

UCH-FC  
DOC-BMCN  
MSS3  
c-1

**"Diferenciación de plastidios y mitocondrias durante el desarrollo  
de *Arabidopsis thaliana*"**

Tesis

entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

por

Ana Mercado Seguel

Enero, 2005



Director de Tesis: Dra. Lee Meisel

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

Ana Verónica Mercado Seguel

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día lunes 27 de Diciembre de 2004.

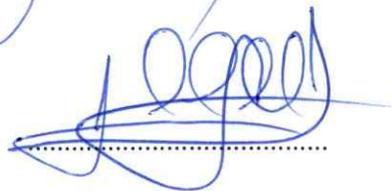
Directora de Tesis:

Dra. Lee Meisel



Comisión Evaluadora de la Tesis:

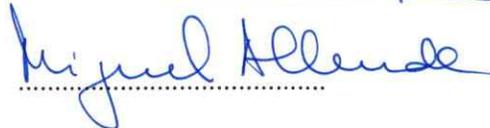
Dr. Ariel Orellana



Dra. Loreto Holuigue



Dr. Miguel Allende



Dr. Ricardo Maccioni

.....



A mi familia  
que me levanta cada vez que caigo  
y que me ha apoyado siempre



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Todos los miembros del Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, en especial a la Dra. Lee Meisel, por ser mi tutora en esta tesis y porque nuestras discusiones están dando frutos. A Andrea Morales y Daniela Urbina por toda la ayuda técnica y, en conjunto con Rodrigo Alvarez, por sus palabras de apoyo en todo momento. A mi compañera y amiga Lorena Marchant por nuestras discusiones científicas y filosóficas.

A Claudio Pastenes por permitirme utilizar su laboratorio y enseñarme más sobre fotosíntesis y a Javiera González por su amabilidad.

A los miembros del comité de doctorado por guiarme con sus comentarios.

A Eric Lam y Naohiro Kato por su colaboración y ayuda técnica.

A Ian Small, quien nos donó vectores con el gen para GFP.

A Lorena Saragoni por su compañía y apoyo en el microscopio confocal.



## FINANCIAMIENTO



El desarrollo de esta tesis fue posible gracias al apoyo de:

- Beca CONICYT para estudiantes de Doctorado. 1999-2002.
- Beca de Tesis de Postgrado. Depto de Postgrado y Postítulo. Universidad de Chile.
- Beca para finalización de estudios de doctorado Escuela de Postgrado-Depto. de Biología.

Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

- Proyecto Fondecyt #1000812, ICM P02-009-F, ICM P99-031-F
- Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología.
- Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, Nucleo Milenio en Biología Celular Vegetal (PCB).



## INDICE DE MATERIAS

TITULO	PAGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
FINANCIAMIENTO	iii
INDICE DE MATERIAS	iv
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo para estudiar cambios en los organelos durante el desarrollo.	3
1.1.1. Fertilización	3
1.1.2. Embriogénesis	4
1.1.3. Germinación y desarrollo vegetativo	7
1.1.4. Meristema apical	8
1.1.5. Desarrollo de la raíz	9
1.2. Plastidios y mitocondrias.	11
1.2.1. Los plastidios adoptan diferentes morfologías.	12
1.2.2. Diferenciación de cloroplastos	13
1.2.3. Diferenciación de Amiloplastos	14
1.2.4. Importancia de las mitocondrias en células vegetales	18
1.2.5. Las mitocondrias adoptan diferentes morfologías	18
1.3. Propósitos de esta tesis	20
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
2.1. Obtención de plántulas y embriones de distintas edades	21
2.2. Clareamiento de semillas	21
2.3. Visualización de cloroplastos.	22
2.4. Tinción de embriones con yoduro de propidio (PI).	22
2.5. Análisis por microscopía electrónica de transmisión.	23
2.6. Obtención de embriones y plantas mutantes.	23
2.7. Medición de la funcionalidad del fotosistema II	24
2.8. Detección de amiloplastos con yodo.	24
2.9. Construcción de vectores para la marcación de organelos.	25
2.10. Verificación del funcionamiento de los vectores en epidermis de cebolla.	25
2.11. Transformación de <i>Arabidopsis</i> mediante inmersión floral.	25
2.12. Selección de semillas transformadas, determinación de la eficiencia de transformación y del número de inserciones de T-DNA.	26
2.13. Visualización de proteínas fluorescentes dirigidas a distintos organelos.	27
2.14. Visualización de clorofila e YFP en embriones mediante microscopía confocal.	27

	PAGINA
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
3.1. Cloroplastos	29
3.1.1. Los cloroplastos se diferencian sólo en la zona apical de plántulas de <i>Arabidopsis</i> después de la germinación.	29
3.1.2. Los cloroplastos se diferencian en células específicas del embrión.	32
3.1.3. Los cloroplastos presentes en el embrión realizan fotosíntesis.	41
3.1.4. Las plantas mutantes en biogénesis de cloroplastos contienen embriones que han detenido su desarrollo en globular.	43
3.1.5. Los embriones mutantes en adquisición de patrones tienen alteración en la distribución de células que contienen cloroplastos	47
3.2. Amiloplastos	51
3.2.1. Los amiloplastos están presentes en células de la columella.	51
3.2.2. La diferenciación de células de la columella va asociada a la diferenciación de amiloplastos y es influenciada por auxina y fitocromos	59
3.3. Otros plastidios y mitocondrias	64
3.3.1. El uso de proteínas fluorescentes permitió la observación de plastidios y mitocondrias.	64
3.3.2. En células epidermales de cebolla las mitocondrias se mueven utilizando el citoesqueleto de actina.	67
3.3.3. La obtención de líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que destinan YFP a mitocondrias y plastidios permitió la observación de estos organelos en plántulas pero no en embriones.	69
<b>4. DISCUSION</b>	<b>74</b>
4.1. Los cloroplastos están presentes en el embrión en células específicas.	75
4.2. Importancia de los cloroplastos durante la embriogénesis	77
4.3. Los amiloplastos se diferencian a la par de las células de la columella de <i>Arabidopsis</i>	81
4.4. Señales que podrían participar en la diferenciación de amiloplastos en raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
4.5. YFP como herramienta para visualizar otros plastidios.	86
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>90</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>93</b>



## INDICE DE TABLAS



	PÁGINA
Tabla 1. Mutantes utilizados en esta tesis.	16
Tabla 2: Vectores diseñados y construidos para la transformación de tejidos vegetales con distintas proteínas fluorescentes.	25
Tabla 3. Temporalidad del desarrollo de embriones de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de la anthesis.	33
Tabla 4. Algunos mutantes en biogénesis de cloroplastos detienen su desarrollo embriogénico.	43
Tabla 5. Análisis de la presencia de almidón en raíces de plantas de <i>Arabidopsis</i> de 4 DPS.	60



## INDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Organización básica de una plántula de Arabidopsis.	5
Figura 2. Desarrollo embrionario en Arabidopsis.	6
Figura 3. Los cloroplastos están presentes en la zona apical de plántulas de Arabidopsis y se diferencian durante la germinación.	31
Figura 4. Estados de la embriogénesis en Arabidopsis.	33
Figura 5. Espectro de absorción de una fracción de homogenizado obtenida desde embriones de Arabidopsis.	34
Figura 6. Espectro de emisión de embriones y plantulas de arabidopsis.	34
Figura 7. Presencia de cloroplastos en regiones específicas de embriones de Arabidopsis.	36
Figura 8. Presencia de clorofila en diferentes capas celulares.	36
Figura 9. Los embriones de Arabidopsis en estado de cotiledones doblados contienen cloroplastos en células de la epidermis.	38
Figura 10. Distribución de cloroplastos en embriones en estado de cotiledones doblados de Arabidopsis.	40
Figura 11. Los embriones de Arabidopsis tienen cloroplastos con un fotosistema II funcional.	42
Figura 12. Las líneas mutantes en genes que participan en la biogénesis de cloroplastos tienen embriones que detienen su desarrollo en globular.	46
Figura 13. Las células que contienen clorofila presentan una distribución alterada en mutantes en adquisición de patrones.	49
Figura 14. Los amiloplastos están presentes en varios tejidos en plántulas de Arabidopsis.	51
Figura 15. Análisis de la presencia de amiloplastos en diferentes estados del desarrollo de la raíz de Arabidopsis.	53
Figura 16. Análisis por Microscopía electrónica de Transmisión (TEM).	54
Figura 17. Las células de la columella de plántulas de 4 días tienen amiloplastos.	56
Figura 18. Detalle de células del ápice de la raíz de plántulas de 2 días.	57
Figura 19. Microfotografías de células del ápice de la raíz de embriones en estado de cotiledones doblados.	58

	<b>PÁGINA</b>
Figura 20. Fotografía de distintos mutantes en la vía de transducción de señales de la luz (fitocromos).	60
Figura 21. Identificación de mutantes con alteración en el contenido de almidón en células de la raíz de Arabidopsis.	61
Figura 22. Restauración del fenotipo WT en el doble mutante aux-1/ein2-1 por tratamiento con auxina (NAA).	62
Figura 23. Comparación de los amiloplastos de plantas silvestres columbia y mutantes dobles phyA-201/phyB-5 y aux1-7/ein2-1.	63
Figura 24. Verificación del transporte de proteínas fluorescentes a plastidios y mitocondrias.	66
Figura 25. Dinámica de mitocondrias marcadas con GFP en células epidermales de cebollas.	68
Figura 26. Los plastidios y las mitocondrias marcados con YFP pueden observarse en distintas células de plantas de Arabidopsis.	70
Figura 27. Movimiento de mitocondrias en células epidermales de cotiledones de plántulas de Arabidopsis establemente transformadas con una construcción para la destinación de YFP a mitocondrias.	71
Figura 28. Fluorescencia de YFP en embriones obtenidos desde plantas con mitocondrias y plastidios que acumulan YFP.	72
Figura 29. Embriones de plantas transgénicas que acumulan YFP en plastidios.	72



## LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

35S : Promotor 35S del virus mosaico de la coliflor

DNA : Acido desoxiribonucleico

DPF : Dias post-fertilización

DPA : Días post-anthesis

DPS : Días post-siembra

DIC : Differential interference contrast

Kan : Kanamicina

LB : Luria broth

MS : Medio de cultivo de plantas utilizado en esta tesis.

NosT : Secuencia de término de la transcripción del gen que codifica para Nopalina sintetasa.

PAS : Periodic Acid Schiff reagent, reactivo para teñir carbohidratos

PI : Yoduro de propidio

NASC : Nottingham Arabidopsis Stock Centre

TEM : Microscopía electrónica de transmisión

YFP : Yellow fluorescent protein, proteína fluorescente amarilla

## RESUMEN

Los plastidios y las mitocondrias son organelos que poseen un genoma propio y que efectúan funciones metabólicas esenciales para las células vegetales. Entre los plastidios más estudiados se encuentran los cloroplastos, que realizan fotosíntesis y los amiloplastos, que almacenan almidón. En los últimos años, la marcación de plastidios y mitocondrias con proteínas fluorescentes ha permitido observar cambios dinámicos en la morfología y distribución de estos organelos en la célula. Además, se han realizado estudios de microscopía electrónica y de actividad enzimática de plastidios y mitocondrias, en los que se ha demostrado que los cambios en la morfología de estos organelos se asocian con cambios en su función metabólica. Estos estudios han sido realizados durante el desarrollo de órganos en plantas adultas. Se ha visto que a medida que las células se diferencian, los organelos que contienen cambian su morfología. Se sabe que durante el periodo embriogénico también existe diferenciación celular. Sin embargo, no existen estudios de la diferenciación de organelos durante la embriogénesis en plantas.

En esta tesis se ha caracterizado la diferenciación de plastidios y mitocondrias en embriones y en raíces durante la germinación, utilizando como modelo *Arabidopsis thaliana*. Observé que los embriones contienen cloroplastos en células específicas. Estos organelos se diferencian en el estado globular en la protodermis. Pude establecer que los cloroplastos presentes en el embrión tienen un fotosistema II activo, por lo que son capaces de realizar fotosíntesis. Para determinar si los cloroplastos son necesarios para completar la embriogénesis, analicé embriones de mutantes con fallas en la biogénesis de cloroplastos. En estos mutantes algunos embriones detenían su desarrollo en globular, lo que indica que los cloroplastos son necesarios para completar la embriogénesis.

Para determinar si las señales del desarrollo influyen en la diferenciación de cloroplastos, estudié mutantes en la formación del eje axial en el embrión. Los embriones

homocigotos para estas mutaciones podían diferenciar cloroplastos, pero la distribución espacial de las células que tenían cloroplastos respecto a las que no contenían estos organelos estaba alterada. Este estudio se realizó en embriones silvestres en estado de cotiledones doblados, los cuales contenían cloroplastos en todos los tipos celulares, excepto las células provasculares y de la columella de la raíz.

En las células de la columella observé la presencia de otro tipo de plastidios: los amiloplastos. Según resultados de microscopía electrónica se comprobó que estos organelos se diferencian después de la germinación. Además, observé que la morfología de mitocondrias cambia a través de la diferenciación de células de la columella en la raíz, a la par de la diferenciación de amiloplastos.

Para observar otros plastidios y mitocondrias, se condujo YFP a estos organelos. Observé que existía una población heterogénea de plastidios tanto en embriones como en plantas adultas y que las mitocondrias se mueven y cambian su forma en células de la epidermis de plantas adultas de *Arabidopsis* y en células epidermales de cebolla. Este movimiento era conducido por el citoesqueleto de actina en células de cebolla. Es decir, las mitocondrias tienen un comportamiento dinámico, ya que cambian su morfología y son capaces de moverse en el citoplasma. La caracterización de la diferenciación de plastidios y mitocondrias realizada en este trabajo es el primer paso en la búsqueda de señales que conducen a la diferenciación de estos organelos y al estudio de su función durante el desarrollo en *Arabidopsis*.

## ABSTRACT

Plastids and mitochondria are genome containing organelles central to plant cell metabolism. The most studied types of plastid are chloroplasts and amyloplast. Chloroplasts are specialized types of plastids that contain chlorophyll and carry out photosynthesis. Amyloplasts are starch-containing non-green plastids. Within the past few years, labeling of plastids and mitochondria with fluorescent proteins has made it possible to study the dynamic changes in the morphology and distribution of these organelles within the cell. Additionally, electronic microscopy and enzymatic studies carried out on mitochondria and plastids, have demonstrated that morphological changes are correlated to changes in their metabolic functions. These studies have been carried out during the development of organs in adult plants. It was observed that as cells get differentiated, organelles inside them change their morphology. It has been demonstrated previously the cell differentiation also occurs on embryogenesis. However, there are no studies about organelle differentiation during plant embryogenesis.

In this thesis, plastid and mitochondria differentiation in embryos and roots of germinating plants have been characterized in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Chloroplasts have been observed in specific cells during embryogenesis. These organelles are differentiated in the protodermal layer during the globular stage of embryogenesis. Additionally, I demonstrate that the chloroplasts within the embryo have an active photosystem II and are, therefore, capable of carrying out photosynthesis.

To determinate if chloroplast are essential to complete embriogenesis, mutant embryos in chloroplast biogenesis were analyzed. It was noticed that these mutants stopped their development at globular stage, indicating that active chloroplasts are essential to complete embryogenesis.

To determine if developmental signals influence chloroplast differentiation, I studied chloroplasts within embryo axis formation mutants. Homozygous embryos from these mutant lines contained differentiated chloroplasts, but the spatial distribution of the chloroplast-containing cells was altered. This survey was realized in bent cotyledon stage embryos, which contain chloroplasts in all cell types except provascular and root columella cells.

I observed another kind of plastid within columella cells: amyloplasts. According to electronic microscopy studies we were able to see that these organelles differentiate after germination. Additionally, our findings indicate that mitochondria morphology changes throughout columella cell differentiation within the root, at the same time as amyloplasts differentiate.

To observe other plastids and mitochondria, YFP was targeted to these organelles. It was observed that there exists a heterogeneous plastid population in embryos as well as adult plants. Additionally, it was seen that mitochondria move and changes its morphology in epidermal cells of adults plants and onion epidermal cells. This movement was driven by the actin cytoskeleton in onion epidermal cells. Therefore, mitochondria in plant cells are dynamic because they change their morphology and are capable of moving inside the cytoplasm. The characterization of plastid and mitochondria differentiation carried out in this thesis is a first step towards searching for the signals that drive organelle differentiation and subsequent function during Arabidopsis development.

## 1. INTRODUCCION

Las células que conforman los organismos pluricelulares realizan funciones especializadas y altamente coordinadas, lo cual permite la mantención de la homeostasis en el individuo. Entre las características propias de una célula están su posición respecto a otras células; su forma; tamaño; capacidad de dividirse; capacidad metabólica; genes que expresa; proteínas que acumula; cantidad y tipo de organelos que contiene; y distribución de sus organelos en el citoplasma. Para adquirir estas características, cada una de las células que forman parte de un individuo deben diferenciarse durante el desarrollo.

Se han tomado varios modelos para estudios del desarrollo, entre ellos, insectos como *Drosophila*; vertebrados, como *Xenopus* o pez cebra; y plantas, como *Arabidopsis thaliana*. Los estudios de estos modelos nos han enseñado que existe una red de señales complejas que regula la diferenciación de cada una de las células en el lugar y en el tiempo precisos. Algunas de estas señales se conservan entre diferentes especies. Por ejemplo, las proteínas homeodominio han sido encontradas en organismos filogenéticamente distantes, como levaduras, plantas y humanos (Vershon y Johnson, 1993; Gilbert y cols, 2000; Bellaoui y cols, 2001; Marchini y cols, 2004). Pero, existen otras señales del desarrollo que son propias de una familia o de un reino filogenético, y este es el caso de las plantas.

A diferencia de animales, las plantas poseen células rodeadas por una pared. La pared celular ancla unas células a otras y les impide moverse. Es decir, durante el desarrollo de plantas, no se observan movimientos celulares como en la gastrulación de animales. Por lo tanto, en plantas el plano de división de una célula determina la posición de su descendencia y la posición espacial dictará las señales que ella recibe de sus células vecinas o del medioambiente (Woodrick y cols, 2000).

Otra diferencia entre el desarrollo observado en plantas y en animales es que las plantas presentan morfogénesis de órganos a lo largo de toda su vida. Es decir, el nuevo

individuo que se forma por la fusión de los gametos masculino y femenino, presenta un desarrollo embriogénico en el que se establece su estructura básica. Pero también presenta un desarrollo post-embriogénico, a través del cual crece continuamente. Este crecimiento se sustenta en centros de crecimiento y diferenciación, llamados meristemas, que se forman en varias partes de la planta durante distintas fases de su desarrollo. Las células meristemáticas presentes en estos centros son células madres que se dividen continuamente para auto preservarse y originar nuevos órganos (Meyerowitz y Somerville, 1995; Taiz y Zeiger, 1998; Carles y Fletcher, 2003).

Además, las células vegetales poseen tres genomas distintos y físicamente separados: el genoma nuclear, el plastidial y el mitocondrial. Estos genomas deben estar coordinados para que la célula pueda responder a señales ambientales o del desarrollo.

La presencia de plastidios en la célula vegetal, le otorga funciones metabólicas propias y distintas de las células animales, como la capacidad de hacer fotosíntesis, que es llevada a cabo por un tipo de plastidios denominados cloroplastos (Buchanan y cols, 2000). La presencia de estos organelos también influye sobre las funciones de otros. Por ejemplo, en las células vegetales, las mitocondrias en conjunto con los cloroplastos y peroxisomas llevan a cabo la fotorespiración, un proceso que sirve para la recuperación de carbono que ha sido perdido por la reacción de oxigenación de la rubisco. Este proceso de fotorespiración no existe en animales (Somerville, 2001). Los plastidios y las mitocondrias son fundamentales en el metabolismo energético, a partir del cual se sintetizan aminoácidos, lípidos y carbohidratos. En estos y otros procesos metabólicos se sintetizan las moléculas necesarias para construir las miles de células que forman un individuo pluricelular, por lo que el metabolismo también es regulado durante el desarrollo (Logan y cols, 2001).

Las propiedades metabólicas de una célula dependen de la diferenciación de organelos en su citoplasma. Plastidios y mitocondrias presentan cambios morfológicos que se correlacionan con su función, pero esto no ha sido estudiado durante el desarrollo embriogénico, por lo que en esta tesis se ha tomado como modelo *Arabidopsis thaliana* para

comenzar el estudio de la diferenciación de organelos en el contexto de la diferenciación celular en embriones.

### **1.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo para estudiar cambios en los organelos durante el desarrollo.**

*Arabidopsis* es una planta diploide, su genoma es relativamente pequeño y se encuentra completamente secuenciado. Se dispone de bancos de semillas con mutaciones que cubren la mayoría de sus genes, por lo que presenta ventajas como modelo para estudios genéticos. El ciclo de vida de *Arabidopsis* alterna una fase diploide y una haploide. La formación de los gametos mediante meiosis constituye la fase haploide. Esta fase termina con la fertilización, o fusión de los gametos, para la creación de un nuevo cigoto diploide. El cigoto adquiere sus estructuras básicas y se convierte en una nueva planta durante el desarrollo embriogénico. Luego, durante el desarrollo post-embriogénico forma continuamente órganos y crece. La primera fase de crecimiento se denomina vegetativa, y la segunda reproductiva. En la fase reproductiva se producen los gametos que reinician el ciclo.

Para caracterizar el desarrollo de *Arabidopsis*, se han establecido mapas de destino basados en la posición y morfología celular. Estos mapas han sido construidos tanto para el desarrollo embriogénico como para el post-embriogénico (Dolan, 1993; Woodrck y cols, 2000; Saulsberry y cols, 2002) y se conocen algunas de las señales que controlan estos procesos en cada una de las etapas del ciclo de vida de *Arabidopsis*, lo cual se muestra a continuación.

#### **1.1.1. Fertilización**

*Arabidopsis* es una angiosperma, y como tal, produce gametos en órganos especializados, conocidos como flores. Entre las estructuras de las flores se encuentran las anteras, en las cuales se produce el grano de polen o gameto masculino, y el carpelo u ovario, en el cual están los gametos femeninos.

El grano de polen está formado por dos células: la célula del tubo y la célula generativa. La célula del tubo contiene en su interior a la célula generativa. Esta última es haploide y genera dos espermios por división. Cuando el grano de polen se poza en la superficie del carpelo

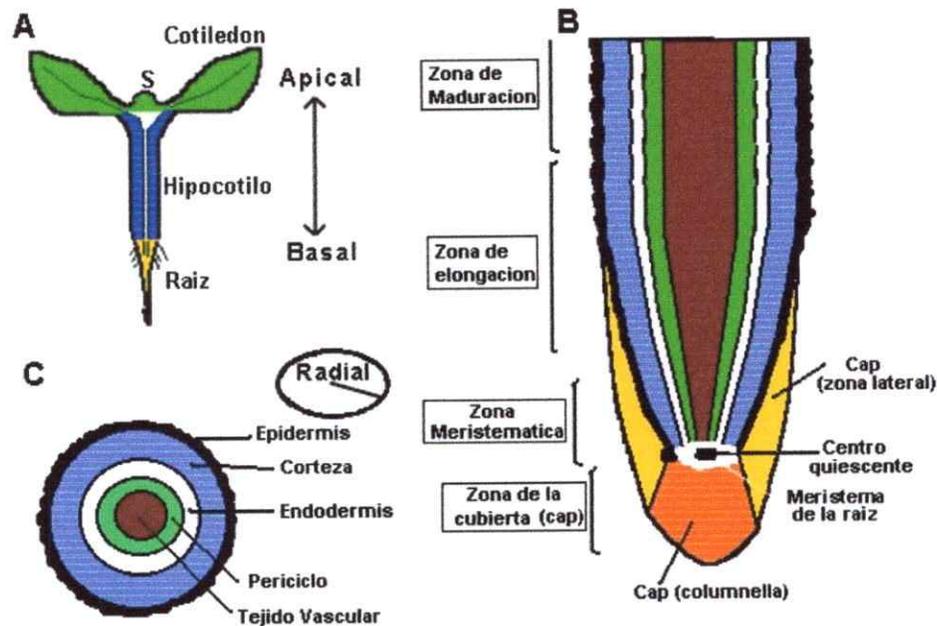
queda alejado de los óvulos. Para alcanzar a los óvulos, la célula del tubo germina y se alarga, dando origen a una estructura conocida como tubo polínico, en cuyo extremo se ubican los espermios. Uno de los espermios fertiliza al óvulo y el otro fertiliza a las células diploides que rodean al óvulo, creando células triploides que por mitosis forman el endosperma. El endosperma protege al embrión y contiene reservas nutritivas necesarias para su desarrollo post-embriogénico. El conjunto de endosperma más embrión constituyen la semilla (Berger, 2003).

Una vez que se produce la fertilización, el ovario se transforma y origina una vaina denominada silicua que protege a las semillas (Coen y Meyerowitz, 1991; Laufs y cols, 1998; Langdale, 1998; Bowman y Eshed, 2000).

### **1.1.2. Embriogénesis**

Existe una amplia variación morfológica entre plantas adultas con flores (angiospermas). Sin embargo, durante la embriogénesis, ellas pasan a través de estados similares, formando embriones maduros estereotipados. La embriogénesis es el periodo durante el cual se pone en marcha el plan de desarrollo que establece la organización básica de la plántula y se asegura la disponibilidad de reservas nutritivas para la germinación. Este periodo va desde la fertilización hasta la dormancia de la semilla.

La organización básica de una plántula (después de la germinación) puede ser descrita como la sobreposición de dos ejes: uno axial y uno radial. El eje axial comprende cotiledones, meristema apical del brote (S), hipocotilo, raíz y meristema de la raíz (Figura 1A). En este eje pueden establecerse subdivisiones en los distintos órganos, como en el caso de la raíz, en el que se distingue desde la zona de maduración hasta la zona de la cubierta (Figura 1B). El eje radial consiste en capas de tejidos ordenadas de manera concéntrica y puede observarse claramente en hipocotilo y raíz. En un corte transversal de la raíz, a nivel de la zona de elongación, el eje radial comprende epidermis, corteza, endodermis, periciclo y tejido vascular (Figura 1C), estos ejes se establecen durante la embriogénesis.

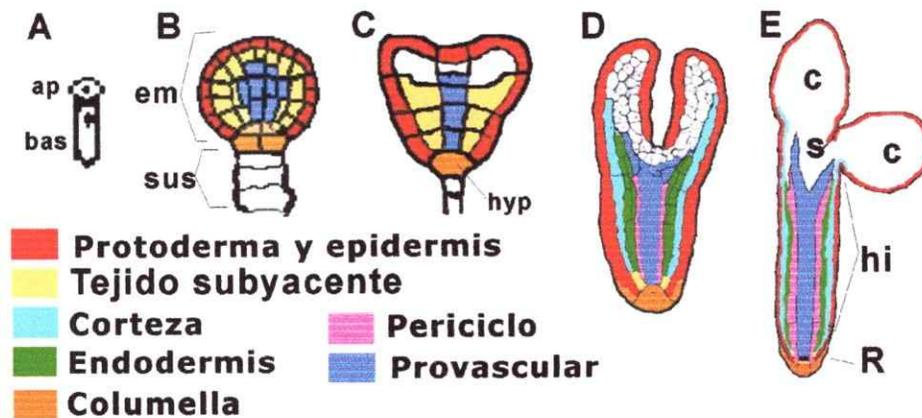


**Figura 1. Organización básica de una plántula de Arabidopsis.**

A: Eje axial, que comprende cotiledones, meristema apical del brote (S), hipocotilo, raíz y su meristema. B: Raíz mostrando su eje axial (Zona de la cubierta a zona de maduración) y radial completo. C: Eje radial, que se representa como un corte transversal de la zona de elongación de la raíz y que comprende epidermis, corteza, endodermis, periciclo y tejido vascular.

En Arabidopsis la embriogénesis se ha dividido en cinco estados principales: dos células, globular, corazón, torpedo y cotiledones doblados (Figura 2) (Mayer y cols, 1991; Meyerowitz y Somerville, 1995; Taiz y Zeiger, 1998). A través de la embriogénesis el primer eje que se establece es el axial. Este eje se establece durante la primera división del cigoto, que es asimétrica y origina dos células, una terminal, que da origen al embrión; y una basal, que da origen al suspensor y parte de la raíz. El suspensor tiene como función principal la comunicación del embrión con la madre (Figura 2A) (Meyerowitz y Somerville, 1995). Las señales para la orientación del primer eje son desconocidas, aunque se sabe que mutantes *gnom* (*gn*) presentan una primera división simétrica. *Gnom* codifica para una proteína con similitud a intercambiadores de nucleótido guanina, implicados en el transporte de vesículas del Golgi (Tabla 1) (Geldner y cols, 2003).

El segundo eje que se establece es el radial, éste puede distinguirse en el estado globular (Figura 2B) y comprende tres tipos de tejidos: el tejido dermal o protodermis, que da origen a epidermis; el tejido subyacente, que formará corteza y médula (endodermis y periciclo); y el tejido vascular, que formará los tejidos conductores denominados xilema y floema. En esta etapa se observa la expresión apical de *Wus* y *Stm*, que codifican para proteínas homeodominio, y de *Ant*, un factor de transcripción propio de plantas (Long y Barton, 1998). Los productos de estos tres genes especifican y mantienen indiferenciadas a las células que forman el meristema apical del brote (Mayer y cols, 1998).



**Figura 2. Desarrollo embrionario en *Arabidopsis*.** A. Dos células. B. Globular. C. Corazón. D. Torpedo. E. Cotiledones doblados. ap= célula apical, bas = célula basal, em = embrión propiamente tal, sus= suspensor, hyp= hipófisis, c = cotiledon, s= meristema apical, hi= hipocotilo, R= raíz.

En el estado de corazón se establece un eje de simetría bilateral, comenzando a ser visibles los cotiledones (Figura 2C). En las células precursoras del meristema apical, se expresan *Ufo* y *Clv1*. UFO tiene un dominio F-box característico de proteínas que forman parte del complejo de poliubiquitinación para la degradación de proteínas y CLV1 es un receptor de membrana con actividad kinasa que limita el tamaño del meristema apical (Long J y Barton M, 1998). En esta etapa el embrión no ha completado el desarrollo de meristemas.

Durante el estado de torpedo (Figura 2D), el embrión se elonga y siguen las divisiones celulares que dan origen a los meristemas apical y de la raíz, los cuales completan su desarrollo

en el estado de cotiledones doblados (Figura 2E). En este estado los cotiledones continúan creciendo a la par de las reservas nutritivas de la semilla (Ruuska y cols, 2002).

Los antecedentes descritos en la literatura demuestran que distintos productos génicos se expresan en etapas particulares de la embriogénesis y en regiones específicas del embrión. Por lo que, el desarrollo del embrión depende de la expresión coordinada de genes (Long J y Barton, 1998; Helariutta y cols, 2000). Entre estos genes se encuentran aquellos relacionados con la especificación de la arquitectura o patrón del embrión. Se han aislado algunos mutantes en adquisición de patrones que presentan fallas en el desarrollo del eje axial o radial (Tabla 1). Es así como *gurke (gk)* no tiene cotiledones ni meristema apical, es decir, falla en la diferenciación de órganos apicales; *fackel (fk)* falla en diferenciación de hipocotilo; *monopteros (mp)* falla en la diferenciación de hipocotilo y raíz; y *gnom (gn)* no diferencia raíz (Mayer y cols, 1991). Además *scarecrow* presenta alteración en el patrón radial, ya que en vez de corteza y endodermis tiene una sola capa celular ubicada en esa posición (Wysocka-Diller y cols, 2000). Todos estos mutantes tienen alteraciones en el desarrollo de uno o más órganos, mientras que el resto de la arquitectura del embrión se mantiene similar al silvestre.

### **1.1.3. Germinación y desarrollo vegetativo**

Una vez que el embrión ha adquirido su morfología básica entra en el estado de dormancia, la actividad transcripcional y metabólica disminuyen, la semilla pierde agua y corta la conexión con la planta madre (Meyerowitz y Somerville, 1995; Taiz y Zeiger, 1998). Cuando la humedad, la luz y la temperatura gatillan la germinación, se produce un aumento en la actividad metabólica de la semilla, lo que se traduce en la movilización de nutrientes para ayudar al crecimiento de la plántula. Lo primero que emerge de la semilla es la raíz y luego los cotiledones.

Una vez que la planta germina, comienza el desarrollo vegetativo. Este comprende la generación de nuevos órganos. En el extremo apical de la plántula se originan continuamente las hojas, encargadas de realizar fotosíntesis. En el extremo basal, la raíz se elonga y se ramifica, originando raíces secundarias. En la región central, el hipocotifo presenta pocas

divisiones celulares, por lo que su composición celular es más cercana a la existente en el embrión (Gendreau y cols, 1997).

Para sostener el crecimiento en la zona apical y en la basal, la plántula contiene zonas de activa división, denominadas meristema del brote (S) y meristema de la raíz, respectivamente. Los meristemas están constituidos por células troncales que, por división, originan los distintos tipos celulares que formarán los órganos al diferenciarse. Además, una de las células hijas continúa integrando el meristema, siendo indiferenciada.

El meristema de la raíz, da origen a las células de la raíz; y el meristema apical del brote, durante la fase de crecimiento vegetativo de la planta, da origen a las hojas y, durante la fase reproductiva, origina las inflorescencias. Sin embargo, existe división celular y diferenciación que ocurre en otras regiones especializadas de la planta, y que se originan una vez que el órgano principal está formado. Es el caso de las células guardianas y de los tricomas en las hojas y de los pelos radiculares en la raíz. Estos tres tipos celulares se originan de la epidermis y constituyen modelos de diferenciación post-meristemática (Zhao y Sack, 1999; Larkin y cols, 2003).

#### **1.1.4. Meristema apical**

Las células del meristema apical del brote pueden ser clasificadas de acuerdo a su relación histológica en las zonas central, periférica y *rib*. En la zona central se encuentran las células meristemáticas indiferenciadas y basales a ellas, la zona *rib* o células subyacentes (Nakajima K y Benfey P, 2002). Como se mencionó anteriormente, en el estado globular de la embriogénesis, se ha detectado la expresión apical de genes que promueven el desarrollo del meristema apical del brote, como *Wus*, *Ant*, *Stm*, *Ufo* y *Civ1*. Tanto el meristema apical, como el de la raíz completan su desarrollo en el estado de cotiledones doblados y, después de la germinación, el meristema del brote comienza su división estereotipada que da origen a todos los órganos aéreos, incluyendo las hojas y el meristema floral (Long y Barton, 1998; Nakajima y Benfey, 2002).

Para la mantención del meristema del brote en la planta adulta es necesaria la coordinación entre varios genes, algunos de los cuales también se expresan en el embrión (Mayer y cols, 1998; Brand y cols, 2000, Long y Barton, 1998). Por ejemplo, *Wus* promueve la mantención de las células meristemáticas desdiferenciadas y se expresa en las células del *rib* (basales a las meristemáticas). La expresión de *Wus* es regulada por los genes *Civ1*, *Civ2* y *Civ3*, que limitan la cantidad de células indiferenciadas. *Civ3* se expresa en las células meristemáticas. Por lo que, al aumentar la expresión de *Wus*, aumenta la cantidad de células meristemáticas. Al haber más células meristemáticas, aumenta la cantidad de *Civ3*, que actúa disminuyendo la expresión de *Wus*. Los genes *Civ1* y *Civ2* forman un complejo que actúa como receptor de *Civ3* en las mismas células que expresan *Wus*. Por lo que la acción de *Wus* y los genes *civ* colaboran para la mantención del meristema y de su equilibrio entre células indiferenciadas y aquellas que se diferencian para originar los distintos órganos (Mayer y cols, 1998; Brand y cols, 2000).

#### **1.1.5. Desarrollo de la raíz**

La raíz se origina a partir de la célula basal del embrión (Figura 2A), de esa célula deriva el suspensor y la hipófisis (Figura 2B y C). La hipófisis es una célula de mayor tamaño que las restantes. Al dividirse da origen a varias zonas de la raíz, incluyendo el meristema (Dolan y cols., 1993). A diferencia de lo que ocurre en meristema apical, se desconocen las señales moleculares que llevan al desarrollo de la raíz y su meristema. Pero, como se mencionó anteriormente, se ha descrito la importancia de *Gn* y *Mp* para la adquisición de patrones en esta región.

La regeneración de la raíz en el periodo post-embriionario depende de las células meristemáticas formadas durante la embriogénesis. El meristema de la raíz está formado por células en activa división que rodean a otras que no se dividen (centro quiescente) (Figura 1B). Las células en activa división se denominan células iniciales y presentan distintas capacidades generativas que dependen de su ubicación espacial. Por ejemplo, las células iniciales de la columella se ubican en el lado apical del centro quiescente y dan origen a las células ubicadas

en el ápice de la raíz, denominadas células de la columella. En lado contrario del centro quiescente, se ubican las células iniciales de la corteza y la endodermis, que dan origen a estos dos tipos celulares.

Una vez que las células iniciales o meristemáticas se dividen, comienzan a diferenciarse y son reemplazadas por otras células iniciales, formando filas de células con el mismo origen clonal, que se diferencian a medida que se alejan del meristema. (Dolan y cols., 1993, Meyerowitz y Somerville, 1995; Taiz y Zeiger, 1998). En estudios de eliminación del centro quiescente por láser, se ha demostrado que este centro mantiene la identidad de las células iniciales que lo rodean e inhibe su diferenciación, se desconoce la señal que mantiene el patrón de división y diferenciación en las células del meristema de la raíz, pero se ha propuesto que auxina puede actuar como un morfógeno (Sabatini y cols, 1999; Friml y cols, 2002). La máxima concentración de auxina se encuentra en las células iniciales de la columella de la raíz, y cuando este máximo se altera, aplicando inhibidores del transporte de esta hormona, se amplía la zona de máxima concentración de auxina y se reespecifican los distintos tipos celulares de la raíz. A modo de ejemplo, las células de la corteza normalmente no tienen amiloplastos. Al alterar las concentraciones de auxina pudieron desarrollar amiloplastos, y estos organelos han sido utilizados como un marcador de diferenciación de células de la columella. Es decir, las células de la corteza adoptaron característica de células de la columella (Sabatini y cols, 1999; Nakajima K y Benfey P, 2002).

Por lo tanto, a medida que transcurre el desarrollo, las células se diferencian. Esta diferenciación va acompañada por cambios morfológicos que incluyen cambios en sus organelos. Se desconoce cuáles son las señales que gatillan la diferenciación de organelos, aunque deben corresponder a señales del desarrollo, ambientales e internas. Estas señales deben ser detectadas por la célula en su conjunto para coordinar los genomas nuclear, mitocondrial y plastidial y promover la diferenciación de organelos en conjunto con la diferenciación celular.

## 1.2. Plastidios y mitocondrias

Los plastidios y las mitocondrias son organelos rodeados por dos membranas que contienen un genoma propio y que realizan parte fundamental del metabolismo en células vegetales (Neuhaus y Emes, 2000; Buckhoutand y Thimm, 2003). La teoría endosimbionte postula que ambos organelos derivaron de dos ancestros bacterianos que colonizaron una célula eucarionte primitiva o proto-eucarionte. La transición desde un procarionte de vida libre a un organelo se acompañó por la pérdida de gran parte de sus genes, muchos de los cuales hoy se encuentran en el núcleo (Gray, 1995). En el genoma mitocondrial de distintas especies, se encuentran codificadas de 3 a 67 proteínas. La mayor parte de estas proteínas son ribosomales o subunidades de la cadena transportadora de electrones. En el genoma plastidial están codificadas de 50 a 200 proteínas en diferentes especies, las cuales participan en la transcripción, traducción y fotosíntesis en este organelo (Dyall y cols, 2004).

En análisis del proteoma de plastidios, se ha estimado que ellos poseen unas 2000 a 4000 proteínas distintas, de las cuales sólo se han aislado 750 (Leister D, 2003; Kleffmann y cols, 2004; Stern y cols, 2004), es decir, el organelo codifica una pequeña fracción de sus proteínas y las restantes las obtiene del núcleo. En mitocondrias se observa un fenómeno similar, ya que se predice que habrían de 2000 a 3000 proteínas en el organelo (Binder y Brennicke, 2003). Por lo tanto, ambos organelos dependen de la transcripción de genes nucleares, su traducción y correcta destinación de las proteínas para su biogénesis y su diferenciación.

En la evolución, se ha creado la maquinaria de importación que permite discriminar entre proteínas que se destinan a plastidios o a mitocondrias, denominada translocón. El translocón está constituido por complejos proteicos distintos que se encuentran en la membrana interna y externa, tanto de plastidios como de mitocondrias. Estos complejos proteicos reconocen péptidos señales específicos, ubicados en el amino-terminal de las proteínas (Soll y Schleiff, 2004). Gracias a la existencia de estas señales, se ha logrado conducir proteínas fluorescentes a estos organelos, lo que ha revelado su comportamiento dinámico. Se ha

observado que son capaces de moverse, cambian su forma y que adoptan una disposición ordenada durante la división celular (Köhler y cols, 1997a; Van Gestel y cols, 2002; Logan y cols, 2003 y 2004).

En animales existen datos sobre la dinámica de mitocondrias asociados a diferenciación celular, apoptosis y división celular (Cummins, 2001; Sovova y cols, 2003; van der Bliet, 2004). En plantas, antes del inicio de esta tesis, la dinámica de organelos sólo se había estudiado en cultivos celulares o en plantas adultas (Pyke K. y Page A, 1998; Pyke K, 1999; Kohler y Hanson, 2000) y faltaba comprender la diferenciación y la dinámica de estos organelos durante el desarrollo, asociado a la diferenciación celular. Se sabe que en plantas adultas, dependiendo del tipo de célula, los plastidios y mitocondrias adoptan diferentes morfologías y cumplen distintas funciones metabólicas y de señalización.

#### **1.2.1. Los plastidios adoptan diferentes morfologías.**

Los plastidios son organelos que se encuentran sólo en plantas y algas. Entre las funciones metabólicas de los plastidios están la fotosíntesis, la asimilación de nitrógeno y azufre, la biosíntesis de terpenos, de ácidos grasos, de almidón y de aminoácidos aromáticos e hidroxilados (Weber, 2004). Para realizar estas funciones los plastidios se especializan, adquieren nuevas enzimas; cambian su expresión génica y cambian su morfología.

Los diferentes tipos de plastidios provienen de un precursor, el proplastidio, un organelo pequeño (1  $\mu\text{m}$ ), que contiene pocas membranas internas, una doble membrana que le rodea, y que generalmente está presente en células meristemáticas en división (Vothknecht y Westhoff, 2001). Los plastidios más conocidos son los cloroplastos, organelos que contienen un sistema de membranas interno, denominados tilacoides, en los cuales residen los fotosistemas y los complejos transportadores de electrones que participan en la fotosíntesis. En los fotosistemas se encuentra la clorofila, un pigmento que capta la luz necesaria para hacer fotosíntesis y le da el color verde a las hojas (Corriveau y Coleman, 1991; Pyke y Page, 1998; Pyke, 1999). Además, algunas angiospermas poseen cromoplastos, que contienen otros pigmentos, como carotenoides, que le dan el color a pétalos y frutos. Los cromoplastos también poseen un

sistema de membranas internas y se diferencian a partir de cloroplastos (Fraser y cols, 1994). En los tejidos de almacenamiento se encuentran plastidios sin pigmentos. Entre ellos, los elaioplastos, encargados de almacenar y sintetizar aceites y los amiloplastos, que sintetizan y almacenan almidón (Hernández-Pinzon y cols, 1999; Kim y cols, 2001; Neuhaus y Emes, 2000). Además de provenir del proplastidio, los plastidios ya diferenciados se pueden desdiferenciar o convertirse en otro tipo de plastidio, según las necesidades metabólicas y las señales ambientales y del desarrollo (Sperling y cols, 1998; Pyke y Page, 1998; Vothknecht y Westhoff, 2001; Obukosia y cols, 2003).

Muchos tipos de plastidios no pueden ser fácilmente aislados de otros organelos celulares, por lo que su función exacta se desconoce. Sin embargo, existe una relación clara entre estructura y función en el caso de cloroplastos y de amiloplastos. Estos organelos se han podido aislar con facilidad desde el tejido vegetal para realizar estudios metabólicos y de transporte de proteínas involucradas en su biogénesis. Además, pueden ser observados al microscopio debido a su gran tamaño (10  $\mu\text{m}$ ), lo que ha permitido aislar algunos de los componentes involucrados en su diferenciación.

### **1.2.2. Diferenciación de cloroplastos**

Como se mencionó antes, los cloroplastos se caracterizan por poseer membranas tilacoidales, que contiene proteínas y pigmentos, como clorofila, que participa en los eventos fotoquímicos de la fotosíntesis. Por lo tanto, la diferenciación de proplastidios a cloroplastos requiere la formación de membrana tilacoidal, es decir la síntesis de nuevos lípidos y de proteínas codificadas tanto en el plastidio, como en el núcleo.

Se han aislado mutantes de *Arabidopsis* que no son capaces de formar cloroplastos, y que presentan cotiledones y hojas blancas o amarillas (Leister D, 2003). Muchos de estos mutantes fallan en la importación de proteínas o pierden alguna subunidad de las proteínas tilacoidales, es decir, no pueden ensamblar correctamente los fotosistemas. Aunque estos mutantes son informativos respecto al ensamblaje del tilacoide, constituyen un evento tardío en

la transformación de plastidios a cloroplastos. Las señales que gobiernan la diferenciación deben estar río arriba de la expresión de estos genes estructurales.

Se conocen algunas señales de diferenciación que dependen de factores ambientales y de desarrollo, entre los que se cuentan las hormonas vegetales y la luz (Glick R y Sears B, 1994; Seyedi y cols, 2001; Hwang y Sheen, 2001; Chun y cols, 2001; McCormac y Terry, 2002; Yagisawa y cols, 2003; Zhong y Burns, 2003). En los bancos genéticos existen mutantes disponibles para algunas de estas señales. Los utilizados en esta tesis, se listan en la Tabla 1.

Cuando las plantas se germinan en ausencia de luz, presentan un fenotipo etiolado que consiste en un aumento del tamaño del hipocotilo y la presencia de cotiledones de color amarillo no expandidos. El color amarillo se debe a la presencia de protoclorofila, un pigmento precursor de la clorofila. La protoclorofila se encuentra en los etioplastos, en un sistema de membranas interno menos desarrollado que los tilacoides. Cuando estas plantas se someten a la luz, los etioplastos se transforman en cloroplastos y la protoclorofila a clorofila (Reinbothe y cols, 1993; Kasten y cols, 1997; Weston y cols, 2000; Chun y cols, 2001). En presencia de luz la diferenciación de proplastidios a cloroplastos es directa y no se detiene en etioplastos.

Además de las señales ambientales y del desarrollo existen señales retrógradas que informan del estado de diferenciación del organelo al núcleo. Estas señales van del cloroplasto al núcleo y regulan la expresión nuclear, como se ha observado en los mutantes *gun* (genomes uncoupled) de *Arabidopsis*, los cuales presentan una falla en la comunicación cloroplasto-núcleo, por lo que tienen expresión de genes nucleares que codifican para proteínas tilacoidales, en ausencia de diferenciación de cloroplastos (Mochizuki y cols, 2001).

### **1.2.3. Diferenciación de Amiloplastos**

La diferenciación de proplastidios a amiloplastos se ha estudiado en órganos de reserva, como el tubérculo de papa o el endosperma de maíz, o en células especializadas, como las células de la columella del ápice de la raíz (Geigenberg, 2003; Hendriks y cols, 2003). Los amiloplastos presentes en el ápice de la raíz no sólo sirven para el almacenamiento de almidón, sino también para sensor la gravedad (Saether e Iversen, 1991). Las células iniciales

de la columella, a medida que se diferencian adquieren los metabolitos para la fabricación de almidón, cuya síntesis y almacenamiento ocurre en los amiloplastos (Guisinger, 1999). Para esto, los proplastidios, presentes en las células iniciales de la columella, deben aumentar en tamaño, es decir, deben adquirir nueva membrana y proteínas estructurales, entre las que se cuentan las que se asocian y soportan el crecimiento de los gránulos de almidón.

Al igual que en el caso de los cloroplastos, el proceso de diferenciación de amiloplastos se ha estudiado en plantas adultas y depende de factores ambientales y del desarrollo, como luz y auxina. Existen mutantes en estos procesos que se detallan en la Tabla 1 (Miyazawa y cols, 1999; Hendriks y cols, 2003). Además, se ha demostrado que la concentración de algunos metabolitos, como sacarosa, regula la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de almidón. El control se ejerce a través de regulación alostérica, de la expresión génica, o mediante modificación postraducciona (Geigenberg, 2003; Hendriks y cols, 2003). Por lo tanto, en el desarrollo de amiloplastos debe existir una coordinación entre señales metabólicas y del desarrollo.

**Tabla 1. Mutantes utilizados en esta tesis. Mutantes en adquisición de patrones durante la embriogénesis.**

Alelo	Locus	Producto génico	Fenotipo	Stock	Referencias
<i>gurke (gk)</i>	AT1G36160	acetyl-CoA carboxylasa1 citoplasmática.	No tiene cotiledones (delección apical); las cadenas vasculares terminan apicalmente sin ramificaciones, desarrollo hasta globular.	CS8148.	Mayer y cols, 1991 y 1993; Baud y cols, 2003.
<i>fackel (fk)</i>	AT3G52940	Esterol C-14 reductasa (Síntesis brassinosteroides).	No tiene hipocotilo, los cotiledones se unen directamente a la raíz (delección central). Muere después de la germinación.	CS8149	Mayer y cols, 1991 y 1993; Jang y cols, 2000.
<i>monopteros (mp)</i>	AT1G19850	Factor de transcripción IAA24 (Se uniria a elementos de respuesta a auxina).	No tiene hipocotilo ni meristema de la raíz (delección basal). Tiene cotiledones y meristema apical, el n° de cotiledones varía de 2 a 1. Muere después de la germinación.	CS8147	Mayer y cols, 1991 y 1993. Aida y cols, 2002.
<i>gnom (gn)</i>	AT1G13980	Arf-GEF, participa en tráfico intracelular de vesículas.	Los embriones no tienen raíz ni cotiledones y son con forma de cono o balón (delección terminal); las células vasculares están presentes pero no se interconectan, desarrollo hasta globular.	CS8146	Mayer y cols, 1991 y 1993. Molendijk y cols, 2004.
<b>Mutantes en biogénesis de cloroplastos.</b>					
Alelo	Producto génico	Fenotipo	Referencias		
<i>hy2-1 (gun3)</i>	fitocromobilina sintetasa.	La elongación del hipocotilo no se inhibe en presencia de luz. Plantas verde claro.	Vinti y cols, 2000.	CS68	
<i>foc33_182 E5</i>	Subunidad del complejo importador de proteínas de cloroplastos.	Las mutantes en <i>foc33</i> tienen un color verde claro.	Kubis y cols, 2003.	CS93496	
<i>arc6</i>	Proteína de función desconocida similar a telomerasa.	Tiene menor cantidad de cloroplastos por célula del mesófilo.	Pyke y cols, 1994.	CS286	
<i>emb2036-1</i>	AKR, proteína con dominios <i>ankirin repeat</i> localizada en cloroplastos.	Falla en el desarrollo de cloroplastos. Detención del desarrollo durante la embriogénesis.	Zhang y cols, 1992.	CS16041	
<i>emb2036-2</i>	Alelo de <i>emb2036-1</i> .	Idéntico a <i>emb2036-1</i>	Zhang y cols, 1992.	CS16042	

Tabla 1. Continuación.

Mutantes en transducción de señales de la luz.			
Alelo	Producto génico	Fenotipo	Referencias
<i>phyA-211</i>	Fitocromo A	Alelo Fuerte. Hipocotilo largo y cotiledones no expandidos al crecer la planta en luz roja-lejana.	Nagatani y cols, 1993.
<i>phyB-5</i>	Fitocromo B	Alelo fuerte, hipocotilo largo al crecer la planta en luz blanca y roja, pero no en luz roja-lejana. Plantas de color verde claro, debido a bajo contenido de clorofila en cloroplastos.	Neff y Chory, 1998.
<i>phyA-201</i> <i>phyB-5</i>		Mutante doble. Hipocotilos un poco más largos que en <i>phyB</i> en luz blanca y roja y del mismo largo que <i>phyA</i> en luz roja-lejana. Reducida inducción de clorofila y de la expresión del gen CAB por luz roja.	Neff y Chory, 1998.
<i>cop1-5</i>	Proteína con dominios zinc-finger, coiled-coil, y repeticiones WD-40.	Acumulación de antocianinas en embriones y en plantas germinadas en luz; las plántulas crecidas en oscuridad son similares a las que crecen en luz (hipocotilo corto y cotiledones expandidos, fotomorfogénesis inducida).	Deng y cols, 1992.
<b>Mutantes en transducción de señales de hormonas.</b>			
Alelo	Producto génico	Fenotipo	Referencias
<i>hy5-1</i>	Factor de transcripción con leucine zipper (bZIP).	Hipocotilo de plantas crecidas en luz un poco más elongado que el silvestre.	Cluis y cols, 2004.
<i>axr4-1</i>	Desconocido	Hojas de la roseta irregulares y curvadas. Resistente a auxina, las raíces elongan en medio con auxinas, gravitropismo defectuoso.	Hobbie y Estelle, 1995.
<i>aux1-7</i>	Transportador de auxina hacia el citoplasma.	Incremento leve en elongación de la raíz, respuesta gravitropica alterada. Resistente a etileno y auxina.	Rahman y cols, 2002.
<i>ein2-1</i>	Putativo canal iónico que participa en la vía de transducción de señales de etileno.	Plantas insensibles a etileno, rosetas grandes, floración retardada.	Rahman y cols, 2002.
<i>aux1-7</i> <i>ein2-1</i>		Mutante doble; resistente a auxina y etileno; roseta grande, maduración retardada; respuesta geotrópica alterada; incremento leve en elongación de la raíz.	Rahman y cols, 2002.
<i>axr2-1</i> ( <i>iaa7</i> )	Proteína de respuesta a auxina (IAA7). Factor de transcripción.	Las hojas de la roseta son redondas, verde oscuras, pequeñas. Raíces con respuesta gravitropica alterada, sin pelos radiculares. Es resistente a etileno, ácido absísico y auxina. Mutación dominante.	Timplte y cols, 1994.

#### **1.2.4. Importancia de las mitocondrias en células vegetales**

Entre las funciones que llevan a cabo las mitocondrias en células vegetales se cuenta la respiración celular, cuya base es el ciclo de Krebs, la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. Al ciclo de Krebs confluyen los productos de degradación de carbohidratos, lípidos y las cadenas carbonadas de los aminoácidos. Estas vías metabólicas, además de generar ATP, producen metabolitos que participan en otras vías metabólicas, como la fotorespiración y la gluconeogénesis (Buchanan y cols, 2000).

Además, se ha demostrado que las mitocondrias participan en las señales que conducen a la muerte celular programada en Arabidopsis, imitando una de las funciones de estos organelos en animales (Yao y cols, 2004). A diferencia de animales, las mitocondrias de plantas producen una cantidad pequeña de especies de oxígeno reactivas, principalmente gracias a la acción de oxidasas alternativas y a proteínas que desacoplan el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa (Smith y cols, 2004). Se ha propuesto que el mecanismo por el cual las mitocondrias de plantas promueven la muerte celular sucede después del aumento de especies de oxígeno reactivas y es causado por la liberación de citocromo C al citoplasma, tal como una de las vías que suceden en animales (Laloi y cols, 2004).

#### **1.2.5. Las mitocondrias adoptan diferentes morfologías**

Logan y Leaver (2000) marcaron mitocondrias con "Green Fluorescent Protein" (GFP) en Arabidopsis, utilizando péptidos de destinación que conducen GFP a este organelo, y determinaron que las mitocondrias son capaces de moverse dentro de la célula y que su distribución intracelular es diferente en distintos tejidos, por ejemplo, en epidermis y corteza, las mitocondrias se distribuyen en la periferia celular, cerca de la membrana plasmática; y en células del hipocotilo aparecen agregadas alrededor de los cloroplastos. Además, pudieron demostrar que existe una variabilidad en tamaño y forma de mitocondrias entre distintos tejidos (Logan y Leaver, 2000).

La forma de las mitocondrias está relacionada con su función, ya que se ha observado que antes de la germinación, las semillas secas de maíz contienen mitocondrias que no tienen

crestas en la membrana interna, sin embargo, después de la germinación, las mitocondrias desarrollan crestas. Estos tipos de mitocondrias difieren en actividades de las enzimas del ciclo de Krebs y el complejo piruvato deshidrogenasa, siendo las mitocondrias de la semilla germinada la que está capacitada para realizar respiración celular (Logan y cols, 2001). Por lo tanto, la diferenciación de estos organelos va a la par con la diferenciación celular y le otorga a la célula ciertas características morfológicas y metabólicas.

Por lo tanto, se ha descrito que tanto plastidios como mitocondrias presentan cambios de morfología característicos que se relacionan con su función (Logan y cols, 2001; Vothknecht y Westhoff, 2001). La presencia de organelos con diferentes grados de diferenciación en distintos tejidos, habilita a la célula para realizar diferentes funciones. Además puede servir como un marcador de diferenciación celular, lo que puede indicarnos cómo se coordina la función metabólica durante el desarrollo.

Aunque se ha estudiado la diferenciación mitocondrial durante la germinación; la diferenciación de cloroplastos en plantas adultas; y la de amiloplastos en tejidos de almacenamiento, se desconoce si la morfología de estos organelos cambia durante el desarrollo embrionario.

### 1.3. Propósitos de esta tesis

Para esta tesis se plantea como hipótesis que los plastidios y las mitocondrias se diferencian a través del desarrollo en *Arabidopsis thaliana*. Con el propósito de probar esta hipótesis se tomó como modelos de estudio el desarrollo del embrión y el desarrollo de la raíz en el periodo post-embriónico.

El objetivo general de esta tesis es caracterizar la aparición de características particulares de cada tipo de plastidio y de mitocondrias como marcadores de su diferenciación durante la embriogénesis y durante el desarrollo de la raíz en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y determinar el efecto de mutaciones sobre la diferenciación de estos organelos.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Estudiar la diferenciación de cloroplastos durante la embriogénesis y la germinación de *Arabidopsis thaliana* utilizando la fluorescencia de clorofila como marcador de la presencia de estos organelos.
2. Estudiar la diferenciación de amiloplastos en células de la columella de la raíz mediante la detección de la presencia de almidón.
3. Observar la diferenciación de mitocondrias y los cambios en su morfología a través de microscopía electrónica y marcación con YFP.
4. Analizar mutantes disponibles en bancos de semillas para detectar genes que participen en la diferenciación de organelos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Obtención de plántulas y embriones de distintas edades.

Para obtener plántulas de distintas edades, se sembraron semillas en medio que contenía la mitad de concentración de sales del medio Murashige y Skoog (Phytotechnology laboratories, product n°M519), con sacarosa (Gibco 15503-014) 1%, agar 7 gr/L; y se colectaron a los 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 días post-siembra, como describen Meyerowitz y Somerville, 1995. Este medio de cultivo fue utilizado a lo largo de todo el trabajo y se abrevia como MS.

Para obtener embriones de distintas edades, se utilizaron dos métodos que permitieron medir temporalidad en el desarrollo. En ambos, se sembraron plantas en tierra, las cuales dieron flores. El primer método consistió en realizar polinización manual de varias flores, las que comenzaron a formar la silicua (fruto en forma de vaina que contiene dentro las semillas). El segundo método consistió en marcar las flores con la fecha de su floración y maduración del polen (anthesis). En ambos métodos se recolectaron las silicuas a distintos días post-fertilización (DPF) o días post-anthesis (DPA) y se extrajeron de ellas las semillas. Para obtener los embriones se quitó la cubierta a cada semilla utilizando pinzas, agujas y una lupa Nikon. Los embriones se montaron inmediatamente en glicerol (Sigma G-7757) 50% y se observaron al microscopio, o fueron sometidos a distintos tratamientos.

### 2.2. Clareamiento de semillas.

Para visualizar los embriones en desarrollo en el interior de las semillas fue necesario clarearlas, como describe Apuya, (2001). Las semillas fueron fijadas y clareadas con chloral hydrate (Sigma C-8383), para ello, se depositaron en un pocillo con solución de Etanol : Ac. acético = 9 : 1 y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente, se lavó en etanol 90% por 30 min y en etanol 70% por 30 min, se agregó una solución que contenía 8 gr de chloral hydrate, 1 mL de glicerol y 2 mL de agua y se incubó por 2 hrs. Se montó en glicerol 50% y se observó en microscopio DIC.

### **2.3. Visualización de cloroplastos.**

Los cloroplastos se visualizaron utilizando la fluorescencia emitida por la clorofila que contienen (Corriveau y Coleman, 1991; Nagata y cols., 1999). Se disectaron embriones que se encontraban en diferentes estados del desarrollo desde semillas de plantas de Arabidopsis; se depositaron en una gota de glicerol 50% que estaba sobre un portaobjetos, y se cubrieron con un cubreobjetos. Se observaron inmediatamente en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 meta utilizando un láser de excitación de 488 nm, un filtro dicroico HFT 514/633 y un filtro de emisión LP650, o en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX70 utilizando un filtro UMNG. Las fotografías fueron procesadas con Adobe Photoshop 6.0.

### **2.4. Tinción de embriones con yoduro de propidio (PI).**

En la literatura no existen métodos para la separación de la fluorescencia de la clorofila del yoduro de propidio en embriones (P. Benfey, comunicación personal). Esta técnica se desarrolló durante el curso de esta tesis tomando como punto de partida la tinción con yoduro de propidio descrita en la literatura (Helariutta y cols, 2000). Para ello, se extrajeron embriones en estado de cotiledones doblados (9 DPA) desde silicuas de plántulas de Arabidopsis; se depositaron en una gota de yoduro de propidio (PI) (Sigma P4170) 1ug/uL que estaba sobre un portaobjetos y se incubaron por 30 segundos, se adsorbió la gota de yoduro de propidio con un papel y se agregó agua destilada, lavando 2 veces por 15 segundos. Finalmente se adsorbió el agua y se montó en glicerol 50% cubriendo con un cubreobjetos. Se observaron inmediatamente en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta.

El PI presenta un máximo de absorción de luz en 540 nm y un máximo de emisión de fluorescencia a 640 nm. La clorofila absorbe luz de varias longitudes de onda, con un máximo en el rango de 420, 480 y emite fluorescencia a 680 nm y en el infrarrojo (800 nm),

Para observar clorofila se utilizó un láser de excitación de 488 nm, un filtro dicroico HFT 514/633 y un filtro de emisión LP650. Para observar el yoduro de propidio se utilizó un láser de excitación de 543 nm, un filtro dicroico 488/543 y un filtro de emisión LP650. Las fotografías fueron procesadas con Adobe Photoshop 6.0.

## **2.5. Análisis por microscopía electrónica de transmisión.**

Para la observación por microscopía electrónica de transmisión (TEM), se fijaron las plántulas y los embriones por 24 h a temperatura ambiente en glutaraldehído 3%, paraformaldehído 4% en buffer cacodilato 0.1 M (pH 7,2). Luego, se lavó en buffer cacodilato, se post-fijó por 3 h en OsO<sub>4</sub> 1% en el mismo buffer y luego las muestras se deshidrataron y se embebieron en resina Epon. Se hicieron cortes semi y ultrafinos longitudinales. Las secciones semifinas fueron teñidas con azul de toluidina y ácido periodico/ reactivo de Schiff's (PAS) (Olsen et al, 1984). Las secciones ultra-finas (1 um) tomadas del plano medio de la raíz se tiñeron por 30 min con acetato de uranilo y citrato de plomo y se visualizaron en un microscopio electrónico Philips a 60 kV (Saether e Iversen, 1991).

## **2.6. Obtención de embriones y plantas mutantes.**

Se obtuvieron semillas de mutantes en adquisición de patrones durante el desarrollo desde el NASC ("Nottingham Arabidopsis Stock Centre") (Mayer y cols, 1991; Benfey y cols., 1993; Di Laurenzio y cols., 1996; Helariutta y cols., 2000). Estos mutantes eran recesivos y letales, por lo que se mantuvieron como heterocigotos. Para obtener embriones homocigotos, fue necesario autofertilizar las plantas. Teóricamente un 25% de la población resultante serían homocigotos mutantes. Sin embargo, la población de embriones obtenidas desde estas plantas fue pequeña, ya que las plantas crecían poco y se secaban. La cubierta de la semilla estaba frecuentemente arrugada, lo que dificultó el aislamiento de los embriones. Los embriones se obtuvieron por disección de las semillas con pinzas. Específicamente, se aislaron 3 embriones *gk*, 4 embriones *fk* y 3 embriones *mp* que fueron visualizados directamente en el microscopio confocal. En ellos se analizó la fluorescencia de clorofila.

Las semillas con mutaciones en biogénesis de cloroplastos también se obtuvieron desde el NASC y fueron germinadas en placas de MS-agar. A las dos semanas se tomaron las plántulas que presentaban el fenotipo de coloración verde claro o amarillo y se transfirieron a tierra. Estas plantas correspondían a mutaciones homocigotas recesivas. Las plántulas con los alelos mutados *hy-1* y *hy-2*, además presentaban el hipocotilo elongado por lo que su selección

fue fácil. Las hojas de los mutantes *arc6* fueron observadas al microscopio para verificar que tenían menos cloroplastos por célula que el silvestre.

Los mutantes en transducción de señales de la luz fueron obtenidos de una reserva de semillas mantenida en el laboratorio. Todos eran homocigotos recesivos. De los mutantes *phy*, fueron seleccionados aquellos que presentaban hipocotilo largo. Sólo el mutante *phyA-211* mostró segregación, por lo que hubo que seleccionar los homocigotos recesivos (Figura 20).

Los mutantes en transducción de señales de hormonas fueron obtenidos desde el NASC. Todos eran homocigotos recesivos, a excepción de *axr2-1*, que correspondía a una mutación dominante. Las plantas con esta mutación eran de menor tamaño y presentaban una respuesta gravitropica alterada en sus raíces. Los mutantes en *axr4-1* y *aux1-7* fueron seleccionados por su respuesta gravitropica alterada que se observaba por el crecimiento de sus raíces en distintos sentidos, que no se correspondían con el sentido del vector de gravedad.

### **2.7. Medición de la funcionalidad del fotosistema II**

Para medir la capacidad fotoquímica del fotosistema II se utilizó el método descrito por Maxwell y Giles, 2000. Para ello, se extrajeron 150 embriones de *Arabidopsis* desde semillas que tenían de 9 a 12 DPA, se depositaron en glicerol 50% y se adaptaron por 3 horas a la oscuridad. Luego se midió la fluorescencia en un fluoróforómetro Hansatech, utilizando un sistema modulado de excitación y emisión para detectar la fluorescencia de clorofila presente en el fotosistema II. Se hicieron 3 repeticiones de este ensayo en el fluorímetro de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile, a cargo del Dr. Claudio Pastenes.

### **2.8. Detección de amiloplastos con yodo.**

Para observar la presencia de amiloplastos en *Arabidopsis*, los embriones y plántulas se fijaron en formaldehído 1.5% durante 30 min, etanol 50% por 10 min, se tiñeron con solución de yodo (yodo 2%, ioduro de potasio 5%, chloral hydrate 20% ) durante 10 min, y se lavaron 3 veces con agua destilada durante 10 min (Caspar y cols, 1985), luego se montaron en glicerol 50% y se visualizó el complejo yodo-almidón mediante microscopía de luz.

## 2.9. Construcción de vectores para la marcación de organelos.

Las construcciones utilizadas en esta tesis para marcar organelos con proteínas fluorescentes fueron hechas por Andrea Morales y Daniela Urbina, como parte de su tesis de pregrado de Biotecnología (Morales, 2003; Urbina, 2003) y se detallan en la siguiente tabla.

**Tabla 2: Vectores diseñados y construidos para la transformación de tejidos vegetales con distintas proteínas fluorescentes.** Todos los vectores contienen el promotor 35S.

Nombre del vector	Base en el vector	Señal de destinación	Proteína fluorescente	Acumulación
pAMA3	pBI121 <sup>a</sup>	<i>coxIV</i>	Amarilla	Mitocondrias
pAMA7	pBI221 <sup>b</sup>	<i>coxIV</i>	Amarilla	Mitocondrias
pAMA12	pBI221 <sup>b</sup>	<i>RecA</i>	Amarilla	Plastidios
pDUA3	pEL103 <sup>a</sup>	<i>RecA</i>	Amarilla	Plastidios
pAMA9	pBI221 <sup>b</sup>	—	Amarilla	Citoplasma, Núcleo
pAMA5	pEL103 <sup>a</sup>	—	Amarilla	Citoplasma, Núcleo

<sup>a</sup> 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 se puede usar el vector para otros métodos de transformación, como biobalística.

<sup>b</sup> El vector pBI221 permite transformar tejidos vegetales mediante biobalística.

## 2.10. Verificación del funcionamiento de los vectores en epidermis de cebolla.

Para verificar que los vectores fabricados marcaban los organelos a los que fueron destinados, se transformaron células de epidermis de cebolla y se observó la destinación a distintos organelos mediante microscopía de epifluorescencia y confocal.

Desde las cebollas se extrajeron cuadrados de aproximadamente 3 cm de lado de tejido epidermal y se pusieron sobre una placa con medio de cultivo MS. Para disparar el ADN, se tomaron 5-8µg de éste, y se mezcló con partículas de Tungsteno (150µg) de 3 µm de diámetro. La presión de disparo sobre el tejido fue de 1500 psi en una atmósfera de vacío de 30 mmHg. El tejido se incubó por 48 hrs a 24°C, se montó en un portaobjetos con agua, y se observó en un microscopio de fluorescencia Olympus IX70 o confocal. Adaptado del protocolo descrito por Sheen y cols 1995.

## 2.11. Transformación de *Arabidopsis* mediante inmersión floral.

Se hizo una solución de transformación a partir de un cultivo de *Agrobacterium* que contenía el vector de interés. Se creció un preinoculo de *Agrobacterium* a 28°C por 30 horas (o

por 2 días a 24°C) en LB suplementado con gentamicina 100µg/ml, kanamicina 100µg/ml y rifampicina 10µg/ml con agitación constante. Se extrajeron 100 µl de este precultivo para inocular un cultivo de 250ml de LB con los mismos antibióticos en un matraz de 1L y se dejó crecer por 16 horas a una temperatura entre 25 y 28°C hasta que alcanzó una D.O.<sup>600nm</sup> entre 0,6-0,8. Luego, el cultivo se centrifugó y el pellet bacteriano se resuspendió en una solución que contenía Silwett L-77 (Loveland Co.) 0,05% y sacarosa 5% (Clough y Bent 1998). Esta solución de transformación se mantuvo en agitación constante.

Se tomaron plantas de *Arabidopsis silvestres* de ecotipo Columbia, en estado adulto, que tenían inflorescencias de aproximadamente de 10 cm de largo, se les cortó las silicuas, y las flores se sumergieron por 15 segundos en la solución de transformación, posteriormente, las plantas se colocaron en posición horizontal en oscuridad por 16 horas, cubiertas con plástico para mantener la humedad, pasado este tiempo se sacaron las plantas de la oscuridad a la cámara de crecimiento a 23°C, con ciclos 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se regaron por 2 semanas, luego de lo cual se dejaron secar para colectar las semillas.

#### **2.12. Selección de semillas transformadas, determinación de la eficiencia de transformación y del número de inserciones de T-DNA.**

Las semillas de las plantas sometidas al método de transformación descrito previamente, se cuantificaron para determinar los porcentajes de eficiencia de transformación obtenidos. Las semillas se esterilizaron y se sembraron en placas de MS-agar suplementado con 100µg/ml de kanamicina, como medio de selección. Aquellas plantas capaces de sobrevivir en presencia del antibiótico fueron trasplantadas a tierra para obtener de ellas la próxima generación de semillas. La eficiencia de la transformación se calculó determinando el porcentaje de semillas que son resistentes a kanamicina del total de semillas que se sembraron.

Para obtener líneas homocigotas con una sola inserción se sembraron tres generaciones de las plantas transgénicas, y mediante el análisis de las proporciones mendelianas, se dedujo si una línea presentaba sólo una inserción de T-DNA y si era homocigota. Para esto, se sembraron semillas que habían sido colectadas de plantas

seleccionadas en kanamicina (generación T<sub>1</sub>). La proporción de plantas resistentes: sensibles obtenidas en esta generación (generación T<sub>2</sub>) es un indicador del número de inserciones de T-DNA existente en cada línea de plantas. Las líneas que presentaron una proporción de 3:1= resistentes: sensibles, contenían sólo una inserción de T-DNA. A la par de la resistencia a kanamicina se observó si las hojas de estas plantas presentaban acumulación de proteína fluorescente.

### **2.13. Visualización de proteínas fluorescentes dirigidas a distintos organelos.**

Para 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.

### **2.14. Visualización de clorofila e YFP en embriones mediante microscopía confocal.**

Se extrajeron embriones en estado de cotiledones doblados desde silicuas de plántulas de Arabidopsis; se depositaron en una gota de glicerol 50% que estaba sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Se observaron inmediatamente en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 meta. Para observar clorofila se utilizó un láser de excitación de 488 nm, un filtro dicróico HFT 514/633 y un filtro de emisión LP650. Para observar la fluorescencia de YFP se utilizó un láser de excitación de 514 nm, un filtro dicróico de 530 nm y un filtro de emisión 560. Las fotografías fueron procesadas con Adobe Photoshop 6.0.

### 3. RESULTADOS

Como se mencionó en la introducción, las plantas contienen tres compartimentos con genes propios, que deben ser coordinados para la mantención de la homeostasis celular. Estos compartimentos son el núcleo, los plastidios y las mitocondrias. Tanto plastidios como mitocondrias se diferencian morfológicamente, lo que se correlaciona con cambios en su función metabólica. Esta diferenciación debe estar coordinada con la diferenciación de la célula en su conjunto. La diferenciación celular sucede a medida que el desarrollo embriogénico y post-embriogénico progresa, por lo que es en este contexto que la célula debe recibir las señales para su diferenciación y la de sus organelos. La diferenciación de organelos ha sido observada en plantas adultas durante el desarrollo post-embriogénico, pero no durante el desarrollo embrionario.

El objetivo general de este trabajo es caracterizar cambios en la morfología de mitocondrias y plastidios y en su localización celular durante la embriogénesis y durante el desarrollo de la raíz en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y determinar el efecto de mutaciones sobre la morfología o distribución de estos organelos.

Con el propósito de analizar cambios morfológicos en plastidios a través del desarrollo, se comenzó con la observación de dos tipos de plastidios: cloroplastos y amiloplastos. Estos organelos son más fáciles de observar que otros plastidios o mitocondrias, ya que poseen clorofila y almidón, respectivamente. Como se detalla más adelante, existen las técnicas para la observación de estos compuestos mediante microscopía óptica o de fluorescencia. Además, la presencia de estructuras internas facilita su identificación mediante microscopía electrónica.

### **3.1. Cloroplastos**

#### **3.1.1. Los cloroplastos se diferencian sólo en la zona apical de plántulas de Arabidopsis después de la germinación.**

Los cloroplastos poseen clorofila, pigmento que se usó como marcador de la presencia de estos organelos. La clorofila es verde y fluoresce, lo que permite la observación de cloroplastos mediante microscopía de luz o confocal. Los proplastidios, precursores de los cloroplastos, no tienen pigmentos, por lo que no pueden observarse mediante fluorescencia.

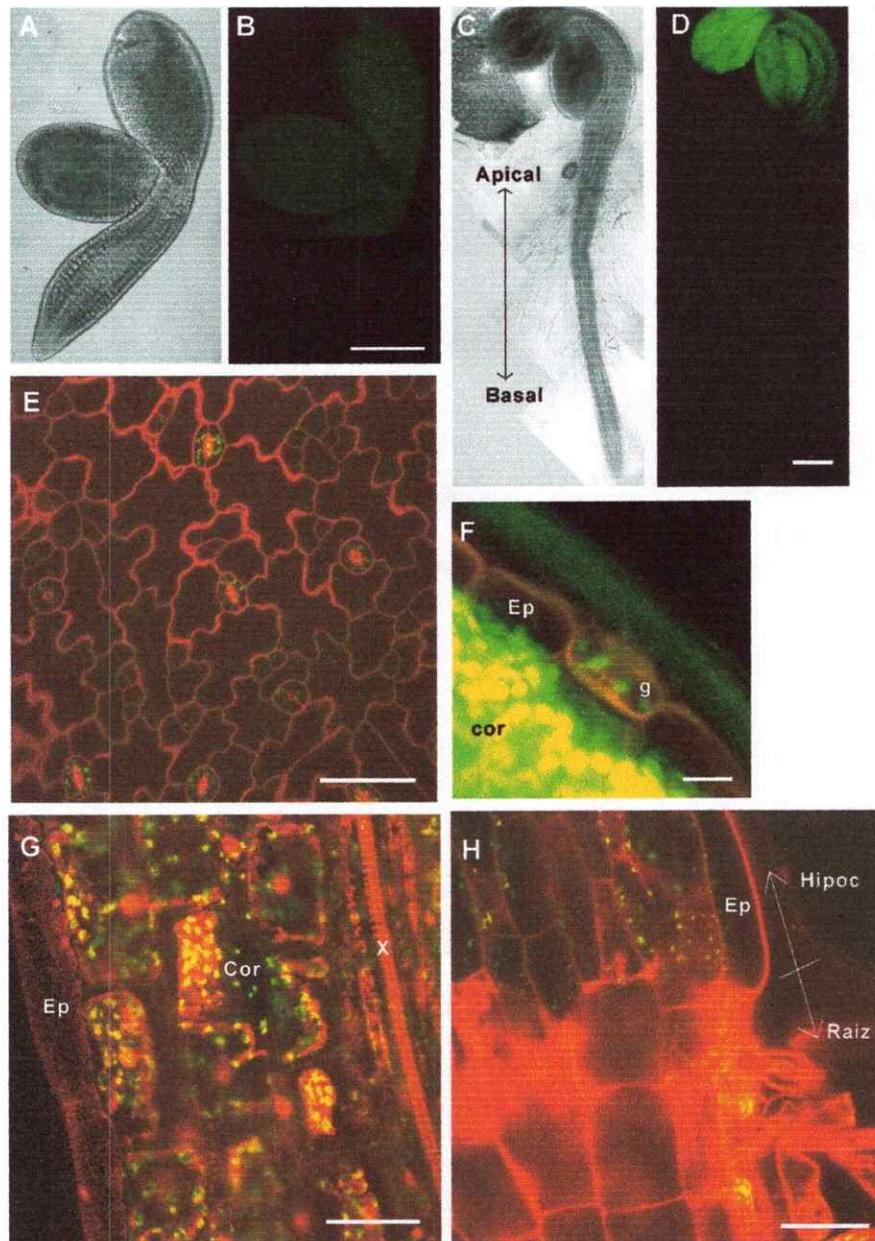
Como se ha descrito en la literatura, en plantas adultas el contenido de clorofila predomina en la región apical, principalmente en cotiledones y hojas (Taiz L. y Zeiger E, 1998). Esta misma observación se realizó en nuestro laboratorio en plántulas de 3 días post-siembra (DPS). Las plántulas de esta edad habían completado su germinación y, tanto la raíz como los cotiledones, habían emergido de la semilla, pero no presentaban hojas. Utilizando clorofila como marcador de la presencia de cloroplastos, se observaron estos organelos en cotiledones e hipocotilo, pero no en raíz (Figura 3C y D). En estas figuras se asignó arbitrariamente el color verde a la emisión de fluorescencia de clorofila, aunque en realidad emite luz roja.

Para determinar cuándo se diferencian los cloroplastos en la región apical, se observó una etapa anterior en el desarrollo. Se disectaron plántulas de 1 DPS. En ellas, la raíz había comenzado a emerger y se encontraba fuera de la semilla, por lo que la plántula ya había germinado, sin embargo los cotiledones aun no emergían de la semilla. No se detectó fluorescencia de clorofila en estas plántulas (Figura 3A y B). Por lo tanto, el desarrollo de cloroplastos en la región apical de la plántula sucede poco después de la germinación, cuando los cotiledones emergen de la semilla.

Se sabe que la luz es importante en promover el desarrollo de cloroplastos (Barkan A y Goldschmidt M, 2000; Voithknecht y Westhoff, 2001; McCormac A y Terry M., 2002). Sin embargo, en plántulas de 3 DPS, que han sido completamente expuestas a la luz, no hay formación de cloroplastos en la región basal, pero sí en la apical. Por lo tanto, existen señales de identidad celular que capacitan a algunas células para formar cloroplastos y no a otras.

Para saber cuáles células poseen la capacidad de diferenciar sus plastidios a cloroplastos, las plántulas de 3 DPS se tiñeron con yoduro de propidio (PI). Este fluoróforo es excluido de células vivas, pero tiene afinidad por el DNA, por lo que, dependiendo del tiempo de exposición de la planta puede marcar los límites celulares o el DNA contenido en núcleo, plastidios y mitocondrias. Si las células se encuentran muertas, se marcan completamente. En este trabajo de tesis se logró la separación de la fluorescencia emitida por el PI de la emitida por la clorofila a través del uso de microscopía confocal, lo que no había podido hacerse anteriormente (Helariutta y cols, 2000; P. Benfey, comunicación personal).

En la Figura 3 se muestran imágenes de microscopía confocal de plántulas teñidas con PI. Este fluoróforo se observa en rojo y la clorofila en verde. La suma de los dos colores se aprecia en amarillo frecuentemente marcando cloroplastos, por la unión del PI al DNA de estos organelos. Específicamente los cloroplastos de la zona apical se encuentran en células del mesófilo del cotiledón y en células guardianas, pero no en otras células de la epidermis ni en las células del tejido vascular (Figura 3D, E y F). En hipocotilo se encuentran en células de la corteza y endodermis (Figura 3G). En la zona basal, no se observan cloroplastos en pelos radiculares ni en células de la raíz (Figura 3H). Por lo tanto, sólo ciertas células poseen la maquinaria necesaria para permitir la biogénesis de cloroplastos. Estas células se originan durante la embriogénesis por división celular, en el mismo lugar que conservarán a través de la vida de la planta. En esa posición recibirán las señales que les permitirán diferenciarse y diferenciar sus organelos.



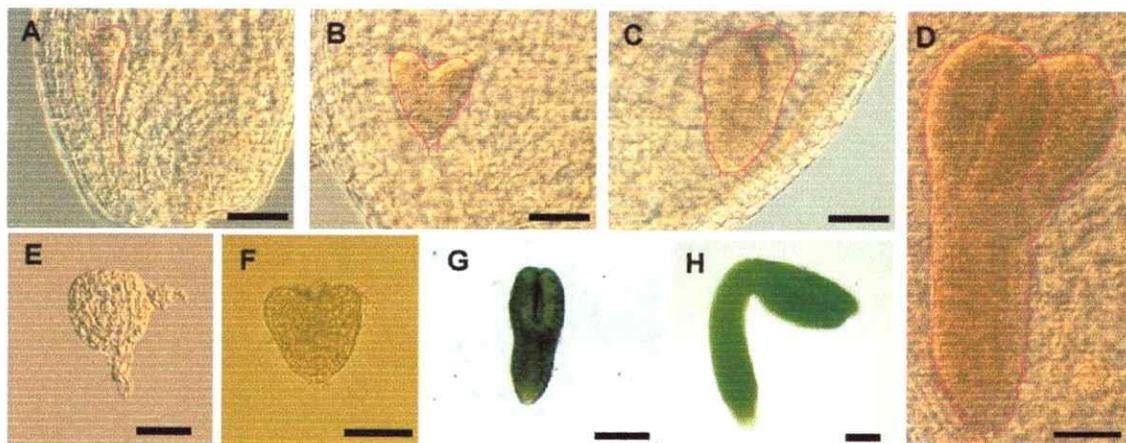
**Figura 3. Los cloroplastos están presentes en la zona apical de plántulas de *Arabidopsis* y se diferencian durante la germinación. A:** Plántula de 1 día, en campo claro. **B:** La misma plántula de A, mostrando que no presenta fluorescencia de clorofila. La raíz de esta plántula había emergido de la semilla, pero no los cotiledones. **C:** Plántula de 3 DPS observada en campo claro. **D:** La misma plántula de C, mostrando fluorescencia de clorofila (verde). En **E; F; G y H**, las plántulas de 3 DPS se han teñido con yoduro de propidio (rojo) y se observa fluorescencia en los contornos celulares y en algunos organelos que contienen DNA. Algunos cloroplastos presentan fluorescencia verde y roja, por lo que se ven amarillos. **E:** Células de la epidermis del cotiledón. **F:** Corte óptico a través del borde de un cotiledón. Se aprecian las células guardianas (g) de la epidermis que contienen cloroplastos; las células epidermales (Ep) sin cloroplastos; y las células del mesófilo (cor, corteza) de un cotiledón que contienen muchos cloroplastos, por lo que la imagen se ve saturada de fluorescencia. **G:** Corte longitudinal del hypocotilo, en el que se ven las células epidermales (Ep) sin cloroplastos, las células de la corteza (cor) con cloroplastos y los haces conductores del centro del hypocotilo (X, xilema). **H:** Intersección hypocotilo raíz. Las células de la corteza del hypocotilo tienen cloroplastos, pero estos no se encuentran en la raíz. Todas las fotografías se hicieron mediante microscopía confocal. Barra en B y D: 200µm ; E, G y H: 40 µm; F: 10 µm.

### 3.1.2. Los cloroplastos se diferencian en células específicas del embrión.

Se ha observado que los embriones de varias especies son verdes, entre ellas *Brassica napus*, *Vicia faba* y *Arabidopsis* (Eastmond y Rawsthorne, 1998; Apuya y cols, 2001 y 2002; Borisjuk y cols, 2003; Gutierrez y cols 2004), es decir, se sabe que poseen cloroplastos. Pero, al inicio de esta tesis, se desconocía en qué etapa de la embriogénesis se diferencian estos organelos y si las mismas células que tienen cloroplastos en la planta adulta, también tienen la capacidad de diferenciar estos organelos en el embrión. Por lo tanto, se siguió con el estudio de la presencia de cloroplastos en embriones. Para ello, fue necesario aislar embriones en distintas etapas de la embriogénesis y analizar cuáles de sus células contenían cloroplastos, y en qué etapa se diferenciaban.

Antes de analizar la presencia de cloroplastos en embriones de *Arabidopsis*, se probaron métodos de extracción para obtener embriones en los 5 diferentes estados del desarrollo. La técnica más utilizada para estudiar embriogénesis consiste en el clareamiento de semillas completas (Mayer y cols, 1991 y 1993). De este modo las semillas quedan transparentes y dejan ver los embriones en su interior (Figura 4A a D). Este método no podía utilizarse para el análisis de la presencia de cloroplastos, ya que el clareamiento elimina la clorofila presente en el embrión. Por eso fue necesario aislar los embriones desde el interior de la semilla y observarlos frescos (Figura 4E a H).

Para obtener embriones en distintas etapas de la embriogénesis, se tomaron dos puntos de partida alternativos: la fertilización (Chaudhury y cols, 1997) y el momento de apertura de la flor (floración), que corresponde a la anthesis (momento de maduración del polen) (Rossak y cols, 2001). En la Tabla 3 se muestra que los embriones extraídos a diferentes días post-anthesis (DPA) presentan un desarrollo progresivo: el estado globular se observó hasta 3 DPA, corazón a los 5 DPA, torpedo a los 6 DPA y embrión maduro desde los 7 DPA. La disecación completa de la semilla ocurrió alrededor de los 20 DPA. Por lo tanto, la adquisición de patrones para formar un embrión maduro es de 7 días, y el resto del tiempo es un periodo en el cual se observó crecimiento del embrión y disecación de la semilla.



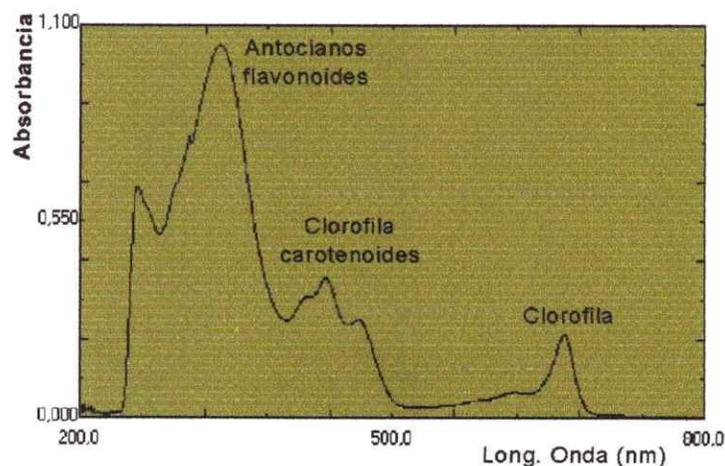
**Figura 4. Estados de la embriogénesis en *Arabidopsis*.** A a D: Semillas clareadas que contienen en su interior a embriones en diferentes estados de la embriogénesis. Se ha resaltado el borde de los embriones con una línea fucsia. E a H: Embriones aislados desde las semillas. A y E: Embrión en estado globular, 3 DPA, B y F: Corazón, 5 DPA, C y G: Torpedo, 6 DPA, y D y H: Embrión maduro, a los 7 DPA y 10 DPA, respectivamente. Barra en A a F: 50  $\mu$ m. En G y H: 100 $\mu$ m.

**Tabla 3. Temporalidad del desarrollo de embriones de *Arabidopsis thaliana* después de la anthesis.** Se muestra el número de embriones en diferentes etapas de la embriogénesis. Estos embriones se obtuvieron al aislar semillas a diferentes días post-anthesis (DPA).

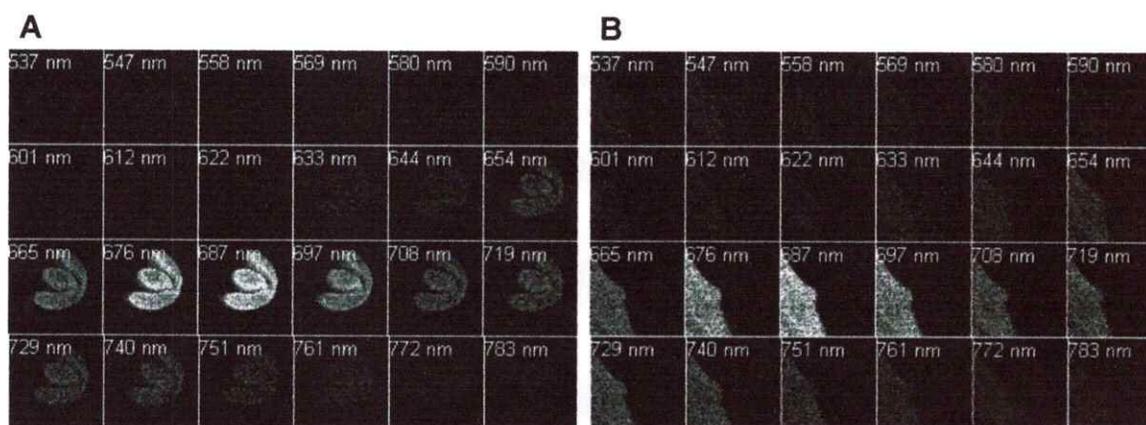
DPA	Globular	Corazón	Torpedo	Embrión maduro	n
2	26	0	0	0	26
3	29	0	0	0	29
5	5	34	0	0	39
6	0	1	23	0	24
7	0	0	2	23	25
10	0	0	0	28	28

Como se observa en la Figura 4G y H, los embriones en estado de torpedo y de cotiledones doblados son verdes. Para determinar si esta coloración se debía a la presencia de clorofila, se aislaron embriones y se homogenizaron en etanol 100%, obteniéndose un extracto cuyo espectro de absorción tenía un *peak* de absorbancia característico de clorofila (Figura 5) (Lichtenthaler y Wellburn, 1983; Walters y Horton, 1995).

Antes de utilizar la fluorescencia de clorofila como método para observar cloroplastos en embriones, se comparó el espectro de emisión de embriones y plántulas, utilizando el láser de 488 nm del microscopio confocal. Se obtuvo el mismo espectro para plántulas y para embriones (Figura 6), por lo tanto, la fluorescencia observada en embriones se puede atribuir a clorofila.



**Figura 5. Espectro de absorción de una fracción de homogenizado obtenida desde embriones de Arabidopsis.** Se muestra el espectro de absorción del homogenizado de embriones, con los picos de absorbancia característicos de pigmentos presentes en los cloroplastos. Se disectaron 300 embriones desde semillas de Arabidopsis, se homogenizaron en etanol 100% en un mortero a 4°C, se centrifugó para eliminar el material que no se disolvió y se midió el espectro de absorción en un espectrofotómetro.



**Figura 6. Espectro de emisión de embriones y hojas de plántulas de Arabidopsis.** Las plántulas fueron crecidas en MS por 15 días y los embriones de 9 DPA fueron extraídos desde semillas. Ambos fueron montados en glicerol 50% y observados inmediatamente al microscopio confocal. Se observó la fluorescencia emitida en las longitudes de onda que se señalan en el extremo superior izquierdo, al excitar con un láser de 488 nm en el microscopio confocal. **A:** Embrión de Arabidopsis entero. **B:** Borde de una hoja de la cual emergía un tricoma, la fluorescencia corresponde principalmente el mesófilo de la hoja.

Para observar la presencia de cloroplastos en embriones en diferentes etapas del desarrollo, se aislaron embriones desde semillas de Arabidopsis y se analizó la presencia de

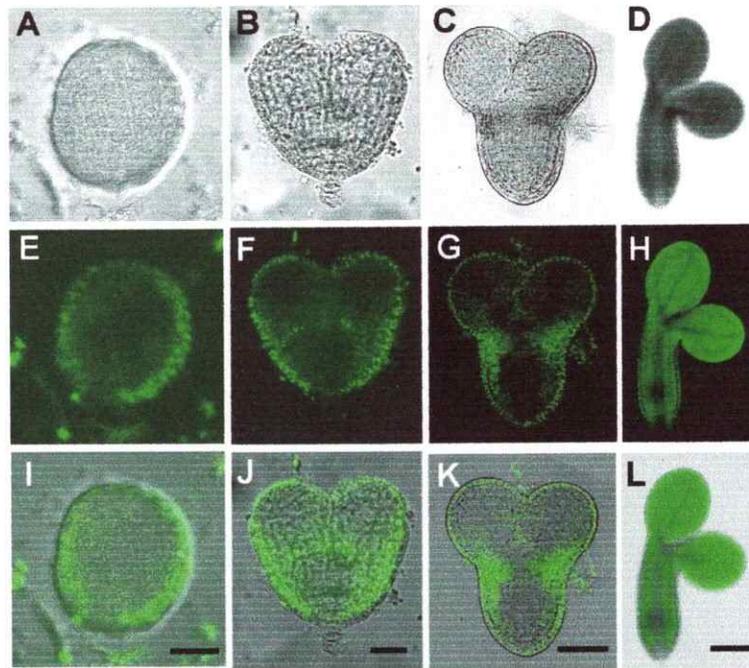
clorofila mediante microscopía confocal. Se analizó un mínimo de 3 embriones en cada estado, obteniéndose patrones de fluorescencia similares. Los embriones representativos de cada estado se muestran en la Figura 7 y en la Figura 8 se muestran los cortes ópticos realizados con el microscopio confocal.

En todos los estados del desarrollo la fluorescencia tenía un patrón punteado, característico de cloroplastos individuales. En el estado globular, la fluorescencia de clorofila se observó en la capa celular que rodea al embrión, denominada protoderma en un patrón asimétrico (Figura 7A, E, I). Como se mencionó en la introducción, el protoderma da origen a la epidermis en estado más avanzados de la embriogénesis (Figura 2B, en rojo).

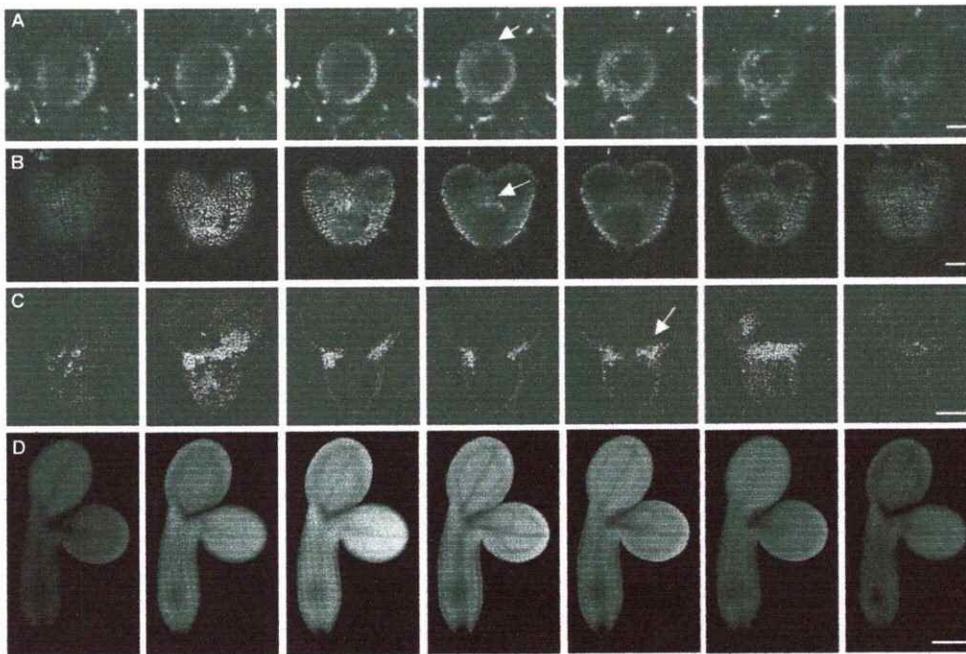
En el estado corazón, se observó fluorescencia de clorofila en la epidermis y en algunas células de la corteza, simulando un triángulo central (Figura 7B, F, J y Figura 8). En el embrión en estado torpedo, este triángulo se observa como una franja en la base de los cotiledones (Figura 7C, G, K y Figura 8).

En ninguno de los estados del desarrollo se observó fluorescencia en las células del suspensor. En el estado de corazón, la célula apical al suspensor, denominada hipófisis tampoco mostró fluorescencia. Esta célula da origen a las células del ápice de la raíz, incluido el meristema. En el estado torpedo, las células derivadas de la hipófisis sí mostraron fluorescencia, pero esta fluorescencia se pierde en el estado de cotiledones doblados. Es decir, podría estar sucediendo una diferenciación de cloroplastos, seguida de una desdiferenciación de organelos en el ápice de la raíz en el estado de cotiledones doblados.

Los embriones en el estado de cotiledones doblados presentaron cloroplastos en epidermis y corteza. El tejido provascular no contenía cloroplastos (Figura 7D, H, L).



**Figura 7. Presencia de cloroplastos en regiones específicas de embriones de Arabidopsis.** Observación mediante microscopía confocal de embriones de Arabidopsis en diferentes estados embriogénicos. A, E, I: Globular. B, F, J: Corazón. C, G, K: Torpedo. D, H, L: Cotiledones doblados. A a D: Imágenes en campo claro. E a H: Imágenes de la fluorescencia de clorofila (verde). I a L: Sobreposición de imágenes en campo claro y fluorescencia. Barra I y J: 20  $\mu$ m; K: 50  $\mu$ m; L: 100  $\mu$ m.

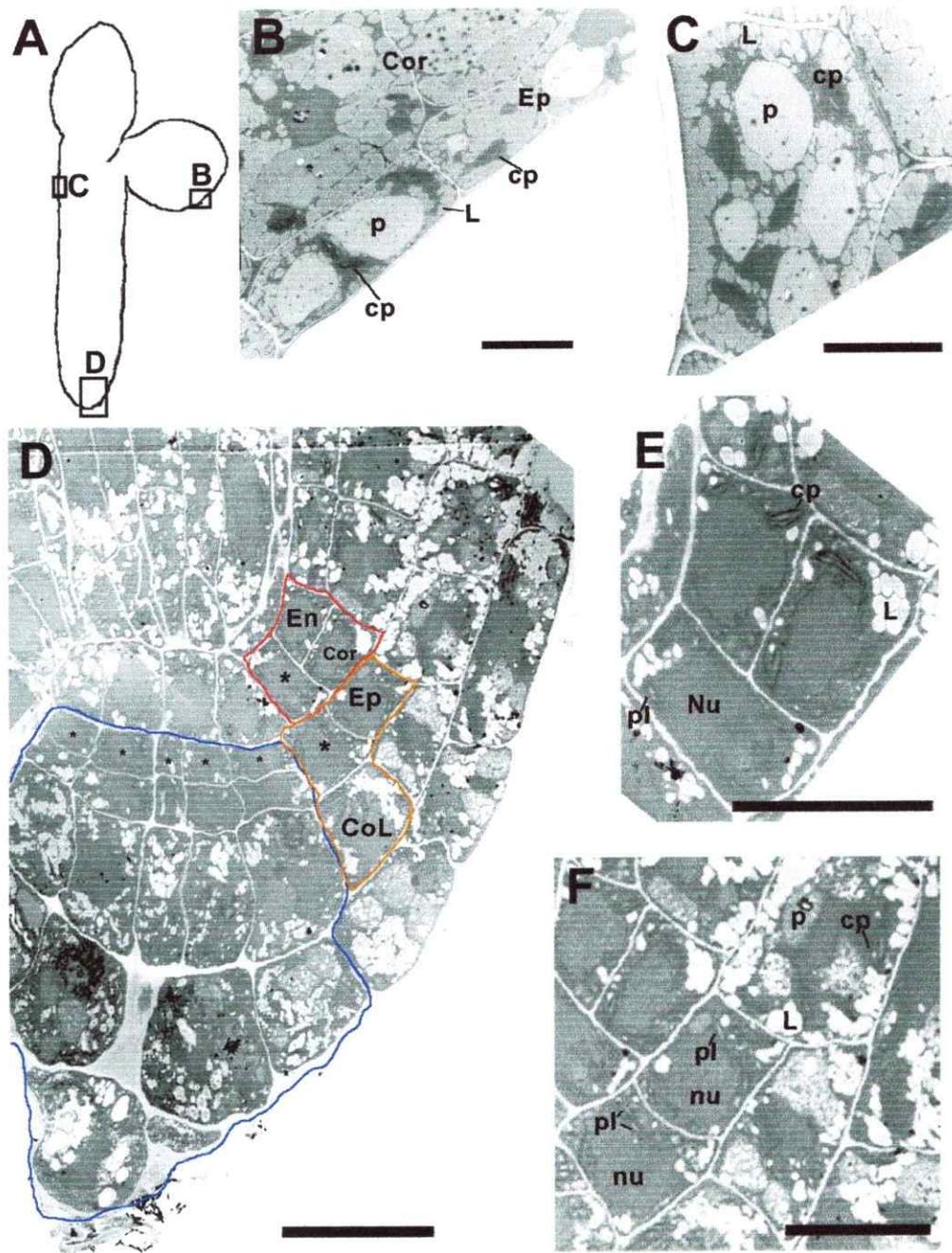


**Figura 8. Presencia de clorofila en diferentes capas celulares.** La fluorescencia de clorofila fue observada en embriones en diferentes estados del desarrollo, realizando cortes ópticos. A. Globular (cortes ópticos de 2.2  $\mu$ m), la fluorescencia no es simétrica, ya que se extiende hacia el interior del embrión (Flecha). B. Corazón (cortes ópticos de 4.3  $\mu$ m), la fluorescencia en un triángulo interno se muestra con una flecha. C. Torpedo (cortes ópticos de 2.4  $\mu$ m), existe fluorescencia en una franja bajo los cotiledones (Flecha). D. Cotiledones doblados (cortes ópticos de 5  $\mu$ m). Barra en A y B: 20  $\mu$ m, C: 50  $\mu$ m, D: 100  $\mu$ m.

Por lo tanto, se demostró que existen cloroplastos en el embrión en células específicas y en un patrón distinto al de plantas adultas. Un resultado que llama la atención es el hecho de que las plantas no tienen cloroplastos en sus células epidermales, pero los embriones sí.

Para corroborar que los cloroplastos estaban presentes en células específicas del embrión, se observaron embriones en el estado de cotiledones doblados a través de microscopía electrónica de transmisión (Figura 9). Los embriones en estado de cotiledones doblados contienen todos los tipos celulares presentes en plántulas de 3 DPS. En cotiledones se pueden observar las células de la epidermis ubicadas en la capa más externa, seguidas por las células de la corteza (Figura 9B). Estas últimas, dan origen a las células del mesófilo, que contienen cloroplastos en plántulas que han germinado. Tal como se había observado por microscopía confocal, las células de la epidermis de cotiledones y de hipocotilo en el embrión contienen cloroplastos (Figura 9B y C, respectivamente). Estos cloroplastos son fácilmente identificables por la presencia de membranas tilacoidales internas. Por lo tanto, las células epidermales de los embriones tienen la capacidad de diferenciar cloroplastos. En plántulas, las únicas células de la epidermis que contienen cloroplastos son las células guardianas, las cuales aparecen durante el desarrollo post-embriogénico (Zhao y Sack, 1999).

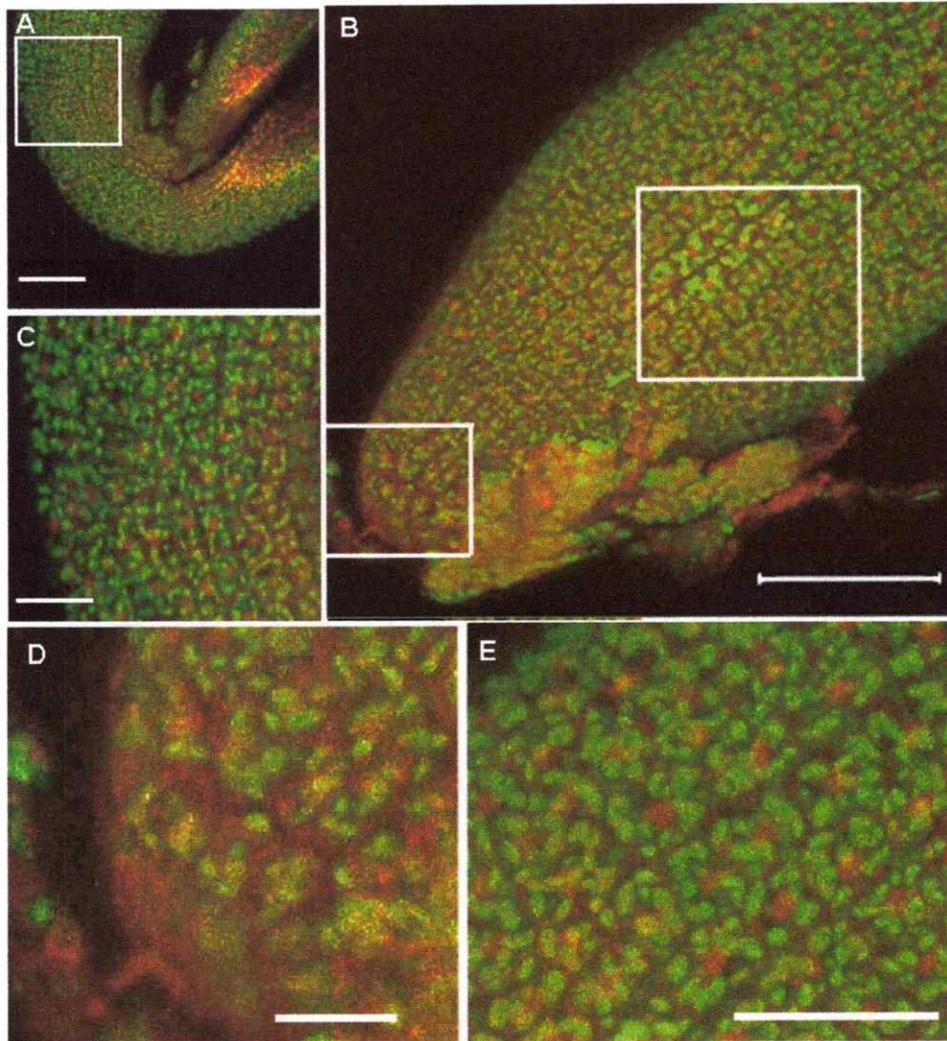
En la raíz se observaron varios tipos celulares, entre ellos, las células de la endodermis y corteza contienen cloroplastos desarrollados. La célula meristemática que da origen a estos dos tipos celulares, denominada célula inicial de la endodermis-corteza contiene plastidios (Figura 9E). En las células de la epidermis y de la columella lateral también se observaron cloroplastos (Figura 9F), pero no en las células de la columella central (Figura 9D), ni en el tejido provascular, tal como se había observado mediante microscopía confocal (Figura 7H).



**Figura 9. Los embriones de Arabidopsis en estado de cotiledones doblados contienen cloroplastos en células de la epidermis.** A: Esquema de un embrión en estado de cotiledones doblados mostrando con rectángulos las zonas representadas en las figuras B, C y D. B: Células de la epidermis y corteza del cotiledón. C: Célula de la epidermis del hipocotilo. D: Raíz. Las células iniciales meristemáticas se marcan con un asterisco. Encerrado en rojo se muestra la primera célula de la endodermis y de la corteza y su célula inicial, que se han amplificado en E. Encerrado en naranja están las primeras células de la epidermis y de la columella lateral y su célula inicial, que se han amplificado en F. Encerrado en azul se muestran las células de la columella central. E: Célula inicial de la endodermis-corteza marcada con un asterisco en D y las células que origina. F: Célula inicial de la epidermis-columella lateral marcada con un asterisco en D. En= endodermis. Cor= corteza; ep= epidermis, CoL= columella lateral; cp= cloroplasto; p= cuerpo proteico; pl= plastidio; L= cuerpo lipídico; nu= núcleo. Barra en B, C, E y F: 5  $\mu$ m; en D: 10  $\mu$ m.

Para observar la distribución de cloroplastos en el interior de células embrionarias, se aislaron embriones en estado de cotiledones doblados desde semillas y se tñieron con PI. Como se mencionó anteriormente, este fluoróforo es excluido de células vivas de plantas adultas, por lo que se ha usado como tinción vital que se excluye de la célula y delinea la pared celular. En embriones la tinción no fue consistente, observándose en algunos casos tinción de la pared, como ocurre en plantas adultas y en otros, tinción de núcleo (Figura 10), como ocurre con sustancias que se intercalan en el DNA. No obstante, este colorante fue apropiado para observar la distribución de cloroplastos dentro de la célula mediante microscopía confocal. La Figura 10 presenta colores falsos, mostrándose el PI en rojo y la autofluorescencia de la clorofila en verde. En células epidermales del hipocotilo, se observa frecuentemente que los cloroplastos se ordenan rodeando al núcleo (Figura 10A y B). En la zona de elongación de la raíz también se observa este ordenamiento, aunque se pierde cuanto más cerca del meristema se ubican las células (Figura 10B y D). Tanto en hipocotilo, como en raíz, es posible observar agrupaciones de cloroplastos en sectores del citoplasma en algunas células, por lo que su ubicación en torno al núcleo no se repite para todas las células epidermales.

Por lo tanto, se ha observado la presencia de cloroplastos durante la embriogénesis utilizando fluorescencia de la clorofila como marcador de la diferenciación de este organelo. En el estado globular, los cloroplastos se encuentran en el protoderma y en embriones en estado de cotiledones doblados, se encuentran en epidermis y corteza. Dentro de las células de la epidermis los cloroplastos se encuentran frecuentemente rodeando al núcleo en hipocotilo. En plántulas que no han germinado completamente (2 DPS) no existen estos organelos y en plántulas completamente germinadas (3 DPS), se encuentran en corteza (mesófilo) y en células guardianas de la epidermis, pero no en otras células epidermales.



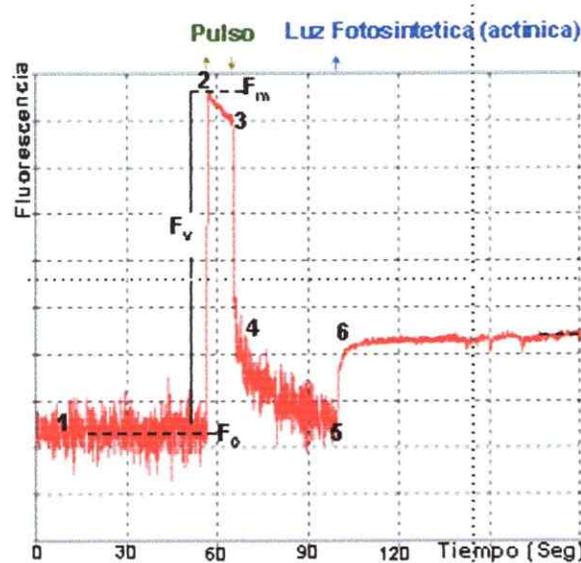
**Figura 10. Distribución de cloroplastos en embriones en estado de cotiledones doblados de *Arabidopsis*.** Para observar la distribución de cloroplastos dentro de la célula, se extrajeron embriones y se tiñeron con PI (rojo). Los cloroplastos se observaron por la autofluorescencia de la clorofila que contienen (verde). **A:** Zona del hipocotilo y cotiledones. **B:** Raíz. **C:** Detalle del cuadro en A, mostrando el hipocotilo. **D:** Detalle del cuadro en B, mostrando la zona apical de la raíz. **E:** Detalle del cuadro en B, mostrando el hipocotilo sobre la zona de elongación de la raíz. Barra de tamaño A y B: 50  $\mu\text{m}$ ; C y E: 25  $\mu\text{m}$ ; D: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3. Los cloroplastos presentes en el embrión realizan fotosíntesis.

Para determinar si los cloroplastos presentes en el embrión son funcionales, se analizó su capacidad fotosintética. La primera fase de la fotosíntesis depende de luz y utiliza dos complejos proteicos ubicados en la membrana tilacoidal, denominados fotosistemas y que contienen clorofila. Cuando la clorofila recibe luz, sus electrones pasan a un estado excitado. Estos electrones pueden ser transferidos a una cadena de moléculas que se reducen y oxidan (proceso fotoquímico), para la formación de NADPH, como uno de los productos de la fotosíntesis. La energía de los electrones de la clorofila en estado excitado, también puede ser emitida como calor o fluorescencia. Este último proceso se da frecuentemente en el fotosistema II y se han desarrollado métodos para medirlo (Maxwell y Giles, 2000). Entonces, la energía absorbida por la clorofila puede conducirse a la primera fase de la fotosíntesis, o puede ser disipada como calor o como fluorescencia. Considerando que el aumento de la eficiencia de uno de estos tres procesos va en desmedro de los otros dos y que la pérdida de energía en forma de calor se mantiene dentro de un rango constante, podremos decir que una fluorescencia alta, nos indica que la energía no está siendo conducida a la fotosíntesis y una fluorescencia baja implica que el proceso fotoquímico esta funcionando, es decir que el fotosistema II es funcional.

Para realizar las mediciones en embriones en estado de cotiledones doblados, se extrajeron embriones desde las semillas a los 9-12 DPA y se adaptaron por 3 horas a la oscuridad. Luego se midió la fluorescencia emitida por el fotosistema II, como se muestra en la Figura 11. Al adaptar los embriones a la oscuridad, los componentes de la cadena transportadora de electrones estaban oxidados y la emisión de fluorescencia presentó un valor basal (Figura 11, F<sub>0</sub>, punto 1). Al darles un pulso de luz intenso, se redujeron todos los componentes de la cadena transportadora de electrones (se satura) por lo que bajó la eficiencia de "apagamiento" fotoquímico, aumentando la disipación de la energía como fluorescencia (Figura 11, F<sub>m</sub>, punto 2). Esta es la fluorescencia máxima que da cuenta de la máxima capacidad de transporte del fotosistema II. Mientras dura el pulso de luz, la fluorescencia

comenzó a disminuir, lo que se explica por un incremento en la eficiencia con la que se transportan los electrones fuera del fotosistema II o en la producción de calor (Figura 11, punto 3). Al apagar el pulso de luz la fluorescencia disminuye (Figura 11, puntos 4 y 5), lo que se traduce como la reoxidación de las moléculas transportadoras de electrones, las cuales son capaces nuevamente de reducirse al aplicar un pulso de luz actínica fotosintéticamente activa de menor intensidad que el pulso de luz anterior (Figura 11, punto 6). Es decir, el fotosistema II es capaz de reducir a sus aceptores y los transportadores de electrones son capaces de reoxidarse, por lo que los componentes de la fase clara de la fotosíntesis son funcionales en el embrión y pueden responder a las condiciones de luz y oscuridad.



**Figura 11. Los embriones de Arabidopsis tienen cloroplastos con un fotosistema II funcional.** Se adaptaron 150 embriones de Arabidopsis por 3 horas a la oscuridad y se midió la fluorescencia emitida por el fotosistema II, como se muestra en el gráfico en la línea roja. Existe un nivel basal de fluorescencia (F<sub>o</sub>), que aumenta al dar un pulso de luz (F<sub>m</sub>) (flecha verde hacia arriba: se enciende la luz, hacia abajo: se apaga). Existe adaptación del PSII, como queda de manifiesto en la disminución de la fluorescencia mientras se mantiene encendido el pulso de luz, lo que indica que existe transporte de electrones. El nivel basal de fluorescencia también aumenta al estimular con luz fotosintéticamente activa (actínica, señalada con una flecha azul). Esta luz es de menor intensidad que el pulso de luz inicial, señalado con las flechas verdes.

**3.1.4. Las plantas mutantes en biogénesis de cloroplastos contienen embriones que han detenido su desarrollo en globular.**

Los cloroplastos de embriones en estado de cotiledones doblados son capaces de realizar fotosíntesis, pero no se sabe si esta función es importante para el desarrollo embriogénico. Como vimos anteriormente, los cloroplastos se diferencian en el estado globular. Si la diferenciación de cloroplastos era importante para el desarrollo, se esperaba ver alguna alteración en la embriogénesis, específicamente en los estados globular o corazón.

En la literatura existen estudios de genes que participan en la biogénesis de cloroplastos. Algunos de estos trabajos señalan que al mutar estos genes, se detiene la embriogénesis (Tabla 4). Pero en otros trabajos no se reportan fallas en el embrión.

**Tabla 4. Algunos mutantes en biogénesis de cloroplastos detienen su desarrollo embriogénico. Se muestran datos bibliográficos de mutantes en genes que participan en la biogénesis de cloroplastos, que además presentan fallas en embriogénesis y ejemplos de otros mutantes sin fallas en este proceso.**

Genes (a)	Producto génico	Detención de la embriogénesis detectada	Referencias
<i>toc159</i>	Subunidad del translocón de la membrana externa del cloroplasto.	No	Kubis y cols, 2004.
<i>toc132 toc120</i>	Subunidad del translocón de la membrana externa del cloroplasto.	No	Kubis y cols, 2004.
<i>toc159 toc132</i>	Subunidades del translocón. Ambos son miembros de una pequeña familia génica que incluye <i>toc159</i> , <i>toc 132</i> y <i>toc120</i> .	Sí, no se sabe en qué estado.	Kubis y cols, 2004.
<i>tic32</i>	Subunidad del translocón de la membrana interna del cloroplasto.	Sí, en corazón	Horman y cols, 2004.
<i>Lpaat</i>	Aciltransferasa del ácido lisofosfatídico. El ácido lisofosfatídico es un intermediario de la síntesis de lípidos de la membrana del cloroplasto.	Sí, en globular	Yu y cols, 2004.
<i>GyrA</i>	DNA girasa, subunidad A. En <i>Arabidopsis</i> un gen destinado a plastidios y mitocondrias.	Sí, no se sabe el estado	Wall y cols, 2004.
<i>raspberry3</i>	Proteína localizada en cloroplasto con un dominio de hidrólisis de ATP.	Sí, en globular	Apuya y cols, 2002.
<i>chaperonin-60</i>	Proteína de plastidios que ayuda al plegamiento de otras proteínas.	Sí, en globular	Apuya y cols, 2001.
<i>GlyRS</i>	glycyl-tRNA synthetase de cloroplastos.	Sí, en globular	Uwer y cols, 1998.
<i>nap7</i>	Homólogo de <i>sufC</i> de bacterias. En esta especie participa en la biogénesis de proteínas Fe-S.	Sí, en globular	Xu y Moller, 2004.

(a) En cada fila de la tabla se señalan los genes mutados en una línea de *Arabidopsis*.

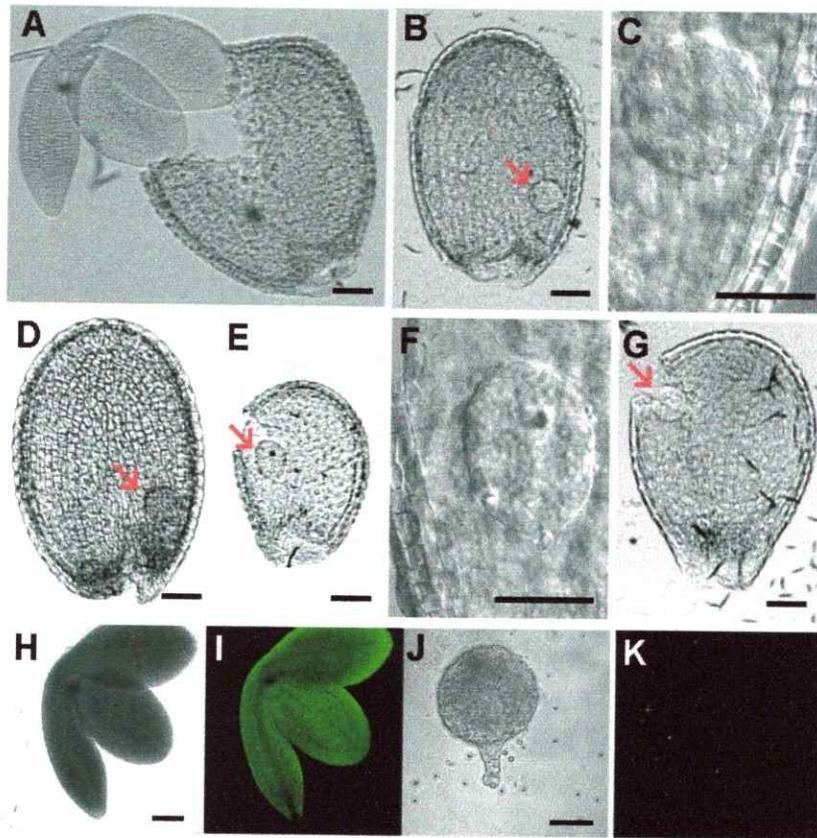
En algunos casos, la ausencia de fallas en la embriogénesis puede ser el resultado de la existencia de genes con funciones redundantes. Esto se observa para la familia génica *toc159*, *toc132* y *toc120*. Los mutantes en uno de estos genes no presentan fallas en la embriogénesis, pero esta falla está presente en los dobles mutantes (Kubis y cols, 2004).

Otra razón por la cual pueden no haberse observado fallas en la embriogénesis, en mutantes en biogénesis de cloroplastos, tiene que ver con el aporte de sustancias desde la madre. Es decir, aun cuando los cloroplastos del embrión presenten funciones metabólicas importantes para el desarrollo, esta función podría ser reemplazada por el transporte de metabolitos desde la madre. En este caso, es probable que sólo algunos embriones presenten problemas en su desarrollo y otros no, por lo que el fenotipo puede no haber sido detectado en estudios anteriores. Por lo tanto, pueden existir mutantes en genes que participan en la biogénesis de cloroplastos para los cuales no se han reportado fallas en la embriogénesis. Para analizar en más detalle los embriones de mutantes en biogénesis de cloroplastos, se obtuvieron líneas mutantes desde el NASC (Tabla 1). Las semillas de estas líneas se sembraron en placas MS, se seleccionaron por su color verde claro o amarillo, y se traspasaron a tierra para obtener sus embriones.

Como se mencionó anteriormente, las silicuas de plantas silvestres presentan semillas con embriones en el mismo estado del desarrollo. Los embriones en estado de cotiledones doblados se pueden observar desde los 7 DPA y le dan una coloración verde a la semilla silvestre (Figura 4 y Tabla 3). En algunas plantas obtenidas de semillas del NASC, se desarrollaron silicuas que tenían el total de las semillas de color verde. Pero en otras plantas, se desarrollaron silicuas con semillas incoloras, verdes y abortos. Todas estas semillas se aislaron, se clarearon y se observaron al microscopio. Los embriones que provenían de semillas color verde tenían un fenotipo silvestre (Figura 12A). Los embriones que provenían de semillas incoloras habían detenido su desarrollo en el estado globular (Figura 12B a G). Los cloroplastos sólo estaban presentes en los embriones de fenotipo silvestre y no en los mutantes incoloros extraídos de la misma silicua (igual temporalidad en el desarrollo) (Figuras 12I y 12K).

La información existente para el alelo *emb2036-1* en el banco de semillas señala que corresponde a una inserción de *T-DNA* en el locus AT5G66055 y que detiene la embriogénesis. Por otro lado, se había reportado que al reducir la expresión de un gen denominado *Akr*, se observaba una falla en el desarrollo del cloroplasto (Zhang y cols, 1992). En este último trabajo se clonó el gen *akr* de *Arabidopsis*, y se reportó que tiene una región *ankyrin-repeat* para la interacción con otras proteínas. Al realizar un alineamiento de este gen contra la base de datos de genes secuenciados en *Arabidopsis*, se encontró que este gen presentaba un 87% de identidad con AT5G66055, existiendo algunos *gaps* en la secuencia. Es decir, es altamente probable que el gen *Akr* corresponda al locus AT5G66055. Por lo tanto, una baja expresión del gen *Akr* no generaba fallas en la embriogénesis, pero sí en el desarrollo de cloroplastos en plantas adultas. Una interrupción del gen con *T-DNA* genera detención de la embriogénesis y falta de desarrollo de cloroplastos.

Por lo tanto, las líneas obtenidas desde el NASC presentaron embriones con fallas en el desarrollo. Esto no se observó en todas las plantas de un stock de semillas, por lo que puede haber segregación de la mutación o estamos frente a mutaciones con baja penetrancia. El hecho de que los embriones detuvieran su desarrollo en globular es coincidente con la literatura y nos sugiere que los cloroplastos se requieren para proseguir con la embriogénesis.



**Figura 12. Las líneas mutantes en genes que participan en la biogénesis de cloroplastos tienen embriones que detienen su desarrollo en globular.** Las semillas extraídas desde plantas mutantes en biogénesis de cloroplastos eran incoloras o verdes. Las semillas verdes tenían embriones con fenotipo silvestre y las incoloras, habían detenido su desarrollo en globular. Desde A hasta G se muestran semillas clareadas, que contienen los embriones en su interior. Desde H a K se observan embriones extraídos desde la semilla y visualizados de inmediato para poder observar su clorofila. **A:** Embrión con desarrollo en globular. La semilla fue extraída desde la misma silicua que el embrión en A (*emb-2036-1*). **B:** Embrión que detuvo su desarrollo en globular. La semilla fue extraída desde la misma silicua que el embrión en A (*emb-2036-1*). **C:** Amplificación de B, mostrando en detalle el embrión. **D:** Semilla de *emb2036-2*. **E:** Semilla de *hy2-1*. **F:** Amplificación de E. **G:** Semilla de *toc33*. **H:** Embrión silvestre extraído desde una semilla verde de una planta *emb-2036-1*. **I:** El mismo embrión en H, mostrando fluorescencia de clorofila (verde) **J:** Embrión extraído desde una semilla incolora, que ha detenido su desarrollo en globular (extraído desde una planta *emb-2036-1*). **K:** El mismo embrión en J, mostrando que no presenta fluorescencia de clorofila. Barra A, B, D, E, G y H: 100  $\mu$ m ; en C, F y J: 50  $\mu$ m.

### 3.1.5. Los embriones mutantes en adquisición de patrones tienen alteración en la distribución de células que contienen cloroplastos

Para determinar si las señales que coordinan la adquisición de patrones durante la embriogénesis afectan el desarrollo de células que contienen cloroplastos, se observaron mutantes que presentaban fallas en la formación de órganos en el eje axial (Tabla1). Para ello, se obtuvieron del NASC líneas de *Arabidopsis* con mutaciones en genes relacionados con la adquisición de patrones durante el desarrollo. Estos mutantes presentan mutaciones recesivas y como homocigotos son letales, por lo que se mantienen como heterocigotos (Mayer y cols, 1991b; Benfey y cols., 1993; Di Laurenzio y cols.,1996; Helariutta y cols., 2000).

Para observar cloroplastos en mutantes con fallas en el eje axial, se sembraron las líneas heterocigotas en tierra, se autocruzaron, y se disectaron embriones. Se esperaba que el 25% de la población fuera homocigota para la mutación y presentara el fenotipo correspondiente. Sin embargo, fue muy difícil obtener embriones mutantes, ya que la cubierta de la semilla se arrugaba, atrapando al embrión mutante y haciendo muy difícil su disección manual. Sin embargo, se obtuvieron embriones *gk*, *fk* y *mp* que presentaban el fenotipo descrito anteriormente (Schrack y cols, 2000; Mayer y cols, 1991). En la literatura se ha descrito que estos mutantes presentan fallas en el desarrollo de órganos en el eje axial (Mayer y cols, 1991; Benfey y cols., 1993; Di Laurenzio y cols.,1996; Helariutta y cols., 2000), como se detalla en la Tabla 1. Se ha descrito que el mutante *gurke* (*gk*) no desarrolla cotiledones ni meristema apical (falla apical); *fackel* (*fk*) no tiene hipocotilo (falla central); *monopteros* (*mp*) no desarrolla hipocotilo ni raíz (falla basal); y *gnom* (*gn*) no tiene raíz (falla terminal).

La fluorescencia de clorofila en embriones extraídos desde estos mutantes fue observada mediante microscopía confocal, haciendo cortes ópticos. En la Figura 13 se presenta un corte óptico a través de la región media de los embriones (Detalles en Anexo2).

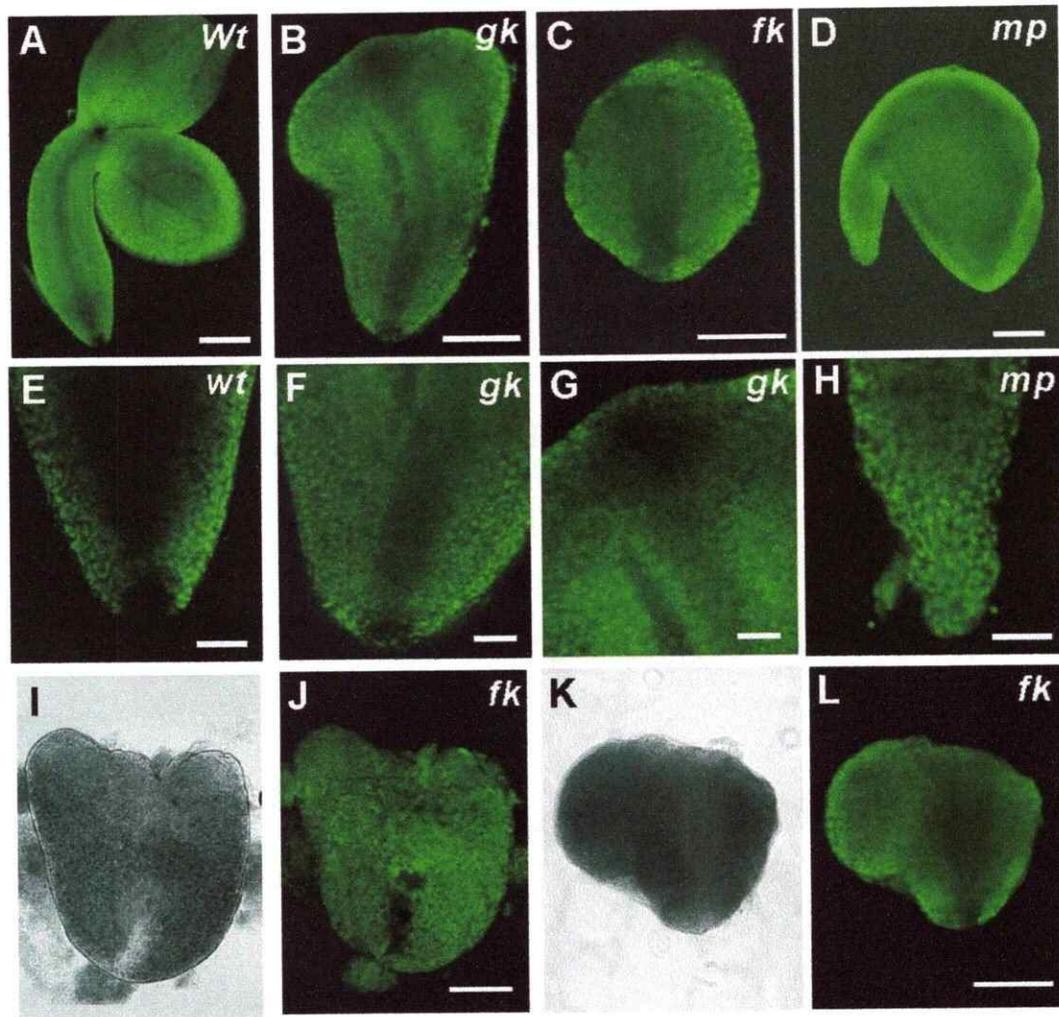
Como se había descrito en la literatura, *gk* tiene sólo unos rudimentos de cotiledones (Figura 13B). Se observó que los mutantes *gk* presentaban un patrón global de fluorescencia de clorofila diferente al embrión silvestre. Como se muestra en la Figura 13A, los embriones

silvestres tienen células con cloroplastos que delimitan claramente la zona del tejido provascular, compuesto por células sin cloroplastos. En cambio, en la región apical de *gk* no se observó el tejido provascular, cuya característica es la pérdida de clorofila. Sólo se observó ausencia de clorofila en un territorio central, correspondiente al meristema apical presuntivo y esta ausencia de clorofila fue más extensa que en el silvestre (Figura 13G). Al observar la región basal de *gk*, se vio que contenía un sistema provascular sin clorofila, similar al embrión silvestre. Pero, las células que contienen clorofila en *gk* ocupan una región más extensa que en el silvestre (Figuras 13E y F). Al comparar el ancho de la raíz e hipocotilo de 3 embriones mutantes y de 3 embriones silvestres, se observó que la raíz a 15  $\mu\text{m}$  de su ápice, tiene un ancho de  $75 \pm 6.5 \mu\text{m}$  en *gk* y de  $53 \pm 2.1 \mu\text{m}$  en el silvestre. El hipocotilo, a 100  $\mu\text{m}$  del ápice de la raíz, tiene un ancho de  $163 \pm 4.8 \mu\text{m}$  en *gk* y de  $132 \pm 5.6 \mu\text{m}$  en el silvestre. Esto puede deberse a la existencia de una mayor cantidad de capas celulares o a la presencia de células de mayor tamaño.

Según se ha descrito en la literatura, entre los mutantes *fk* se encuentran plántulas homocigotas que no sólo presentaban una delección central sino también apical (Shrick y cols, 2000). En este trabajo se encontraron embriones con una variedad de morfologías que diferían incluso dentro de una misma silicua, encontrándose embriones sin cotiledones (Figura 13C) o con rudimentos de ellos (Figura 13J y K). El ordenamiento espacial de células que contienen clorofila respecto a las que no contienen este pigmento está alterado en *fk*, en comparación al silvestre. Por ejemplo, no se aprecia el sistema provascular con claridad. Sin embargo, se pudo observar una zona interna en la cual hay ausencia de clorofila.

Como se había descrito (Mayer y cols, 1991 y 1993; Aida y cols, 2002), en el mutante *mp* se observó una delección basal, es decir, tenían una zona apical con cotiledones, y un apéndice pequeño que simulaba la región hipocotilo-raíz de embriones silvestres. Los cotiledones frecuentemente se encontraban fusionados, por lo que también tenían fallas al completar la adquisición del eje bilateral (Figura 13D). En la región del hipocotilo y del meristema apical se vieron zonas de células que carecían de clorofila, pero que no constituían

un sistema provascular como en el silvestre. En la zona basal todas las células presentaban clorofila, por lo que tampoco se distinguió la presencia de tejido provascular (Figura 13H).



**Figura 13. Las células que contienen clorofila presentan una distribución alterada en mutantes en adquisición de patrones.** Se extrajeron embriones que presentaban fenotipo silvestre o mutante en adquisición de patrones de silicuas provenientes de plantas heterocigotas y se observaron en microscopio confocal. Se muestra la fluorescencia de clorofila (color falso, verde). **A:** Embrión con fenotipo silvestre. **B:** Embrión *gurke* (*gk*). **C:** Embrión *fackel* (*fk*). **D:** Embrión *monopteros* (*mp*), extraído de la misma silicua que el embrión con fenotipo silvestre mostrado en A. **E:** Corte óptico longitudinal de la raíz del embrión mostrado en A. **F:** Corte óptico longitudinal de la raíz del embrión mostrado en B (*gk*). **G:** Región apical del embrión mostrado en B (*gk*). **H:** Corte óptico longitudinal de la raíz del embrión mostrado en D (*mp*). **I, K:** Imágenes en campo claro de embriones *fk*. **J y L:** Imágenes confocales que representan un corte óptico longitudinal por el centro de los embriones de I y K. **C y L** son dos embriones *fk* que fueron extraídos de la misma silicua. Barra en A a D, J y L: 100  $\mu$ m; E a H: 25  $\mu$ m.

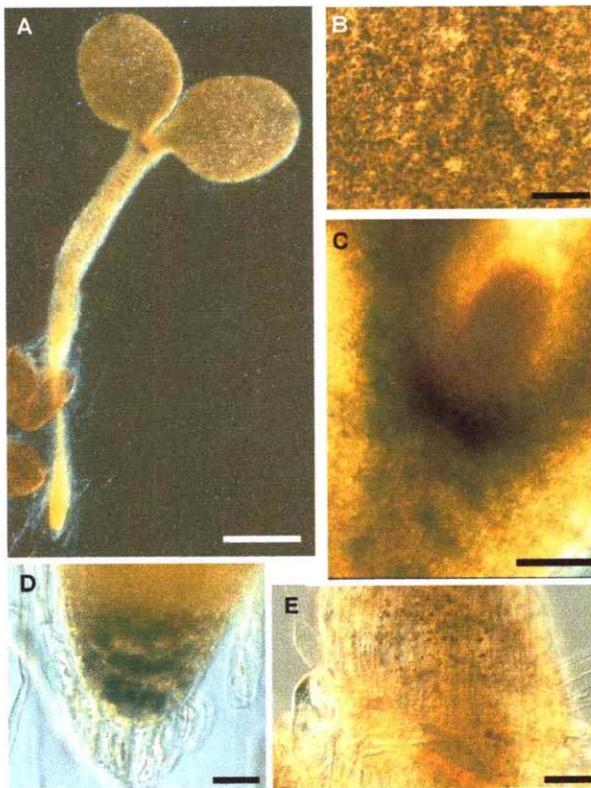
Por lo tanto, fue posible visualizar el ordenamiento espacial de células que contienen clorofila en mutantes *gk*, *fk* y *mp*. En todos ellos existe una alteración en la adquisición de

patrones en la embriogénesis, aunque en *fk* este patrón fue variable, por lo que es posible que se trate de una mutación pleiotrópica. Los mutantes *gk* y *mp* presentaron alteraciones en la arquitectura del embrión, principalmente en las regiones apical y basal. Todos estos mutantes presentan alteraciones en el ordenamiento espacial de células que contienen clorofila, fallas que podrían deberse a una alteración global en el programa de diferenciación celular, respecto al lugar que ocupan dentro del embrión. Sin embargo, contienen clorofila, por lo que las células embrionarias tienen la capacidad de diferenciar cloroplastos en estos mutantes.

## 3.2. Amiloplastos

### 3.2.1. Los amiloplastos están presentes en células de la columella.

Los amiloplastos son un tipo de plastidios que sintetizan y almacenan almidón. Para observar estos organelos se utilizó tinción con yodo, ya que el complejo yodo-almidón es de color azul oscuro y se puede ver por microscopía óptica. En plántulas enteras, de 4 días post-siembra (DPS), teñidas con yodo, se observó depósito de almidón bajo el meristema apical de la raíz y bajo el meristema apical del tallo (Figura 14). Se sabe que en ambos meristemas existen divisiones celulares continuas que dan origen a órganos como raíces y hojas (Figura 14C y D). Es posible que el almidón se ubique cerca de los meristemas para aportar la fuente de carbohidratos que se requiere para la activa proliferación.



**Figura 14. Los amiloplastos están presentes en varios tejidos en plántulas de Arabidopsis.** Se observan las manchas oscuras del complejo Yodo-almidón, que se utilizó como marcador de la presencia de amiloplastos.

A: Planta de 4 DPS.

B: Células del mesófilo del cotiledón, que muestran depósitos de almidón en cloroplastos.

C: Zona del meristema apical del tallo de otra plántula.

D: Apice de la raíz. El depósito de almidón se encuentra principalmente en los amiloplastos de las células de la columella.

E: Intersección hipocotilo-raíz de otra plántula. Que muestra depósito de almidón en hipocotilo, pero no en raíz. Las células de la raíz se pueden distinguir en la zona inferior de la fotografía por la presencia de pelos radiculares.

Barra A : 0.5 cm; B, C y E: 50  $\mu$ m; D: 20  $\mu$ m.

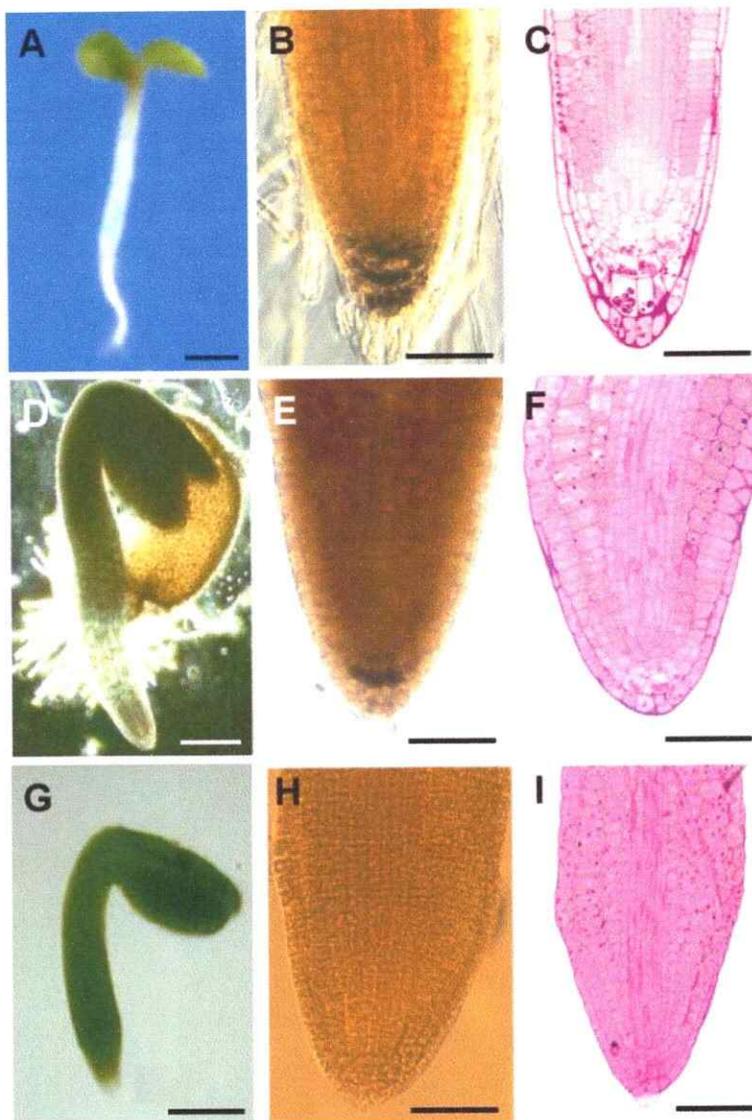
También se observó depósito de almidón en cotiledones e hipocotilo (Figura 14B y E). En cotiledones el almacenamiento no es en amiloplastos, sino en cloroplastos, que una vez que realizan fotosíntesis y sintetizan carbohidratos, los almacenan como almidón, para luego

distribuirlos al resto de la planta (Hendriks y cols, 2003). Como se mencionó anteriormente, en esta etapa del desarrollo los cloroplastos acaban de diferenciarse, por lo que es posible que el almidón observado en cotiledones provenga de las reservas presentes en la semilla.

En el hipocotilo, se sabe que el depósito de almidón corresponde a amiloplastos presentes en la endodermis, que ayudan a sensar la gravedad, para el crecimiento del hipocotilo en el sentido contrario a esta fuerza, respuesta conocida como gravitropismo negativo (Yamamoto y cols, 2002). En la figura 14 se aprecia depósito de almidón en otras células del hipocotilo, como epidermis. Esto puede deberse a que aun se conservan reservas nutritivas provenientes del embrión.

Los amiloplastos del ápice de la raíz de plantas adultas, también participan en la respuesta gravitropica, pero en este caso, se trata de gravitropismo positivo, es decir el crecimiento de la raíz sigue el sentido del vector de gravedad (Chen y cols, 1999). Se ha establecido que estos organelos, al ser más densos que el citoplasma que los rodea, son capaces de sedimentar siguiendo el vector de gravedad. Este es el comienzo de una serie de señales que mantienen el sentido del crecimiento de la raíz hacia el suelo, involucrando segundos mensajeros como calcio, y hormonas como auxina (Chen y cols, 1999; Blancaflor y Masson, 2003; Hou y cols, 2004). Hasta antes de esta tesis no se había descrito si los embriones contienen este tipo de organelos en la raíz, es decir, si la raíz del embrión tiene la habilidad de sensar la gravedad.

Para observar amiloplastos en distintas etapas del desarrollo de la raíz, se utilizó tinción con yodo y con reactivo de Schiff, este último reactivo se une a carbohidratos formando un precipitado fucsia. Como se muestra en la Figura 15, las plántulas a los 4 DPS ya presentaban cotiledones y una raíz primaria bien desarrollados (Figura 15A). En ellos se observó tinción con yodo y se vieron amiloplastos en cortes semifinos teñidos con reactivo de Schiff, en tres a cinco corridas de células (Figura 15B y C).



**Figura 15. Análisis de la presencia de amiloplastos en diferentes estados del desarrollo de la raíz de Arabidopsis.**

A, B, C: Plántulas de 4 DPS.  
D, E, F: Plántulas de 2 DPS.  
G, H, I: Embriones en estado de cotiledones doblados.

Las imágenes de la izquierda corresponden a plántulas enteras (A, D, G). En el centro se observan raíces de plántulas teñidas con yodo para ver el depósito de almidón (B, E, H) y en la fila de la derecha, cortes semifinos teñidos con reactivo de Schiff para ver carbohidratos de la pared y amiloplastos (C, F, I). Los amiloplastos se ven como puntos teñidos de color fucsia.

Barra en A: 1 mm; D y G: 200 μm; y en las restantes imágenes: 50 μm.

Las semillas, a los 2 DPS, ya habían germinado, y lo primero que emergió de ellas fue la raíz, como se ve en la Figura 15D. Al teñir estas plantas con yodo, se distinguieron una o dos corridas de células teñidas en el ápice de la raíz (Figura 15E) y los amiloplastos se observaron en cortes semifinos, teñidos con reactivo de Schiff, como pequeños gránulos también presentes en una o dos corridas de células (Figura 15F). Los embriones en estado de cotiledones doblados medían menos de 1mm (Figura 15G). En esta etapa del desarrollo las células del ápice de la raíz no se tiñeron con yodo (Figura 12H). La tinción con reactivo de Schiff reveló pequeñas manchas de color fucsia en las células de la corteza y epidermis del hipocotilo, que

podrían corresponder a almidón, pero las células de la columella presentaban una baja tinción, comparada con las plántulas de 2 o 4 DPS (Figura 12I).

Para saber si habían amiloplastos en células de la columella en embriones, se hizo microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como resultado de este análisis, en la Figura 16 se muestra la raíz de una plántula de 4 DPS; de una de 2 DPS; y de un embrión maduro. En las plantas de 4 DPS las células de la columella se encuentran polarizadas, orientando los amiloplastos basalmente y el núcleo apicalmente. Estos amiloplastos son visibles en varias filas de células (Figura 16). En las plántulas de 2 DPS, no existe polaridad, los amiloplastos se distribuyen en varias regiones del citoplasma y son más pequeños (Figura 16B). En el embrión se observaron unos organelos muy pequeños que podrían corresponder a plastidios, pero que por su tamaño y su densidad no corresponden a amiloplastos (Figura 16C y 19).



**Figura 16. Análisis por Microscopía electrónica de Transmisión (TEM).**

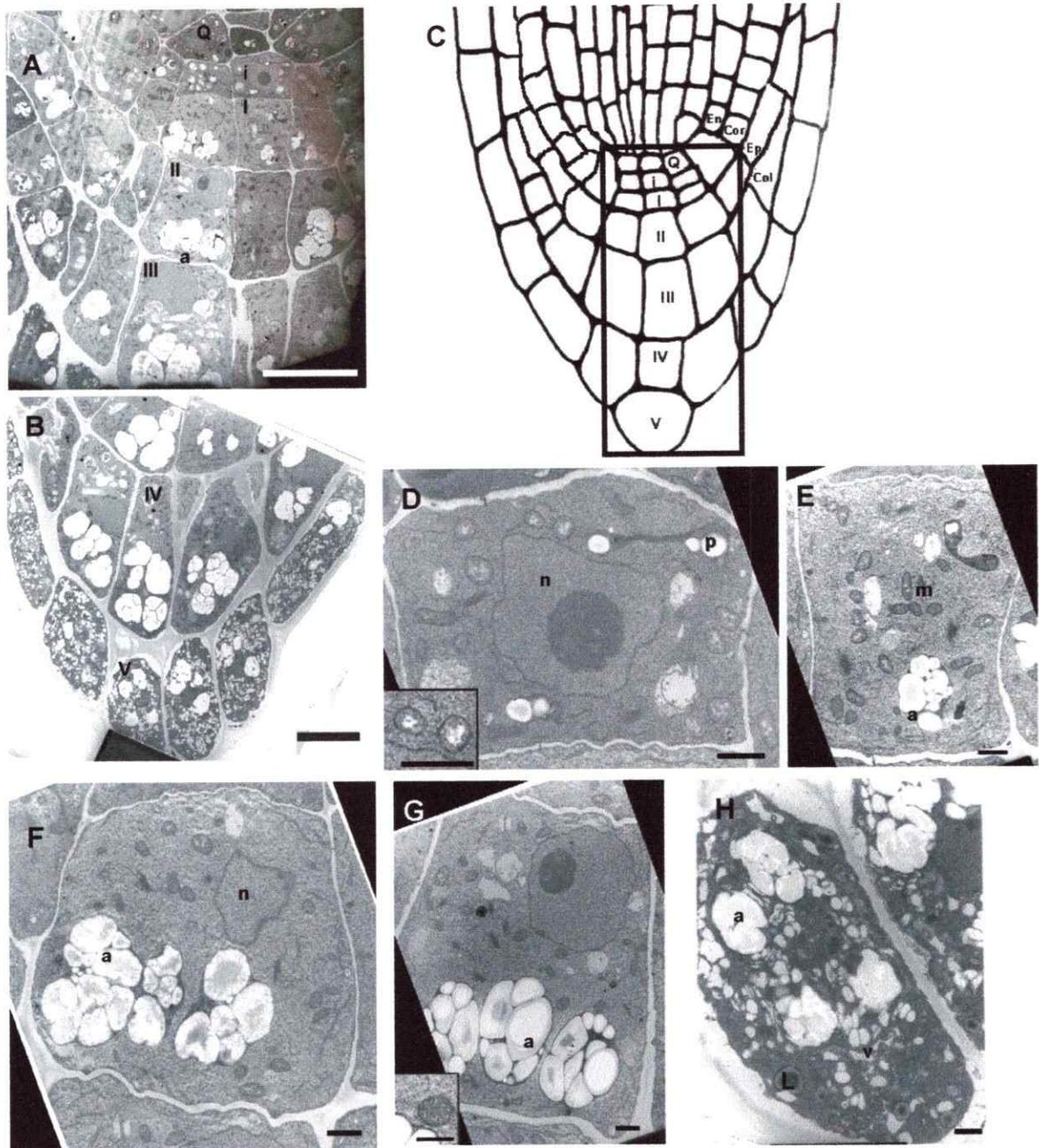
Se observan las microfotografías electrónicas de ápices de raíces. Algunos amiloplastos se señalan con una flecha. A: Ápice de la raíz de una plántula de *Arabidopsis* de 4 DPS. B: Ápice de la raíz de una plántula de 2 DPS. C: Ápice de la raíz de un embrión en estado de cotiledones doblados. Las células de la columella reordenan sus organelos y se polarizan durante el desarrollo de la raíz orientando los amiloplastos en la base y el núcleo hacia el ápice, como se observa en la plántula de 4 DPS. En plantas de 2 DPS, aunque hay amiloplastos, estos no están polarizados; y en embriones se ven unos organelos muy pequeños que podrían corresponder a plastidios, según se muestra más adelante. Barra en A y B: 10  $\mu$ m; en C: 5  $\mu$ m.

El ápice de raíces maduras se denomina cap o caliptra y se muestra esquemáticamente en la Figura 17A. Se aprecia una columna de cinco filas de células enumeradas hacia la periferia, llamadas células de la columella, tal como describe Olsen y cols (1984). La letra Q muestra la ubicación de las células del centro quiescente, que corresponde a células que permanecen sin dividirse. Debajo de ellas, se encuentran las células iniciales de la columella

(Figura 17A y C, célula "i"), que son células meristemáticas, que por división dan origen a todas las células de la caliptra (células de la columella). En las células iniciales de la columella se ven plastidios que comienzan a acumular almidón, algunos de ellos presentan una constricción central que podría deberse a su división o a la presencia de canales membranosos entre ellos (estrómulos) (Figura 17 D). Los estrómulos se han observado en otro tipo de plastidios, los cloroplastos, y son puentes transcientes entre organelos, a través de los cuales se transportarían proteínas o ácidos nucleicos (Kohler y cols., 1997a; 1997b y 2000).

Las células "i" se transforman en las células I que presentan amiloplastos más grandes (Figura 17E). Estas células se diferencian a las células II que son polarizadas, ya que sus amiloplastos se ubican en un extremo y el núcleo en el otro (Figura 17A). Las células de la fila III y IV (Figura 17 A y B) son un poco más grandes que las de la fila II, pero presentan una morfología similar. Estos tres tipos celulares serían los más sensibles a cambios en el vector de gravedad que provocan cambios en la distribución de amiloplastos y que actuarían como señal para cambiar la dirección del crecimiento, manteniendo a la raíz siempre en dirección hacia el suelo (Chen y cols, 1999). Además, las células II, III y IV presentan una mayor cantidad de dictiosomas que el resto. Los dictiosomas del aparato de Golgi son necesarios para la producción y secreción de mucílago que facilita la penetración de la raíz en el suelo (Olsen y cols, 1984). La última fila de células (V) presenta muchas vacuolas y una distribución de organelos no polar (Figuras 17B y H), estas células se descaman de la raíz y mueren, para ser reemplazadas por la fila de células IV de manera continua en el tiempo, a medida que se dividen las células meristemáticas. De este modo, en una raíz adulta la caliptra siempre se está regenerando y las células se están diferenciando para adquirir polaridad producir almidón, secretar mucílago y morir.

Es interesante señalar que en las mitocondrias también se observan cambios morfológicos a través de la diferenciación de las células de la columella. En las células II las mitocondrias tienen más crestas que en las células iniciales (Figura 17 D y G, insertos).



**Figura 17. Las células de la columella de plántulas de 4 días tienen amiloplastos.** En A y B se muestran las microfotografías TEM del ápice de dos raíces distintas obtenidas de plántulas de 4 DPS. En ellas, se aprecian las células del centro quiescente (Q) y las filas de células de la columella que contienen amiloplastos (a), numeradas del I al V. En C Se muestra un esquema del ápice de la raíz. En este esquema se aprecia la ubicación de las células del centro quiescente (Q) y las células iniciales de la columella (i). Se señala en un rectángulo la zona correspondiente a A y B. En D se muestra una ampliación de la célula marcada como "i" en A. Esta célula corresponde a una célula inicial de la columella, que da origen a las células I a V por división. Se observa el núcleo (n) con su nucleolo y un plastidio (p) con una constricción central **D (inserto)**. Corresponde a la ampliación de dos mitocondrias presentes en esta célula. En E y F se observan dos células I con amiloplastos (a). La célula de se ve polarizada, ya que sus amiloplastos están en un extremo y su núcleo en el otro. En G también se observa una célula polarizada II. **G (inserto)**. Ampliación de una mitocondria de la misma célula. Esta mitocondria tiene más membranas internas que las mitocondrias de células iniciales. En H se observa una célula V, que presenta amiloplastos (a), cuerpos lipídicos (L) y vacuolas (v). Barra en A y B: 10um; en D, D (inserto), E, F, G y H: 1 um; en G (inserto): 0.5 um.

Al observar raíces de plántulas de 2 días se aprecia claramente que tienen amiloplastos en células de la columella (Figuras 16B y 18). En la mayoría de las células estos amiloplastos no están polarizados, miden de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y están mayoritariamente en la penúltima y última corrida de células. Por su ubicación, estas células se han marcado como IV y V, respectivamente. Sin embargo, sus características se asemejan más a las células I y II de plántulas de 4 DPS, ya que contienen amiloplastos más pequeños que no se distribuyen de manera polar (Figuras 18A y B). En las células de la columella de plántulas de 2 DPS se observaron más cuerpos lipídicos que en plántulas de 4 DPS.

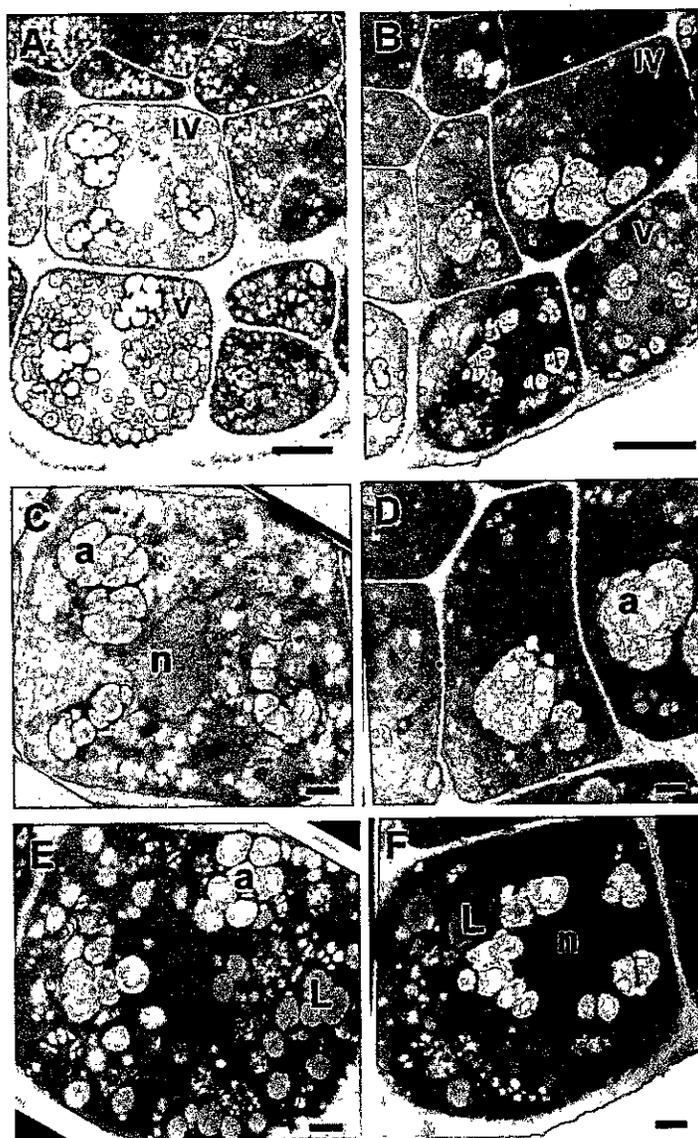


Figura 18. Detalle de células del ápice de la raíz de plántulas de 2 días. En A y B se muestran la penúltima (IV) y última (V) célula del ápice de la raíz de dos plántulas distintas obtenidas a los 2 DPS.

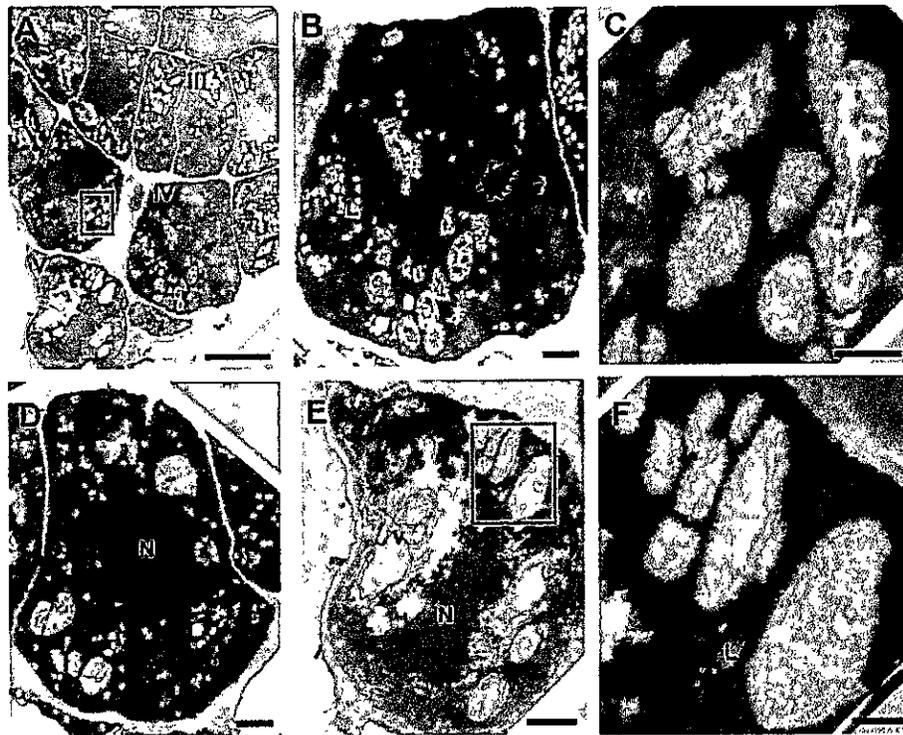
En C y D se han amplificado las células de la fila IV.

En E y F Se han amplificado las células V.

Tanto en las células IV, como en las V se distinguen amiloplastos (a) y otros organelos como núcleo (n), y cuerpos lipídicos (L). La distribución de amiloplastos no era polar.

Barra en A y B: 5  $\mu\text{m}$ ; en el resto de las figuras: 1  $\mu\text{m}$ .

En embriones en estado de cotiledones doblados, las células de la columella son más pequeñas que en plántulas de 4 DPS. Por ejemplo, la célula IV en embriones tiene un diámetro de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , en plántulas de 2 DPS es de 5 a 10  $\mu\text{m}$  y en plántulas de 4 DPS, es de 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente. En la figura 19 se muestra el ápice de una raíz embrionaria. En las células de las filas IV y V se pueden apreciar unos plastidios que podrían estar empezando a acumular almidón, pero no se trata de amiloplastos maduros como los que se observan en plántulas de 2 ó 4 DPS, ya que su diámetro es bastante pequeño (menos de 1  $\mu\text{m}$ ) como para definirlos como amiloplastos, y no contienen depósito de almidón alrededor de un centro nucleador, como se observa en plántulas de 2 ó 4 DPS, en las cuales el almidón forma gránulos más densos.



**Figura 19. Microfotografías de células del ápice de la raíz de embriones en estado de cotiledones doblados.** A: Se muestra el ápice de una raíz de un embrión en estado de cotiledones doblados, con células de las filas III, IV y V. B: Se ha amplificado una células IV. C: Se muestran los organelos presentes en el rectángulo de la fotografía A. D y E: Células V de dos embriones diferentes, la célula en D corresponde a la de la Figura 18D y la célula en E a la fotografía A. F: Se muestra una amplificación de los organelos encerrados en un rectángulo en E. Se distinguen núcleo (n), cuerpos lipídicos (L) y vacuolas (v). Barra en A : 5  $\mu\text{m}$ ; en B, D y E: 1  $\mu\text{m}$ ; en C y F: 500 nm.

Con estos resultados, se estableció que los amiloplastos maduros no están presentes en la raíz del embrión, sino que aparecen después de la germinación de la planta. La ausencia

de amiloplastos en el ápice de la raíz de embriones sugiere que éstos no son capaces de sentir ni responder a la gravedad. En plántulas de 4 días se aprecian cambios morfológicos en mitocondrias a medida que las células de la columella y los amiloplastos se diferencian.

### **3.2.2. La diferenciación de células de la columella va asociada a la diferenciación de amiloplastos y es influenciada por auxina y fitocromos**

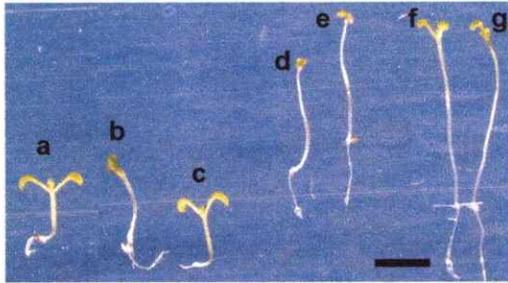
Los diferentes tipos de plastidios provienen de un precursor, el proplastidio, éste se diferencia en la hoja a cloroplasto, en los pétalos y frutos a cromoplasto, y en los tejidos de almacenamiento, a amiloplasto (Corriveau y Coleman, 1991; Pyke y Page, 1998; Pyke, 1999).

La diferenciación de plastidios a amiloplastos es un proceso complejo, en el cual los proplastidios comienzan a acumular almidón aumentando de tamaño para transformarse en amiloplastos. Este proceso ocurre de manera simultánea con la diferenciación celular y el desarrollo y requiere aporte de metabolitos para la síntesis de almidón, por lo que requiere reguladores del desarrollo y del metabolismo. Para estudiar la diferenciación de plastidios a amiloplastos, se ha utilizado cultivo celular y órganos como tubérculos de papa y el ápice de la raíz, pero se desconoce cómo es regulado (Miyazawa y cols. 1999 y 2002; Geigenberger, 2003; Dolan, 1993; Moore, 1983).

Las células de la columella son un buen modelo para estudiar la diferenciación de plastidios a amiloplastos porque son fáciles de visualizar mediante microscopía, se pueden teñir para detectar el contenido de almidón, no presentan pigmentos que interfieran, y constituyen el único tipo celular dentro de la raíz que tiene amiloplastos.

Utilizando tinción con yodo, se analizaron plantas con mutaciones en varios genes, disponibles en el laboratorio, principalmente relacionadas con las vías de transducción de señales de luz y hormonas (Tabla 1). Estos mutantes se analizaron para la presencia del fenotipo por el cual se han caracterizado en la literatura, y luego para la tinción con yodo, como marcador de la presencia de amiloplastos. A modo de ejemplo, se muestran en la Figura 20 mutantes en fitocromos, sensores de luz roja, que en la luz inhiben la elongación del hipocotilo y estimulan la expansión de los cotiledones (respuesta fotomorfogénica). Por lo que, en mutantes

con fitocromos no funcionales se observa un hipocotilo elongado al crecer las plantas en luz, fenotipo que ha sido descrito anteriormente (Wang, 2003).



**Figura 20.** Fotografía de distintos mutantes en la vía de transducción de señales de la luz (fitocromos). Las plantas fueron germinadas y mantenidas en MS durante 4 días. En A se aprecia una plántula silvestre, en B y C, dos plantas de la colección de semillas CS6223 (*phyA-211*), una de ellas presenta el fenotipo silvestre (C) y otra el mutante (B), por lo que fue necesario seleccionar aquellas semillas mutantes antes de teñirlas con yodo. en D y E dos plantas de la colección de semillas CS6213 (*phyB-5*), y en F y G, dos plantas de la colección de semillas CS6224 (*phyA-201 phyB-5*), que presentan el fenotipo esperado: hipocotilo largo. Barra de tamaño: 5 mm.

Se encontró mutantes que presentan alteraciones en los niveles de almidón en células de la raíz. Estas líneas fueron caracterizadas previamente para otros fenotipos y son mutantes en dos tipos de genes: 1) En fitocromos y 2) en respuesta a hormonas (auxina y etileno). Las raíces de estos mutantes se tiñeron con yodo para detectar su almidón y los resultados del análisis de varias plantas de 4 DPS se muestran en la Tabla 5.

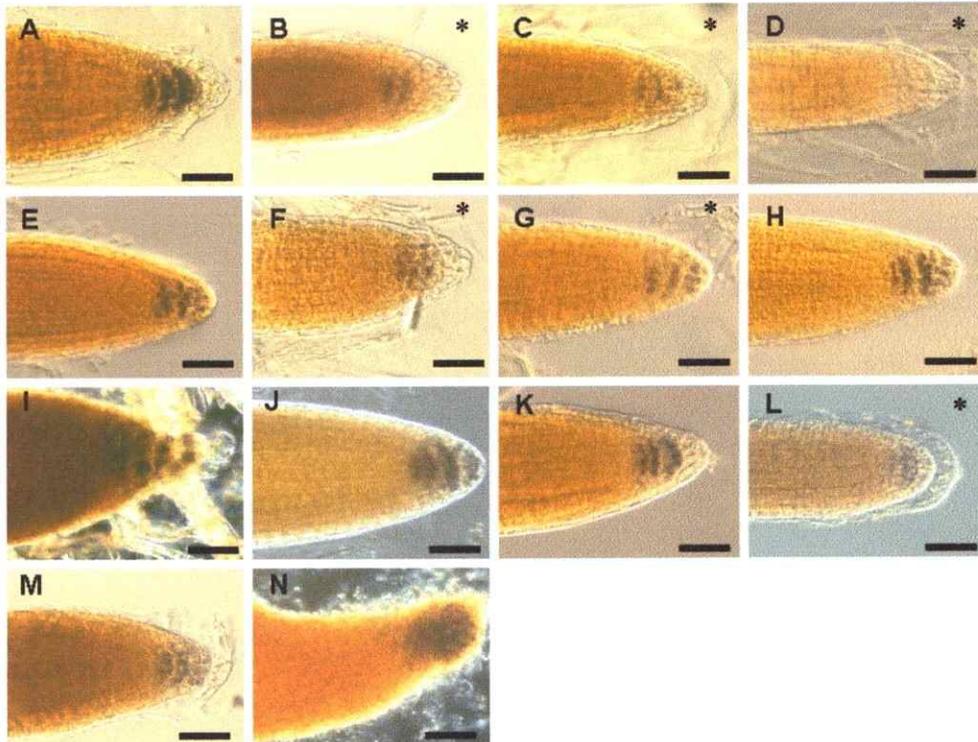
**Tabla 5. Análisis de la presencia de almidón en raíces de plantas de Arabidopsis de 4 DPS.** Se muestra el grado de tinción con yodo de las células de la columella de plántulas de 4 DPS. Las plántulas mutantes fueron teñidas en paralelo a las silvestres en varios experimentos. Se cuantificó el número de raíces que se teñían, que presentaban una tinción débil o que no se teñían con yodo. El total de raíces cuantificado para cada línea se señala en la última columna (n).

Alelo	Se tiñe	Tinción débil	No se tiñe	n
<i>phyA-201 phyB-5</i>	0	24	12	36
<i>phyA-201</i>	10	2	20	32
<i>phyA-211</i>	11	1	3	15
<i>phyB-5</i>	2	13	58	73
<i>aux1-7 ein2-1</i>	4	12	8	24
<i>aux1-7</i>	8	0	0	8
<i>ein2-1</i>	11	0	0	11
Silvestre ( <i>col</i> )	21	6	0	27

En la Figura 21 se muestran raíces representativas de cada línea mutante y los mutantes que presentan menor contenido de almidón que el silvestre se han marcado con un asterisco. Estos son *phyA-201* (Figura 21B), *phyA-211* (Figura 21F), *phyB-5* (Figura 21C), *phyB-4* (Figura 21G), y el doble mutante *phyA201 phyB-5* (Figura 21D).

El doble mutante *aux1-7 ein2-1* (Figura 19L) también presenta menor contenido de almidón que el silvestre, sin embargo las mutaciones en uno sólo de esos genes *aux1-7* (Figura 21J) , *ein2-1* (Figura 21K) presentan un contenido normal de almidón.

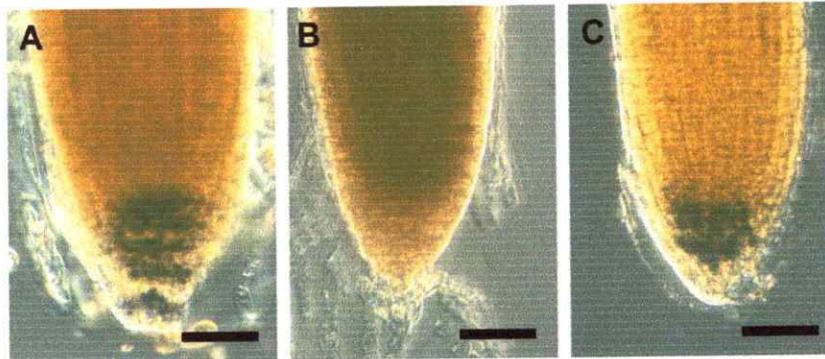
Otros mutantes en la vía de transducción de señales de auxina, como *axr4-1* (Figura 21I) y *axr2-1* (Figura 21N) también presentan tinción con yodo, pero en *axr2-1*, existe mayor tinción que en el silvestre.



**Figura 21. Identificación de mutantes con alteración en el contenido de almidón en células de la raíz de Arabidopsis.** Las muestras correspondientes a distintas plantas se crecieron por 4 días en MS, se fijaron y se tificaron con yodo para detectar almidón. Los mutantes que tienen menos almidón que el silvestre se señalan con un asterisco. En A: Se muestra la raíz de una plántula silvestre y en las restantes fotografías se muestran los mutantes: B: *phyA-201*. C: *phyB-5*. D: Doble *phyA-201 phyB-5*. E: *cop1-5*. F: *phyA-211*. G: *phyB-4*. H: *hy5-1*. I: *axr4-1*. J: *aux1-7*. K: *ein2-1*. L: Doble *aux1-7 ein2-1*. M: *arc-6*. N: *axr2-1*. Barra en todas las figuras 50  $\mu$ m.

El doble mutante *aux-1 ein2-1* es deficiente en las vías de transducción de señales de auxina y etileno. Se sabe que *Aux-1* codifica para una proteína que se ubica en la membrana plasmática y que sirve para el transporte de auxina (hormona vegetal) al interior de la célula ("influx carrier"). Para saber si la falta de tinción con yodo en este mutante se debía a la falta de auxina, se trataron con auxina exógena. Para ello, se crecieron 5 plántulas *aux-1 ein2-1* en

medio MS y otras 5 plántulas en medio con la auxina ácido naftalenacético (NAA) 0.4  $\mu$ M. Como control positivo de la tinción con yodo se utilizaron plántulas silvestres. Se observó que las plántulas dobles mutantes tratadas con auxina recuperaron el fenotipo silvestre. Por lo que se atribuyó a esta hormona la causa de la alteración observada en la tinción con yodo (Figura 22).



**Figura 22. Restauración del fenotipo WT en el doble mutante *aux-1/ein2-1* por tratamiento con auxina (NAA).** Todas las raíces fueron crecidas por 4 días en placas, fueron fijadas y teñidas con yodo, como se detalla en métodos. **A.** Planta silvestre crecida en MS. **B.** Doble mutante *aux-1 ein2-1* crecido en MS. **C.** Doble mutante *aux-1 ein2-1* crecido en medio MS con NAA 0.4  $\mu$ M, resultando la restauración del fenotipo silvestre de tinción con yodo. Barra en todas las figuras: 50  $\mu$ m.

El fenotipo de alteración en el contenido de almidón podía ser el resultado de una alteración en el número de plastidios por célula; en su diferenciación a amiloplastos; en la síntesis de almidón; o podía resultar de una falla generalizada en la diferenciación de las células de la raíz. Para determinar con mayor exactitud cuál era la falla en la raíz de los mutantes que presentaban menor tinción con yodo, se hizo microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los mutantes dobles *phyA-201 phyB-5* y *aux1-7 ein2-1* (Figura 23). Se observó que existen amiloplastos en los mutantes y que estos organelos en los dobles mutantes *phyA-201 phyB-5* presentaban un color gris, atribuible a un menor contenido de almidón que los de plantas silvestres fijadas, cortadas y teñidas en paralelo. En los dobles mutantes *aux1-7 ein2-1*, se observó que las células eran de menor tamaño que en la planta silvestre, pero no se observó diferencias en la morfología o tamaño de los amiloplastos, pero sí en su abundancia.



**Figura 23. Comparación de los amiloplastos de plantas silvestres columbia y mutantes dobles *phyA-201 phyB-5* y *aux1-7 ein2-1*. Todas las plantas son de 4 días y fueron procesadas en paralelo, utilizando los mismos reactivos. En A se muestra la TEM de una planta silvestre; en B un doble mutante *phyA-201 phyB-5* y en C un doble mutante *aux-1 ein2-1*. Se ha marcado con la letra "a" un amiloplasto en células de la columella equivalentes en cada planta (células de tipo IV). Se ve claramente que los amiloplastos de (B) presentan menor contenido de almidón que los de la planta silvestre (A), mientras que no existe una diferencia obvia de (C) con el silvestre en cuanto a su contenido de almidón, pero sí en cuanto a su abundancia, observándose además que las células de este mutante son más pequeñas. Barra en todas las figuras: 10  $\mu$ m.**

Por lo tanto, se determinó que existen mutantes en fitocromos y en vía de transducción de auxina que presentan menor tinción con yodo en células de la columella que las plántulas silvestres, esto no se debe a la inhabilidad de los mutantes para formar amiloplastos, sino a la presencia de una baja cantidad de almidón en el ápice de la raíz.

### **3. 3. Otros plastidios y mitocondrias**

Como se mencionó en la introducción, en plantas existen dos organelos con genoma propio y que realizan procesos centrales en el metabolismo. Estos son los plastidios y las mitocondrias. Aunque en el capítulo anterior se estudiaron cambios en cloroplastos y amiloplastos, para cumplir el objetivo de la tesis era necesario observar otros plastidios y mitocondrias y sus cambios durante la embriogénesis.

Los plastidios y las mitocondrias son incoloros, por lo que es muy difícil su observación al microscopio. Por ello, para marcar estos organelos, se probaron cromóforos con afinidad por mitocondrias, como Mitotraker green, o anticuerpos dirigidos contra proteínas mitocondriales y plastidiales. Tanto Mitotraker green como anticuerpos marcaron los organelos en cortes de tejidos o en protoplastos (Células vegetales sin pared celular). Sin embargo, en tejidos completos la penetración de estos marcadores fue baja, lo que dificultó la observación de organelos en embriones completos o durante el desarrollo de la raíz. Por esta razón se hicieron construcciones para dirigir proteínas fluorescentes a los organelos.

#### **3.3.1. El uso de proteínas fluorescentes permitió la observación de plastidios y mitocondrias.**

En nuestro laboratorio se han diseñado distintos vectores para la expresión en plantas de proteína fluorescente amarilla, roja y cian, con destinación a compartimentos celulares, como citoplasma, núcleo, mitocondria y plastidios (Morales, 2003; Urbina, 2003). Los vectores que se utilizaron en este trabajo se señalan en la Tabla 2 y su construcción se detalla en Métodos.

Se trabajó con dos tipos de vectores de expresión en vegetales, el primer tipo se utilizó para expresión transiente. El segundo tipo de vector es el "binario", que se puede replicar en bacterias *E. coli* y en *A. tumefaciens*, y además posee dos extremos ("Left y Right border" o LB y RB) que le permiten insertarse en el genoma vegetal al azar y replicarse, pasando a las siguientes generaciones de células vegetales. Para verificar que los vectores construidos servían para destinar proteína fluorescente a los organelos, se transformó células epidermales

de cebolla por biobalística de manera transciente y se observó la ubicación de la proteína fluorescente.

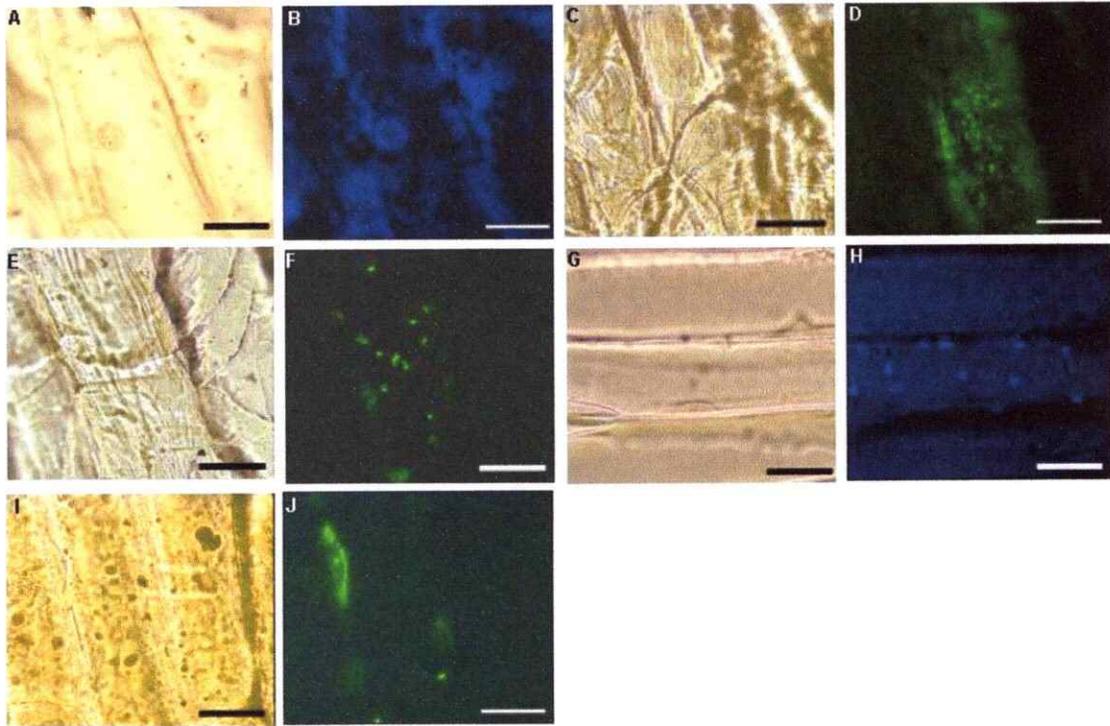
Además de los vectores fabricados en nuestro laboratorio, en el comienzo de este trabajo de tesis, se recibieron como donación los vectores de expresión transciente pCK-CoxIV-GFP y pCK-RecA-GFP, para la destinación de GFP a mitocondrias y plastidios, respectivamente (Peeters y cols, 2000). Estos vectores se utilizaron como control positivo (Figura 22).

Como control negativo de la destinación, se fabricaron vectores de expresión transciente sin secuencia de destinación a organelos (pAMA7 o pBI221-CFP) cuando se transformó células epidermales de cebolla con estas construcciones se observó fluorescencia en algunas regiones del citoplasma y núcleo (Figura 24 A y B). La marcación del núcleo podría deberse a la localización de la proteína rodeando a este compartimiento. Alternativamente, podría ser causada por la migración hacia ese compartimiento de las proteínas fluorescentes, suceso que ha sido reportado por otros autores (Hasseloff y cols, 1997; Davis y Vierstra, 1998).

Además se fabricaron vectores con la secuencia señal de destinación a mitocondrias de CoxIV río arriba de las proteínas fluorescentes cyan (CFP) y amarilla (YFP). Con ambos tipos de vectores se observó marcación de mitocondrias, aunque las mitocondrias marcadas con CFP fueron difíciles de visualizar, pues la iluminación del tejido con luz de longitudes de onda cercanas al UV provoca daño celular (Morales, 2003).

También se fabricaron vectores que contenían la secuencia de destinación a plastidios, de la proteína RecA, ubicada río arriba de la proteína fluorescente roja (RFP), cyan (CFP) o amarilla (YFP). En la Figura 24 se muestran células de la epidermis de cebolla transformadas con pAMA10 (pBY221-RecA-CFP) (Figura 24 G y H) o con pAMA12 (pBY221-RecA-YFP) (Figura 24 I y J). Tanto los plastidios marcados con CFP, como aquellos marcados con YFP presentan un tamaño y número similar al control positivo pCK-RecA-GFP (Figura 24 E y F). En diferentes células observadas la distribución de los plastidios era distinta. A veces se observaron en todo el citoplasma y otras veces se agrupaban en torno al núcleo.

Por lo tanto, utilizando un sistema de transformación transciente en epidermis de cebolla comprobamos que las construcciones diseñadas con el péptido señal de RecA marcan plastidios, y las diseñadas con el péptido señal de CoxIV marcan mitocondrias.



**Figura 24. Verificación del transporte de proteínas fluorescentes a plastidios y mitocondrias.** Los vectores de expresión transciente y binarios se utilizaron para transformar células de la epidermis de cebolla, tal como se detalla en materiales y métodos. En la fila de la izquierda se muestran fotografías de células de cebolla en campo claro o DIC. En la fila de la derecha se muestra la fluorescencia de la célula correspondiente ubicada a la izquierda.

**A y B:** vector sin destinación a organelos pAMA7 (pBI221-CoxIV-CFP).

**C y D:** vector con destinación a mitocondrias pCK-CoxIV-GFP (Donado por I. Small).

**E y F:** vector con destinación a plastidios pCK-RecA-GFP (Donado por I. Small).

**G y H:** vector con destinación a plastidios pAMA10 (pBI221-RecA-CFP).

**I y J:** vector con destinación a plastidios pAMA12 (pBI221-RecA-YFP).

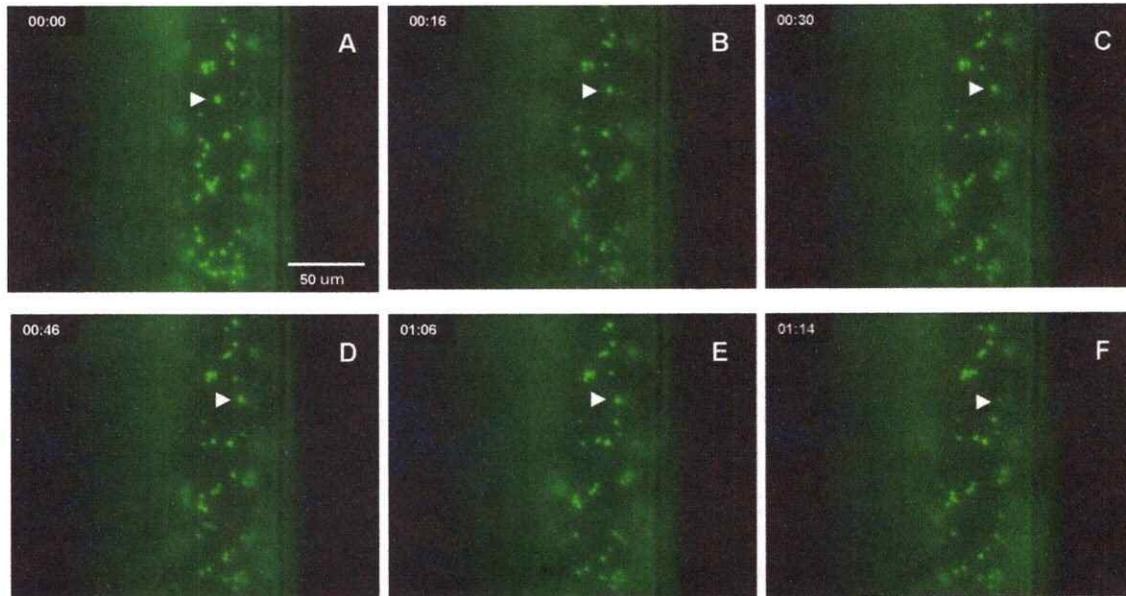
Barra de tamaño en todas las figuras: 50  $\mu$ m.

### **3.3.2. En células epidermales de cebolla las mitocondrias se mueven utilizando el citoesqueleto de actina.**

La marcación de organelos con proteínas fluorescentes permitió su observación directa en el tiempo. Se observó que las mitocondrias se mueven a través del citoplasma en células de la epidermis de cebollas. Al inicio de esta tesis, se desconocía si el movimiento dependía del citoesqueleto de actina, de microtúbulos o de ambos. Para resolver este problema, las células que contenían mitocondrias marcadas fueron tratadas con distintos desestabilizadores del citoesqueleto para determinar si el movimiento de estos organelos se alteraba.

Como sistema modelo se utilizó epidermis de cebollas. Las ventajas de este tejido eran su transparencia y el gran tamaño de sus células (50 a 200  $\mu\text{m}$ ), lo que facilitó la observación microscópica; y que además podía ser transformado a través de biobalística. La epidermis de cebolla se transformó con el vector pCK-CoxIV-GFP (marca mitocondrias) y al cabo de 48 hrs de incubación en cámara de crecimiento, se observó por microscopía de epifluorescencia tomando fotos cada 15 segundos (Figura 25). Se observa claramente que las mitocondrias se mueven y que no todas lo hacen a la misma velocidad.

Para el tratamiento con drogas desestabilizadoras del citoesqueleto, se fabricó una cámara que en el fondo tenía un cubreobjetos y hacia arriba el tejido inmovilizado con agarosa. Se logró gravar algunas imágenes en vivo del tratamiento con cytochalacina D, pero hubo dificultades en mantener el tejido quieto durante toda la observación, por lo que se optó por incubar el tejido en diferentes drogas, montarlo entre un cubreobjetos y un portaobjetos, sin retirar la droga del medio y observarlo. Los tratamientos fueron con DMSO 0.1%, (utilizado como solvente); cytochalasina D 10  $\mu\text{M}$  (un desestabilizador del citoesqueleto de actina); BDM 10 mM (un inhibidor de miosinas); y colchicina 5% (un desestabilizador de microtubulos). Todos los tratamientos se hicieron con incubaciones de 30 minutos.



**Figura 25. Dinámica de mitocondrias marcadas con GFP en células epidermales de cebollas.** Las mitocondrias se mueven en el citoplasma de células epidermales de cebolla. Se ha marcado con una flecha blanca una de las mitocondrias que se mueve en el citoplasma de una célula epidermal. Entre los cuadros A y B, la mitocondria se mueve hacia la derecha en el plano XY. Entre C y E permanece casi en el mismo lugar. Luego presenta un movimiento en el eje Z, desenfoándose hasta casi desaparecer en F. Se tomaron imágenes cada 15 seg (el tiempo se indica en la esquina superior izquierda de cada imagen) y se procesaron las imágenes utilizando Photoshop. Se utilizó la construcción que contiene la secuencia 5' de CoxIV fusionada a GFP en el vector pBI221, que conduce esta proteína a mitocondrias (Vector pCK-CoxIV-GFP, donado por Ian Small, Peeters y cols, (2000). Se extrajo desde cebollas el tejido epidermal y se puso sobre una placa de MS. Para disparar el ADN, se utilizaron partículas de tungsteno de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro sometidas a una presión de disparo de 1500 psi. El tejido se incubó por 48 hrs a 24°C y se observó en un microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (filtro Chroma UN31001).

Como resultado de estos análisis se observó que el movimiento de mitocondrias es inhibido por citochalacina D, un desestabilizador del citoesqueleto de actina y no por colchicina, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos. Resultados similares fueron publicados por Van Gestel y cols. (2002). Al tratar con BDM, los resultados no son consistentes, pues existieron experimentos en los cuales las mitocondrias continuaban moviéndose, y otros en los cuales las mitocondrias reducían su velocidad o se detenían.

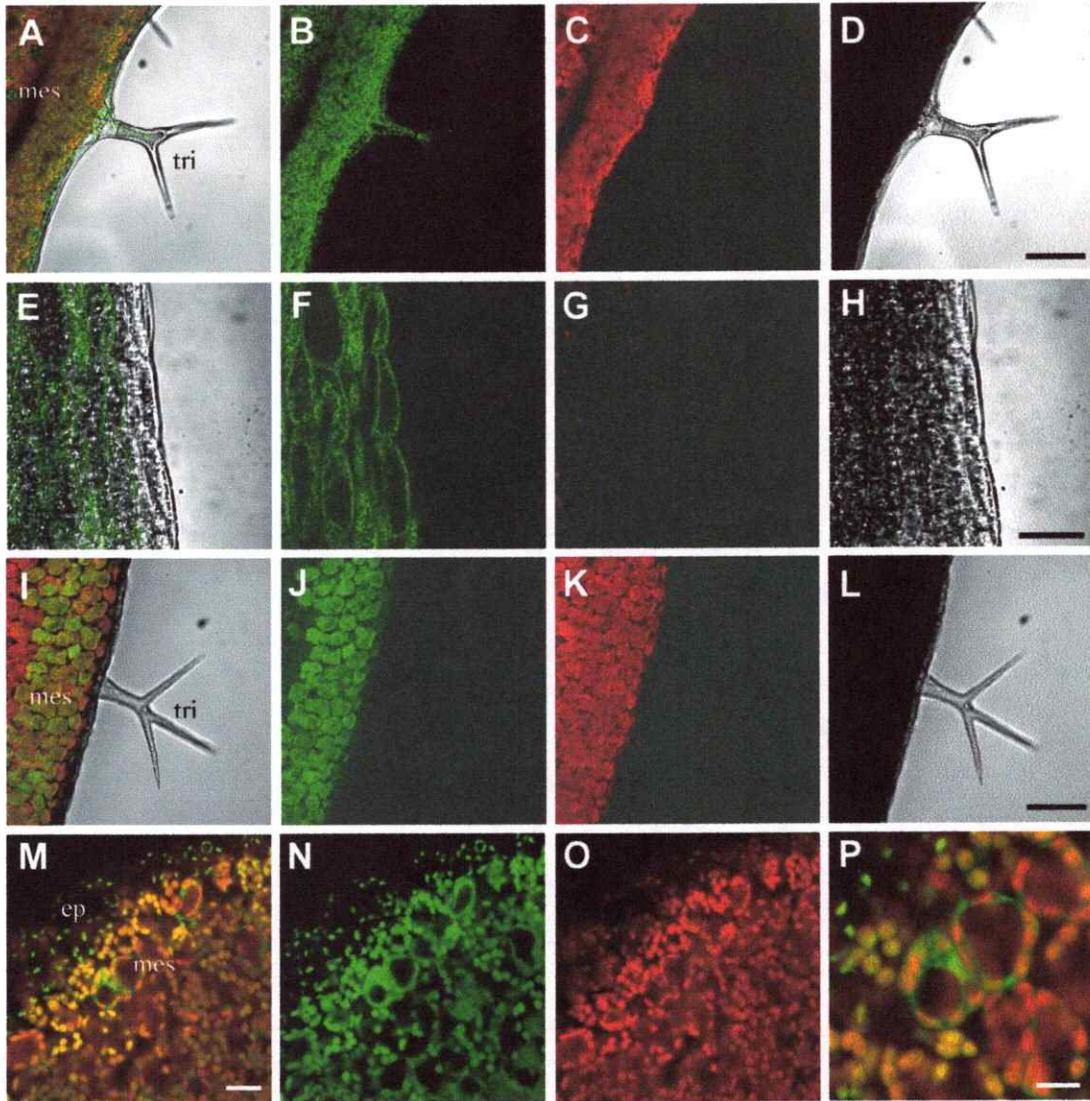
Estos resultados sugieren que el citoesqueleto de actina participa en el movimiento de mitocondrias en células de la epidermis de cebolla.

**3.3.3. La obtención de líneas transgénicas de Arabidopsis que destinan YFP a mitocondrias y plastidios permitió la observación de estos organelos en plántulas y embriones.**

Una vez que se confirmó que los vectores binarios sintetizaban proteínas fluorescentes correctamente destinadas a plastidios y mitocondrias, se utilizaron estas construcciones para transformar plantas de Arabidopsis de manera estable. Como marcador de selección se utilizó el gen de resistencia a kanamicina.

Para marcar mitocondrias, se utilizó el vector pAMA3 que contiene la fusión *coxIV-YFP* y el gen *nptII*, que otorga resistencia a kanamicina. Este vector se utilizó para transformar 9 plantas (Anexo 1, Tabla 1). Se analizó la segregación de la resistencia a kanamicina y presencia de fluorescencia amarilla en tres generaciones (Anexo 1), obteniéndose plantas con una sola inserción de T-DNA, homocigotas (Anexo 1- Tabla 3, Planta AM3B4M) y con mitocondrias que acumulan YFP (Figura 26). Las mitocondrias son visibles en varios tipos celulares como tricomas, células del mesófilo de la hoja (Figura 26B) y de la epidermis del hipocotilo (Figura 26E). Las mitocondrias observadas con YFP son capaces de moverse, aunque menos que las mitocondrias de cebolla (Figura 27).

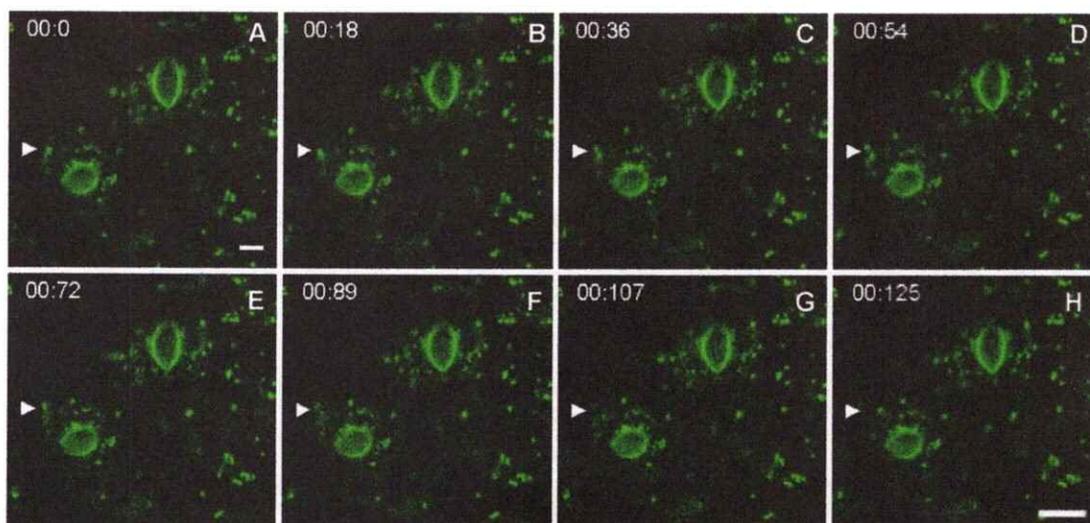
Para marcar plastidios se utilizó el vector pDUA3, que contiene la fusión *RecA-YFP* y el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección. Con este vector se transformaron plantas de Arabidopsis. Al igual que en el caso de mitocondrias, se analizó la segregación de la resistencia a kanamicina y presencia de fluorescencia amarilla en tres generaciones, obteniéndose plantas con una sola inserción de T-DNA, homocigotas (Anexo 1- Tabla 4, plantas DU3A6C, Du3M50 y Du3M5T7), y con plastidios que acumulan YFP (Figura 26). Los plastidios marcados con YFP pueden observarse en células de la epidermis, en el mesófilo marcando cloroplastos, los cuales también presentan fluorescencia de clorofila (Figura 26I y M), y en varias células del hipocotilo y de cotiledones de plantas de 4 días, como epidermis, mesófilo y abundantemente en tejido vascular (no mostrado).



**Figura 26. Los plastidios y las mitocondrias marcados con YFP pueden observarse en distintas células de plantas de Arabidopsis. A a H:** Plantas transformadas establemente con un constructo que destina YFP a mitocondrias. **I. a P.** Plantas transformadas establemente con un constructo que destina YFP a plastidios.

**A. a D.** Hoja, mostrando un tricoma (tri) y las células del mesófilo o corteza (mes). Las mitocondrias se observan en ambos tipos celulares. **E. a H.** Células epidermales del hipocotilo. Estas células contienen mitocondrias, pero no cloroplastos, por lo que no se observó fluorescencia de clorofila en G.

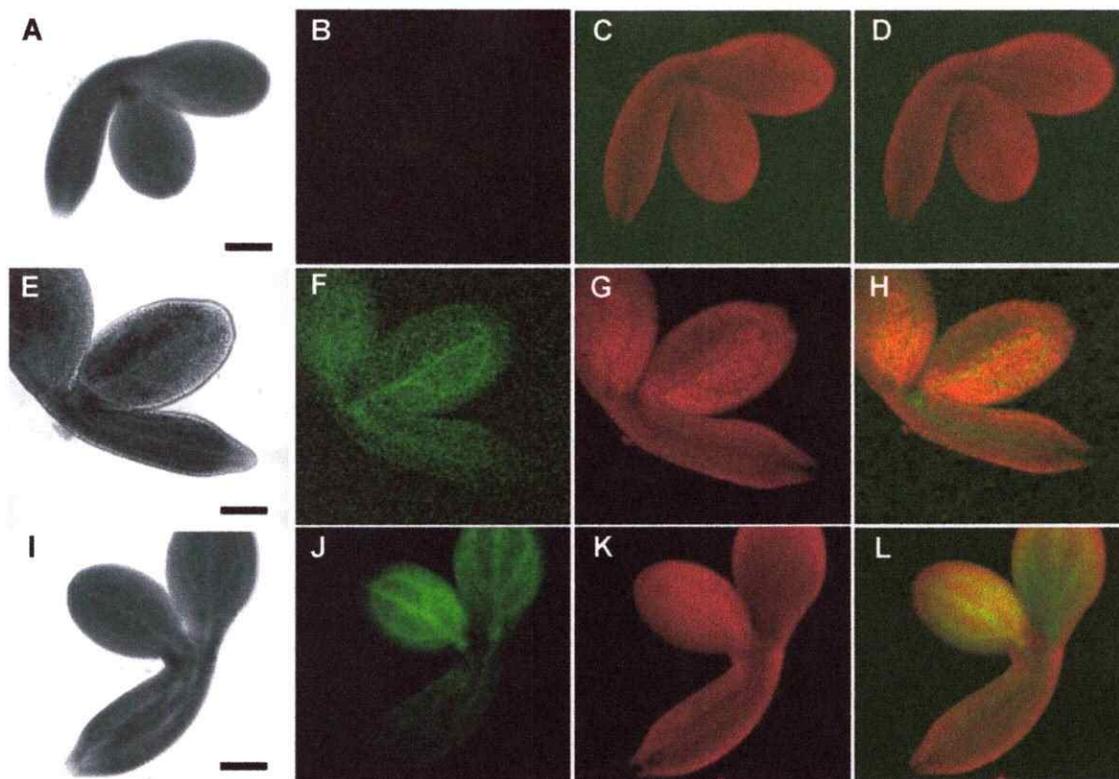
**I. a L.** Hoja, mostrando un tricoma (tri) y las células del mesófilo (mes). La fluorescencia de YFP, correspondiente a plastidios, se observa en células del mesófilo marcando cloroplastos, pero no en tricomas. **M. a P.** Células epidermales (ep) y del mesófilo (mes) de un cotiledón. En P se ha amplificado una región de M que muestra cloroplastos marcados con YFP, otros sin marcar y plastidios que sólo presentan fluorescencia de clorofila. Además se observan células con YFP marcando el citoplasma. Todas las imágenes son confocales, obtenidas de distintas plantas transgénicas. **Verde:** Fluorescencia de YFP. **Rojo:** Fluorescencia de clorofila. En **blanco y negro** se muestran las imágenes en campo claro. Barra en D y L: 100  $\mu$ m; en H: 50  $\mu$ m; M: 20  $\mu$ m; P: 10  $\mu$ m.



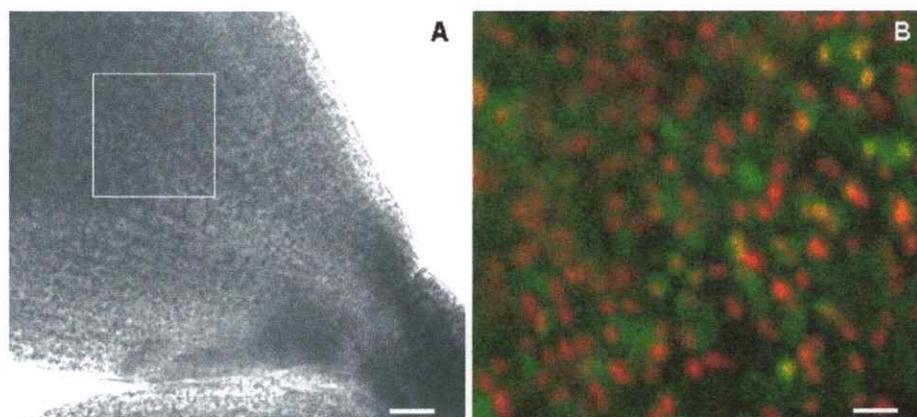
**Figura 27. Movimiento de mitocondrias en células epidermales de cotiledones de plántulas de *Arabidopsis* establemente transformadas con una construcción para la destinación de YFP a mitocondrias.** Se puede ver la fluorescencia de mitocondrias como círculos u óvalos, más la fluorescencia de la pared celular de células guardianas. Se enfocó una región, tomando fotografía en el tiempo indicado en la esquina superior izquierda (en seg). Con una flecha se muestra el movimiento de una mitocondria.

Aunque se observó fluorescencia del YFP en plantas adultas, la visualización de esta proteína en embriones fue difícil, observándose sólo en el embrión en estado de cotiledones doblados y no en estados más tempranos del desarrollo. Para obtener embriones con las mitocondrias o plastidios marcados con YFP, las plantas homocigotas para cada inserción se dejaron crecer en tierra y de ellas se obtuvieron embriones, que fueron observados mediante microscopía confocal (Figura 28). Tanto los embriones que acumulan YFP en mitocondrias, como los que acumulan esta proteína en plastidios, presentan fluorescencia de YFP mayoritariamente en las zonas cercanas al tejido provascular. Sin embargo, el patrón de fluorescencia de los embriones que acumulan YFP en mitocondrias es distinto a los que acumulan YFP en plastidios, lo que se ve claramente en la región del meristema apical del brote. La fluorescencia de YFP sólo se observó en embriones de 9 DPA que se encontraban en estado de cotiledones doblados y no en estados previos del desarrollo.

Al observar la fluorescencia de clorofila más la fluorescencia de YFP, se visualizaron 3 tipos de marcación; primero, plastidios marcados sólo con YFP; segundo, plastidios marcados sólo con clorofila; y tercero, plastidios marcados con YFP y clorofila (Figura 29). Esto demuestra que existe heterogeneidad en la población de plastidios presentes en el embrión.



**Figura 28. Fluorescencia de YFP en embriones obtenidos desde plantas con mitocondrias y plastidios que acumulan YFP. A hasta D: Embriones silvestres. E hasta H: Embriones extraídos de plantas AM3B4M (mitocondrias marcadas con YFP). I hasta L: Embriones extraídos de plantas Du3M50 (plastidios marcados con YFP). A, E e I: Campo claro. B, F y J: Fluorescencia de YFP (verde). C, G y K: fluorescencia de clorofila (rojo). D, H y L: Sobreposición de la fluorescencia de clorofila con la de YFP. Barra en A, E e I: 100  $\mu$ m.**



**Figura 29. Embriones de plantas transgénicas que acumulan YFP en plastidios. A: Fotografía de un cotiledón de un embrión maduro que muestra la zona cuadrada ampliada en B. B: Plastidios marcados con YFP (en verde) y cloroplastos (en rojo, fluorescencia de la clorofila). Barra en A: 20  $\mu$ m; en B: 5  $\mu$ m.**

Por lo tanto, las construcciones que destinan YFP a plastidios o a mitocondrias sirvieron para la observación de estos organelos en tejidos vegetales y plantas de Arabidopsis. En estos sistemas se vio que las mitocondrias se mueven. En epidermis de cebolla este movimiento depende del citoesqueleto de actina.

Como se mostró anteriormente, sólo algunas células específicas del embrión tienen cloroplastos diferenciados. Mediante el uso de YFP para marcar organelos en embriones, se observó que existen poblaciones heterogéneas de cloroplastos (según su capacidad para acumular YFP y su contenido de clorofila). Las diferencias en la capacidad de acumular YFP pueden resultar de la presencia o ausencia del translocón para la importación de proteínas al organelo, lo que abre nuevas interrogantes sobre la funcionalidad de este complejo proteico en distintos plastidios. Aunque también esta capacidad puede ser afectada por la cantidad de proteína presente en la célula, es decir con la regulación de la expresión génica o de la degradación de proteínas.

El hecho de que sólo se observó presencia de YFP en ciertas células sugiere que el promotor que conducía la expresión de las proteínas fluorescentes (35S) no se expresaba de manera constitutiva en el embrión. Por lo tanto, es necesario utilizar otros promotores para determinar si la cantidad de proteína presente en una célula influye en su destinación a los diferentes plastidios.

#### 4. DISCUSION

Este trabajo de tesis se ha realizado con el fin de estudiar plastidios y mitocondrias durante el desarrollo en *Arabidopsis*. Se analizó la diferenciación de cloroplastos en etapas y en células específicas durante la embriogénesis. Se observó que en embriones en estado de cotiledones doblados, los cloroplastos están presentes en corteza y epidermis, pero no en tejido provascular ni en el ápice de la raíz, donde se encuentran las células de la columella. En estas células se diferencian los amiloplastos después de la germinación. En células de la columella también se observaron cambios en la morfología de mitocondrias a medida que éstas se diferencian a partir de células meristemáticas. La morfología de mitocondrias cambia de un organelo sin crestas mitocondriales a uno que ha desarrollado crestas. Por lo tanto, este trabajo es un aporte al análisis de los cambios que suceden en plastidios y mitocondrias, como primer paso para establecer correlaciones entre la diferenciación de organelos y su función durante la diferenciación celular a través del desarrollo.

Se sabe que los cambios morfológicos en plastidios y mitocondrias van a la par con cambios en su función, por lo que la descripción de la presencia de ciertos organelos en distintos tipos celulares ayuda a la comprensión de la función biológica de las células dentro de un organismo, y hace que aparezcan nuevas interrogantes acerca de cómo se coordina la diferenciación de los organelos y cuáles son las señales que provocan su diferenciación espacial y temporal en algunas células y no en otras. Por ejemplo, el desarrollo de crestas mitocondriales se ha correlacionado con un aumento en la capacidad respiratoria de mitocondrias (Logan y cols, 2001). En esta tesis, se observó que las mitocondrias desarrollan crestas a la par de la diferenciación de células de la columella. Queda por responder cuáles son los cambios metabólicos que suceden en células de la columella y cómo éstos se correlacionan con la síntesis de almidón que sustenta la diferenciación de amiloplastos.

Para estudiar los organelos se utilizó como modelo *Arabidopsis thaliana*, cuyas raíces se obtuvieron fácilmente al crecer estas plantas en medio MS. La obtención de embriones fue más difícil, ya que, se desarrollan en el interior de semillas que miden unos 600  $\mu\text{m}$  de diámetro. La cubierta de la semilla dificultó la observación microscópica del embrión. Por ello, los embriones fueron disectados desde las semillas utilizando material quirúrgico. Se logró extraer embriones en los cuatro estados principales del desarrollo según la temporalidad reportada en la literatura (Western y cols, 2000; Rossak y cols, 2001; Ruuska y cols, 2002; Raz y cols, 2001). En estos embriones se observó la diferenciación de cloroplastos en distintas etapas del desarrollo y en células específicas del embrión.

#### **4.1. Los cloroplastos están presentes en el embrión en células específicas.**

Se sabía que los embriones en estado de cotiledones doblados de *Arabidopsis* son verdes, y se ha demostrado por microscopía electrónica que tienen cloroplastos (Apuya y cols, 2001 y 2002; Gutierrez y cols 2004). En estos trabajos sólo se observó el embrión en estado de cotiledones doblados, comparando cloroplastos normales de embriones silvestres con cloroplastos anormales de mutantes en biogénesis de estos organelos. Pero no se estudió cuáles son las células embrionarias que tienen cloroplastos y en qué estado del desarrollo se diferencian.

En esta tesis se demostró que los embriones tienen clorofila, un marcador de la presencia de cloroplastos. Esto se sustenta en dos resultados: primero, el espectro de absorbancia obtenido de una fracción de homogenizado de embriones presentó *peaks* de absorbancia en longitudes de honda características de clorofila (Figura 5). Segundo, el espectro de emisión de clorofila en embriones coincide con el de cloroplastos de plantas de *Arabidopsis* al excitar la clorofila con el láser de 488 nm del microscopio confocal (Figura 6), por lo que se trata de clorofila y no de otro pigmento.

Adicionalmente, en otros trabajos, la fluorescencia de clorofila se había utilizado para la observación de este pigmento como un marcador de la presencia de cloroplastos en plantas adultas de *Arabidopsis* (Pyke K. y Page A, 1998) y en otras especies vegetales (Kohler y

Hanson, 2000; Singh y cols, 2004) y este mismo método fue el que se utilizó en esta tesis para observar cloroplastos mediante microscopía de fluorescencia y confocal.

En este trabajo, se observó que los cloroplastos se diferencian en el tejido protodermal en embriones en estado globular y que permanecen diferenciados en células de la epidermis hasta el estado de cotiledones doblados. En este estado la presencia de cloroplastos se extiende a otros tejidos más internos, pudiendo ser observados en corteza, que tiene un origen clonal diferente. Estos cloroplastos desaparecen en plántulas de 1 DPS, recién germinadas (Figura 3) y vuelven a diferenciarse en plántulas de 3 DPS, en células de la corteza del cotiledón (mesófilo) y en células guardianas de la epidermis (Figura 4). Por lo tanto, la diferenciación de cloroplastos es un proceso dinámico que sucede tanto en la embriogénesis como durante el desarrollo post-embriogénico. Es decir, la diferenciación de cloroplastos no sólo depende de la posición de la célula dentro del individuo, sino también del estado del desarrollo en el que se encuentra.

Se sabe que embriones de otras angiospermas, como *Brassica napus*, *Pisum sativum* y *Vicia faba* también contienen clorofila que acumulan de manera transiente durante el desarrollo (Eastmond y cols, 1996; Eastmond y Rawsthorne, 1998; Rolletschek y cols, 2003, Borisjuk y cols, 2003). Los embriones de *B. napus* muestran evolución de oxígeno dependiente de CO<sub>2</sub> que se correlaciona con el contenido de clorofila, es decir, los cloroplastos realizan fotosíntesis (Eastmond y cols, 1996). Estos organelos son capaces de incorporar carbono en aceites y almidón. Esta incorporación es mayor en luz que en oscuridad y aumenta mucho más al agregar ATP (Eastmond y Rawsthorne, 1998).

En *V. faba* se ha estudiado el metabolismo durante el desarrollo de la semilla y se ha visto que la distribución de ATP se correlaciona con la distribución de clorofila y la capacidad fotosintética en embriones en estado de cotiledones doblados (Rolletschek et al, 2003). Estos autores han establecido como hipótesis que los cloroplastos de embriones producen O<sub>2</sub> mediante la fotosíntesis, que sirve a la respiración mitocondrial aeróbica, para la generación local de ATP, y que este ATP es utilizado en los procesos de síntesis de sustancias de reserva.

Para determinar si los cloroplastos del embrión en estado de cotiledones doblados de *Arabidopsis* son funcionales, en esta tesis se analizó su capacidad fotosintética.

#### **4.2. Importancia de los cloroplastos durante la embriogénesis**

Aunque se sabe la importancia funcional de los cloroplastos en el metabolismo de plantas adultas, sobretodo por su función fotosintética en la hoja, se desconoce la función de estos organelos en embriones.

Los embriones de *Arabidopsis* que han completado la organogénesis, aumentan su volumen y su masa, debido a la expansión celular y la acumulación y almacenamiento de proteínas y lípidos, que luego, son usados como fuente de nitrógeno y carbono durante la germinación. Las semillas en crecimiento requieren nutrientes, los cuales importan desde el floema, principalmente como sacarosa y aminoácidos, por lo que se acepta que ellos son órganos receptores de nutrientes (*sink*) y que tendrían un metabolismo heterótrofo (Patrick y Offler, 2001). Sin embargo, como se ha demostrado en este y otros trabajos, los embriones de *Arabidopsis* tienen cloroplastos.

En esta tesis se pudo demostrar que los cloroplastos poseen un fotosistema II acoplado a un sistema de transporte de electrones activo. Por lo tanto, se puede proponer que en embriones en estado de cotiledones doblados, los cloroplastos realizan fotosíntesis para sustentar la síntesis de reservas en conjunto con el aporte de metabolitos desde la madre.

La síntesis de reservas comienza en el estado torpedo tardío de la embriogénesis y los cloroplastos se diferencian en globular, previo al inicio de la acumulación de reservas (Ruuska y cols, 2002): Queda por responder porqué estos organelos se diferencian tan tempranamente. Es posible que los cloroplastos cumplan alguna función durante la adquisición de patrones en la embriogénesis. Para responder esta interrogante, en esta tesis se analizaron embriones obtenidos de plantas con alteraciones en la biogénesis de cloroplastos.

Para la biogénesis de cloroplastos se requieren genes codificados en el núcleo y en el organelo (Sato y cols, 1999; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Se han obtenido cientos de mutantes en genes nucleares con alteraciones en la pigmentación verde, debida a falla en la

biogénesis de cloroplastos (Leister D, 2003). Dentro de los mutantes en biogénesis de cloroplastos, algunos muestran letalidad durante la embriogénesis y detienen su desarrollo en la transición de globular a corazón, que es cuando aparecen los cloroplastos (Tabla 4). Para otros mutantes, no se han reportado alteraciones de la embriogénesis (Yamamoto y cols, 2000; Vothknecht y Westhoff, 2001; Bisanz y cols, 2003; Gutierrez y cols, 2004). El hecho de que no exista efecto en la embriogénesis puede ser el resultado de redundancia génica, como ha reportado Kubis y cols, 2004 para la familia génica formada por *toc159*, *toc132* y *toc120*. Los mutantes en uno de estos genes presentan alteraciones en el desarrollo de cloroplastos en plantas adultas, pero no presentan problemas en embriogénesis. Los dobles mutantes *toc159*, *toc132*, detienen su desarrollo en globular. En el trabajo de Kubis y cols, 2004 no se observó si el embrión presentaba cloroplastos anormales en los mutantes en un gen ni en los dobles mutantes. Como existe un flujo de sustancias de la madre al embrión, es posible que las mutaciones en un sólo gen permitan que la madre aporte las señales y nutrientes para la diferenciación de cloroplastos en embriones y su desarrollo se complete. El aporte materno puede provocar que no se haya detectado o no exista un desarrollo anormal de cloroplastos durante la embriogénesis. Para demostrar esto, falta el desarrollo de metodologías que permitan cultivar el embrión *in vitro*.

En esta tesis, hemos detectado embriones que detienen su desarrollo en globular en mutantes en biogénesis de cloroplastos, para los cuales no se había reportado esta falla (Figura 12). Estos mutantes habían sido caracterizados sólo en plantas adultas y no se habían observado sus embriones. Dentro de la silicua sólo algunos embriones son anormales, lo que puede haber detectado la presencia de estas fallas. Aún queda por demostrar que la mutación en los genes nucleares que participan en la biogénesis cosegrega con el fenotipo de detención de la embriogénesis en globular. Sin embargo, es posible que la correlación entre la mutación y este fenotipo no tenga carácter mendeliano por el aporte de sustancias desde la madre. Sería destacable correlacionar el hecho de que una falla en diferenciación de cloroplastos causa la detención de la embriogénesis durante la transición de globular a corazón, que es justo el

periodo en que ellos comienzan a diferenciarse en el embrión.

Otro punto importante es que muchos de los genes, que se han involucrado en desarrollo de cloroplastos se han estudiado sólo en este organelo, sin embargo ellos también pueden participar en funciones plastidiales, las que no tienen que ver con la diferenciación de plastidios a cloroplastos. Por lo que hay que descartar que los cloroplastos y no otro tipo de plastidio es el que estaría involucrado en la embriogénesis.

Por lo tanto, los cloroplastos cumplen funciones importantes durante la embriogénesis y se diferencian en etapas específicas y en células específicas del embrión. Por lo que el desarrollo de cloroplastos y la diferenciación de organelos son dos procesos interdependientes. Para saber si las señales del desarrollo afectan la diferenciación de cloroplastos, se estudió el efecto de mutaciones en genes que participan en la adquisición de patrones sobre la diferenciación de cloroplastos. Todos estos mutantes presentaron cloroplastos, por lo que las señales de diferenciación de este organelo no se vieron afectadas, sin embargo, se observó que el ordenamiento espacial de células que contienen clorofila estaba alterado.

Los mutantes *gk* han sido descritos como embriones que detienen su desarrollo en el estado globular tardío, siendo incapaces de adquirir simetría bilateral para el desarrollo de los cotiledones (Torres-Ruiz y cols, 1996). En esta tesis se observó el mismo fenotipo morfológico descrito, pero además, se vio que presentaba alteraciones en el patrón de fluorescencia de clorofila en la región apical respecto al silvestre. *Gk* codifica para una acetyl-CoA carboxilasa citoplasmática, cuyo sustrato es malonyl-CoA, un precursor de ácidos grasos (Baud y cols 2003). Los ácidos grasos se requieren para la fabricación de membranas en todas las células del embrión. Sin embargo, los embriones *gk* presentan alteraciones específicamente en la región apical y no en todo el embrión. Esto sugiere que *GK* afecta el desarrollo de la región apical y no el metabolismo general del embrión. Uno de los modos en que *gk* podría afectar sólo el desarrollo sería a través de la síntesis de esfingolípidos. Estas sustancias son necesarias para la síntesis del tallo GPI, que ancla a ciertas proteínas a regiones específicas de la membrana, lo cual podría afectar señales del desarrollo (Schultz y cols, 1998; Borner y cols,

2003; Lalanne y cols, 2004).

Los mutantes *fk* han sido descritos originalmente como mutantes con una delección de la región central del embrión (Mayer y cols, 1991). Sin embargo, en trabajos más recientes se ve que esta mutación provoca la germinación de plántulas con morfologías variables (Schrick y cols, 2000; Jang y cols, 2000). En esta tesis se observaron patrones morfológicos que variaban dentro de la misma silicua, y que afectaban al embrión completo, por lo que la mutación en *fk* no es específica para una región del embrión. Se observaron alteraciones en el patrón de clorofila correspondiente a las regiones que presentaban fallas morfológicas. *Fk* codifica para una esteroil C-14 reductasa (Schrick y cols, 2000), implicada en la síntesis de esteroides, entre ellos, metabolitos como sitosterol y las hormonas vegetales brasinoesteroides, por lo que puede estar participando en múltiples procesos, desde las señales que gobiernan el desarrollo hasta las moléculas que constituyen la estructura o que participan en el metabolismo.

El gen *Mp*, que codifica para un factor de transcripción de respuesta a auxina, media la adquisición de patrones en la zona central y basal del embrión (Hardtke y Berleth, 1998). En estas zonas se observó un apéndice que correspondería al hipocotilo y la raíz, y se apreció fluorescencia de clorofila en todos los cortes ópticos hechos con el microscopio confocal, por lo que la distribución de células que contienen cloroplasto respecto de las que no han diferenciado estos organelos difiere del silvestre, ya que, en el silvestre se observa claramente que las células del centro, correspondientes al tejido provascular, no tienen clorofila. En la zona apical del embrión también existen diferencias morfológicas de los mutantes respecto al silvestre. Los mutantes *mp* presentan cotiledones desarrollados, pero estos se encuentran fusionados. En este trabajo, se logró apreciar fluorescencia de clorofila en la zona apical, cuyo patrón también es diferente del silvestre, ya que las células que no presentan cloroplastos forman una zona cercana al meristema apical, con pequeñas ramificaciones que se extienden hacia el cotiledón, como reminiscentes de tejido provascular, sin embargo, esta región es menos extensa que en el silvestre.

El gen *Mp* ha sido involucrado en el desarrollo del sistema vascular (Hardtke y Berleth,

1998 Mattsson y cols, 2003). Como hemos visto en esta tesis, una de las características del sistema provascular es la falta de desarrollo de cloroplastos en el embrión. Por lo que la ausencia del gen *Mp* causa la pérdida de esta características en este tejido, o su ausencia y reemplazo por células que son capaces de diferenciar cloroplastos.

En resumen, las mutaciones en *Gk* y *Mp* causan alteraciones locales y no generalizadas, en algunas regiones del embrión. En esas regiones se altera la distribución de células que desarrollan cloroplastos, al fallar la adquisición de patrones morfológicos durante la embriogénesis. En el mutante *fk* se observó alteraciones morfológicas generalizadas en el embrión que alteraban la distribución de células con cloroplastos respecto a las sin cloroplastos. Por lo tanto, las alteraciones en la adquisición de patrones en el embrión cambian la distribución de células con cloroplastos, pero no detienen la diferenciación de estos organelos. Queda por responder cuáles son las señales del desarrollo que están directamente implicadas en la diferenciación de cloroplastos durante el desarrollo.

En plantas adultas, el desarrollo de cloroplastos depende al menos de una señal ambiental: la presencia de luz (Barkan A y Goldschmidt M, 2000; Vothknecht y Westhoff, 2001; McCormac A y Terry M., 2002). Este factor también puede ser importante en la diferenciación de cloroplastos en el embrión. Se puede especular que el embrión puede recibir luz a través de la silicua y de la cubierta de la semilla sólo en sus células periféricas, y que la luz puede ser un factor que determina el contenido de cloroplastos sólo en esas células. Sin embargo, se observó fluorescencia en el centro de embriones en estado corazón y torpedo, por lo que deben existir otras señales que coordinen este proceso.

#### **4.3. Los amiloplastos se diferencian a la par de las células de la columella de *Arabidopsis***

Los plastidios que acumulan almidón, denominados amiloplastos, han sido observados por numerosos autores mediante tinción con yodo en plántulas y en cultivos celulares de diferentes especies (Caspar y cols, 1985; Miyazawa y cols, 1999; Guisinger y Kiss, 1999; Frimi y cols 2002; Datta y cols, 2002). En este trabajo se utilizó esta misma técnica para observar amiloplastos en plantas enteras, pero se complementó con tinción de carbohidratos (PAS) en

cortes de tejido (Olsen y cols, 1984) y microscopía electrónica (Saether e Iversen, 1991).

Las plántulas de *Arabidopsis*, cuatro días después de la siembra, contienen amiloplastos en las células de la columella de la raíz, tal como han observado otros autores (Guisinger y Kiss, 1999; Sabatini y cols, 1999). Se ha postulado que estos organelos participan en la respuesta gravitrópica (Chen y cols, 1999), sin embargo, hasta el momento no se había descrito en qué etapa del desarrollo se diferencian.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los embriones de *Arabidopsis* en estado de cotiledones doblados, aunque presentan plastidios precursores de amiloplastos, no tienen amiloplastos maduros en las células de la columella. Por lo tanto, se estableció que los amiloplastos no están presentes en la raíz del embrión, sino que aparecen después de la germinación de la planta, es decir, los embriones no serían capaces de responder a la gravedad.

El estado de diferenciación de los amiloplastos tampoco había sido estudiados en plántulas antes de 4 días. En este trabajo se analizaron plántulas de 2 días post-siembra. Estas plántulas habían germinado, ya que su raíz había emergido de la semilla, pero se encontraban en un estado muy temprano post-germinación, ya que sus cotiledones aun estaban dentro de la cubierta de la semilla.

Se ha reportado que durante la germinación y poco después de esta etapa existe degradación de sustancias de reserva y movilización hacia los tejidos en crecimiento (Bove y cols, 2001). En *Arabidopsis* las principales reservas están en cotiledones y son lípidos y proteínas, las cuales deben transformarse en carbohidratos para su transporte a los tejidos en crecimiento (Footitt y cols, 2002; Lu y cols, 2003), y en este caso para la formación de almidón en los amiloplastos.

Cuando la planta ha degradado todas sus reservas, necesariamente debe comenzar a sintetizar sus propios metabolitos para su mantención y crecimiento. Por lo tanto, debe localizarse espacialmente antes de que sus reservas se terminen. Es decir, su raíz debe estar correctamente orientada hacia el suelo para comenzar el transporte de agua y sales minerales.

Hemos demostrado que los amiloplastos dentro de las células de la columella de plantas de 2 días son aun pequeños y no se distribuyen de manera polarizada en la célula, pero a los 4 días pasan a ser amiloplastos de mayor tamaño y con una distribución polarizada. Los estudios de gravitropismo se han hecho en plántulas de más de 4 días, por lo que queda por responder si las plantas de 2 días son capaces de responder a la gravedad.

#### **4.4. Señales que podrían participar en la diferenciación de amiloplastos en raíces de *Arabidopsis thaliana***

Para completar el desarrollo de la raíz, se requiere la división continua de células iniciales meristemáticas, que forman varios tejidos con un origen clonal común (Schieffelbein y cols, 1997, Nakajima y Benfey, 2002). El ápice de la raíz está constituido por las células de la columella y, como se mencionó antes, las células de la columella de la raíz son importantes en sensar la gravedad, aunque también, por su localización apical al meristema, constituyen una barrera protectora para las células meristemáticas, además secretan mucílago que facilita la penetración de la raíz en el suelo (Olsen y cols, 1984).

Durante la embriogénesis ellas se originan de la célula basal del cigoto, que primero da origen a la hipófisis y luego a las células iniciales de la columella, ubicadas en el ápice de la raíz (Dolan y cols, 1993, Scheres, 1994). Como se demostró en este trabajo, las células de la columella en el embrión no tienen amiloplastos, por lo que aun no están diferenciadas. Esta definición se basa en los trabajos que utilizan tinción con yodo como marcador de identidad de las células de la columella maduras (Sabatini y cols, 1999; Umeda y cols, 2000).

Utilizando la tinción con yodo como marcador de la diferenciación de las células de la columella y de los amiloplastos que ellas contienen, encontramos dos tipos de mutantes deficientes en acumulación de almidón: 1) En fitocromos, y 2) en respuesta a hormonas (auxina y etileno).

Se ha reportado que existe una interrelación entre las señales de fitocromos y auxina. Fitocromo A es capaz de fosforilar a factores de transcripción que regulan genes de respuesta a auxina (Colon carmona y cols, 2000). Por lo que estas vías podrían coordinarse para lograr la

diferenciación de células de la columella.

La relación existente entre fitocromos y la diferenciación de amiloplastos en células de la columella se desconoce, pero se sabe que los genes que codifican para fitocromos se expresan en la raíz (Somers y Quail, 1995).

Además, se sabe que existen señales que controlan directamente la síntesis de almidón, entre ellas las que regulan a la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), que utiliza glucosa-1-fosfato y ATP como sustratos y ha sido descrita como la etapa limitante en la vía de síntesis del almidón (Crevillen y cols, 2003). Esta enzima presenta una regulación redox post-traducciona, en la que se producen cambios en la actividad de la enzima por ruptura de puentes disulfuro entre dos subunidades catalíticas. Esta regulación es controlada por luz y sacarosa, siendo mayor la síntesis de almidón en presencia de luz y a altas concentraciones de sacarosa (Hendriks y cols, 2003). Aunque puede existir una relación de este tipo, es necesario descartar que un efecto global en la alteración del metabolismo en los mutantes en fitocromo cause la producción de menor cantidad de almidón.

La relación entre la acumulación de almidón y auxina ha sido más estudiada. En cultivos de células BY-2 de tabaco la expresión de las enzimas de la síntesis de almidón y la diferenciación a amiloplastos aumenta cuando dichas células se traspasan de un medio que contiene auxinas a uno sin esta hormona, y este proceso se acelera al agregar citocininas (Miyazawa y cols. 1999 y 2002).

Comparado con las células BY-2, las células de la columella son un modelo de diferenciación de amiloplastos más complejo, debido a que la diferenciación de los organelos ocurre de manera simultánea a la diferenciación celular durante el desarrollo de la raíz. En este sistema, se ha propuesto la existencia de una señal proveniente del centro quiescente que actuaría inhibiendo la diferenciación de las células iniciales de la columella, debido a que cuando se elimina una célula del centro quiescente, la división celular de la célula inicial de la columella adyacente se detiene y se aprecia acumulación de almidón (Van den Berg y cols,

1997). Sumado a esta señal inhibitoria, podrían existir otros reguladores estimulatorios que interactúen para regular la diferenciación.

La hormona auxina también participa en la diferenciación de las células de la columella en la raíz. Sabatini y cols (1999) localizaron un máximo en la concentración de auxina en las células iniciales de la columella. Ellos lograron ampliar este máximo a otras células de la raíz, utilizando inhibidores del transporte de esta hormona, lo que causó una reespecificación de las células de la endodermis a células iniciales de la columella, las cuales se dividían y originaban amiloplastos. Estos mismos autores analizaron *Axr3-1* que codifica un producto que interactúa con *Auxin Response Factors* (ARFs), observando que el mutante en este gen no contiene almidón, mediante tinción con yodo (Sabatini y cols, 1999). A diferencia de este mutante, en esta tesis se encontró que el mutante *aux1-7* presenta almidón en las células de la columella de la raíz, lo que es similar al silvestre. Se ha reportado que el gen *Aux-1* codifica para una proteína integral de membrana que transporta auxina desde el exterior al interior de la célula y cuya ubicación en la membrana plasmática es polarizada, lo que ayuda a la mantención del gradiente en concentraciones de auxina observado en la raíz. Pero tal vez no es el único mecanismo para transportar auxina, o en el mutante *aux1-7* el transporte hacia el interior celular no está completamente inhibido, por lo que no se observan efectos en la tinción con yodo.

Se ha observado que existen otros procesos en los que auxina y etileno interactúan para coordinar una respuesta, por ejemplo, en el desarrollo y crecimiento de pelos radiculares. Los pelos radiculares en mutantes *aux1-7* presentan menor número de pelos y más cortos que el silvestre, pero en un doble mutante en respuesta a auxina y a etileno (*aux1-7 ein2-1*), este fenotipo es exacerbado (Rahman y cols, 2002). En este trabajo se observó un fenómeno similar cuando se analizó la tinción con yodo de mutantes en un sólo gen *Aux1* o *Ein2*, en los cuales la tinción con yodo fue idéntica al silvestre; y en mutantes dobles *aux1-7 ein2-1*, en los cuales hubo menor tinción con yodo que en el silvestre, lo que indica que habría interacción entre las vías de auxina y etileno.

El gen *Ein-2* codifica para un transportador de membrana que no tiene homología con

otras proteínas de *Arabidopsis*. *Ein2* sólo presenta un 21% de identidad con un transportador Nramp de *Arabidopsis*, que también se encuentra en mamíferos, levaduras y bacterias, y que transporta metales o cationes divalentes estas especies (Alonso y cols, 1999). Sin embargo, en ensayos de transporte realizados en sistemas heterólogos no se ha detectado que *Ein2* transporte metales, por lo que su función es desconocida, más aún, si se muta su homólogo Nramp, no se observa el fenotipo de resistencia a etileno característico de los mutantes *ein2-1* (Alonso y cols, 1999).

La teoría quimiosmótica ha planteado que el transporte de auxina depende del grado de protonación de esta hormona (Fujita H, Syono K, 1996). Es posible que la mutación en *Ein2* altere el transporte de auxina a este nivel, efecto que es aumentado al mutar la otra forma de transportar auxina, a través de *Aux1*. Esta hipótesis se sustenta en los datos obtenidos en esta tesis, en la que se logró rescatar las dobles mutantes *aux-1 ein2-1* por el tratamiento con la auxina lipofílica NAA. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que estos genes estén interactuando a otros niveles en la vía de transducción de señales de auxina y etileno.

Hasta el momento no se han encontrado mutantes que pierdan completamente los amiloplastos de las células de la columella, pero sí aquellos que tienen menos almidón, y que por ende, tienen una menor respuesta gravitrópica (Sun y cols, 1999). Al hacer TEM de los dobles mutantes *phyA-201 phyB-5* y *aux1-7 ein2-1*, se observó presencia de amiloplastos, aunque con menos almidón en *phyA-201 phyB-5*. En *aux1-7 ein2-1* las células eran de menor tamaño que en la planta silvestre, pero no se observó diferencias en la morfología o tamaño de los amiloplastos, pero sí en su abundancia. Por lo tanto, los mutantes deficientes en tinción con yodo estudiados en este trabajo tienen menos almidón que las raíces de plantas silvestres. Es decir, estas mutaciones no alteran la diferenciación de plastidios a amiloplastos, sino que causan fallas que pueden explicarse por un desorden metabólico en la síntesis de almidón, en el caso de *phyA-201 phyB-5*, o por una diferenciación alterada de las células de la columella en el caso de *aux1-7 ein2-1*. Este resultado nos indica que hay que revisar el trabajo de Sabatini y cols (1999), que utiliza la tinción con yodo como marcador de la diferenciación de las células de

la columella de Arabidopsis, lo cual no necesariamente se correlaciona con la diferenciación de amiloplastos.

#### **4.5. YFP como herramienta para visualizar otros plastidios y mitocondrias.**

En este trabajo de tesis se obtuvieron líneas transgénicas de Arabidopsis que destinan YFP tanto a plastidios como a mitocondrias. Se utilizó el péptido señal de la proteína RecA para destinar YFP a plastidios y el péptido señal de CoxIV para destinar YFP a mitocondrias. Estas construcciones estaban bajo la regulación del promotor 35S, el cual funciona de manera constitutiva en plantas adultas y deben ser importadas al organelo a través del translocón (Soll J y Schleiff, 2004). Fusiones similares que utilizaba GFP en vez de YFP se habían utilizado en otros trabajos para marcar estos organelos en plantas (Köhler y cols, 1997a).

Al observar la marcación de plastidios en los distintos tejidos de plantas adultas, se vio que en las células del mesófilo de hojas y cotiledones la fluorescencia de YFP coincidió con la fluorescencia de clorofila, aunque se observó acumulación de YFP en algunos plastidios más que en otros. En otras células, como las epidermales, existen plastidios de menor tamaño que no acumulan clorofila. Es decir, en distintos tipos celulares existen distintos tipos de plastidios. Queda por responder cuál es la función específica de estos organelos que hacen que adopten distintas morfologías célula-específicas.

La marcación de mitocondrias con YFP permitió observar la dinámica de estos organelos en células epidermales de Arabidopsis y de cebolla. En plantas de Arabidopsis transgénicas adultas se observó marcación de mitocondrias en diferentes tejidos, como hojas, raíces y cotiledones. Las mitocondrias marcadas son capaces de moverse dentro de la célula, y cambiar su morfología en el tiempo, como se ha reportado durante el desarrollo de esta tesis en otras publicaciones (Logan y cols, 2003 y 2004). En cebollas este movimiento depende del citoesqueleto de actina y no del de tubulina, según se demostró a través de la tesis, tratando con drogas desestabilizadoras. Este mismo resultado ha sido obtenido por otros autores, en células en cultivo de tabaco, en las cuales el movimiento de mitocondrias también depende del citoesqueleto de actina (Van Gestel y cols, 2002). En otros organelos como peroxisomas, Golgi

y núcleo también se ha observado una dependencia de actina para el movimiento (Jedd y Chua, 2002; Nebenfuhr y cols, 1999; Ketelaar, 2002). Sin embargo, se ha reportado que existe una relación compleja entre los dos elementos del citoesqueleto, que pueden regular la localización intracelular de organelos (Kwok y Hanson, 2003; Romagnoli y cols, 2003).

Los embriones de plantas con plastidios y mitocondrias marcados, presentaron acumulación de YFP en células cercanas al tejido provascular de cotiledones y en el hipocotilo, pero no en raíz. Este patrón de acumulación puede indicar que el promotor 35S no se está expresando de manera constitutiva en embriones. La expresión no constitutiva de 35S se ha detectado en embriones de algodón obtenidos de plantas que acumulan GFP en retículo endoplásmico. Los embriones de algodón presentaron acumulación de GFP en las etapas tardías de la embriogénesis y en las zonas apicales cercanas al tejido provascular, en un patrón muy parecido a lo observado en este trabajo en embriones de *Arabidopsis* (Sunilkumar y cols, 2002).

En *Arabidopsis*, el promotor 35S ha sido utilizado para tratar de rescatar embriones de una mutación en desarrollo (Volker y cols, 2001). Los mutantes *knolle* de *Arabidopsis* tienen una embriogénesis anormal, causada por fallas en las divisiones celulares. Estos mutantes no pudieron ser rescatados por el gen *knolle* bajo el control del promotor 35S. Este constructo tampoco causó alteraciones en la embriogénesis de embriones silvestres. Volker y cols, (2001) demostraron que *Knolle* bajo la regulación de 35S se expresaba predominantemente en la parte apical del embrión en estado de cotiledones doblados, según observaron por análisis *in situ* de RNA. Esto apoya la idea de que 35S no se expresa de manera constitutiva en el embrión.

En embriones que presentaban destinación de YFP a plastidios, se observó que la fluorescencia de clorofila presente en cloroplastos no siempre coincidía con la fluorescencia del YFP, existiendo plastidios que sólo presentaban fluorescencia de YFP o de clorofila, o ambas marcas. Este resultado es interesante, ya que, estamos en presencia de una población de plastidios heterogénea en el embrión. Los organelos que sólo se marcan con YFP son plastidios distintos a cloroplastos. La presencia de ambos marcadores en un organelo se espera para

cloroplastos, sin embargo es extraño que en algunos organelos exista fluorescencia de clorofila y no de YFP. Esto podría deberse a un bajo nivel de expresión de la proteína fluorescente en el embrión, de tal manera que no todos los cloroplastos alcanzan a importarla. Pero también podría deberse a que habrían distintos tipos de plastidios que diferirían en la capacidad de importar proteínas, o de degradarlas en su interior. Aunque existen estudios de expresión de las proteínas que participan en la translocación de proteínas desde el citoplasma al cloroplasto en plantas adultas, se desconoce su expresión en embriones (Gutenshon y cols, 2000) y su actividad en distintos plastidios, ya que los estudios se han realizado principalmente en cloroplastos (Soll y Schleiff, 2004). Por lo que queda por definir si el translocón está activo en el embrión, si es capaz de transportar RecA::YFP y en qué células del embrión lo hace. Para dilucidar esta interrogante debería expresarse RecA::YFP bajo el control de un promotor que se exprese con fuerza en embriones.

Por lo tanto, en esta tesis se ha caracterizado la diferenciación de plastidios y mitocondrias. Esto ha abierto nuevas interrogantes sobre las señales que llevan a la diferenciación de estos organelos, las cuales deben coordinarse espacial y temporalmente durante el desarrollo. Otras preguntas que quedan planteadas tienen que ver con la funcionalidad de estos organelos y cómo estas funciones cambian durante la diferenciación celular. Estas preguntas están comenzando a ser respondidas a la luz de nuevas publicaciones que han emergido en los últimos años.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados generados por esta tesis permiten concluir que la hipótesis formulada es válida, ya que en *Arabidopsis thaliana* los plastidios y mitocondrias se diferencian a medida que progresa el desarrollo. Específicamente, se puede concluir que:

1. A medida que progresa la embriogénesis y prosigue la germinación de la semilla, se observó diferenciación de cloroplastos en distintos tipos celulares. Es decir, las células que contienen cloroplastos varían con el estado del desarrollo.
2. Las células que contienen cloroplastos durante la embriogénesis no son necesariamente las progenitoras de las células que contienen cloroplastos en plántulas germinadas.
3. En embriones en estado de cotiledones doblados, los cloroplastos poseen un fotosistema II acoplado a un sistema de transporte de electrones activo, lo que sugiere que una vez diferenciados adquieren la capacidad realizar fotosíntesis.
4. Los amiloplastos y las mitocondrias se diferencian a la par de la diferenciación de células de la columella de la raíz después de la germinación. La ausencia de amiloplastos en la raíz del embrión sugiere que éstos no serían capaces de censar ni responder a la gravedad utilizando la sedimentación de amiloplastos como un mecanismo central en este proceso.
5. Las mitocondrias se pueden observar en tejidos vegetales mediante destinción de YFP a este organelo. En epidermis de cebollas y de hojas de *Arabidopsis* las mitocondrias se mueven y adoptan distintas morfologías. El movimiento de estos organelos en cebollas depende del citoesqueleto de actina.

## 6. REFERENCIAS

- Aida M, Vernoux T, Furutani M, Traas J, Tasaka M. 2002. Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the Arabidopsis embryo. *Development*. 129: 3965-3974.
- Alonso J, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker J. 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science*. 284: 2148-2152.
- Apuya N, Yadegari R, Fischer R, Harada J, Zimmerman J, and Goldberg R. 2001. The Arabidopsis Embryo Mutant schlepperless Has a Defect in the Chaperonin-60 Gene. *Plant Physiol*. 126: 717-730.
- Apuya N, Yadegari R, Fischer R, Harada J, Goldberg R. 2002. RASPBERRY3 Gene Encodes a Novel Protein Important for Embryo Development. *Plant Physiology*. 129: 691-705.
- Barkan A y Goldschmidt M. 2000. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie*. 82: 559-572.
- Baud S, Guyon V, Kronenberg J, Wuilleme S, Miquel M, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C. 2003. Multifunctional Acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in Arabidopsis. *Plant J*. 33: 75-86.
- Bellaoui M, Pidkowich M, Samach A, Kushalappa K, Kohalmi S, Modrusan Z, Crosby W, Haughn G. 2001. The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *Plant Cell*. 13: 2455-2470.
- Benfey P, Linstead P, Roberts K, Schiefelbein J, Hauser M, Aeschbacher R. 1993. Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119: 57-70.
- Berger F. 2003. Endosperm: the crossroad of seed development. *Curr Opin Plant Biol*. 6: 42-50.
- Binder S y Brennicke A. 2003. Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 358: 181-189.
- Bisanz C, Begot, Carol P, Perez P, Bligny M, Pesey H, Gallois J, Lerbs-Mache S, Mache R. 2003. The Arabidopsis nuclear DAL gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation. *Plant Molecular Biology* 51: 651-663.
- Blancaflor E, Masson P. 2003. Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiol*. 133: 1677-1690.
- Borisjuk L, Rolletschek H, Walenta S, Panitz R, Wobus U, Weber H. 2003. Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. *Plant J*. 36: 318-329.

- Borner G, Lilley K, Stevens T, Dupree P. 2003. Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in Arabidopsis. A Proteomic and Genomic Analysis. *Plant Phys.* 132: 568-577.
- Bove J, Jullien M, Grappin P. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Gen. Biol.* 3: reviews 1002.1-1002.5.
- Bowman J, Eshed Y. 2000. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci.* 5: 110-115.
- Brand U, Fletcher J, Hobe M, Meyerowitz E, Simon R. 2000. Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science.* 289: 617-619.
- Buchanan B, Gruisem W, Jones R. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. The American society of plant physiologists. Rockville, USA.
- Buckhoutand T y Thimm O. 2003. Insights into metabolism obtained from microarray analysis. *Curr. Opin. Plant Biology.* 6: 288-296.
- Buckman J, Hernandez H, Kress G, Votyakova T, Pal S, Reynolds I. 2001. MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *J Neurosci Methods.* 104: 165-176.
- Busch M, Mayer U, Jurgens G. 1996. Molecular analysis of the Arabidopsis pattern formation of gene GNOM: gene structure and intragenic complementation. *Mol Gen Genet.* 250: 681-691.
- Butler J, Hu S, Brady S, Dixon M, Muday G. 1998. *In vitro* and *in vivo* evidence for actin association of the naphthylphthalamic acid binding protein from zucchini hypocotils. *Plant J.* 13: 291-301.
- Carles C, Fletcher J. 2003. Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci.* 8: 394-401
- Caspar, Huber S, Somerville, C. 1985. Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Phys.* 79: 11-17.
- Chaudhury A, Ming L, Miller C, Craig S, Dennis E, Peacock W. 1997. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS.* 94: 4223-4228.
- Chen R, Rosen E, Masson P. 1999. Gravitropism in Higher Plants. *Plant Phys.* 120: 343-350.
- Chun L, Kawakami A, Christopher D. 2001. A Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiol.* 125: 1957-1966.
- Clough S, Bent A. 1998. Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis. *Plant J.* 16: 735-743.
- Cluis C, Mouchel C, Hardtke C. 2004. The Arabidopsis transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant J.* 38: 332-347.
- Coen E, Meyerowitz E. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature.* 353: 31-37.

- Coleman A y Nerozzi A. 1999. Temporal and spatial coordination of cells with their plastid component. *Int. Rev. Cytol.* 193: 125-163.
- Colon-Carmona A, Chen D, Yeh K, Abel S. 2000. Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome *in vitro*. *Plant Phys.* 124: 1728-1738.
- Corriveau J, Coleman A. 1991. Monitoring by epifluorescence microscopy of organelle DNA fate during pollen development in five angiosperm species. *Dev. Biol.* 147: 271-280.
- Cummins J. 2001. Mitochondria: potential roles in embryogenesis an nucleocytoplasmic transfer. *Human reprod Update.* 7: 217-228.
- Crevillen P, Ballicora M, Merida A, Preiss J, Romero J. 2003. The Different Large Subunit Isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose Pyrophosphorylase Confer Distinct Kinetic and Regulatory Properties to the Heterotetrameric Enzyme. *J. Biol Chem.* 278: 28508-28515.
- Davis S y Vierstra R. 1998. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 36: 521-528.
- Datta R, Chamusco K, Chourey P. 2002. Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. *Plant. Physiol.* 130: 1645-1656.
- Deng X, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu A, Feldmann K, Quail P. 1992. COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell.* 71: 791-801.
- Desjardins P, Frost E, Morais R. 1985. Ethidium Bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblast. *Mol. Cell Biol.* 5: 1163-1169.
- Despres B, Delseny M, Devic M. 2001. Partial complementation of embryo defective mutations: a general strategy to elucidate gene function. *Plant J.* 27: 149-159.
- Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy J, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn M, Feldmann K, Benfey P. 1996. "The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root". *Cell.* 86: 423-433.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development.* 119: 71-84.
- Dyall S, Brown M and Johnson P. 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science.* 304: 253-257.
- Eastmond P, Kolacna L, Rawsthorne S. 1996. Photosynthetic characteristics of developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L). *J. Exp. Bot.* 47: 1763-1769.
- Eastmond P, Rawsthorne S. 1998. Comparison of the metabolic properties of plastids isolated from developing leaves or embryos of *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.* 49: 1105-1111.
- Footitt S, Slacombe S, Lerner V, Kurup S, Wu Y, Larson T, Graham I, Baker A, Holdsworth M. 2002. Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *EMBO J.* 21: 2912-2922.

- Fraser P, Truesdale M, Bird C, Schuch W, Bramley P. 1994). Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Phys.* 105: 405-413.
- Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jurgens G, Palme K. 2002. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell.* 108: 661-673.
- Fujita H, Syono K. 1996. Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 37: 1094-1101.
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jurgens G. 2003. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell.* 112: 219-30.
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche I, Hofte H. 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys.* 114: 295-305.
- Gerrits N, Turk S, van Dun K, Hulleman S, Visser R, Weisbeek P, Smeekens S. 2001. Sucrose metabolism in plastids. *Plant Physiol.* 125: 926-934.
- Gilbert S. 2000. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. 6<sup>th</sup> ed. Sunderland, USA.
- Giege P, Heazlewood J, Roessner-Tunali U, Millar A, Fernie A, Leaver C, Sweetlove L. 2003. Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell.* 15: 2140-2151.
- Girke T, Todd J, Ruuska S, White J, Benning C, Ohlrogge J. 2000. Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Phys.* 124: 1570-1581.
- Gray M. 1995. *Mitochondrial evolution: The molecular Biology of plant Mitochondria*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 635-659.
- Geigenberger P. 2003. Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *J. Exp. Botany.* 54: 457-465.
- Glick R y Sears B. 1994. Genetically Programmed Chloroplast Dedifferentiation as a Consequence of Plastome-Genome Incompatibility in *Oenothera*. *Plant Phys.* 106: 367-373.
- Rintoul G, Filiano A, Brocard J, Kress G, and Reynolds I. 2003. Glutamate Decreases Mitochondrial Size and Movement in Primary Forebrain Neurons. *J. Neuroscience.* 23: 7881-7888.
- Guisinger M, Kiss J. 1999. The influence of microgravity and spaceflight on columella cell ultrastructure in starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Am J Bot.* 86: 1357-1366.
- Gutenshon M, Schulz B, Nicolay P, Flügge U. 2000. Functional analysis of the two *Arabidopsis* homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import apparatus. *Plant J.* 23: 771-783.
- Gutierrez M, Gillmor S, Jimenez L, Guevara A, Leon P. 2004. "CHLOROPLAST BIOGENESIS Genes Act Cell and Noncell Autonomously in Early Chloroplast Development". *Plant Phys.* 135: 471-482.

- Guzman P, Ecker J. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*. 2: 513-523.
- Haffter P y Fox T. 1992. Nuclear mutations in petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* allow growth of cells lacking mitochondrial DNA. *Genetics*. 131: 255-260.
- Hall A, Bleecker A. 2003. Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the *Arabidopsis* ethylene receptors reveals that the *ers1 etr1* double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent. *Plant Cell*. 15: 2032-2041.
- Hardtke C, Berleth T. 1998. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J*. 17: 1405-1411.
- Haseloff J, Siemering K, Prasher D, Hodge S. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark *Arabidopsis* plants brightly. *PNAS*. 94: 2122-2127.
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser M, Benfey P. 2000. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101: 555-567.
- Hendriks J, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P. 2003. ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of *Arabidopsis* and Other Plant Species. *Plant Physiology*. 133: 838-849.
- Hernandez-Pinzon I, Ross J, Barnes K, Damant A, Murphy D. 1999. Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*. *Planta*. 208: 588-598.
- Hobbie L y Estelle M. 1995. The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J*. 7: 211-220.
- Hormann F, Kuchler M, Sveshnikov D, Oppermann U, Li Y, Soll J. 2004. Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J Biol Chem*. 279: 34756-34762.
- Hou G, Kramer V, Wang Y, Chen R, Perbal G, Gilroy S, Blancaflor E. 2004. The promotion of gravitropism in *Arabidopsis* roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalization of the columella cytoplasm and a persistent lateral auxin gradient. *Plant J*. 39: 113-125.
- Huang S, An Y, McDowell J, McKinney J, y Meagher R. 1996. *ACT4/ACT12* differential expression in *Arabidopsis*. *Plant J*. 10: 189-202.
- Hwang I, Sheen J. 2001. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*. 413: 383-389.
- Jang J, Fujioka S, Tasaka M, Seto H, Takatsuto S, Ishii A, Aida M, Yoshida S, Sheen J. 2000. A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the *fackel* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*. 14: 1485-1497.
- Jedd G, Chua N. 2002. Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals acto-myosin-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. *Plant Cell Physiol*. 43: 384-392.

- Jürgens G, Torres-Ruiz R, Berleth T, Miséra S. 1991. Genetic analysis of pattern formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev. Suppl.* 1: 27-38.
- Kagawa T, Wada M. 2000. Blue light-induced chloroplast relocation in *Arabidopsis thaliana* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Cell Physiol.* 41: 84-93.
- Kandasamy M y Meagher R. 1999. Actin-organelle interactions: Association with chloroplast in *Arabidopsis* leaf mesophyll cells. *Cell Motil Cytos.* 14: 251-262.
- Kasten B, Buck F, Nuske J, Reski R. 1997. Cytokinin affects nuclear- and plastome-encoded energy-converting plastid enzymes. *Planta.* 201: 261-272.
- Khazi F, Edmondson A, Nielsen B. 2003. An *Arabidopsis* homologue of bacterial RecA that complements an *E. coli* recA deletion is targeted to plant mitochondria. *Mol. Gen and Genomics.* 269: 454-463.
- Kim H, Wu S, Ratnayake C, Huang A. 2001. *Brassica rapa* has three genes that encode proteins associated with different neutral lipids in plastids of specific tissues. *Plant Physiol.* 126: 330-41.
- King M. y Attardi G. 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246: 500-503.
- Ketelaar T, Faivre-Moskalenko C, Esseling J, de Ruijter N, Grierson C, Dogterom M, Emons AM. 2002. Positioning of nuclei in *Arabidopsis* root hairs: an actin-regulated process of tip growth. *Plant Cell.* 14: 2941-55.
- Klahre U, Chua N. 1999. The *Arabidopsis* AtARP2 promoter directs expression in xylem precursor cells and pollen. *Plant Mol Biol* 41: 65-73.
- Kleffmann T, Russenberger D, Zychlinski A, Christopher W, Sjölander K, Gruijsem W, Baginsky S. 2004. The *Arabidopsis thaliana* Chloroplast Proteome Reveals Pathway Abundance and Novel Protein Functions. *Curr. Biol.* 14: 354-362.
- Köhler R, Zipfel W, Webb W, Hanson M. 1997a. The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo. *The Plant J.* 11: 613-621.
- Köhler R, Cao J, Warren R, Webb W, Hanson M. 1997b. Exchange of proteins molecules through connections between higher plant plastids. *Science.* 276: 2039-2042.
- Kohler R, Hanson M. 2000. Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *J. Cell Sci.* 113: 81-89.
- Kost B, Spielhofer P, Chua N. 1998. A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J.* 16: 393-401.
- Kubis S, Baldwin A, Patel R, Razzaq A, Dupree P, Lilley K, Kurth J, Leister D, Jarvis P. 2003. The *Arabidopsis ppi1* mutant is specifically defective in the expression, chloroplast import, and accumulation of photosynthetic proteins. *Plant Cell.* 15: 1859-1871.
- Kubis S, Patel R, Combe J, Bedard J, Kovacheva S, Lilley K, Biehl A, Leister D, Rios G, Koncz C, Jarvis P. 2004. Functional Specialization amongst the *Arabidopsis* Toc159 Family of Chloroplast Protein Import Receptors. *Plant Cell.* 16: 2059-2077.

- Kwok E, Hanson M. 2003. Microfilaments and microtubules control the morphology and movement of non-green plastids and stromules in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* 35: 16-26.
- Lalanne E, Honys D, Johnson A, Borner G, Lilley K, Dupree P, Grossniklaus U, Twell D. 2004. SETH1 and SETH2, Two Components of the Glycosylphosphatidylinositol Anchor Biosynthetic Pathway, Are Required for Pollen Germination and Tube Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16: 229-240.
- Laloi C, Apel K, Danon A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 323-328.
- Langdale J. 1998. Cellular differentiation in the leaf. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10: 734-738.
- Larkin J, Brown M, Schiefelbein J. 2003. How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in *Arabidopsis*. *Ann. Rev Plant Biol.* 54: 403-430.
- Laufs P, Grandjean O, Jonak C, Kieu K, Traas J. 1998. Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10: 1375-90.
- Leister D. 2003. Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet.* 19: 47-56.
- Ledbetter M y Porter K. 1970. Introduction to the fine structure of plant cells. Springer- Verlag (Eds). Berlin- Alemania.
- Lichtenthaler H y Wellburn A. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extract in different solvents. *Biochem Soc. Trans.* 603: 591-592.
- Logan D, Leaver C. 2000. Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J. Exp Bot.* 51: 865-871.
- Logan D, Millar A, Sweetlove L, Hill S, Leaver C. 2001. Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiol.* 125: 662-672.
- Logan D, Scott I, Tobin A. 2003. The genetic control of plant mitochondrial morphology and dynamics. *Plant J.* 36: 500-509.
- Logan D, Scott I, Tobin A. 2004. ADL2a, like ADL2b, is involved in the control of higher plant mitochondrial morphology. *J Exp Bot.* 55: 783-785.
- Long J y Barton M. 1998. The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* 125: 3027-3035.
- Lu C, DeNoyer S, Hobbs D, Kang J, Wen Y, Krachtus D, Hills M. 2003. Expression pattern of diacylglycerol acyltransferase-1, an enzyme involved in triacylglycerol biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 52: 31-41.
- Lubomir N. Sokolov S, Annabelle D. 1998. Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress) *Biochem. J.* 336: 681-687.
- Lukowitz W, Mayer U, Jurgens G. 1996. Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell* 84: 61-71.

- Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke R, Hacker B, Rao E, Karperien M, Wit J, Richter W, Tommasino M, Rappold G. 2004. The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem.* 279: 37103-37114.
- Mathur J, Spielhofer P, Kost B, Chua N. 1999. The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 126, 5559-5568.
- Mattsson J, Ckurshumova W, Berleth T. 2003. Auxin Signaling in Arabidopsis Leaf Vascular Development. *Plant Phys.* 131: 1327-1339.
- Mayer U, Ruiz R, Berleth T, Miséra S, Jürgens. 1991. Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embryo. *Nature* 353: 402-407.
- Mayer U, Büttner G y Jürgens G. 1993. Apical-basal pattern formation in the Arabidopsis embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 117: 149-162.
- Mayer K, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G, Laux T. 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell.* 95: 805-815.
- McCormac A y Terry M. 2002. Loss of Nuclear Gene Expression during the PhytochromeA-Mediated Far-Red Block of Greening Response. *Plant Phys.* 130: 402-414.
- McKinney E, Kandasamy M, Meagher R. 2002. Arabidopsis contains ancient classes of differentially expressed actin-related protein genes. *Plant Physiol.* 128: 997-1007.
- Meyerowitz E y Somerville C. 1995. Arabidopsis. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Miyazawa Y, Sakai A, Miyagishima S, Takano H, Kawano S, Kuroiwa T. 1999. Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 121: 461-469.
- Miyazawa Y, Kato H, Muranaka T, Yoshida S. 2002. Amyloplast Formation in Cultured Tobacco BY-2 Cells Requires a High Cytokinin Content. *Plant Cell Physiol.* 43: 1534-1541.
- Molendijk A, Ruperti B, Palme K. 2004. Small GTPases in vesicle trafficking. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 694-700.
- Morales A. 2003. Marcación de organelos (mitocondrias y plastidios) in vivo mediante el uso de proteínas fluorescentes y análisis de la respuesta de núcleo, plastidios y mitocondrias a estímulos de luz de distintas longitudes de onda, en tejidos vegetales. Tesis de Ingeniero en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Moore R. 1983. A morphometric analysis of the ultrastructure of columella statocytes in primary roots of *Zea mays* L. *Ann Bot.* 51: 771-778.
- Müller A, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E and Palme K. 1998. AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J.* 17: 6903-6911.

- Nagata N, Saito C, Sakai A, Kuroiwa H, Kuroiwa T. 1999. The selective increase or decrease of organellar DNA in generative cells just after pollen mitosis one controls cytoplasmic inheritance. *Planta*. 209: 53-65.
- Nagatani A, Reed J, Chory J. 1993. Isolation and Initial Characterization of Arabidopsis Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol*. 102: 269-277.
- Nakajima K y Benfey P. 2002. Signaling In and Out: Control of Cell Division and Differentiation in the Shoot and Root. *Plant Cell*, S265-S276.
- Navarro B, Rubino L, Russo M. 2004. Expression of the Cymbidium ringspot virus 33-kilodalton protein in *Saccharomyces cerevisiae* and molecular dissection of the peroxisomal targeting signal. *J Virol*. 78: 4744-4752.
- Nebenfuhr A, Gallagher L, Dunahay T, Frohlick J, Mazurkiewicz A, Meehl J, Staehelin L. 1999. Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol*. 121: 1127-42.
- Neff M, Chory J. 1998. Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiol*. 118: 27-35.
- Neuhaus H y Emes M. 2000. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 111-140.
- Obukosia S, Richards C, Boyer C. 2003. Expression of plastid-encoded photosynthetic genes during chloroplast or chromoplast differentiation in *Cucurbitae pepo* L. fruits. *Phytochemistry*. 64: 1213-1221.
- Olsen G, Mirza J, Maher P, Iversen T. 1984. Ultrastructure and movements of cell organelles in the root cap of agravitropic mutants and normal seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant*. 60: 523-531.
- Ormo M, Cubitt A, Kallio K, Gross L, Tsien R, Remington S. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*. 273: 1392-1395.
- Patrick J y Offler C. 2001. Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. *J. Exp. Bot.* 52: 551-564.
- Peeters N, Chapron A, Giritch A, Grandjean O, Lancelin D, Lhomme T, Vivrel A, Small I. 2000. Duplication and quadruplication of *Arabidopsis thaliana* cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *J Mol Evol*. 50: 413-423.
- Pyke K, Rutherford S, Robertson E, Leech R. 1994. *arc6*, A Fertile Arabidopsis Mutant with Only Two Mesophyll Cell Chloroplasts. *Plant Physiol*. 106: 1169-1177.
- Pyke K y Page A. 1998. Plastid ontogeny during petal development in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 116: 797-803.
- Pyke K. 1999. Plastid Division and Development. *The Plant Cell*, 11: 549-556.
- Rahman A, Hosokawa S, Oono Y, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S. 2002. Auxin and ethylene response interactions during Arabidopsis root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiol*. 130: 1908-1917.

- Raz V, Bergervoet J, Koornneef M. 2001. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* 128: 243-252.
- Reinbothe S, Reinbothe C, Parthier B. 1993. Methyl jasmonate-regulated translation of nuclear-encoded chloroplast proteins in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. salome). *J Biol Chem.* 268: 10606-10611.
- Rolletschek H, Weber H, Borisjuk L. 2003. Energy Status and Its Control on Embryogenesis of Legumes. Embryo Photosynthesis Contributes to Oxygen Supply and Is Coupled to Biosynthetic Fluxes. *Plant Phys.* 132: 1196-1206.
- Romagnoli S, Cai G, Cresti M. 2003. *In vitro* assays demonstrate that pollen tube organelles use kinesin-related motor proteins to move along microtubules. *Plant Cell.* 15: 251-269.
- Rossak M, Smith M and Kunst L. 2001. Expression of the FAE1 gene and FAE1 promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 46: 717-725.
- Rube D, y van der Blik A. 2004. Mitochondrial morphology is dynamic and varied. *Mol Cell Biochem.* 256-257: 331-9.
- Ruuska S, Girke T, Benning C, Ohlrogge J. 2002. Contrapuntal Networks of Gene Expression during *Arabidopsis* Seed Filling. *Plant Cell.* 14: 1191-1206.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B. 1999. An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. *Cell.* 99: 463-472.
- Saether N, Iversen T. 1991. Gravitropism and starch statoliths in an *Arabidopsis* mutant. *Planta* 184: 491- 497.
- Saulsberry A, Martin P, O'Brien T, Sieburth L, Pickett F. 2002. The induced sector *Arabidopsis* apical embryonic fate map. *Development.* 129: 3403-3410.
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Tabata S. 1999. Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 6: 283-290.
- Scheres B y Benfey P. 1999. Asymmetric cell division in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 505-537.
- Schiefelbein J, Masucci J, Wang H. 1997. Building a Root: The Control of Patterning and Morphogenesis during Root Development. *Plant Cell.* 9: 1089-1098.
- Schrack K, Mayer U, Horrichs A, Kuhnt C, Bellini C, Dangl J, Schmidt J, Jürgens G. 2000. FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* 14: 1471-1484.
- Sehnke P, Chung, Wu K, Ferl R. 2001. Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *PNAS.* 98: 765-770.
- Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H, Galbraith D. 1995. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* 8: 777-784.

- Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P. 1994. Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development* 120: 2475-2487.
- Shulman J y Johnston D. 1999. Pattern Formation in Single Cells. *TIBS*. 24: M60-64.
- Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A. 1998. GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends Plant Sci.* 3: 426-431.
- Seyedi M, Selstam E, Timko M, Sundqvist C. 2001. The cytokinin 2-isopentenyladenine causes partial reversion to skotomorphogenesis and induces formation of prolamellar bodies and protochlorophyllide657 in the lip1 mutant of pea. *Physiol Plant.* 112: 261-272.
- Singh B, Mishra R, Agarwal P, Goswami M, Nair S, Sopory S, Reddy M. 2004. A pea chloroplast translation elongation factor that is regulated by abiotic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 523-530.
- Smith A, Ratcliffe R, Sweetlove L. 2004. Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J Biol Chem.* (manuscripto acceptado).
- Snedden WA, Fromm H. 1997. Characterization of the plant homologue of prohibitin, a gene associated with antiproliferative activity in mammalian cells. *Plant Mol Biol.* 33: 753-756.
- Soll J y Schleiff E. 2004. Protein import into chloroplasts. *Nature Reviews.* 5: 198-208.
- Somerville C. 2001. An early Arabidopsis demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. *Plant Physiol.* 125: 20-24.
- Sovova V, Stokrova J, Sloncova E, Kucerova D, Tuhackova Z, Korb J. 2003. Alterations in mitochondria function and morphology in HT29 cells upon conditions inducing differentiation and apoptosis. *Int J Oncol.* 23: 1755-1760.
- Sperling U, Franck F, van-Cleve B, Frick G, Apel K, Armstrong G. 1998. Etioplast Differentiation in Arabidopsis: Both PORA and PORB Restore the Prolamellar Body and Photoactive Protochlorophyllide-F655 to the *cop1* Photomorphogenic Mutant. *Plant Cell.* 10: 283-296.
- Sun J, Okita T, Edwards G. 1999. Modification of Carbon Partitioning, Photosynthetic Capacity, and O<sub>2</sub> Sensitivity in Arabidopsis Plants with Low ADP-Glucose Pyrophosphorylase Activity. *Plant Phys.* 119: 267-276.
- Sunilkumar G, Mohr L, Lopata-Finch E, Emani C, Rathore K. 2002. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Mol Biol.* 50: 463-474.
- Stark D, Timmerman, Barry G, Preiss J, Kishore G. 1992. Regulation of the amount by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science.* 258: 287-292.
- Stern D, Hanson M, Barkan A. 2004. Genetics and genomics of chloroplast biogenesis: maize as a model system. *Trends in plant science.* 9: 293-301.
- Szymanski D, Marks M, Wick S. 1999. Organized F-Actin is essential for normal trichoma morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 11: 2331-2347.

- Rossak M, Smith M, Kunst L. 2001. Expression of the FAE1 gene and FAE1 promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* 46: 717-725.
- Ruuska S, Gierke T, Benning C, Ohlrogge J. 2002. Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *Plant Cell* 14: 1191-1206.
- Taiz L y Zeiger E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer associates Inc. 2th Ed. USA.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408: 796-815.
- Timpte C, Wilson A, Estelle M. 1994. The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics*. 138: 1239-1249.
- Torres-Ruiz R, Lohner A, Jurgens G. 1996. The GURKE gene is required for normal organization of the apical region in the *Arabidopsis* embryo. *Plant J.* 10:1005-1016.
- Umeda M, Umeda-Hara C, Uchimiya H. 2000. A cyclin-dependent kinase-activating kinase regulates differentiation of root initial cells in *Arabidopsis*. *PNAS*. 97: 13396-13400.
- Urbina D. 2003. Estudio del rol de bombas de  $Ca^{2+}$  y miosinas en la respuesta gravitropica de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Ingeniero en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Uwer U, Willmitzer L, Altmann T. 1998. Inactivation of a glycyl-tRNA synthetase leads to an arrest in plant embryo development. *Plant Cell*. 10: 1277-1294.
- Van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B. 1997. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*. 390: 287-289.
- Van Gestel K, Kohler R, 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.* 53: 659- 667.
- Vinti G, Hills A, Campbell S, Bowyer J, Mochizuki N, Chory J, Lopez-Juez E. 2000. Interactions between *hy1* and *gun* mutants of *Arabidopsis*, and their implications for plastid/nuclear signalling. *Plant J.* 24: 883-894.
- Volker A, Stierhof Y, Jurgens G. 2001. Cell cycle-independent expression of the *Arabidopsis* cytokinesis-specific syntaxin KNOLLE results in mistargeting to the plasma membrane and is not sufficient for cytokinesis. *J Cell Sci.* 114: 3001-3012.
- Vothknecht U y Westhoff P. 2001. Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochim. Biophys Acta.* 1541: 91-101.
- Vershon A, Johnson A. 1993. A short, disordered protein region mediates interactions between the homeodomain of the yeast alpha 2 protein and the MCM1 protein. *Cell.* 72: 105-112.
- Wall M, Mitchenall L, Maxwell A. 2004. *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *PNAS*. 101: 7821-7826.
- Walter R y Horton P. 1995. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: regulation of chloroplast composition. *Planta.* 197: 475-481.

- Wang H, Wang X. 2003. Dissecting the phytochromeA-dependent signaling network in higher plants. *TRENDS Plant Sci.* 8: 172-178.
- Weber A. 2004. Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 247-253.
- Western T, Skinner D, Haughn G. 2000. Differentiation of Mucilage Secretory Cells of the Arabidopsis Seed Coat. *Plant Phys.* 122: 345-355.
- Weston E, Thorogood K, Vinti G, Lopez-Juez E. 2000. Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type and blue-light-perception mutants. *Planta.* 211: 807-815.
- Whittington A, Vugrek O, Wei K, Hasenbein N, Sugimoto N, Rashbrooke M, Wasteneys G. 2001. MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature.* 411: 610-613.
- Woodrick R, Martin P, Birman I, Pickett F. 2000. The Arabidopsis embryonic shoot fate map. *Development.* 127: 813-820.
- Wysocka-Diller J, Helariutta Y, Fukaki H, Malamy J, Benfey P. 2000. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development.* 127: 595-603.
- Xu X, Moller S. 2004. AtNAP4 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for Arabidopsis embryogenesis. *PNAS.* 101: 9143-9148.
- Yagisawa F, Mori T, Higashiyama T, Kuroiwa H, Kuroiwa T. 2003. Regulation of *Brassica rapa* chloroplast proliferation in vivo and in cultured leaf disks. *Protoplasma.* 222: 139-148.
- Yamamoto Y, Puente P, Deng X. 2000. An Arabidopsis Cotyledon-Specific Albino Locus: a Possible Role in 16S rRNA Maturation. *Plant Cell Physiol.* 41: 68-76.
- Yamamoto K, Pyke K, Kiss J. 2002. Reduced gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls, but not roots, of Arabidopsis mutants with large plastids. *Physiol Plant.* 114: 627-636.
- Yao N, Eisfelder B, Marvin J, Greenberg J. 2004. The mitochondrion - an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 40: 596-610.
- Yu B, Wakao S, Fan J, Benning C. 2004. Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 45: 503-510.
- Zhang H, Scheirer D, Fowle W, Goodman H. 1992. Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in Arabidopsis. *Plant Cell.* 4:1575-1588.
- Zhao L y Sack F. 1999. Ultrastructure of stomatal development in Arabidopsis leaves. *Am. J. Bot.* 86: 929-939.
- Zhong G, Burns J. 2003. Profiling ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Plant Mol Biol.* 53. 117-131.

## 6. ANEXOS

ANEXO 1 : Transformación de plantas de arabidopsis con vectores para la destinación de YFP a mitocondrias (pAM3) o a plastidios (pDU3).

ANEXO 2 : Presencia de clorofila en mutantes en adquisición de patrones.

## ANEXO 1

**Transformación de plantas de arabidopsis con vectores para la destinación de YFP a mitocondrias (pAM3) o a plastidios (pDU3).**

**Tabla 1. Eficiencia de transformación de plantas de Arabidopsis.** Las plantas (T<sub>0</sub>) que se listan en la primera columna fueron transformadas con un vector para la destinación de YFP a mitocondrias (pAM3) o a plastidios (pDU3). Se seleccionaron las plantas resistentes a kanamicina (T<sub>1</sub>).

<b>Planta Transformada (T<sub>0</sub>)</b>	<b>N° plantas sometidas a selección</b>	<b>N° de Plantas resistentes a kanamicina (T<sub>1</sub>)</b>	<b>% de Eficiencia de Transformación</b>
<b>Vector para la acumulación de YFP en Mitocondrias</b>			
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
<b>TOTAL</b>	<b>4805</b>	<b>63</b>	<b>1.3</b>
<b>Vector para la acumulación de YFP en Plastidios</b>			
DU3A	3375	8	0.24
DU3I	1465	5	0.34
DU3J	1810	3	0.17
DU3M	4610	8	0.17
<b>TOTAL</b>	<b>11260</b>	<b>24</b>	<b>0.21</b>

**Tabla 2: Segregación observada luego de la transformación de plantas de Arabidopsis.** Las plantas de la generación T1 fueron sembradas y de ellas se obtuvieron semillas (T2), las cuales fueron seleccionadas por su resistencia a Kanamicina. Si la razón resistentes: sensibles es 3: 1, entonces con alta probabilidad, en el genoma de la planta transformada existe una sola inserción.

Líneas transgénicas parentales (generación T <sub>1</sub> )	N° plantas T2 resistentes a 50 µg/ml kanamicina	N° plantas T2 sensibles a 50 µg/mL kanamicina	Razón resistentes/sensibles	N° de inserciones de T-DNA estimadas
AM3B4	71	22	3.2:1	1
AM3B10	54	27	2:1	
AM3B13	5	1	5:1	>1
AM3B15	12	12	1:1	
AM3C1	69	14	5:1	>1
AM3F1	94	42	2.2:1	
AM3F4	107	42	2.5:1	
AM3G4	21	8	2.6:1	1
DU3A3	32	1	32:1	>1
DU3A6	111	38	2.9:1	1
DU3A7	16	2	8,1:1	>1
DU3M1	63	8	7.9:1	>1
DU3M5	16	5	3.2:1	1

**Tabla 3. Segregación de semillas T3 de plantas transformadas con el vector pAMA3.** Para comprobar que las plantas T<sub>2</sub> tenían una inserción en su genoma y para saber si eran homocigotas, se analizó la progenie de T<sub>2</sub>. Una razón resistentes: sensibles (R:S) de 3:1 indica que la planta T<sub>2</sub> era heterocigoto. Si todas las plantas eran resistentes, la planta madre (T<sub>3</sub>) era homocigota.

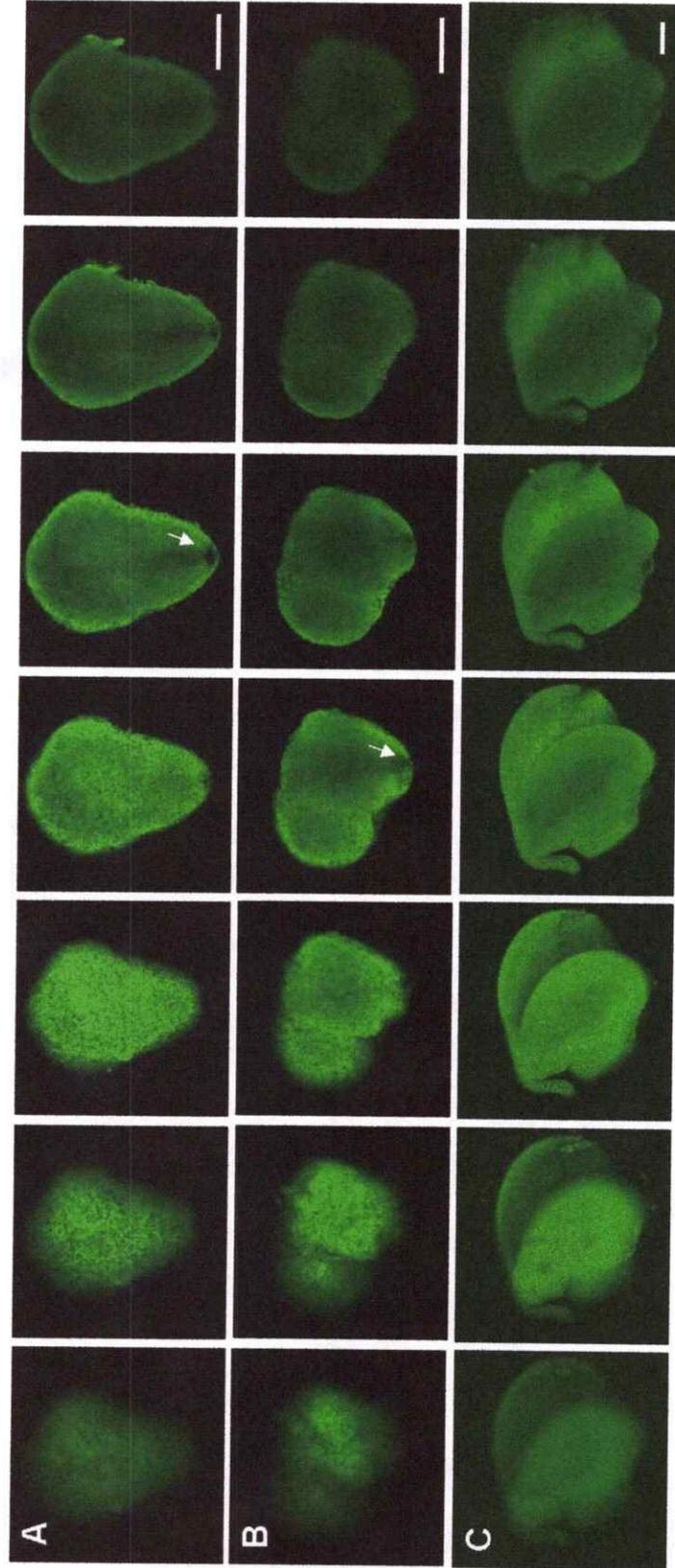
Planta (T2)	KanR	KanS	Dudoso	Razón R:S	n
AM3B4A	40	0	0	--	40
AM3B4B	10	4	0	2.5 : 1	13
AM3B4C	40	0	0	--	40
AM3B4D	28	9	0	3.1 : 1	37
AM3B4E	40	0	0	--	40
AM3B4F	23	5	0	4.6 : 1	28
AM3B4G	15	8	0	1.9 : 1	23
AM3B4H	42	17	0	2.5 : 1	59
AM3B4M	60	0	0	--	60

**Tabla 4. Segregación de semillas T3 de plantas transformadas con el vector pDU3.** Para comprobar que las plantas T<sub>2</sub> tenían una inserción en su genoma y para saber si eran homocigotas, se analizó la progenie de T<sub>2</sub>. Una razón resistentes: sensibles (R:S) de 3:1 indica que la planta T<sub>2</sub> era heterocigoto. Si todas las plantas eran resistentes, la planta madre (T<sub>3</sub>) era homocigota.

Planta (T2)	KanR	KanS	Dudoso	Razón R:S	n
Du3M5O	71	0	0		71
Du3M5T	60	33	0	1.8 : 1	93
Du3M5V	31	18	2	1.7 : 1	51
Du3A6E	14	1	0		15
Du3A6C	28	0	1		29
Planta (T3)	KanR	KanS	Dudoso	Razón R:S	n
Du3M5T1	13	10	0	1.3 : 1	23
Du3M5T2	31	4	0	7.8 : 1	35
Du3M5T4	35	0	0		35
Du3M5T5	33	10	0	3.3 : 1	43
Du3M5T6	65	0	0		65
Du3M5T7	62	0	0		62
Du3M5T8	28	9	0	3.1 : 1	37
Du3M5T9	50	15	0	3.3 : 1	65
Du3M5T10	49	10	0	4.9 : 1	59

## ANEXO 2

### Presencia de clorofila en mutantes en adquisición de patrones



**Figura 1. Presencia de clorofila en mutantes en adquisición de patrones.** La fluorescencia de clorofila fue observada en embriones realizando cortes ópticos seriales. **A.** Embrión *gurke (gk)* (cortes ópticos de 4.3  $\mu\text{m}$ ). **B.** Embrión *fackel (fk)* (cortes ópticos de 4.3  $\mu\text{m}$ ). **C.** Embrión *monopteros (mp)*, (cortes ópticos de 9  $\mu\text{m}$ ). Se puede observar que *gk* y *fk* poseen una zona basal con células sin cloroplastos rodeadas por células que han diferenciado estos organelos (flecha). En *mp*, las células de zona basal han formado un ápndice en vez de hipocotilo y raíz. Barra en todas las figuras: 100  $\mu\text{m}$ .