la tabla 5 corresponde solamente a la transformación de *Arabidopsis* con el constructo pAMA3.

Tabla 5: Eficiencia de transformación

Planta Transformada (T ₀)	N° plantas sometidas a selección	N° de Plantas resistentes a kanamicina (T ₁)	% de Eficiencia de Transformación
AM3A	552	3	0.54
AM3B	508	12	2.3
AM3C	325	2	0.62
AM3D	535	1	0.2
AM3F	570	4	0.7
AM3G	668	21	3.1
AM3H	530	2	0.4
AM3I	202	1	0.5
AM3J	915	17	2.0
TOTAL	4805	63	1.3

La tabla muestra que de 4805 semillas obtenidas de las 9 plantas transformadas en este experimento (T₀), se obtuvo 63 plantas que expresan el gen de resistencia a kanamicina (T₁). Para saber si es que también expresan el

gen de la proteína fluorescente amarilla es necesario observarlas por microscopia de epifluorescencia, encontrándose que todas las plantas observadas presentan fluorescencia, en distintos niveles (figura 13).

Dentro del trabajo de esta tesis, debido a la falta de tiempo, no se harán experimentos con estas plantas, pero dentro de los planes del laboratorio esta realizar diversos experimentos con ellas, entre las que se encuentran el repetir los experimentos aquí descritos, para corroborar los resultados ahora en plantas completas, además de hacer cruzamientos con distintos mutantes en los fotorreceptores de la luz azul, que permitan analizar las respuestas observadas son dependientes de ellos.

Para obtener líneas homocigotas se procede como se describió en materiales y métodos, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Proporción de plantas resistentes: sensibles a kanamicina en la segunda generación de autocruce de plantas transformadas

Planta (T ₁)	Nº de plantas resistentes a kanamicina	Nº de plantas sensibles a kanamicina	NºTotal de plantas (T ₂)	Proporción
AM3B10	54	27	81	2:1
AM3B13	5	1	6	5:1
AM3B15	12	12	24	1:1
AM3C1	69	14	83	5:1
AM3F1	94	42	136	2,2:1
AM3F4	107	42	149	2,5:1
AM3G4	21	8	29	2,6:1

En esta tabla podemos observar que de todas las líneas analizadas de la T₂, solo dos de ellas se encuentran en una proporción cercana a lo esperado de 3 resistentes: 1 sensible, que daría cuenta de la existencia de una sola inserción.



Figura 13: Plantas transgénicas de Arabidopsis que acumulan la proteína fluorescente amarilla en las mitocondrias

Imágenes de epifluorescencia obtenidas de distintas plantas transgénicas que acumulan la proteína fluorescente amarilla en las mitocondrias **A** y **B** muestran imágenes de sistema vascular de hojas de plantas transgénicas, en **C** se observa mitocondrias en un tricoma.

4 DISCUSIÓN

Entre los objetivos propuestos para desarrollar en este trabajo, se especificó el diseño de un sistema que permita analizar la respuesta que presentan los tres organelos con genoma de las células vegetales, frente a estímulos de luz de diferentes longitudes de onda. Para ello, primero fue necesario determinar si la proteína fluorescente es inocua para realizar este tipo de análisis, ya que se ha descrito que los cloroplastos, uno de los tres organelos con genoma de la célula vegetal, responden a la luz azul, la misma que se utiliza para excitar la proteína fluorescente verde (GFP) (Kagawa y Wada 1999, 2000; Jarillo y cols 2001, Tlalka y cols 1999).

Analizamos como respondían los distintos organelos con genoma de la célula vegetal a luz de distintas longitudes de onda, a través del uso de las distintas proteínas fluorescentes. Determinamos que el único intervalo de luz en el que no vemos respuesta de los organelos es la luz verde (500-520nm), convirtiendo de esta manera, a la proteína fluorescente amarilla (YFP) en la proteína que nos permite observar el movimiento de los distintos organelos sin agregar artefactos propios de la luz de excitación.

De los resultados, destacamos que el uso de la luz azul de menor longitud de onda (426-446nm), que se utiliza para excitar la proteína fluorescente cian (CFP), produce daño en el tejido observado, ya que transcurridos dos minutos de excitación con esta luz, el tejido presenta lesiones en el punto de incidencia

de la luz, lo que se puede observar macroscópicamente. Esto también nos permite explicar la dificultad de encontrar los patrones definidos cuando utilizamos la proteína fluorescente cyan para marcar los organelos, pues lo que observamos es el resultado de la marca de la proteína fluorescente y el proceso degenerativo de la célula.

Al usar luz azul (465-485nm) que excita la proteína fluorescente verde (GFP), tenemos resultados que muestran que no sólo los cloroplastos, sino que también otros plastidios y mitocondrias presentan respuestas evasivas. Por lo tanto, hay que tener en cuenta que fluoróforo se utilizará para marcar *in vivo* y analizar el movimiento de organelos dentro de una célula vegetal, porque los resultados no deben ser alterados por el método utilizado. La luz que excita a la proteína fluorescente verde (GFP) produce, por si misma, una respuesta en plastidios y mitocondrias de células de la epidermis de tabaco.

La luz verde es inocua para el tejido y la célula vegetal, lo que nos hace concluir que la proteína fluorescente amarilla (YFP) es la proteína más adecuada para marcar los organelos y estudiar su respuesta frente a la luz de diferentes longitudes de onda.

En este trabajo no solo analizamos la dependencia de la repuesta evasiva que presentan estos organelos al punto de incidencia de la luz, sino que también analizamos la variación en la respuesta observada al irradiar un punto fijo en la célula o irradiar siempre en el plano de enfoque de la fluorescencia emitida por

la proteína fluorescente que se acumula en el organelo. Los resultados obtenidos con la luz azul, descritos en la figura 11A y 11B, nos muestran que los plastidios presentan una mayor respuesta cuando la luz irradia directamente sobre el plano de enfoque de los organelos, lo que puede ser un indicio que el sensor que se está activando con la luz se ubica en el organelo o interactuando muy cercano a él. Poco se conoce de los fotorreceptores de luz azul, PHOT1 se localiza en la membrana plasmática (Sakamoto y Briggs 2002), pero la localización de PHOT2 no ha sido determinada aún, sabiendo que éste fotorreceptor es el encargado de iniciar la respuesta evasiva de los cloroplastos frente a luz azul de alta intensidad (Jarillo y cols 2001, Kagawa y cols 2001); puede pensarse que este fotorreceptor está cerca del organelo.

Las mitocondrias también muestran una respuesta de evasión frente a la luz azul (465-495nm) como se observa en la figura 11C y 11D. Observamos para este organelo un fenómeno de evasión mayor al irradiar directamente el plano de enfoque de la fluorescencia emitida por la proteína que se acumula en las mitocondrias. No existen evidencias que las mitocondrias sean capaces de responder a la luz en plantas, pero como los cloroplastos, las mitocondrias poseen complejos que transportan electrones. Estos pueden ser dañados por la luz, entonces, postulamos que los mismos mecanismos que permiten el movimiento de cloroplastos pueden estar modulando el movimiento de mitocondrias en respuesta a la luz.

Frente a luz UV-A (350-390nm), todos los organelos estudiados responden de manera similar, tanto al irradiar sobre un punto fijo de la célula como directamente sobre el organelo (figura 11). Esta respuesta sería una consecuencia del daño causado por la luz a la célula y no una respuesta específica de cada organelo. No obstante, plastidios, mitocondrias y núcleo son organelos con genoma y la respuesta podría ser un mecanismo para evitar mutaciones que este tipo de luz puede causar sobre el ADN (Draper y Hays 2000).

Al observar los resultados obtenidos con la luz azul de 426-446nm, que corresponde a la luz que se utiliza para excitar la proteína fluorescente cyan, podemos ver que todos los organelos estudiados presentan una respuesta evasiva (figura 11 y 12). La intensidad de esta respuesta no es dependiente del punto de irradiación. Pero al analizar la respuesta de cada organelo a tiempos más cortos de exposición a la luz, la velocidad de las distintas respuestas observadas es mayor para esta luz que con cualquier otra, incluida la luz UV-A.

Al analizar la respuesta de los distintos organelos a la luz amarilla (530-550nm) los resultados se alejan de lo esperado. Tanto plastidios como mitocondrias muestran un movimiento evasivo frente a este rango de longitudes de onda. Hasta el momento no se conoce de la existencia de un fotorreceptor que sense este tipo de luz en plantas, lo que estaría dando cuenta de la existencia de un mecanismo hasta ahora no descrito. Las respuestas observadas son, en el caso de los plastidios nuevamente mayores cuando la luz irradia directamente

sobre el organelo. Para la mitocondrias, a diferencia de lo observado con la luz azul, la respuesta es mayor cuando se irradia directamente el organelo (igual que para plastidios) y la respuesta es muy pequeña cuando se irradia un punto constante en la célula.

Como control se hizo los mismos experimentos, pero con bacterias que acumulan la proteína fluorescente amarilla, adheridas a una base de agarosa que les impidiese desplazarse; los resultados muestran que la fluorescencia no desaparece y solo decae levemente con las luces UV y azul (426-446nm), resultados no mostrados. Con esto eliminamos la posibilidad que la proteína se foto-blanquee con la luz que utilizamos para irradiar el tejido.

Para explicar este fenómeno pensamos que existen dos mecanismos diferentes de respuesta, uno frente a longitudes de onda pequeñas (350 a 446nm), en el cual se activa un proceso masivo de evasión de los organelos frente a la luz altamente energética para evitar el daño. Otro mecanismo seria el que induce el movimiento de plastidios y mitocondrias frente a la luz de mayor longitud de onda, donde el estímulo o señal desencadena una respuesta fisiológica iniciada con dicho movimiento de organelos. No obstante, solo la realización de nuevos y más específicos experimentos permitirán finalmente dilucidar el mecanismo que modula la respuesta de los organelos con genoma de la célula vegetal frente a la luz de diferentes longitudes de onda.

Para dilucidar el mecanismo que permite este movimiento de evasión de los organelos, en el cual podrían estar involucrados fotorreceptores y estructuras del citoesqueleto, sugerimos el uso de drogas que afectan la dinámica del citoesqueleto, ya que otros estudios han demostrado que tanto plastidios, como mitocondrias y núcleo en plantas estarían moviéndose a través del citoesqueleto de actina (Chytilova y cols 2000, Van Gestel y cols 2002).

Es importante incorporar a este tipo de análisis la intensidad de la luz, ya que existen en la literatura evidencias que los cloroplastos presentan diferentes respuestas frente a distintas intensidades de la luz. Preliminarmente hemos realizado algunos experimentos que indican que la velocidad y distancia total recorrida por los organelos aumenta frente a mayores intensidades de la luz.

Durante el desarrollo de esta tesis se han construido plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen el gen que codifica para la proteína fluorescente amarilla, que se dirige a las mitocondrias. Además otros trabajos del laboratorio han permitido transformar plantas de *Arabidopsis* que acumulen la proteína fluorescente amarilla en el núcleo y plastidios. En el futuro se utilizarán estas plantas para hacer cruces con plantas mutantes en fotorreceptores y estructuras del citoesqueleto y poder disectar los mecanismos por los cuales los tres organelos con genoma de la célula vegetal evaden la luz de diferentes longitudes de onda a velocidades distintas.

5 CONCLUSIONES

- Los organelos con genoma de la célula vegetal evaden la luz de diferentes longitudes de onda, exceptuando el rango correspondiente a la luz verde (500-520nm).
- Las longitudes de onda de la luz utilizadas para excitar las proteínas fluorescentes cyan, verde y roja afectan el movimiento de plastidios y mitocondrias.
- El núcleo, en particular, evade la luz de longitudes de onda menores a 465nm, lo que implica que la luz utilizada para excitar la proteína fluorescente cyan afecta el movimiento de este organelo.
- La exposición prolongada (sobre 1 minuto) de células vegetales a luz de longitudes de onda menores a 465nm producen daño en el tejido expuesto.
- La proteína fluorescente amarilla (YFP) es la proteína más apropiada para observar el movimiento de organelos con genoma en la célula vegetal.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad M., Jarillo J., Smirnova O. and Cashmore A. (1998). Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature* 392:720-723.
- Ahmad M., Grancher N., Heil M., Black R., Giovani B., Galland P. and Lardemer D. (2002). Action spectrum for cryptochrome-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129(2):774-85.
- Briggs W. and Huala E. (1999). Blue-light photoreceptors in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:33-62.
- Cerutti M., Osman M., Grandoni P. and Jagendorf A. (1992). A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 8068-8072.
- Chen H., Nelson R. and Sherwood J. (1994). Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotech.* 16: 664-669.
- Chytilova E., Macas J., Sliwinska E., Rafelski S., Lambert G and Galbraith D. (2000). Nuclear dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Cell* 11: 2733-2741.
- Clough S. and Bent A. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* – mediated transformation of *Arabidopsis*. *Plant J.* 16(6): 734-743.
- Draper K. and Hays J. (2000). Replication of chloroplasts mitochondrial and nuclear DNA during growth of unirradiated and UV-B irradiated *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 23(2):255-265.
- Gilmartin P. and Chua N. (1990). Localization of a phytochrome-responsive element within the upstream region of pea *rbcS-3A*. *Mol. Cell Biol.* (10):5565-5568.
- Gressel J. (1979). Blue light photoreception. *Photochem. Photobiol.* 30:749-754.

- Guo H., Duong H., Ma N. and Lin C. (1999). The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism.
Plant J. 19(3):279-87.
- Hanson M. and Kohler R. (2001). GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants.
J. Exp. Bot. 52 (356): 529-539.
- Heim R., Cubitt A. and Tsien R. (1994). Improved green fluorescent protein.
Nature 373: 663-664.
- Hoffman P., Batschauer A. and Hays J. (1996). NPH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases.
Mol. Gen. Genet. 253(1-2):259-265.
- Huala E., Oeller P., Liscum E., Han I., Larsen E. and Briggs W. (1997). Arabidopsis NPH1: A protein Kinase with a putative redox-sensing domain.
Science 278:2120-2122.
- Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1991). High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids.
Gen 30: 96(1):23-28.
- Jarillo J., Gabrys H., Capel J., Alonso J., Ecker J. and Cashmore A. (2001). Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light.
Nature 410:952-954.
- Kagawa T. and Wada M. (1999). Chloroplast-Avoidance response induced by high – fluence blue light in prothellic cells of the fern *Adiantum capillus-veneris* as analyzed by microbeam irradiation.
Plant Physiol. 119: 917-923.
- Kagawa T. and Wada M. (2000). Blue light- induced Chloroplast relocation in *Arabidopsis thaliana* as analyzed by microbeam irradiation.
Plant Cell Physiol. 41(1):84-93.
- Kagawa T., Sakai T., Suetsugu N., Oikawa K., Ishiguro S., Kato T., Tabata S., Okada K. and Wada M. (2001). Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response.
Science 291: 2138-2141.
- Kasahara M., Kagawa T., Oikawa K., Suetsugu N., Miyao M. and Wada M. (2002). Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants.
Nature 420:829-832.

Kato N., Pontier D. y Lam E. (2002). Spectral profiling for the simultaneous observation of four distinct fluorescent proteins and detection of protein-protein interaction via fluorescence resonance energy transfer in tobacco leaf nuclei. *Plant Physiol.* 129:931-942.

Kinoshita T., Dol M., Suestsugu N., Kagawa T., Wada M and Shimazaki K. (2001). phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414:656-660.

Kleiner O., Kircher S., Harter K. and Batschauer A. (1999). Nuclear localization of the Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J.* 19(3):289-96.

Köhler R., Cao J., Zipfel W., Webb W. and Hanson M. (1997). Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science*, 276: 2039-2042.

Köhler R., Zipfel W., Webb W. and Hanson M. (1997). The Green fluorescent protein to visualize plant mitochondria *in vivo*. *Plant J.* 11(3): 613-621.

Lin C., Ahmad M. and Cashmore A. (1996). Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J.* 10:893-902.

Lin C. (2000). Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* 5(8): 337-342

Lin C., Robertson D., Ahmad M., Raibekas A., Schuman M., Dutton L. and Cashmore A. (1995). Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science* 269:968-970.

Lin C., Yang H., Guo H., Mockler T. and Cashmore A. (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedling by blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2686-2690.

Liscum E. and Briggs W. (1995). Mutations in the *NPH1* locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* 7:473-485.

Logan D. and Leaver C. (2000). Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement with in living plant cells.

J. Exp. Bot. 51(346): 865-871.

Malhotra K. (1995). Putative blue-light photoreceptor from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequences homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. Biochemistry 34:6892-6899.

Nagatani A., Reed J. and Chory J. (1993). Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. Plant Physiol. 102:269-277.

Reed J., Nagpal P., Poole D., Furuya M. and Chory J. (1993). Mutations in the gene for red/far red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. Plant Cell 5:147-157.

Ries G., Heller W., Puchta H., Sandermann H., Seldlitz H. and Hohn B. (2000). Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. Nature 406:98-101.

Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T., Christie J., Briggs W., Wada M. and Okada K. (2001). *Arabidopsis* *nph1* and *npl1*: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(12): 6969-6974.

Sakamoto K. and Briggs W. (2002). Cellular and subcellular localization of Phototropin 1. Plant Cell 14:1723-1735.

Sambrook I., Fritsch E. and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Sancar A. (1994). Structure and function of DNA photolyase. Biochem. 33:2-9.

Scott A., Waytt S., Tsou P., Robertson D. and Allen N. (1999). Model System for Plant Cell Biology: GFP Imaging in Living Onion Epidermal Cells. BioTechn. 26:1125-1132.

Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H. and Galbraith D. (1995). Green fluorescent protein as a new vital marker in plants cell. Plant J. 8:777-784.

Shinomura T., Nagatani A., Chory J. and Furuya M. (1994). The Induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by Phytochrome B and secondarily by Phytochrome A.
Plant Physiol. 104(2):363-371.

Stoelzle S., Kagawa T., Wada M., Hedrich R. and Dietrich P. (2003). Blue light activates calcium- permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:1456-1461.

Tirlapur U. K., Dahse I., Reiss B., Meurer J., and Oelmüller R. (1999). Characterization of the activity of a plastid – targeted green fluorescent protein in *Arabidopsis*.
Eur. J. of Cell Biol. 78: 233-240.

Tlalka M., Runquist M. and Fricker M. (1999). Light perception and the role of the xanthophyll cycle in blue-light-dependent chloroplast movements in *Lemna trisulca* L.
Plant J. 20(4):447-459.

Tsien R. (1998). The green fluorescent protein.
Annu. Rev. Biochem. 67:509-44.

Van Gestel K., Kohler R. and Verbelen J. (2002). Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules.
J. exp. Bot. 51 (436): 659-667.

Vierstra R. (1993) Illuminating phytochrome functions; there is light at the end of the tunnel.
Plant Physiol. 103:679-684.

Zhou C., Yang Y. and Jong Y. (1990). Miniprep in ten minutes.
Biotech. 8(2): 172-172.