



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO MOLECULAR Y microARNs DEL
ALBINISMO Y LA VARIEGACIÓN EN EL CULTIVO
in vitro DE *Agave angustifolia* Haw.**

Tesis que presenta

SARA HERNÁNDEZ CASTELLANO

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México,

2020



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Sara Hernández Castellano**, titulado "**Estudio molecular y microARNs del albinismo y la variegación en el cultivo *in vitro* de *Agave angustifolia* Haw.**", fue realizado en el Laboratorio de Epigenética y Cromatina de Plantas de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dr. Clelia De la Peña Seaman, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este centro.

Atentamente:

Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 13 de enero de 2020.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

ATENTAMENTE:



M. en C. Sara Hernández Castellano

Mérida, Yucatán, México, 13 de enero 2020

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “La participación de las auxinas en la metilación de novo en el ADN de *Agave angustifolia* Haw: Una vía para la formación de somaclonas albinas”, en el que participe bajo la dirección de la Dra. Clelia De la Peña Seaman y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB2016-285898, ciencia básica 2016), así como, la beca nacional otorgada por el CONACYT con número 271240.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y a la Unidad de Biotecnología, por la oportunidad de cursar el programa de doctorado en Ciencias biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca nacional con el número 271240 y el financiamiento del Proyecto de Ciencia Básica 2016, número CB2016-285898.

A las instalaciones de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por permitirme el uso de los laboratorios de: Histología, Microscopía Óptica y Confocal y Termocicladores.

A la Dra. Clelia De la Peña Seaman, por su apoyo y confianza en mi trabajo, así como por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección.

A cada uno de los doctores que constituyeron el comité tutorial y predoctoral: Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, Dr. Stefan De Folter, Dr. Enrique Castaño de la Serna, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dra. Virginia A. Herrera Valencia y Dra. Clelia De la Peña Seaman, expreso mi profundo agradecimiento y admiración por sus acertados comentarios, su calidad de tiempo para orientar la dirección de este trabajo y su notable experiencia que proporcionaron durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

Al Dr. René Garruña Hernández, por su apoyo para el análisis fisiológico, sugerencias y recomendaciones otorgadas en este trabajo.

Al M.C. Angela Kú Gonzales, por facilitar el uso de los múltiples microscopios y herramientas de histología esenciales en este trabajo.

A mis compañeros de grupo de UBT, UBBMP y otras instituciones, muchas gracias por cada sugerencia y reactivos facilitados en alguna etapa de este trabajo de investigación.

A mis profesores de doctorado, por transmitirme sus conocimientos y contribuir en mi formación como estudiante de posgrado.

DEDICATORIAS

Innumerables son las personas que me dieron su apoyo. A todos los que, con una palabra, una sonrisa, un abrazo, han contribuido a recuperar mis fuerzas y finalizar esta meta profesional, les ofrezco un abrazo fraternal y mi profunda gratitud

Honor e infinito agradecimiento

A Dios, porque a pesar de innumerables pruebas físicas y emocionales me dio fuerza, inteligencia y sabiduría para continuar y finalizar este trabajo

A mi madre Sra. María Cruz Castellano Hernández

A mi padre Sr. Juan Antonio Hernández Sánchez

Por su amor y sacrificio en algún punto incomprensible, por ser ejemplos ante las cotidianidades y adversidades de la vida enfrentadas con tenacidad, sabiduría y buen humor y principalmente por su amor y confianza en mí

A mis amados sobrinos Mauricio, Guadalupe, Fátima, *Xóchitl* y Litza, y a mi eterno Angelito[†] con todo mi amor

Gracias por cada una de sus sonrisas, abrazos y besos, muestras sinceras de amor que fueron de gran inspiración para finalizar este trabajo

A mis amigos y compañeros... Lau, Zamy, Rosy, Dulce, Maythe, Doris, Daniel, Fatu, y Geovany...

A todos infinitas gracias por hacer amena esta travesía

A Plutarco de Jesús García Izquierdo

Mi futuro compañero de vida, gracias por su apoyo y comprensión.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	v
LISTADO DE TABLAS.....	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	6
ANTECEDENTES	6
1.1 ALBINISMO EN LAS PLANTAS SUPERIORES	6
1.2 FACTORES ASOCIADOS AL ALBINISMO EN LAS PLANTAS	7
1.3 LOS CLOROPLASTOS Y SU FUNCIÓN EN LAS PLANTAS	12
1.3.1 Desarrollo y biogénesis	12
1.3.2 Los cloroplastos y el albinismo.....	15
1.3.3 Regulación redox en el cloroplasto.....	21
1.3.4 Biosíntesis de la clorofila.....	22
1.3.5 Fotoinhibición, Fotoprotección, y Fotoinactivación	25
1.4 DESARROLLO FOLIAR: EPIDERMIS Y ESTOMAS	26
1.4.1 Limitación estomática en plantas superiores	30
1.5 LA EPIGENÉTICA Y SU REGULACIÓN EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS	31
1.5.1 Epigenética y la variación somaclonal.....	32
1.5.2 El mecanismo epigenético de los miARNs en las plantas	33
1.5.3 Participación de los miARNs durante la variación somaclonal.....	34
1.6 AGAVE SP.	35
1.6.1 <i>Agave Angustifolia</i> Haw. como modelo de estudio	37
JUSTIFICACIÓN	39
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	39
HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS ESPÉCIFICOS	40
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	42
CAPITULO II	44

Caracterización fenotípica, fisiológica y molecular de las variables somaclonales verde, variegada y albina de <i>A. angustifolia</i> Haw.	44
2.1.1 INTRODUCCIÓN	44
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	45
2.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. angustifolia</i>	45
2.2.2 Análisis histológico del tejido foliar	46
2.2.3 Eficiencia cuántica del fotosistema II.....	46
2.2.4 Diseño de oligonucleótidos asociados a la fotosíntesis y clorofila	47
2.2.5 RT-qPCR	50
2.2.6 Aislamiento de los ARNs pequeños (200-15 nt)	50
2.2.7 microARNs: Reacción de poliadenilación y síntesis de ADNc	51
2.2.8 qPCR microARNs	51
2.2.9 Análisis estadístico.....	52
2.3 RESULTADOS	52
2.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. angustifolia</i>	52
2.3.2 Patrones celulares en la hoja y región meristemática en G, V y A	53
2.3.4 Eficiencia fotoquímica y fotosintética.....	55
2.3.5 Secuenciación de fragmentos de ADN amplificados	57
2.3.6 Análisis molecular de los niveles de expresión de genes asociados a vía de las clorofilas y fotosíntesis	59
2.3.7 Niveles transcripcionales de expresión de los microARNs, miR408, miR172 y miR156	65
2.4 DISCUSIÓN	66
CAPÍTULO III	71
Estudio fisiológico y molecular de plástidos presentes en hojas de las variantes somaclonales albinas de <i>A. angustifolia</i>	71
3.1 INTRODUCCIÓN	71
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	72
3.2.1 Material vegetal.....	72
3.2.2 Aislamiento de los cloroplastos en los fenotipos G, V y A	73
3.2.3 Amortiguadores para el aislamiento y purificación de los cloroplastos	73
3.2.4 Amortiguadores para resuspensión de los cloroplastos.....	73
3.2.5 Aislamiento de plástidos.....	73

3.2.6	Gradiente de sacarosa.....	74
3.2.7	Intercambio de gases.....	74
3.2.8	Microscopía de confocal de plástidos aislados.....	75
3.2.9	Cuantificación de clorofila	75
3.2.10	Diseño de cebadores asociados a la biogénesis del cloroplasto	75
3.2.11	RT-qPCR	77
3.3	RESULTADOS	77
3.3.1	Aislamiento y purificación de los plastidos en variantes somaclonales G, V Y A de <i>A. angustifolia</i>	77
3.3.2	Plástidos aislados: Actividad fotoquímica y fotosintética	81
3.3.3	Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados.....	83
3.3.4	Análisis molecular de los niveles de expresión de los genes asociados al desarrollo de los cloroplastos.....	84
3.4	DISCUSIÓN	88
CAPÍTULO IV		92
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EPIGENÉTICA DEL DESARROLLO ESTOMÁTICO EN LAS VARIABLES SOMACLONALES ALBINAS DE <i>A. angustifolia</i>		92
4.1	INTRODUCCIÓN	92
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS	95
4.2.1	Material vegetal <i>in vitro</i>	95
4.2.2	Cuantificación de pigmentos	95
4.2.3	Morfología estomática.....	95
4.2.4	Contenido relativo de agua (CRW).....	96
4.2.5	Fotoquímica	96
4.2.6	Intercambio de gases.....	97
4.2.7	Diseño de los cebadores.....	97
4.2.8	qRT-PCR	97
4.2.9	qRT-PCR micro-RNAS.....	98
4.3	RESULTADOS	98
4.3.1	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. angustifolia</i>	98
4.3.2	Morfología estomática.....	100
4.3.3	Contenido relativo de agua	102
4.3.4	Variables fotoquímicas e intercambio de gases.....	103
4.3.5	Niveles transcripcionales de expresión de genes asociados al desarrollo	

estomático.....	106
4.3.6 Niveles de expresión de micro-ARNs asociados al desarrollo estomático....	110
4.4 DISCUSIÓN.....	113
CAPÍTULO V.....	119
Análisis proteómico de las variantes somaclonales albinas de <i>Agave angustifolia</i> cultivado <i>in vitro</i>.....	119
5.1 INTRODUCCIÓN.....	119
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	120
5.2.1 Aislamiento de proteínas totales para 2-DE	120
5.2.2 Cuantificación de proteínas.....	121
5.2.3 Electroforesis SDS-PAGE	122
5.2.4 Western blotting	122
5.2.5 Inmunodetección.....	123
5.2.6 Detección por quimioluminiscencia	123
5.3 RESULTADOS.....	124
5.4 DISCUSIÓN.....	128
CAPÍTULO VI.....	131
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	131
6.1 Conclusiones	131
6.2 Perspectivas	133
BIBLIOGRAFÍA.....	135

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Ruta de biosíntesis de la clorofila en plantas.....	24
FIGURA 1.2 Distribución geográfica del <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	37
FIGURA 1.3 Estrategia experimental general.	37
FIGURA 2.1 Variantes somaclonales albinas de <i>A. angustifolia</i>	53
FIGURA 2.2 Cortes histológicos de hojas de <i>A. angustifolia</i> G, V y A <i>in vitro</i>	54
FIGURA 2.3 Disecciones histológicas de la región meristemática y análisis del crecimiento en plántulas de <i>A. angustifolia in vitro</i>	55
FIGURA 2.4 Parametros fotoquimicos evaluados en <i>A. angustifolia</i>	57
FIGURA 2.5 Genes candidatos asociados a la biosíntesis de clorofilas, ciclo de las clorofilas, degradación de clorofilas y fotosíntesis.....	59
FIGURA 2.6 Niveles de expresión relativa de los genes que codifican para la biosíntesis de clorofilas: HEMA, MgH, CHLG, y PORA.	61
FIGURA 2.7 Niveles de expresión de genes que codifican para el ciclo y degradación de clorofilas.	62
FIGURA 2.8 Niveles de expresión de los genes que codifican para la fotosíntesis.....	64
FIGURA 2.9 Eficiencias de los oligonucleótidos normalizadores para la expresión de microRNAs utilizando qPCR- tiempo real.....	65
FIGURA 2.10 Optimización de las concentraciones del ADNc para el estudio de los microARNs; miR156, miR172 y miR408.	65
FIGURA 2.11 Niveles de expresión relativa de la secuencia madura de los microARNs. 66	
FIGURA 3.1 Aislamiento y fraccionamiento de los cloroplastos a través de un gradiente de sacarosa en los tres fenotipos de <i>A. angustifolia</i>	78
FIGURA 3.2 Fraccionamiento de los plástidos y cloroplastos aislados de los fenotipos G, V y A de <i>A. angustifolia in vitro</i>	81
FIGURA 3.3 Cuantificación de clorofilas totales en las fases purificadas de las suspensiones de cloroplastos en los tres fenotipos de <i>A. angustifolia</i>	81
FIGURA 3.4 Análisis fotosintético de las fracciones de los plástidos y cloroplastos aislados	

en los fenotipos G, V y A.	82
FIGURA 3.5 Curvas de respuesta del rendimiento cuántico fotoquímico efectivo del fotosistema II (PSII).	83
FIGURA 3.6 Clasificación de los genes asociados al desarrollo de los cloroplastos.	85
FIGURA 3.7 Niveles de expresión relativa de los genes que codifican para el desarrollo del cloroplasto	87
FIGURA 4.1 Variantes somaclonales albinas de <i>A. angustifolia in vitro</i>	100
FIGURA 4.2 Fotomicrografías de MEB de la superficie laminar en las regiones, basal, media y apical de <i>A. angustifolia</i> (G, V y A).	101
FIGURA 4.3 Análisis cuantitativo de las fotomicrografías (largo, ancho y apertura estomática).....	102
FIGURA 4.4 a) Contenido relativo de agua (RWC) y b) seguimiento del control estomático durante 60 minutos en G, V y A de <i>A. angustifolia</i>	103
FIGURA 4.5 Conductancia estomática (g_s), transpiración (E) y uso eficiente del agua (WUE) en plantas de <i>A. angustifolia in vitro</i>	105
FIGURA 4.6 Curva de respuesta de CO_2 (A_N-C_i) y flujo de densidad fotónica A_N -PPFD en plantas de <i>A. angustifolia in vitro</i>	106
FIGURA 4.7 Niveles de expresión relativa de los genes que codifican para el desarrollo estomático.	110
FIGURA 4.8 Eficiencia de los oligonucleótidos utilizados para la expresión de miR824 y miR166.	111
FIGURA 4.9 Niveles de expresión relativa de los miR824 y miR166 involucrados en el control del desarrollo estomático.....	112
FIGURA 4.10 Niveles de expresión relativa de <i>AGL16</i> y <i>ABA1</i> asociados al desarrollo estomático.	113
FIGURA 5.1 Visualización del perfil electroforético total en fenotipos de <i>A. angustifolia</i>	124
FIGURA 5.2 Gel de electroforesis bidimensional de proteínas separadas en tres fenotipos de <i>A. angustifolia</i>	126

FIGURA 5.3 Visualización del contenido de 20 µg de proteínas totales por fenotipos de *Agave angustifolia in vitro*..... 128

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Marcadores seleccionables en genes esenciales del cloroplasto para transformación a través de la ingeniería de plástidos.....	20
Tabla 1.2 Genes involucrados en el linaje estomático de plantas monocotiledóneas	29
Tabla 2.1 Secuencias de oligonucleótidos asociados a la biosíntesis Chl y fotosíntesis..	48
Tabla 2.2 Secuencias de los oligonucleótidos para el análisis qRT-PCR.....	49
Tabla 2.3 Coeficiente de extinción fotoquímico (qP), Coeficiente de extinción no fotoquímico (NPQ), Actividad potencial del PSII (F_v/F_0) y Rendimiento cuantico máximo del FSII (F_v/F_m) de <i>A. angustifolia</i> Haw..	56
Tabla 2.4 Similitud de los fragmentos de PCR de cada gen amplificado con sus proteínas ortólogas.....	58
Tabla 3.1 Secuencias de oligonucleótidos de genes implicados en la biogénesis de los cloroplastos	76
Tabla 3.2 Secuencias de los oligonucleótidos para el análisis qRT-PCR de genes implicados en la biogénesis de los cloroplastos.....	76
Tabla 3.3 Similitud de los fragmentos de PCR de cada gen amplificado con sus proteínas ortólogas.....	84
Tabla 4.1 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos en los fenotipos G, V y A de.....	100
Tabla 4.2 Variables fotoquímicas asociadas al funcionamiento del complejo estomático y la fotosíntesis.	104
Tabla 4.3 Secuencias de cebadores de genes implicados en el desarrollo estomático.	107
Tabla 4.4 Oligonucleótidos utilizados qRT-PCR de genes implicados en el desarrollo estomático.	108
Tabla 4.5 Similitud de los fragmentos de PCR de cada gen amplificado con sus proteínas ortólogas.....	109
Tabla 5.1 Anticuerpos utilizados contra, PEP-carboxilasa y D1/D2 en tres fenotipos diferentes de <i>Agave angustifolia</i> y además sus respectivos tiempos de detección.	123
Tabla 5.2 Análisis cuantitativo de los spots en los tres fenotipos de <i>A. angustifolia</i>	127

ABREVIATURAS

18s	ARN ribosomal 18s
A	Tejido albino
ABA	Ácido abscísico
AGL16	AGAMOUS LIKE 16
Amax	Máxima tasa fotosintética
AN	Tasa neta fotosintética
Asat	Radio máximo de saturación fotosintética
AV	Región albina del tejido variegado
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CaO	Clorofilida A oxigenasa
ChIP	Geranylgeranyl difosfato reductasa cloroplástica
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
ChLG	Clorofila sintasa
Ci/Ca	Asimilación del CO ₂ intercelular/CO ₂ atmosférico
CRW	Contenido relativo de agua
DS	Densidad estomática
E	Transpiración
ERECTA	LRR-Receptor-Like serina/treonina-proteína quinasa
ETR	Transporte de electrones por el PSII
FAMA	Factor transcripcional FAMA
FC1	Ferroquelatasa 1-CLOROPLASTIC
FLP	FOUR LIPS
G	Tejido verde
GC	Célula guarda
GCM	Célula madre guarda
GLK	Factor transcripcional GLK-mRNA
g _s	Conductancia estomática
Gun1	Pentatricopéptidos repetidos de proteína1
HCAR	Hidroximetil clorofila A reductasa

HEMA	Glutamil ARNt reductase
I	Limitación estomática
ID	índice estomático
Jmax	Máxima capacidad de la regeneración de RuBisCO
LHCa1	Clorofila de unión a/b subunidad A
LHCB1	Clorofila de unión a/b subunidad B
Lox 2.1	Lipoxigenasa linoleato 13s-cloroplástica
MgH	Mg subunidad H
miARN	micros ARNs
MMC	Células madre meristemoides
MPK4	MITOGEN PROTEIN KINASE 4
MPK6	MITOGENO PROTEIN KINASE 6
MUTE1	Factor transcripcional MUTE1
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MLC	Microscopia láser confocal
PAO	Feofórbido A oxigenasa
PAR	Radiación fotosintética activa
PORA	Fotoclorofilida oxidorreductasa A
PPFD	Densidad de flujo de fotones fotosintéticos
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
qN	Coeficiente de extinción no fotoquímica
qP	Coeficiente de extinción fotoquímica
ARNs	pequeños ARNs
RPS4	30S RIBOSOMAL PROTEIN S4
RPS7	30S RIBOSOMAL PROTEIN S7
RuBisCO	RIBULOSA 1,5 BIFOSFATO CARBOXILASA OXIGENASA
rubL	Subunidad mayor de la RuBisCO
rubS	Subunidad menor de la RuBisCO
sAPX	Ascorbato peroxidasa estromal
SC	Célula subsidiarias
SCM	Células subsidiarias madre

SPCH	SPECHLESS
tAPX	Ascorbato peroxidasa tilacoidal
TMM	TOO MANY MOUNTS
UBQ11	Ubiquitina 11
V	Tejido variegado
VcMax	Máxima velocidad de carboxilación de RuBP
WUE	Eficiencia del Uso Eficiente del Agua
YCF4	PHOTOSYSTEM I ASSAMBLY PROTEIN
YODA	Factor transcripcional YODA

RESUMEN

El albinismo en las plantas es un crecimiento que posee problemas biológicos generales. La falta de clorofila y la insuficiente capacidad para producir azúcares, hace que estas plantas heterotróficas se queden sin energía y mueran en corto tiempo. Una causa probable del albinismo en cultivos micropropagados durante varios años es la integridad de las células meristemáticas, ya que factores como la composición química del medio de cultivo, la luz, la humedad, la temperatura, y además cambios en los mecanismos epigenéticos, condicionan la programación celular. En *Agave angustifolia* Haw, el hallazgo azaroso de fenotipos albinos estables, representa un modelo excelente para abordar cuestiones centrales en la biología de la planta y el albinismo. En este trabajo, el objetivo se centró en evaluar los principales contrastes morfológicos y funcionales entre los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A) de *A. angustifolia*. La investigación se orientó al estudio fisiológico, molecular, proteómico y epigenético involucrados en el linaje celular, el desarrollo de los plástidos y de la hoja.

Los resultados mostraron que el fenotipo A presenta cambios en la organización celular meristemática y en la epidermis foliar, además, exhibe un sistema deficiente de transferencia de electrones, ausencia de clorofilas *a* y *b*, una relación anormal de clorofilas *a/b*, determinando así el bajo porcentaje de sobrevivencia. Además, las plantas albinas de *Agave* presentaron niveles de expresión diferencial en genes cruciales para la unión de clorofilas y fotoquímica del PSII (*PsaB*, *PsbA*). También, se observó una desregulación del gen *GLK1* (activador de los genes fotosintéticos *YCF4*, los cuales son esenciales para la biogénesis del cloroplasto) así como la expresión de los genes *SPCH*, *MUTE*, *TMM*, *MPK4*, *MPK6* y *AGL16*, los cuales sugiere que condicionan la programación molecular para crear el linaje celular en cultivares albinos y variegados. Por otra parte, los resultados obtenidos en las plantas V sugieren que, el contenido de leucoplástidos y/o plástidos en diversas etapas de degeneración en la región albina (AV), conllevaría a la ausencia completa, o al desarrollo de plastidios con solo carotenos o xantofilas. Sin embargo, la alta actividad fotosintética y niveles de expresión de los genes analizados en cultivos V sugiere que la región verde (GV) establece un sistema para integrar actividades compensatorias y de fotoprotección entre los cloroplástidos normales y anormales que se encuentran juntos en las células mixtas de la hoja

En esta tesis también se analizaron los perfiles proteicos en electroforesis de doble dimensión (2-DE). Se encontró que la abundancia de algunas proteínas en las plantas A varía notablemente, sugiriendo que algunas proteínas pueden tener roles importantes en los eventos moleculares involucrados en el albinismo, como son la PEP-carboxilasa, las proteínas de unión a las clorofilas como PSAD1/D2 y RuBisCO subunidad mayor. Finalmente, como un mecanismo alternativo en la regulación del ciclo de las clorofilas, la fotosíntesis, y el linaje estomático, se analizó la expresión de cinco microARNs (miR156, mir166, miR172, miR408 y miR824), los cuales mostraron una relación directa con los genes regulados a la baja en las plantas A.

Los resultados de este trabajo sugieren que el albinismo en *A. angustifolia* podría estar asociado a un error en el control y equilibrio de los mecanismos moleculares y epigenéticos sobre la proliferación y la diferenciación del linaje celular, los cuales controlan el desarrollo de la hoja, los cloroplastos y las células guarda de una manera diferente en los fenotipos V y A en comparación con las plantas G.

ABSTRACT

Albinism in plants is a growth that leads to general biologic problems. The lack of chlorophyll and the insufficient capacity to produce sugars, makes these heterotrophic plants run out of energy and die in a short time. A probable cause of albinism in a long-time micropropagated cultures is directed to the integrity of the meristematic cells, since factors such as chemical composition of the culture medium, light, humidity, temperature, and also changes in epigenetic mechanisms, condition the cellular programming. In *Agave angustifolia* Haw., the random finding of a stable albino phenotype represents an excellent model to address central issues on plant biology and albinism. In this dissertation, the main objective was to assess the main morphological and functional differences among green (G), variegated (V) and albino (A) phenotypes of *A. angustifolia*. The research was pointed out to the physiological, molecular, proteomic and epigenetic study, involved in the cellular lineage, the development of plastids and leaf.

The results showed that the phenotype A have changes in the meristematic cellular organization and foliar epidermis. In addition, this phenotype exhibits a deficient system of electron transfer, absence of chlorophyll *a* and *b*, an abnormal chlorophyll *a/b* ratio, provoking a low percentage of survival in the plants. In addition, the albino plants of *Agave* showed differential expression levels in genes crucial for chlorophylls such as *PsaB*, *PsbA*, as well as, in genes associated with the photochemical process of PSII. Also, it has observed a deregulation of the *GLK1* gene (an activator of the photosynthetic genes of *YCF4*, which is a key gene in chloroplast biogenesis). Furthermore, it was found a deregulation in the expression of *SPCH*, *MUTE*, *TMM*, *MPK4*, *MPK6* and *AGL16*, which are key in the molecular programming of the stomatal lineage. However, the results obtained in the V plants suggest that the content of leucoplastids and/or plastids in the albino (AV) region would lead to the complete absence of plastids, or to the development of plastids with only carotenoids or xanthophylls. However, the high photosynthetic activity and expression levels of the genes analyzed in the V phenotype suggest that the green region (GV) establishes an efficient system able of integrating compensatory and photoprotective activities between the normal and abnormal chloroplasts found together in the mixed cells of the leaf.

In this dissertation, I also analyzed the protein profile by 2-DE. I was found a notably variation

in the albino proteomic profile, suggesting that some proteins may have important roles in the molecular events involved in albinism, such as PEP-Carboxylase and chlorophyll binding proteins such as PSAD1/D2 and the major subunit of RuBisCO. Finally, as an alternative mechanism in the regulation of the chlorophyll cycle, photosynthesis, and the stomatal lineage, I analyzed the expression of five microRNAs (miR156, mir166, miR172, miR408 and miR824), which show a strong relationship with some down-regulated genes in the A plant.

The findings of this research suggest that the albinism in *A. angustifolia* could be associated with an error in the control and balance of the molecular and epigenetic mechanisms in the proliferation and differentiation of precursor cell lineage, which control in a different way the leaf development and guard cells in A and V in comparison with G.

INTRODUCCIÓN

El fenómeno de la variegación se conoce ampliamente en casi todas las familias de plantas (Aluru *et al.*, 2006; Evenari, 1989). La formación de patrones divididos exactamente a lo largo de la hoja, blanco/verde, se encuentra asociado a la degeneración pronunciada de cloroplastos, un crecimiento menos vigoroso y una menor capacidad fotosintética (Miura *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Aluru *et al.*, 2006; Darlington, 1929). Sin embargo, la variegación puede conducir al albinismo, un estado vegetativo caracterizado por un tiempo de vida muy corto y de desarrollo irregular (Evenari, 1989; Darlington, 1929).

El albinismo en las plantas es asociado a diversos factores, por ejemplo, el genotipo, la incompatibilidad entre el genoma nuclear y del cloroplasto, y en algunos casos, a factores ambientales como la temperatura, la luz y los nutrientes (Shin *et al.*, 2018; Kumari *et al.*, 2009; Y Du *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, arroz y maíz, el silenciamiento de genes nucleares y de plástidos mutables como; *CHLOROPHYLL SYNTHASE (CHLG)*, *CHLOROPHYLLIDE A OXYGENASE (CAO)*, *FITOENO LICOPENO BETA CICLASA (LCYb)*, y *PROTOCHLOROPHYLLIDE (Pchlide)*, producen cambios ultraestructurales en los plástidos, estableciendo una letalidad prematura y/o una amplia variabilidad fenotípica en una misma especie (Oster *et al.*, 2000; Oster y Rüdiger, 1997).

Por otra parte, la eficiente actividad fotosintética se encuentra asociada al desarrollo de los cloroplastos, indispensables para el crecimiento y la supervivencia de las plantas, así como, también para la síntesis de isoprenoides plástidicosos (clorofilas y carotenoides) (Pogson *et al.*, 2015; Jensen y Leister, 2014). En *Arabidopsis* la mutación cloroplástica (*cla1-1*) y la mutación *wls-2297* en jitomate, obtenidos a través del marcado con T-ADN, desarrollaron fenotipos con plástidos defectuosos, de un menor crecimiento, y letales (García-Alcázar *et al.*, 2017; Estévez *et al.*, 2000). Así pues, el silenciamiento del gen *CLA1*, que codifica para la 1-desoxi-d-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXP sintasa), resulta crucial para la vía de biosíntesis de isoprenoides por la vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-P (MEP) y el desarrollo de las plantas (García-Alcázar *et al.*, 2017).

Hasta el momento, el mecanismo de formación del albinismo y el establecimiento de los patrones de variegación en plantas mono- y dicotiledóneas, es considerado un problema básico para la fisiología del desarrollo (Tsai *et al.*, 2017a; Yu *et al.*, 2007). Las

observaciones microscópicas en hojas variegadas, han demostrado que la morfología de los órganos y tejidos en las zonas con albinismo, se conservan en su mayoría (Aluru *et al.*, 2006). No obstante, en *immutans (im)* y *variegated2 (var2)*, se observó que los sectores verdes desarrollan un engrosamiento foliar, asociando principalmente al aumento en el volumen del espacio aéreo y al tamaño de las células epidérmicas y mesófilas (Wang *et al.*, 2018a; Tsai *et al.*, 2017b; Hu *et al.*, 2015; Aluru *et al.*, 2006).

Adicionalmente, otros defectos en el desarrollo del albinismo comprenden el desarrollo de tricomas, el cierre estomático y el cambio en el grosor de la epidermis incluyendo las regiones adaxial y abaxial, y la cutícula de la hoja (Zhang *et al.*, 2018b; Chao *et al.*, 2014). En *Oryza sativa*, la caracterización de *virescent-albino leaf 1 (val1)*, expuso una morfología foliar estrecha y curva, señalando que la expresión de los genes asociados al desarrollo del cloroplasto y el metabolismo de los pigmentos son esenciales para la fisiología del desarrollo (Zhang *et al.*, 2018b). Por otra parte, en cultivares albino, *pds2-1*, se comprobó que la interrupción del gen *HOMOGENISATE SOLANESYL TRANSFERASE (HST)*, desarrolla un fenotipo albino con defectos asociados a la programación celular de los meristemas, y cambios en la polaridad celular, condicionando el desarrollo y cierre de los estomas al perturbar la biosíntesis de carotenoides y del ácido abscísico (ABA) (Chao *et al.*, 2014).

En otros trabajos se asocian al componente genético, la variación epigenética como un controlador en la plasticidad fenotípica y en la adaptación de nuevos individuos en la variegación y albinismo (Us-Camas *et al.*, 2017; Meyer, 2015; Kinoshita y Seki, 2014; Iwasaki y Paszkowski, 2014; Kitada *et al.*, 2012). Si bien, la expresión génica puede ser modulada, ya sea por metilación de citosina e histonas específicas (modificaciones postraduccionales (PTM), además, el estado de metilación del ADN puede estar condicionado a la actividad de pequeños ARN de interferencia (Guarino *et al.*, 2015; Valledor *et al.*, 2015; Tricker *et al.*, 2012). En *A. angustifolia Haw*, el albinismo fue asociado a la disminución de los niveles de metilación del ADN de la planta madre (Duarte-Aké *et al.*, 2016). No obstante, la acumulación diferencial de la histona acetiltransferasa H3K9ac y otras marcas activadoras y represivas (Us-Camas *et al.*, 2017), sugirieron, un mecanismo de regulación rápida, e hipotéticamente reversible para la fotosíntesis en diferentes longitudes de luz (Valledor *et al.*, 2015).

Por otra parte, aunque, la funcionalidad de los microARNs es estudiada a través de algoritmos bioinformáticos que predicen sus blancos de acción (Zhang *et al.*, 2017; Djami-Tchatchou *et al.*, 2017; Kamthan *et al.*, 2015), que conducen a nuevos precursores específicos para el silenciamiento de genes en plantas y animales (Tang *et al.*, 2010). En cultivos de arroz, los microARNs conservados y artificiales (amiARN), fueron asociados al silenciamiento de genes, al modular rasgos agrónomicamente importantes como la fotosíntesis y el crecimiento vegetal (Warthmann *et al.*, 2008). Las familias de los microARNs altamente conservadas entre las plantas, se han asociado a la morfogénesis e identidad de los órganos (Gao *et al.*, 2017; Djami-Tchatchou *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2011). Por lo que, el sistema *in vitro* de *A. angustifolia* Haw, utilizado recientemente para la caracterización de genes asociados a la deficiencia de pigmentos fotosintéticos (Us-Camas *et al.*, 2017), representa un sistema útil para evidenciar a los microARNs conservados y asociados a la biología molecular en el desarrollo del plástidos, el linaje celular estomático y la eficiencia fotosintética (Wai *et al.*, 2017; Pulido y Laufs, 2010; De Meaux *et al.*, 2008).

En el presente trabajo, con el fin de entender los procesos involucrados en el albinismo de *A. angustifolia* Haw., se analizaron parámetros morfológicos, fisiológicos, moleculares, proteicos y epigenéticos en los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A).

Como primer acercamiento se analizó por microscopía óptica las hojas y base meristemáticas en los tres fenotipos. Así mismo, se determinaron los cambios fisiológicos, contenido de clorofilas y actividad fotosintética en plantas completas de los tres fenotipos. Se procedió al aislamiento de los cloroplastos y evaluación fotoquímica y microscópica en suspensiones celulares obtenidas de hojas en los tres fenotipos. Además, se analizó el nivel de expresión de genes involucrados en la fotosíntesis, desarrollo de cloroplastos y linaje celular estomático. Por último, se analizaron los niveles de expresión de los microARNs (miR166, miR173, miR398, miR408, miR824) asociados a la regulación de los genes *RuBisCo*, *CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN 2*, *CHLOROPLASTIC (LHCB)*, *AGAMOUS LIKE1 (AGL16)* y *ZEAXANTIN EPOXIDE (ABA1)*. Finalmente, con el fin de tener una mayor comprensión sobre la condición de albinismo estudiado, en el presente trabajo se describe por capítulos las diferencias morfológicas, en conjunto al análisis molecular y epigenético asociado a la afectación fisiológica encontrada. Por último,

mostramos por electroforesis de doble dimensión (2-DE) los niveles de expresión de proteínas, que varían notablemente entre los cultivos albinos de *A. angustifolia* Haw., sugiriendo que algunas proteínas pueden tener roles importantes en los eventos moleculares involucrados en el albinismo, como la PEP-carboxilasa y las proteínas de unión a las clorofilas como PSAD1/D2 y RuBisCo subunidad mayor.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 ALBINISMO EN LAS PLANTAS SUPERIORES

En las plantas, el albinismo es un crecimiento que incluye plántulas ligeramente verdes, con regiones verdes y blancas (variegadas), y/o completamente blancas (sin pigmentación) (Torp y Andersen, 2009; Spoehr, 1942). El albinismo interfiere con la fotosíntesis y reduce las posibilidades de sobrevivencia de las plantas ante la pérdida parcial o total de la clorofila (Tsai *et al.*, 2017b; Kumari *et al.*, 2009; Darlington, 1929). No obstante, como anomalía natural o mutación inducida, el grado del albinismo, exterioriza el estado pleiotrópico de los tejidos, afectando aún más las zonas blanquecinas o amarillentas de las hojas (Evenari, 1989). Por consecuencia, el crecimiento de nuevos individuos y la plasticidad de las células meristemáticas son incapaces de producir cloroplastos, por lo que el tejido ya no puede volver a ser verde (Sato *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2007; Sud y Dengler, 2000; Evenari, 1989).

En las últimas décadas, los mutantes albinos, han sido un recurso genético útil para el estudio de la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos, el desarrollo del cloroplasto y el crecimiento de tejidos y órganos (Chao *et al.*, 2014; Babiychuk *et al.*, 2011; Vencill *et al.*, 1989). Mediante el análisis de la clonación y el silenciamiento de genes involucrados en estos procesos, se observaron diferentes anomalías y los principales rasgos del albinismo en plantas mono- y dicotiledóneas (Zhao *et al.*, 2017; Shmakov *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2009). Además, los estudios sobre la morfología y la fisiología foliar albina, han mostraron que en monocotiledóneas (p. ej. trigo, maíz, arroz y agave), el albinismo se desarrolla de forma letal y/o con patrones simétricos (Tsai *et al.*, 2017b; Sud y Dengler, 2000), en contraste con las dicotiledóneas (p. ej. soja, fresa y *Arabidopsis*), donde se expone de forma prematura, aleatoria e inestable (Hu *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007).

Diversos estudios sobre el fenómeno del albinismo mencionan que, de manera natural, el albinismo puede ser un evento con una frecuencia muy baja (Torp y Andersen, 2009; Spoehr, 1942). En *Arabidopsis*, maíz y cebada, los resultados del mapeo genético identificaron una lista de las mutaciones o eliminaciones en el genoma plastídicos y en diferentes **loci** nucleares, asociados a los cambios fenotípicos en los plástidos y a la

aparición de la variegación y albinismo letal (Grübler *et al.*, 2017; Shmakov *et al.*, 2016; De Pascale *et al.*, 2003; Zubko y Day, 2002). Por ejemplo, en *Fagopyrum esculentum*, la eliminación parcial del brazo corto en el cromosoma 11 (40.3 kb), elimina al gen *Lta1*, un elemento clave para el desarrollo del cloroplasto y la fotosíntesis ante el estrés por temperatura (Peng *et al.*, 2012). Además, en *Nicotiana tabacum*, una mutación puntual en el gen que codifica para la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, subunidad mayor, afecta el ensamblaje de holoenzimas esenciales para la biogénesis del cloroplasto (García-Alcázar *et al.*, 2017).

En torno al albinismo, varios grupos de investigación comparten la hipótesis que en algún punto durante la formación de los patrones celulares, los plástidos normales y anormales se hallan juntos en las células "mixtas", sin embargo, debido a la naturaleza transitoria y asincrónica de las células meristemáticas se dificulta su estudio (Zhang *et al.*, 2018b; Serna, 2013; Bilsborough *et al.*, 2011; Evenari, 1989). En cultivares de *Arabidopsis* y en gramíneas, los estudios de identidad y mantenimiento de la hoja, la inducción a la sectorización verde-albino se desarrolla tras una serie de restricciones moduladores del linaje celular putativo, desencadenando la polarización anormal de "celdas mixtas" con plástidos defectuosos y cloroplastos normales (Ankele *et al.*, 2005; Evenari, 1989).

Por otra parte, la alteración estructural en las células del procambium durante el establecimiento del albinismo, se asocian al origen inicial de sectores blancos o amarillentos, observándose la reorganización en células del mesófilo con una oposición a las divisiones proliferativas de las cadenas vasculares (Evenari, 1989). En *Stenotaphrum secundatum*, se ha sugerido que el linaje celular meristemático y el sistema de comunicación entre las células de la vaina del haz y las células mesófilas, establecen un mecanismo de comunicación célula-célula controlador del destino celular y la división celular simétrica en función de señales ambientales (Hu *et al.*, 2015; Sud y Dengler, 2000).

1.2 FACTORES ASOCIADOS AL ALBINISMO EN LAS PLANTAS

La presencia del albinismo se ha observado en la naturaleza, no obstante, es un problema común en los cruces interespecíficos de anteras y la generación de haploides en sistemas *in vitro* (Zhao *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2013; Darlington, 1929). El albinismo se

encuentra asociado a diversos factores que condicionan la integridad del ADN, tales como los factores genotípicos y genéticos que controlan el genoma nuclear y el del cloroplasto, los factores ambientales (luz, temperatura y humedad) y la composición química del medio de cultivo (suplementación de varios aminoácidos y reguladores de crecimiento) (Shmakov *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2009). Sin embargo, la causa principal de muchos defectos de la pigmentación en progenies híbridas es la incompatibilidad interespecífica entre los genomas nuclear y plastidial (Zhao *et al.*, 2017).

A principios del siglo XX el estudio del albinismo en las especies de maíz (Rodríguez *et al.*, 2013; Vencill *et al.*, 1989; Spoehr, 1942), cebada (Zuo *et al.*, 2017; Döring *et al.*, 1999), trigo (Wang *et al.*, 2018b; Zhao *et al.*, 2017) y cultivares híbridos con características agronómicas deseables (Li *et al.*, 2018b; Borek *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2009), han destacado en la historia de la genética y la transmisión de variabilidad de rasgos, el descubrimiento de alteraciones en el ADN de los plástidos y las anomalías ultraestructurales de las laminillas de tilacoides, granas, plastoglobulos y presencia de almidón. Además, en los sistemas *in vitro*, la incidencia del albinismo se ha asociado a la edad y tamaño de los embriones, en los que el carácter genético de alelos recesivo y homocigotos conllevan al establecimiento de fenotipos albinos o pálidos (Torp y Andersen, 2009).

En otros casos, el crecimiento de fenotipos albinos puede alcanzar tamaños relativamente grandes, sin embargo, solo es capaz de sobrevivir en entornos de laboratorio, en donde el medio de cultivo suministre los nutrientes que normalmente producirían en sus hojas y raíces (Zhao *et al.*, 2017; Zuo *et al.*, 2017; Caredda *et al.*, 2000). En trigo y cebada se observó el desarrollo de hojas antes de agotar la reserva de energía, sin embargo, se menciona que la cantidad de reguladores del crecimiento almacenados, el daño físico y origen del tejido asociado de mutación genética, condicionan su supervivencia y crecimiento *in vitro* (Makowska y Oleszczuk, 2014; Mohiuddin *et al.*, 2011).

También, la obtención de plantas albinas se encuentra asociada a la duplicación irregular de cromosomas durante la embriogénesis de microesporas androgénicas en cereales y gramíneas (Zorenc *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2013; Mohiuddin *et al.*, 2011; Ankele *et al.*, 2005; Vencill *et al.*, 1989). Por ejemplo, en cruza de trigo y cebada los defectos fenotípicos del albinismo se asociaron a defectos genéticos heredados cromosómicamente del genoma

plastídico (Rodríguez *et al.*, 2013; Torp y Andersen, 2009; Döring *et al.*, 1999). Otros estudios de localización de genes y de variación alélica asociada con la variación de un carácter cuantitativo (QTL) analizado en cultivares de anteras en arroz, trigo y cebada, permitieron la identificación de varios genes que afectan el crecimiento y los rasgos morfológicos de cultivares híbridos (Shao *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2016b). Por otra parte, la relativa complejidad de los genes que afectan el rasgo y frecuencia de diferenciación de plantas albinas en arroz está asociada a los grupos cromosómicos 1 y 9 en arroz, y en trigo a los cromosomas homólogos del grupo 3 y 5 (Shao *et al.*, 2018).

De tal manera que, durante el albinismo, las alteraciones del ADN plastídico comprende eliminaciones del genoma plastídico del 50 – 80% de las regiones cercanas o dentro de las regiones invertidas al origen de replicación funcional (Kumari *et al.*, 2009; Mouritzen y Holm, 1994; Day y Ellis, 1985). En trigo y cebada la eliminación de 100 kpb del genoma plastídico conduce al establecimiento de plantas con albinismo letal y algunos fenotipos pueden no presentar el origen para la replicación funcional (Day y Ellis, 1985). No obstante, el albinismo se ha asociado principalmente a la herencia materna de plástidos y a diversas eliminaciones y, reordenamiento del genoma plastidial (Kumari *et al.*, 2009). Por otra parte, el papel de los ribosomas plastídicos y las proteínas de la superfamilia de repetición helicoidal, tetratricopéptidos y proteínas de repetición de pentatricopéptidos (PPR), en plantas con albinismo, indicaron nuevas interrupciones en genes asociados al cloroplasto (Zhang *et al.*, 2016; J. Hofinger *et al.*, 2000). Por ejemplo, en arroz *AL1* que codifica a una única proteína de repetición de octotricopéptidos (RAP), resultan en las variaciones fenotípicas y a una alta frecuencia de formación de plantas albinas letales (Zhang *et al.*, 2016).

De forma similar, en *albino leaf1 (al1)* de *Oriza sativa* y *rap mutant* en *Arabidopsis thaliana*, se determinó el papel de la polimerasa nuclear (NEP) y de la polimerasa plastídica (PEP) asociadas a la expresión de genes únicos codificados por el genoma plastídico (Börner *et al.*, 2015). Los resultados mostraron que el grado del albinismo en plantas se asocia a la funciones de NEP y la transcripción de los genes claves para las primeras etapas del desarrollo de los cloroplastos (p.ej. *rpoA*, *rpoB*, *rps4* y *rps7*) (Zubko y Day, 2002). Por otra parte, las funciones PEP son críticas para la transcripción exclusiva de genes para el transporte de electrones y claves en las etapa final del desarrollo del cloroplasto (p.ej. *ycf4*,

gun1, *psbA*, *psbD* y *rbcL*) (Huang *et al.*, 2013).

Durante el albinismo *in vitro*, la combinación de los componentes en el medio de cultivo, como la fuente de carbono (tipo de azúcares) y cantidades de reguladores del crecimiento vegetal ejercen un papel esencial en los procesos morfogénicos, e inclusive, simultáneamente influyen la regeneración de plantas verdes y/o albinas (Rodríguez *et al.*, 2013; Mohiuddin *et al.*, 2011; Torp y Andersen, 2009; Caredda *et al.*, 2000; Spoehr, 1942). En maíz, el crecimiento de la progenie albina, fue asociada a las concentraciones y tipo de carbohidratos suministrados al medio, aumentando el crecimiento significativo de la raíz y hoja (Knudson y Lindstrom, 1919). En cebada, la incidencia del albinismo androgénico se redujo al suplementar manitol en lugar de sacarosa al medio de cultivo (Makowska y Oleszczuk, 2014; Caredda *et al.*, 2000). Así pues, la influencia de los carbohidratos suplementado al medio de cultivo, además de resultar esencial para la fotosíntesis y el crecimiento de la planta (Scott *et al.*, 1995) participa activamente en la expresión del albinismo. Además, el tipo de azúcar utilizado sugiriendo un mayor control osmótico, induciendo en algunos casos la diferenciación inicial de plástidos normales (Wojnarowicz *et al.*, 2004).

Por otra parte, los reguladores del crecimiento resultan ser otro factor importante asociado al albinismo, ya que en gran medida el contenido y el equilibrio de los reguladores condiciona la morfogénesis *in vitro* y el crecimiento de las plantas (Solangi *et al.*, 2018; Kumari *et al.*, 2009; Schulze, 2007). Particularmente, las citocininas, ejercen un efecto clave para la división celular y el desarrollo de cloroplastos en las plantas (Cortleven *et al.*, 2017; Farber *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2007). Se ha mostrado que bajas concentraciones de citocininas naturales y sintéticas promueven la fotomorfogénesis y la conversión de etioplasto a cloroplastos (Cortleven *et al.*, 2016; Cortleven y Schmölling, 2015). P. ej., en híbridos de *C. arietinum* × *C. pinnatifidum* la adición continua de zeaxantina, produjo el reverdecimiento temporal en plantas albinas (Bae, 2001; Badami *et al.*, 1997). En fenotipos albinos de *Arabidopsis*, 2-isopentenil adenina y 6-benciladenina (6-BA), se relacionaron al inicio de la diferenciación de los plástidos (Solís *et al.*, 1989), mientras que en los cultivos albinos haploides de trigo y maíz el ácido indolacético (AIA) y la BA han sido asociados a la baja incidencia del albinismo (Byrne y Taylor, 1996). En resumen, elevadas o muy bajas concentraciones de citocininas naturales o sintéticas pueden afectar significativamente el

desarrollo de los cloroplastos y el mecanismo de degradación de la clorofila (Sosnowski *et al.*, 2019).

Es preciso señalar que, si bien el albinismo se encuentra en relación con las condiciones de crecimiento de la planta madre y los nutrientes, los factores ambientales como la luz y la temperatura juegan un papel muy importante (Kumari *et al.*, 2009). Estudios en cultivos albinos de *qiannianxue* y *xiaoxueya*, avena, cebada y fresa, han demostrado que existe una relación entre la frecuencia y el crecimiento de plántulas albinas a la temperatura y a la luz (Zhang *et al.*, 2018a; Wang *et al.*, 2016a; Rodríguez *et al.*, 2013; Y Du *et al.*, 2008). Se observó que bajas temperaturas (< 20 °C) inducen al albinismo, mientras que las temperaturas elevadas (> 20° C) promueven la biosíntesis de pigmentos en hojas albinas (Gould *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2018; Y Du *et al.*, 2008). Por ejemplo, la incidencia de albinismo en cultivo de fresa y las perturbaciones fisiológicas, resultan menor al 31% en un clima subtropical. Donde el cambio en la temperatura condiciona la acumulación de clorofilas y la ultraestructura de los cloroplastos, al reducir los niveles de aminoácidos y metabolitos (Cheng *et al.*, 2019; R Wang *et al.*, 2010; Y Du *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2006). En contraste, en arroz, temperaturas bajas originan un bloqueo en el desarrollo de cloroplastos y etioplastos, mientras que altas temperaturas conducen a plástidos poco diferenciados promoviendo el desarrollo de mínimas membranas tilacoidales (Shi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016b).

De otro modo, el albinismo puede ser asociado a la cantidad y calidad de la intensidad lumínica, induciendo cambios morfológicos y químicos, además de modificaciones transitorias o irreversibles en el mecanismo genético molecular (Cheng *et al.*, 2019; Shin *et al.*, 2018). En cultivares albinos de *Camelia sinensis*, fresa, y en la inducción de *td5* de arroz y *pap7-1* de *Arabidopsis*, se ha demostrado que la luz induce cambios en niveles de expresión de genes involucrados en la vía de carotenoides y clorofilas, así como, en la formación y el apilamiento de las granas y los tilacoides (Shin *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016; Mohiuddin *et al.*, 2011; Vencill *et al.*, 1989). De tal manera que la falta de síntesis de los pigmentos fotosintéticos lleva a daños irreversibles en el aparato fotosintético provocados por la acumulación de radicales libres, como son las especies reactivas de oxígeno (ROS)(Zakar *et al.*, 2016).

En *C. sinensis* y en *Arabidopsis*, el albinismo inducido por la luz, produjo niveles altos de violaxantina y niveles muy bajos de β -caroteno; por el contrario, en el albinismo inducido por la temperatura los niveles de violaxantina y β -caroteno se encontraron invertidos (Cheng *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2016a). Estos resultados muestran el papel funcional de los carotenoides para disipar el exceso de energía, sin embargo, la ausencia de clorofilas asociadas a plástidos anormales sugiere que en las plantas la intensidad luminosa conduce a un estado de hipoplasia en el que los plástidos suprimen el desarrollo de los tilacoides y las granas en el estado albino (Li *et al.*, 2018b; Hu *et al.*, 2015; Tanaka y Tanaka, 2011; Aluru *et al.*, 2006; Evenari, 1989). Todas estas evidencias muestran las múltiples vías que condicionan el desarrollo de los cloroplastos y la biosíntesis de la clorofila y que el estudio del mecanismo albinismo aún tiene muchas preguntas sin responder.

1.3 LOS CLOROPLASTOS Y SU FUNCIÓN EN LAS PLANTAS

1.3.1 Desarrollo y biogénesis

Los cloroplastos presentan un origen endosimbiótico entre cianobacterias fotosintéticas y hospederos eucarióticos (Reyes-Prieto *et al.*, 2007; Whatley, 1993). Las primeras observaciones de la envoltura de doble membrana de los plástidos, así como, su precursor “los proplástidos”, incoloros y contenidos en los meristemos se remontan a finales del siglo XVIII (Jensen y Leister, 2014; Waters y Langdale, 2009). Los cloroplastos son una parte integral en las células vegetales y desempeñan un papel esencial para la supervivencia y el crecimiento de las plantas (Armbruster *et al.*, 2011). En las monocotiledóneas (p. ej., trigo, cebada, maíz) el desarrollo del cloroplasto es observado como un gradiente a lo largo de la hoja, desde proplástidos iniciales hasta cloroplastos funcionales (Pogson *et al.*, 2015; Aluru *et al.*, 2006). Por otro lado, en las dicotiledóneas, el desarrollo del cloroplasto está asociado al origen de sus cotiledones, en primera instancia, cuando emergen del suelo e inicia la fotomorfogénesis y, en segundo lugar, cuando no emergen de la semilla y el reverdecimiento ocurre exclusivamente en las hojas verdaderas (Barton *et al.*, 2018; Pogson *et al.*, 2015).

El desarrollo pleomorfo del cloroplasto ocurre en paralelo con la biosíntesis de clorofila y además de la fotosíntesis, en los cloroplastos se lleva a cabo la biosíntesis de carotenoides, ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas e isoprenoides (Pogson *et al.*, 2015; Jensen y

Leister, 2014). En *Arabidopsis* se demostró que la comunicación intercelular de las células del mesófilo y células de la vaina resulta crucial para el desarrollo y funcionalidad del cloroplasto (Barton *et al.*, 2018; Maple y Møller, 2006). Lo que sugiere que las células del mesófilo poseen un mayor número de cloroplastos establecidos en torno a la vacuola central de la célula (Majeran *et al.*, 2008; Bisalputra *et al.*, 1969). Sin embargo, el número de cloroplastos presente en la célula está asociado al tipo de célula y tejido de la planta, no obstante y con excepción de las células guarda, las plantas no contiene cloroplastos en su capa epidérmica (Pogson *et al.*, 2015).

En 1885, el proceso de conversión y maduración de los plástidos descrito por Schimper (Schimper, 1885; Schimper, 1883), sentó las bases de la formación del almidón (Gunning *et al.*, 2006). De tal manera, cada plástido se diferencia por su composición y función especializada, p. ej., los cloroplastos a la clorofila, los cromoplastos a la luteína, -caroteno, violaxantina y los leucoplastos al alto contenido de almidón (Pogson *et al.*, 2015; Barsan *et al.*, 2010; Finkemeier y Leister, 2001). Por lo tanto, la diferenciación y estado de conversión del cloroplasto llega a considerarse como una entidad separada, pero esencial, en la célula vegetal y el establecimiento del tejido que los contiene (Pogson *et al.*, 2015).

La diferenciación del cloroplasto comienza cuando los proplástidos se agrandan y se desarrollan los tilacoides y las granas, por lo cual es un proceso que requiere la participación de muchas proteínas (Maple y Møller, 2006; Clément y Pacini, 2001; Finkemeier y Leister, 2001). En plantas etioladas de *Arabidopsis* se demostró que el cuerpo prolamelar (PLB) es imprescindible para la formación de los protilacoides, a lo cual la luz fue un factor crucial para la diferenciación estructural del tilacoide (Kwok y Hanson, 2004b; Higa *et al.*, 2014). Por otro lado, el desarrollo del tilacoide y de las membranas lipídicas, bajo la coordinada regulación molecular de genes que codifican a las diferentes metaloproteasas FtsH, resulta ser primordial para las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis (Zhang *et al.*, 2018b; Zuo *et al.*, 2017; Mohiuddin *et al.*, 2011; Miura *et al.*, 2007; Darlington, 1929).

Si bien, no ha sido caracterizado en su totalidad el sistema de señalización y las complejas redes moleculares que comprende la biogénesis del cloroplasto, sabemos que es un proceso que se asocia a la cantidad y calidad de luz (Pogson *et al.*, 2015; Aluru *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2001). En conjunto, los estudios bioinformáticos, genómicos funcionales y

comparativos entre los genomas (núcleo y cloroplasto), demuestran que el ADN del cloroplasto (ADNcp) presentó un menor número de genes y la mayoría de los genes necesarios para el desarrollo del cloroplasto se encuentran en el genoma del núcleo (Pogson *et al.*, 2015; Armbruster *et al.*, 2011; Waters y Langdale, 2009; Pogson *et al.*, 2008; Zubko y Day, 2002).

El propio ADNcp contiene genes conservados y críticos para la regulación de la vía biogénica del cloroplasto, ya que permite codificar cerca de 120 proteínas vitales para el desarrollo y función del cloroplasto (Shanmugabalaji *et al.*, 2018; Babiychuk *et al.*, 2011; Kahlau y Bock, 2008; Bauer *et al.*, 2001). No obstante, la cantidad de proteínas nucleares dirigidas al desarrollo y función del cloroplasto son aproximadamente entre 2,500 a 3,500 (de Luna-Valdez *et al.*, 2014; Aluru *et al.*, 2006). En los últimos años, se ha demostrado la importancia de la expresión coordinada y única de genes transcritos a través de la polimerasa nuclear (NEP) y la polimerasa plastídica (PEP) y además de la actividad transcripcional de moléculas de ARN como; el ARN de transferencia (ARNt), el ARN ribosómico (ARNr) y el contenido de pequeños ARNs no codificantes (Börner *et al.*, 2015; de Luna-Valdez *et al.*, 2014).

La señalización recíproca establecida entre el núcleo y el cloroplasto condiciona el balance de la información transmitida entre los dos genomas, guiando el ensamblaje adecuado de las moléculas necesarias para formar un cloroplasto fotosintéticamente activo y funcional (Pogson *et al.*, 2008). Estudios moleculares han contribuido a la caracterización de las señales de retroalimentación, sugiriendo que la actividad en cada tipo de plástido, incluidas las señales establecidas durante la biogénesis, determinan los cambios en el estado funcional o daño (Zubo *et al.*, 2018; Waters y Langdale, 2009; Pogson *et al.*, 2008).

Finalmente, los factores ambientales, luz, temperatura y los reguladores del crecimiento vegetal influyen en el desarrollo del cloroplasto, afectando en gran parte el proceso biogénico y la interacción entre el desarrollo de órganos y la diferenciación de los plástidos (Waters y Langdale, 2009; Bauer *et al.*, 2001). En plantas monocotiledóneas, el mecanismo molecular del cloroplasto presenta una regulación diferencial en las zonas adaxial y abaxial de la hoja, en consecuencia el sistema de señalización recíproca está asociado a la producción de complejos proteicos críticos para el control del proceso de maduración del

cloroplasto (Wang *et al.*, 2016b; Pogson *et al.*, 2015; Balzan *et al.*, 2014). En arroz la mutación *chr4* y *midrib1 (am1)* y la remodelación de la cromatina son factores que condicionan la actividad de la cadena del transporte de electrones fotosintético en el lado adaxial de la hoja, en donde una selectiva desregulación en genes codificados por el genoma del cloroplasto delimitan irregularidades en la nervadura central de la hoja y la biogénesis del cloroplasto (Barton *et al.*, 2018; Zubko y Day, 2002; Mouritzen y Holm, 1994; Day y Ellis, 1985; Darlington, 1929).

1.3.2 Los cloroplastos y el albinismo

El albinismo conceptualmente es entendido como la incapacidad de una planta para producir cloroplastos y llevar a cabo la fotosíntesis. Las observaciones microscópicas en hojas con albinismo, variegación, etiolación y/o clorosis, evidencian el grado de afectación de la biogénesis del cloroplasto, las alteraciones estructurales y las fotosintéticas (Waters y Langdale, 2009; Yu *et al.*, 2007). A la par, los diversos estudios genéticos y moleculares han llevado a la determinación de una lista de factores transcripcionales y genéticos relacionados con la desregulación genómica, como determinantes en el mecanismo de la variegación (Shin *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2017; Shmakov *et al.*, 2016; Miura *et al.*, 2007; Evenari, 1989).

Dunford y Walden (1991) demostraron que la reducción en los niveles transcripciones asociados a los plástidos y los genes nucleares, así como la incompatibilidad genómica, son los principales factores desencadenantes del albinismo, sin embargo, el nivel de afectación en el ADNcp establece la gran variabilidad entre los patrones del albinismo. Durante la última década, los fenotipos con deficiencia de clorofila y albinismo letal, han permitido caracterizar los diferentes niveles de expresión de diversos genes involucrados en la floración, la biosíntesis de plastoquinonas (PQ), Chl a y b, giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA) y carotenoides, revelando el papel crítico de la ruta biosintética del metileritritol fosfato (MEP) en el control de la biosíntesis de isoprenoides y el desarrollo del cloroplasto (Xing *et al.*, 2010).

En las plantas, la aclimatación y los estados de conversión de un plástido a cloroplasto funcional, se encuentra determinado principalmente por las condiciones de la intensidad y

calidad de la luz, condicionando la eficiencia fotosintética y los estados de fotoprotección en el fotosistemas PSII (Grieco *et al.*, 2012). Por otra parte, la exploración de los genomas del cloroplasto y nuclear en plantas y en *Chlamydomonas reinhardtii*, han sugerido la clasificación de los principales genes del cloroplasto en tres grupos; I) Los genes codificadores de varias subunidades del complejo fotosintético del fotosistema I (PSI) y del fotosistema II (PSII), el complejo citocromo b6f, de la ATP sintasa, la ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo) y factores del ensamblaje de algunos de estos complejos. II) Genes codificadores de las subunidades de la ARN polimerasa dependiente de ADN plástidico (PEP), la actividad de ARNr y ARNt y, el factor de elongación EF-Tu esencial para la biosíntesis de proteínas y III) Genes relacionadas con el proceso de la proteólisis, la unión de clorofilas, grupos hemo y el metabolismo general (Ramundo *et al.*, 2013; Espineda *et al.*, 1999). Sin embargo, actualmente todavía se están identificando otros genes con funciones aún desconocidas.

Los esfuerzos realizados para caracterizar el albinismo de forma más detallada han conducido a estimar los niveles estables del ARN transcrito a partir de genes determinantes de la biogénesis de los plástidos y de las proteínas localizadas en los plástidos (Kusumi y Iba, 2014; Han *et al.*, 1993; Dunford y Walden, 1991). Sin embargo, al examinar a los cloroplastos y las múltiples copias de su genoma, el albinismo letal podría establecerse en forma posterior a la interrupción génica en todas las copias de genes particulares (Yu *et al.*, 2014). En *Hordeum vulgare* y *Arabidopsis*, la mutación puntual del alelo del cromosoma 3H, asociado a la síntesis de clorofila a través del gen *Alm*, evidenció que no todos los cambios observados entre las líneas mutantes se encuentran asociados funcionalmente con los cambios fenotípicos del albinismo parcial y/o letal (Yu *et al.*, 2007; Rodermel, 2002). En *O. sativa*, a través de la hibridación genética la mutante *seedling leaf albino (sla)*, exhibió el desarrollo anormal de los cloroplastos en las primeras hojas de las plántulas. Sin embargo, el reverdecimiento gradual fue asociado al gen mitocondrial *OsBT1-3*, el cual codifica para proteínas necesarias de la envoltura del cloroplasto (Hu *et al.*, 2017). Por otra parte, en *Arabidopsis*, el análisis de la mutante *asd* reveló que el gen de la proteína ribosomal 60S-L21-1, es necesario para el desarrollo del cloroplasto y el proceso de la embriogénesis (Yin *et al.*, 2011).

Otros estudios, en mutante albinos, han descrito que el desarrollo estructural anormal de

los cloroplastos y plástidos contenidos en los sectores blancos y/o amarillentos, además de tener un déficit de pigmentos (clorofila y/o carotenoides), presentan un incremento en el estado foto-oxidativo, grandes núcleos, membranas vacuoladas globulares, desarrollo incompleto de membranas internas y cuerpos prolamelares, característicos de los etioplastos y/p leucoplastos (Sakamoto *et al.*, 2009; Foudree *et al.*, 2012). Por lo tanto, el avance en el estudio molecular, proteómico y metabolómico en mutantes albinas han conducido a varios de los complejos proteicos como las metaloproteasas dependientes de ATP, la oxidasa plastoquinol, el complejo proteicos D1 (PSII), los tetatricopéptidos repetidos de proteínas y la diferenciación estructural incompleta de los tilacoides y sus membranas, como esenciales para el funcionamiento del fotosistema y el desarrollo de las membranas tilacoidales (Kato *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014).

En *N. tabacum*, el mutante albino *ali* con hojas desprovistas de cloroplastos normales y plástidos con membranas tilacoidales indiferenciadas, está asociado a los niveles transcripcionales indetectables de genes plastídicos; *rbcL*, *psbA* y *psbD-psbC*, sugiriéndose como elementos para la conversión y desarrollo ultraestructural del cloroplasto (Bae *et al.*, 2001). Por otra parte, las eliminaciones anotadas en el genoma del cloroplasto, incluyendo a los loci de los ADNr 23S y 16S, reducen en gran medida el grupo de los genes reguladores de los sistemas fotosintéticos PSI y PSII (Waters y Langdale, 2009; De Santis-Maciossek *et al.*, 1999). P. ej., el silenciamiento de los genes *rpoA*, *rpoB* y *rpoC1* en las líneas transgénicas de tabaco, muestran una novedosa maquinaria de transcripción que transcribe genes preferentemente asociados a la fotosíntesis (Börner *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2014; Bae *et al.*, 2001).

En *Arabidopsis*, maíz y trigo, los estudios en mutantes transitorias muestran la estrecha relación entre el contenido de pigmentación y la biogénesis del cloroplasto con las etapas de maduración de las hojas (Tanaka *et al.*, 2008; Oster y Rüdiger, 1997). La experimentación a través del silenciamiento transitorio y la recombinación homóloga, condujeron a la identificación de marcadores plastídicos seleccionables y de eliminación para cointegrar o cotransformar en el genoma blancos de la fotosíntesis, el metabolismo, resistencia a antibióticos y herbicidas (**Tabla 1.1**) (Day y Goldschmidt-Clermont, 2011). Por ejemplo, el marcador *aadd*, utilizado durante la recombinación y segregación del ADNcp, determinó de manera transitoria el rasgo marcador en genes de la fotosíntesis a través de

la mezcla de copias genómicas interrumpidas como desencadenantes de una baja actividad fotosintética y una biogénesis del cloroplasto interrumpida (Bendich, 1987).

Además, en *Arabidopsis*, la exploración del desarrollo de cotiledones y hojas verdaderas a través de los mutantes *pale green albino (alb1)*, *alb3 (type-2 white)*, *cotiledón albino (sco)*, *yellow variegated (var)*, e *inmutants (im)*, han propuesto que el desarrollo de los cloroplastos difiere entre los órganos y las especies según la especialización de los tejidos y la etapa de desarrollo (Wang *et al.*, 2018b; Tsai *et al.*, 2017b; Shmakov *et al.*, 2016; Oster *et al.*, 2000). En estos estudios los niveles bajos de clorofilas demostraron que numerosos genes se expresan temporalmente durante el desarrollo temprano de la hoja y la reducción de las transcripciones relacionadas con plástidos es independiente a los patrones de alteración del ADNcp albino y variegado. P. ej., niveles poco detectables de los factores de transcripción de la familia GLK y MYB son considerados elementos reguladores para el proceso de división de cloroplastos y la biosíntesis de clorofila; sin embargo, la sobreexpresión de estos conduciría al desarrollo de plástidos anormales en hojas variegadas (Zubo *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2017).

En general, las condiciones ambientales (humedad, luz, CO₂ y temperatura) se han relacionado con los defectos del crecimiento en mutantes con albinismo transitorio, sin embargo, los defectos más dramáticos analizados en dobles mutantes, han demostrado que el bloqueo letal de los genes plastídicos conducen a la inactivación de los procesos realizados en el cloroplasto, como el transporte de electrones y la fotosíntesis (Zhang *et al.*, 2018b; Shin *et al.*, 2018; Zorenc *et al.*, 2017; Xing *et al.*, 2010). P. ej., en *Arabidopsis* y maíz, el restablecimiento de los complejos proteicos en los tilacoides durante las transiciones del estado fotosintético presentaron un patrón de fosforilación en las proteínas LHCII y PSI, lo que altera el funcionamiento fotosintético y produce la interrupción de la biogénesis del cloroplasto (Koskela *et al.*, 2018). La mutante total *NUCLEAR SHUTTLE INTERACTING (ns)*, con una interrupción en la lisina acetiltransferasa (Lys ac), en los cloroplastos, desencadena bajos niveles del complejo PSI-LHCII, el cual es esencial para la transición de plástidos al estado maduro y funcional del cloroplasto (Koskela *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2014b).

Además, el análisis de las propiedades funcionales de la envoltura interna y externa de los

cloroplastos condujeron a la caracterización de los canales en las membranas de los tilacoides evidenciando las funciones de los antiportadores de flujo de potasio (KEA) en el desarrollo de los cloroplastos (Sheng *et al.*, 2014). En arroz, el fenotipo mutante *albidribina albina 1 (am1)* muestra el papel de la vía de los antiportadores en el cloroplasto, indicando que el desarrollo del cloroplasto se encuentra combinado en algunas especies al factor del déficit hídrico o sequía (Aranda-Sicilia *et al.*, 2016; Sheng *et al.*, 2014).

La caracterización del albinismo en plantas susceptibles a la luz y temperatura, ha conducido a la identificación de un grupo denominado pentatricopéptidos repetidos de proteínas con codificación nuclear (PPR), como esenciales al procesamiento, empalme, edición, estabilidad, maduración y traducción del ARN en el cloroplasto (Liu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2016). En arroz, el empalme anormal de *rpl2* y *rps12* inhibe la producción de ribosomas funcionales en el cloroplasto y en consecuencia la señalización recíproca de los cloroplastos al núcleo es desregulada (Liu *et al.*, 2018). De esta forma, la integridad y funcionamiento de las PPR, condiciona la vía de síntesis de las proteínas plastídicas y al desarrollo del cloroplasto; además, la actividad de los PPR en diferentes tejidos destaca esencialmente la complejidad funcional y su papel en la regulación del desarrollo del cloroplasto (Waters y Langdale, 2009).

Tabla 1.1. Marcadores seleccionables en genes esenciales del cloroplasto para transformación a través de la ingeniería de plástidos.

Marca	Selección	Organismo	Referencias
Fotosíntesis			
<i>atpB</i>	Photoautotrophy	Chlamydomonas	<u>Boynton et al. (1988)</u>
<i>psaA/B</i>	Photoautotrophy	Chlamydomonas	<u>Redding et al. (1998)</u>
<i>petB</i>	Photoautotrophy	Chlamydomonas	<u>Cheng et al. (2005)</u>
<i>petA, ycf3, rpoA</i>	Photoautotrophy	Tobacco	<u>Klaus et al. (2003)</u>
<i>rbcL</i>	Photoautotrophy	Tobacco	<u>Kode et al. (2006)</u>
Metabolismo			
<i>BADH</i>	Betaine aldehyde	Tobacco	<u>Daniell et al. (2001b)</u>
<i>codA</i>	5-fluorocytosine	Tobacco	<u>Serino and Maliga (1997)</u>
<i>ARG9</i>	Arg autotrophy	Chlamydomonas	<u>Remacle et al. (2009)</u>
<i>ASA2</i>	Trp analogues	Tobacco	<u>Barone et al. (2009)</u>

Resistencia a antibióticos			
<i>rrnL</i>	Erythromycin	Chlamydomonas	<u>Newman et al. (1990)</u>
<i>aadA</i>	Spectinomycin	Tomate, chlamydomonas	<u>Goldschmidt-Clermont (1991)</u>
<i>nptII</i>	Kanamycin	Tobacco	<u>Carrer et al. (1993)</u>
		Cotton	<u>Kumar et al. (2004b)</u>
<i>aphA-6</i>	Kanamycin, amikacin	Chlamydomonas	<u>Bateman and Purton (2000)</u>
	Kanamycin	Tobacco	<u>Huang et al. (2002)</u>

1.3.3 Regulación redox en el cloroplasto

La luz es el estímulo ambiental más importante para el desarrollo de los cloroplastos. No obstante, una iluminación elevada produce perturbaciones para la producción de NADP⁺ afectando el Ciclo Calvin-Benson (CBC) (Wangs *et al.*, 2014; Waters y Langdale, 2009). Bajo condiciones fisiológicas normales el cloroplasto dispone de sistemas antioxidantes que lo protegen de los radicales libres, siendo sus elementos claves la superóxido dismutasa y el complejo ascorbato peroxidasa/glutati6n reductasa, que asociados a los tocoferoles y carotenoides, son capaces de detener la peroxidaci6n de lípidos y otros compuestos (Pogson *et al.*, 2015; Bisalputra *et al.*, 1969).

En la actualidad, la cantidad de proteínas sensibles a la regulaci6n redox identificadas en los cloroplastos está mucho más allá de las enzimas moduladoras del CBC, ya que el ajuste y la coordinaci6n entre el estroma y los tilacoides impactan la fotomodulaci6n de enzimas durante el ciclo de asimilaci6n del carbono (Michelet *et al.*, 2013). Se ha identificado que la regulaci6n redox dependiente de la luz en los cloroplastos se encuentra mediada por las tiorredoxinas (Trxs) y las propiedades funcionales del grupo tiol de las cisteínas (Cejudo *et al.*, 2019). Por lo cual, el estudio del mecanismo dependiente de la luz ha llevado a la identificaci6n de los transmisores de la seÑalizacion, como las proteínas ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR) y la proteína disulfuro reductasa tiorredoxina (Trx) (Bernal-Bayard *et al.*, 2012; Dangoor *et al.*, 2012). Además, se sabe que las modificaciones de la cisteína controlan varias funciones de luz, característicamente de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa citos6lica (GAPDH) y las isoformas cloroplásticas de la GAPDH involucradas en el CBC, que también se encuentran sometidas a múltiples modificaciones postraduccionales redox (Michelet *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2012).

La regulaci6n redox afecta la mayoría de los procesos que se llevan a cabo en el cloroplasto al ser un mecanismo regulador esencial de adaptaci6n y utilidad ante diferentes condiciones de luz (Michelet *et al.*, 2013; Dangoor *et al.*, 2012). En *Arabidopsis* el papel funcional de otras Trxs en el cloroplasto, evidenci6 al dominio NTR albergado en la Trx reductasa dependiente de NADPH como un factor de incremento al poder reductor en los tilacoides y su inhibici6n lleva a un grave deterioro en el estado redox del cloroplasto (Pulido *et al.*, 2010; Collin *et al.*, 2003). Por otra parte, el dominio NTR en NTRC también conducen a la

transferencia de equivalentes reductores de NADPH a Trxs plastídicos (Toivola *et al.*, 2013). Además, las Trxs también desempeñan un papel importante en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la homeostasis redox en el cloroplasto (Jensen y Leister, 2014).

Para las plantas, el efecto tóxico provocado por especies químicas altamente reactivas (ROS) durante la reducción del oxígeno molecular (O₂), se produce en varios compartimentos celulares, principalmente en cloroplastos y mitocondrias (Dangoor *et al.*, 2012). Sin embargo, en condiciones adversas, la concentración ROS aumenta y supera las capacidades de los sistemas antioxidantes del cloroplasto (Cejudo *et al.*, 2019). De tal manera, las diversas isoformas de Trx, parecen estar específicamente involucradas en la respuesta al estrés oxidativo y en el mantenimiento de la homeostasis de ROS (Collin *et al.*, 2003). Por otra parte, los radicales hidroxilo (OH) formados a través de la reacción de Fenton, son moléculas altamente reactivas que conducen a daños oxidativos al iniciar la peroxidación de los lípidos de las membranas y la oxidación de las proteínas (Zakar *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2013; Miura *et al.*, 2010; Lake *et al.*, 2002).

Por lo tanto, el balance redox refleja el estado funcional del cloroplasto así como la capacidad de regular la expresión y actividad de distintas proteínas cloroplásticas, de tal manera que el nivel de transcripción y de la expresión coordinada de los genes de los PS I/II se encuentran condicionados a la oxidación de la plastoquinona (Anderson *et al.*, 1997; Anderson y Avron, 1976).

1.3.4 Biosíntesis de la clorofila

Las clorofilas (Chl), son pigmentos fotorreceptores de la maquinaria fotosintética, su papel resulta esencial dentro de la primera etapa de la transformación y transferencia de la energía lumínica en energía química (van Campen *et al.*, 2016; Tanaka y Tanaka, 2011). La formación de las clorofilas en las plantas resulta compleja, ya que intervienen cerca de 17 enzimas (Tripathy y Pattanayak, 2012; Alawady y Grimm, 2005). La vía de biosíntesis de las clorofilas se encuentra dividida en cuatro etapas: (A) la síntesis de ácido 5-aminolevulínico (ALA), el precursor de Chl y el grupo hemo; (B) la formación de tetrapirroles, a partir de la formación de un porfobilinógeno del anillo pirrol que da inicio con la reacción de condensación de dos moléculas de ALA y el ensamblaje de cuatro pirroles para la

síntesis del primer tetrapirrol cerrado con inversión del anillo D, definido como uroporfirinógeno III; (C) síntesis de la protoporfirina IX a través de una serie de reacciones de descarboxilación y oxigenación, y (D) inserción del Mg en la estructura de la protoporfirina IX (PPIX) y conduciendo a la formación de la Chl (Hung *et al.*, 2010; Rissler *et al.*, 2002; Castelfranco y Beale, 1981; Benz y Rüdiger, 1981)

Sabemos que la mayoría de las moléculas moduladoras de la biosíntesis de la clorofila se encuentran recluidas en los cloroplastos, precisando además de la sincronización entre la información genómica del cloroplasto y la del núcleo (Tanaka *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, la caracterización molecular y proteómica de la biosíntesis de las clorofilas muestran que hay enzimas en el cloroplasto que son esenciales para la funcionalidad de las moléculas de Chl necesarias para los fotosistemas I y II, así como para el transporte de los electrones que inducen la conversión de la luz en energía química y que se conserva en la forma de NADPH₂ y ATP (Tripathy y Pattanayak, 2012; Alawady y Grimm, 2005; Von Wettstein *et al.*, 1995).

La organización en las membranas especializadas dentro de los cloroplastos resulta ser fundamental para la producción eficiente de la energía fotosintética (Tanaka y Tanaka, 2011). El estudio de la regulación bioquímica y molecular de la biosíntesis de la clorofila han permitido determinar la importancia de diversas etapas, como la biosíntesis del 5-aminolevulinato, el anillo de pirrol, la cadena de tetrapirrol y la formación del anillo tetrapirrol, todos ellos necesarios para la síntesis de la protoclorofila, así como la importancia de las proteínas de unión a clorofila y su papel para el desarrollo de los cloroplastos (Hsieh y Goodman, 2005; Liu *et al.*, 2012). Esta ruta de biosíntesis de las clorofilas, localizada en los plástidos, tiene un paralelo en la mitocondria con la biosíntesis del grupo hemo, así como otras enzimas esenciales para la correcta regulación de esta vía (Kim *et al.*, 2005).

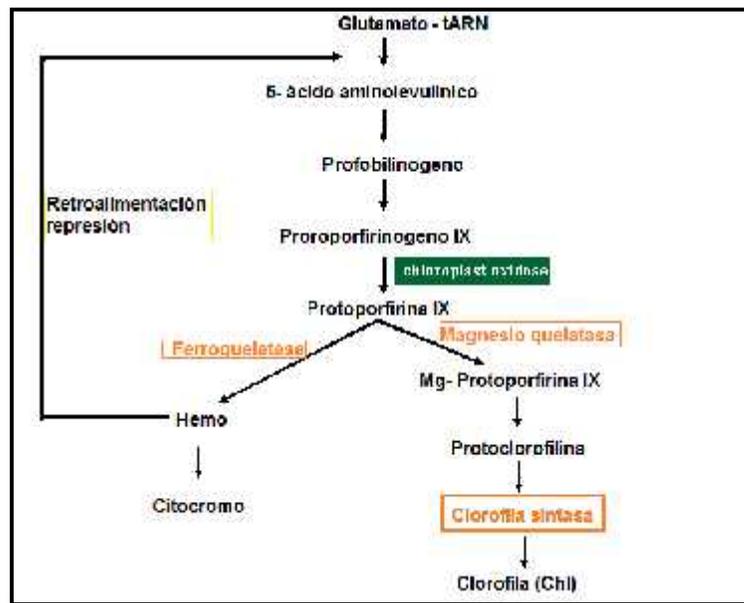


Figura 1.1. Ruta de biosíntesis de la clorofila en plantas. El diagrama muestra los componentes principales de la ruta metabólica de la clorofila. Las enzimas en los recuadros de colores indican los componentes que han sido mayormente relacionado en el desarrollo de fenotipos albinos en plantas. Modificado de Liu *et al.* (2012).

Por otra parte, las enzimas que participan durante la biosíntesis de clorofilas se encuentran codificadas por genes nucleares que ayudan en su totalidad al desarrollo de esta vía, determinado por lo tanto la existencia de una estrecha coordinación entre la expresión génica nuclear y la plastídica (Matsumoto *et al.*, 2004). Otras regulaciones tipo transcripcional, postraduccionales y elementos cis- α abajo contribuyen al control en el metabolismo de las clorofilas (Kumar y Soll, 2000). El estado de equilibrio final del contenido de clorofila en un tejido es el resultado del equilibrio entre el anabolismo y el catabolismo de esta molécula (Baker, 2008). Sin embargo, cambios inducidos por factores bióticos y abióticos interrumpen este equilibrio, generando bloqueos durante su biosíntesis, p. ej., la inhibición de precursores, déficit en el contenido hemo, así como inestabilidad transcripcional de los genes y actividades enzimáticas claves en la ruta de biosíntesis de clorofila (Hsieh y Goodman, 2005; Liu *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2013).

Múltiples estudios se han enfocado en el papel que desempeñan diversos factores genéticos y ambientales sobre las vías de regulación de la biosíntesis de la clorofila y en

consecuencia la actividad fotosintética, aun así, poco se sabe sobre el mecanismo proteómico, genético y molecular en el desarrollo y estabilidad de esta ruta, esencial para el correcto funcionamiento de los fotosistemas I y II (Barneche *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha demostrado el papel clave que tiene el balance entre los complejos fotosintéticos y las subunidades del fotosistema I (PSI), el fotosistema II (PSII), el complejo de recolección de luz del fotosistema I (LHC I) y el complejo de recolección de luz del fotosistema I (LHC II), para la eficiencia fotosintética (Qin *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008). P. ej., la acumulación de clorofila libre y la regulación inespecífica en la expresión del gen inducible por luz (*Elip*) y su proteína conducen a la generación de ROS y en consecuencia la aparición de tejidos cloróticos (Rodríguez *et al.*, 2013).

1.3.5 Fotoinhibición, Fotoprotección y Fotoinactivación

La fotoinhibición es definida como la disminución de la tasa fotosintética como consecuencia de un daño en el aparato fotosintético ante una radiación excesiva (Li *et al.*, 2018a; Anderson *et al.*, 1997). Otro término asociado a la fotoinhibición es la caída de eficiencia máxima del PSII, un parámetro fotoquímico estimado por la disminución de la fluorescencia variable (F_0) y no reversible en la oscuridad (Jones y Kok, 1966). En este sentido, en las plantas, el sistema de fotoprotección es por lo tanto una variable que depende de la luz y de carácter reversible, de tal manera que los procesos fotoquímicos, indican la disminución de la señal a través de la relación entre la fluorescencia variable / fluorescencia máxima (F_v ; señal de fluorescencia en la oscuridad F_0/F_v) (Pinnola y Bassi, 2018; Davis y Hangarter, 2012; Anderson *et al.*, 1997). Por otra parte, la estabilidad del coeficiente de extinción no fotoquímico (q/N y NPQ), está asociado a la tasa de disipación térmica sobre el exceso de energía a nivel del PSII, es un proceso de fotoprotección, ya que puede prevenir la fotoinactivación, disminuyendo la presión de excitación en el centro de reacción del PSII (Gould *et al.*, 2018; Choudhury y Behera, 2001).

Varios estudios han expuesto más de un mecanismo para explicar la fotoinactivación (Derks *et al.*, 2015; Vass, 2012). Se le ha asociado a la disrupción en la síntesis de las proteínas asociadas al centro de reacción del PSII, un fenómeno dependiente de la luz, e involucrando a procesos fotoquímicos primarios lentamente reversibles (Derks *et al.*, 2015). La sobreexcitación del aparato fotosintético, en condiciones de intensidad luminosa excesiva,

puede conducir a la pérdida de la función del centro de reacción del PSII, en consecuencia el aumento de F_0 podría encontrarse correlacionado a la disminución de las proteínas funcionales, principalmente la proteína D1, clave en los centros de reacción del PSII (Moualeu-Ngangue *et al.*, 2017; Jensen y Leister, 2014; Lake *et al.*, 2002). La pérdida funcional y estructural en los cloroplastos genera en los centros de reacción del PSII un proceso de pérdida en la cantidad de fotones absorbidos (Anderson *et al.*, 1997; Oberhuber y Bauer, 1991).

En *Arabidopsis*, la caracterización sobre la funcionalidad de los centros de reacción ha conducido al entendimiento de la desregulación en la síntesis de proteínas en el cloroplasto e inhibición de la función de las membranas tilacoidales (Jensen y Leister, 2014; Sganga y Bauer, 1992). Esto pone en evidencia que el grado de fotoinactivación refleja el equilibrio químico entre daño y reparación de los centros de reacción (Anderson *et al.*, 1997). Por ejemplo, el aumento de F_0 asociado a la fluorescencia en las antenas de recolección de luz sugiere que cuando el centro de reacción es inactivado por intensidades lumínicas elevadas, produce cambios en el contenido de clorofila b, xantofilas y carotenoides (Vass, 2012; Green y Parson, 2003). La fotoprotección involucra cambios claves en los niveles de regulación de las antenas fotosintéticas, pero, además el mecanismo de fotoprotección podría minimizar el nivel de fotoinactivación, e inclusive se ha demostrado que ambos procesos pueden superponerse (Li *et al.*, 2018a).

1.4 DESARROLLO FOLIAR: EPIDERMIS Y ESTOMAS

La epidermis de la hoja es esencial para la supervivencia de plantas mono- y dicotiledóneas, no solo por su papel protector ante factores ambientales, sino también por las funciones cruciales del desarrollo (Nelissen *et al.*, 2016). Las hojas de las monocotiledóneas típicamente son estrechas y alargadas con venas paralelas, mientras que en el caso de las hojas de las dicotiledóneas son generalmente más redondas con venas reticuladas (Nelissen *et al.*, 2016; Gonzalez *et al.*, 2012). La anatomía foliar comprende varios procesos asociados a la expansión celular e interconexión con los ciclos de división celular, que determinan la proliferación de las células epidérmicas, patrones de celulares y respuestas fisiológicas (Tao *et al.*, 2016; Glover, 2000; Sachs y Novoplansky, 1993). Los mecanismos celulares y moleculares que gobiernan el tamaño de los órganos de la hoja se están

convirtiéndose en una prioridad de investigación para varios grupos de investigación.

El desarrollo foliar se encuentra asociado a factores genéticos y ambientales, de esta manera la epidermis de la hoja resulta ser de particular importancia para la protección de las plantas (Luo *et al.*, 2012; Glover, 2000). La epidermis consiste en células relativamente simples no especializadas, pero entremezcladas con células especializadas, como estomas o tricomas, además de encontrarse cubierta por una capa impermeable de polímeros lipídicos complejos llamada "cutícula" (Silva *et al.*, 2014; Becraft, 1999). Kaul (1977), sugirió que la cutícula es la principal barrera para el control de la pérdida de agua y que el grado de succulencia foliar (capacidad extraordinaria para la retención de agua) se encuentra determinada por la elevada proliferación de las células epidérmicas.

En las plantas, el destino de las células epidérmicas se encuentra asociado a factores de transcripción específicos de la epidermis, que a su vez dirigen la diferenciación epidérmica y diferentes vías específicas de la epidermis, inclusive el metabolismo lipídico especializado para construir la cutícula (Javelle *et al.*, 2011). Johnson *et al.* (2008), demostró que el desarrollo de órganos anormales y la ausencia de la epidermis en el fenotipo inducido AtDEK1-RNAi, de *Arabidopsis thaliana*, se encuentra asociado a la regulación negativa del gen *MERISTEM LAYER1 (ML1)*, el cual codifica para el factor transcripcional HD-ZIP IV y es clave para el destino celular protodérmico en las plantas. Javelle *et al.* (2011), sugirió que el mecanismo de señalización y el mantenimiento del destino de las células epidérmicas resultan ser esenciales para el desarrollo de las plantas. Tanaka *et al.* (2007), demostraron que los genes *ABNORMAL LEAF SHAPE1 (ALE1)* y *ALE2* (2001), que codifican para una serina proteasa de tipo subtilisina y una serina/treonina-RLK, favorecen el mantenimiento del destino de las células epidérmicas.

Durante la última década, los estudios sobre el desarrollo foliar en plantas mono- y dicotiledóneas, han demostrado que la formación de los estomas y de los patrones del espacio aéreo del mesófilo en las hojas, son coordinados por un estricto sistema genético y transcripcional que facilita el desarrollo y el funcionamiento fisiológico como el intercambio de gases para la fotosíntesis (Hepworth *et al.*, 2018; Qu *et al.*, 2017; Carter *et al.*, 2017).

En las angiospermas se han identificado genes reguladores del control transcripcional para

los procesos de división y expansión celular, claves para la conservación del linaje estomático (**Tabla 1.1**). Conceptualmente, el linaje estomático está determinado por una serie de elecciones y divisiones celulares que conducen al destino celular a partir de las células protodérmicas, lo que asegura una densidad y espacio estomático óptimos (Larkin *et al.*, 1997). El proceso del desarrollo estomático está regulado por una compleja vía de señalización, que involucra diversas interacciones extracelulares de ligando-receptor y la actividad de factores de transcripción esenciales para la formación del complejo estomático (Zoulias *et al.*, 2018; Qu *et al.*, 2017; Simmons y Bergmann, 2016). En las plantas superiores, las interacciones bioquímicas entre ligandos y los factores asociados al patrón epidérmico, tipo hélice-bucle-hélice (bHLH): SPEECHLESS (SPCH), MUTE y FAMA, son críticos para el desarrollo de los estomas, ya que la supresión o mutación en cualquiera de estos genes bHLH conduce a la pérdida del funcionamiento estomático y a un desarrollo irregular de la epidermis (Simmons y Bergmann, 2016; Pantin *et al.*, 2013; Vatén y Bergmann, 2012).

Tabla 1.2. Genes involucrados en el linaje estomático de plantas monocotiledóneas

Gen	Función	Homología molecular	Referencias
SPEECHLESS (SPCH)	División celular asimétricas de las epidermis y SD	Proteínas tipo Bhlh	(Chater <i>et al.</i> , 2017; Zhang <i>et al.</i> , 2015; Lau <i>et al.</i> , 2014)
MUTE (MUTE1)	Control sobre la divisiones celulares y conversión estomática	Proteína tipo bHLH	(Raissig <i>et al.</i> , 2017; Chater <i>et al.</i> , 2017; MacAlister y Bergmann, 2011)
FAMA	Diferenciación de las células del linaje estomático.	Proteína tipo bHLH	(Chater <i>et al.</i> , 2017; Lee <i>et al.</i> , 2014a; MacAlister y Bergmann, 2011; Peterson <i>et al.</i> , 2010)
FOUR LIPS (FLP)	Regula las divisiones de GMC y patrones estomáticos	Proteína MYB124	(Lee <i>et al.</i> , 2014a; Xie <i>et al.</i> , 2010; Lai <i>et al.</i> , 2005; Yang y Sack, 1995)
MYB88	Control de la división de GMC y organización estomática	Proteína MYB	(Xie <i>et al.</i> , 2010; Lai <i>et al.</i> , 2005)
BREAKING OF ASYMMETRY IN THE STOMATAL LINEAGE (BSAL)	Feedback de las divisiones asimétrica de las MMC a través de las MAPK, YDA y SPCH	Proteína Asn-rich	(Xu <i>et al.</i> , 2018; Carter <i>et al.</i> , 2017; Zhang <i>et al.</i> , 2015; Sutimantanapi <i>et al.</i> , 2014)
POLAR LOCALIZATION DURING ASYMMETRIC DIVISION AND REDISTRIBUTION (POLAR)	División asimétrica en células de linaje estomático (MMC, GMC, SC) y distribución espacial del estoma.	Proteína Basal	(Xu <i>et al.</i> , 2018; Shtein <i>et al.</i> , 2017; Zhang <i>et al.</i> , 2015)
TOO MANY MOUTHS (TMM)	Destino, orientación celular y patrón estomático	Receptor-like protein 17	(Zoulias <i>et al.</i> , 2018; Serna, 2009; Casson y Gray, 2008; Geisler <i>et al.</i> , 2000)
ERECTA	Arquitectura foliar, polaridad, patrón y procesos de la división y la expansión celular	LRR receptor like serine/threonine-protein kinase	(Zoulias <i>et al.</i> , 2018; Zubo <i>et al.</i> , 2018; Shtein <i>et al.</i> , 2017; Hu <i>et al.</i> , 2015)
YODA (YDA)	Destino celular de las GMC e identidad de las CG y formación de patrones	Mitogen-activated protein kinase	(Zoulias <i>et al.</i> , 2018; Zhang <i>et al.</i> , 2015; Serna, 2009; Wang <i>et al.</i> , 2007)
MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 4-6 (MKK4/6)	Regulación de la citocinesis durante la meiosis y la mitosis. El desarrollo del cloroplasto y establecimiento de las CG.	Proteína MAPK	(Zoulias <i>et al.</i> , 2018; Su <i>et al.</i> , 2017; Zhang <i>et al.</i> , 2015)
EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 (EPF1)	Patrón estomático y división celular para la diferenciación de las CG	Proteína Factor 1	(Zoulias <i>et al.</i> , 2018; Serna, 2009; Casson y Gray, 2008)

1.4.1 Limitación estomática en plantas superiores

El movimiento estomático anormal y la ineficiente asimilación del CO₂ que se encuentra en los espacios intercelulares (C_i), es decir el incremento en las concentraciones de C_i, es una causa clave asociada a la disminución de la tasa fotosintética en plantas superiores (Šantr ek *et al.*, 2014). Por otra parte, irregularidades en el sistema metabólico relacionadas a varios tipos de estrés biótico pueden conducir a alteraciones fisiológicas y fotosintéticas a través del desarrollo irregular del complejo estomático (Merced y Renzaglia, 2016; Wang *et al.*, 2016a; Šantr ek *et al.*, 2014; Pillitteri y Dong, 2013). Un término fisiológico asociado a la falta del movimiento estomático ha sido 'limitaciones no-estomáticas' con una máxima afectación en la eficiencia de la fotosíntesis (Li *et al.*, 2007; Sud y Dengler, 2000). En *Arabidopsis* y en arroz, las limitaciones metabólicas de la fotosíntesis se han asociada a los bajos niveles de la fuente de carbono, sugiriendo que una disminución del contenido de carbono inhibe la actividad de enzimas esenciales y en consecuencia limita la tasa de asimilación del CO₂ (Pinnola y Bassi, 2018; Keenan *et al.*, 2013; Haworth *et al.*, 2011).

Una capacidad estomática limitada compromete la fotosíntesis y los valores asociados a esta condición se encuentran determinados principalmente por la actividad enzimática sobre la regeneración y limitación de la RuBisCo (Rodrigues *et al.*, 2018; Geber y Dawson, 1997). La conductancia estomática (g_s) también se ha asociado a las restricciones del suministro de CO₂ y al deterioro metabólico, y en consecuencia disminuye la tasa fotosintética (A) y la limitación no estomática (A_{pot}), lo que demuestra que la limitación estomática disminuye la concentración de A y CO₂ en los espacios intercelulares de la hoja conduciendo al bloqueo del metabolismo (Lawlor, 2002). Una deficiencia fotoquímica restringe en primer lugar la disponibilidad de ATP y NADPH, lo cual lleva a la disminución en el transporte de electrones en los tilacoides (Urban *et al.*, 2017; Ainsworth y Rogers, 2007). Estudios de la actividad enzimática de la RuBisCo *in vitro* demostraron que el contenido y transporte del agua desencadenan cambios importantes en los niveles de activación enzimática (Drake *et al.*, 2017; Varone *et al.*, 2012). Si bien la imitación estomática se encuentra asociada a la regeneración de la Rubisco y del ATP parece ser que el estrés hídrico favorece una mayor limitación estomática (Lawlor, 2002; Noormets *et al.*, 2001). Por lo tanto, la reducción de la *RuBP* y bajos niveles en el contenido de agua

podrían conducir a una limitación de las enzimas claves del Calvin (Rodrigues *et al.*, 2018; Drake *et al.*, 2017; Rho *et al.*, 2012; Lawlor, 2002)

1.5 LA EPIGENÉTICA Y SU REGULACIÓN EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS

Las plantas son organismos sésiles, capaces de adaptarse a las condiciones ambientales en las que crecen y se desarrollan. Su capacidad de regenerar órganos completos o parte de ellos en cualquier etapa de su vida, se encuentra relacionada con su plasticidad celular y el potencial de ciertas células no diferenciadas y pluripotentes, ubicadas generalmente en las estructuras meristemáticas, que tienen la capacidad de proliferar, desdiferenciarse y expandirse en un nuevo tejido (Steward *et al.*, 1964). En la actualidad, se ha demostrado que esta capacidad de regeneración de un tejido depende de la reprogramación epigenética en su genoma (Nic-Can, 2013).

La epigenética, es una rama de la biología que estudia los cambios heredables en la expresión y función génica sin ninguna alteración en su secuencia nucleotídica (Lunyak y Rosenfeld, 2008). La regulación epigenética se encuentra influenciada por el ambiente, de esta manera un genotipo puede mostrar diferentes fenotipos (Rival *et al.*, 2010;Feng *et al.*, 2010;Feng y Jacobsen, 2011). En la actualidad, se han descrito diferentes mecanismos epigenéticos, tales como: metilación de las citocininas en el ADN, modificaciones postraduccionales en las histonas (metilación y acetilación), los miARNs y los pequeños RNAs interferentes (siRNAs) (Kitada *et al.*, 2012). Los avances en el estudio de la dinámica de interacción de estos mecanismo han mostrado su participación en el desarrollo primario de las plantas, así como en los procesos celulares y metabólicos necesarios para procesos como la fotosíntesis y otras vías biosintéticas que dirigen el crecimiento y el funcionamiento normal de una planta (Chynnusamy *et al.*, 2008;Zhang y Ogas, 2009). No obstante, los mecanismos epigenéticos han sido relacionados, de igual manera, con la regulación de otras vías metabólicas en las plantas, que determinan el crecimiento a través del aumento de proteínas, la biosíntesis de moléculas estructurales, la división celular y la morfogénesis (Bird, 2002;Andersen y Panning, 2003;Krizova *et al.*, 2009;Zhou *et al.*, 2011;Kim y Sung, 2013).

Los mecanismos de regulación epigenéticos más estudiados son la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas (PTMs), y se ha demostrado que su

dinámica es clave en la determinación estructural de la cromatina, la regulación del crecimiento y la diferenciación celular (Vanyushin, 2006;Liu y Gong, 2011;li *et al.*, 2011). Por otra parte, los miARNs funcionan como “pequeñas moléculas de etiqueta” y están involucrados en la compatibilidad de los padres durante la fertilización, también actúan durante la diferenciación celular y son claves en la regulación postranscripcional, pues a través de su señalización se mantienen estables procesos biológicos como la morfogénesis (Mallanna y Rizzino, 2010;Zhang *et al.*, 2013; Palatnik *et al.*, 2003).

1.5.1 Epigenética y la variación somaclonal

El crecimiento y la regeneración *in vitro* de células vegetales a una planta completa es un proceso asexual, que involucra la división mitótica celular para la obtención de plantas genéticamente idénticas (Jain *et al.*, 1998). No obstante, aún bajo las condiciones controladas en los sistemas *in vitro* se pueden generar variaciones entre las células de los tejidos y órganos diferenciados, que conllevan al desarrollo de “variaciones somaclonales”, es decir desarrollo de fenotipos diferentes y no esperados del cultivo del cual se derivan (Skirvin *et al.*, 1994). Los cambios genéticos asociados a la variación somaclonal comprende el nivel de ploidía, los rearrreglos cromosómicos, mutaciones en la secuencia nucleotídica del ADN, así como la activación y movilidad de elementos móviles (Phillips *et al.* 1994; Skirvin *et al.*, 1994).

La variación somaclonal puede observarse en niveles elevados en cultivos *in vitro*, pero su aparición variará de acuerdo a la clona madre, el genotipo, el nivel de ploidía, la naturaleza del explante, los componentes del medio de cultivo, el número de subcultivos y la edad de las plantas (Veilleux y Johnson, 1998). No obstante, se ha determinado que el suministro de reguladores del crecimiento vegetal como auxinas y citocininas y sus concentraciones determinan la frecuencia de la variación en los cultivos *in vitro* (Pierik, 1997; Larkin y Scowcroft, 1983; Larkin y Scowcroft, 1981). Por otra parte, en líneas somaclonales de la palma aceitera, el desarrollo de variantes somaclonales, como es el fruto envuelto, no se encuentran relacionada a cambios en la secuencia de ADN, la pérdida o ganancia de cromosomas, sino a la regulación epigenética (Jaligot *et al.*, 2000;Jaligot *et al.*, 2004;García *et al.*, 2007;Jaligot *et al.*, 2010;Adler *et al.*, 2011).

En general, las explicaciones sobre la variación somaclonal que enfatizan aspectos genéticos y epigenéticos siguen siendo en la actualidad un objeto de investigación. Actualmente una de las preguntas sobre el mecanismo de los pequeños ARNs es ¿Sí los miARNs contribuye a la variación somaclonal? y si ¿Los microARNs se encuentran asociados al albinismo? Se sabe muy poco sobre ello.

1.5.2 El mecanismo epigenético de los miARNs en las plantas

Desde el descubrimiento de los miARNs como reguladores epigenéticos globales en las plantas, estos son cada vez más reconocidos como un mecanismo regulador postranscripcional, que coordinan diferentes programas de expresión génica, en diferentes procesos biológicos como, el desarrollo fisiológico, morfológico y de adaptabilidad a determinados extremos ambientales (Chen, 2005; Nonogaki, 2010; Xia *et al.*, 2012; Rogers y Chen, 2013). Por otra parte, cuando en las plantas se presentan un metabolismo alterado de los miARNs se generan defectos pleiotrópicos.

Una de las características generales de los miARNs es su apareamiento con el ARNm blanco, que determina la regulación génica a través de la inhibición y/o escisión postranscripcional (Axtell y Bartel, 2005; Ronen *et al.*, 2010). La biogénesis de los miARNs es por tanto un mecanismo complejo, que involucra la transcripción de una secuencia *MIARN gen* por la ARN polimerasa II (Pol II), el procesamiento de varios transcritos primarios (pri-miRNAs y pre-miRNAs), a través del complejo proteico Dicer-like 1 (DCL-1), así como algunos componentes efectores de la familia de proteínas ARGONAUTA (AGO), que están implicados en la maduración selectiva de la hebra del miARN en conjunto con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Rogers y Chen, 2013; Arikait *et al.*, 2013).

Durante los últimos años en las plataformas de datos de miARNs, como son miRBase y NpsRNAtarget, se han registrado aproximadamente 1,500 miARNs en plantas que podrían regular a su vez cientos de genes (www.mirbase.org y www.plantgrn.noble.org). Generalmente, diversos miARNs cambian su expresión para regular a los genes, a través de la complementariedad del miARNs al ARNm, de genes implicados en el desarrollo y de respuesta a estrés y transporte de nutrientes. En *A. thaliana*, los primeros 117 miARNs han sido clasificados en 42 familias, altamente conservadas evolutivamente (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Por otra parte, con el avance de los procesos bioinformáticos se

ha demostrado que al menos un 30% de las familias de los miARNs existen en al menos 10 especies de plantas diferentes. Se ha demostrado experimentalmente que familias como miR159/319, miR157/156, miR165/166, miR163, miR158, miR172 y miR824 participan en diferentes procesos del desarrollo vegetal, (Zhang *et al.*, 2005;Sunkar *et al.*, 2008;Zhang *et al.*, 2010).

Además de los estudios bioinformáticos se ha demostrado experimentalmente la participación de los miARNs, miR165 y miR166 en el desarrollo de la raíz mediante la regulación del factor transcripcional SHORT ROOT (SHR) y de las proteínas Scarecrow like (SCR). En tanto que, durante el desarrollo de los brotes axilares, miR164 se le ha asociado con la regulación de factores de transcripción y familias de genes que presentan dominios Cup-Shaped Cotyledon (CUC1) y NAC (NAM, ATAF1/2 y CUC2). Por otra parte, durante el proceso embriogénico, isoformas de los miR160, miR167 y miR171 presentan niveles de expresión diferenciales durante las etapas involucradas en el proceso de diferenciación celular (Wu *et al.*, 2011;Zhang *et al.*, 2012). También se ha evidenciado que durante la maduración de embriones somáticos y cigóticos estos miARNs presentan expresiones tejido-especifico (Szittyá *et al.*, 2008;Lelandais-Brière *et al.*, 2009;Naya *et al.*, 2010).

1.5.3 Participación de los miARNs durante la variación somaclonal

Las plantas requieren de por lo menos catorce elementos minerales esenciales para el crecimiento y desarrollo normal durante su ciclo de vida, estos son adquiridos generalmente a través del suelo (Cubas *et al.*, 1999;Miguel y Marum, 2011). En años reciente y con el descubrimiento de los miARNs como reguladores epigenéticos en varios procesos biológicos, su participación e importancia biológica se encuentra dirigida, en algunos grupos de investigación, hacia la homeostasis de los nutrientes y variantes somaclonales *in vitro* (Wang y Wang, 2012). Por ejemplo, el miR399 regula la homeostasis del fosforo, el macronutriente más influyentes en el ciclo de vida de la plantas, esencial para las reacciones de fosforilación, el suministro de energía, síntesis de fosfolípidos y ácidos nucleicos (Kruszka *et al.*, 2012). Se ha observado que los miR395 y miR397/ miR398 son claves en la homeostasis del sulfato y del cobre, lo cual está relacionado al estrés oxidativo (Kruszka *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha observado que el desbalance entre los efectores AGO y DCL-1, que

participan en la biogénesis de los miARNs, crea un desequilibrio entre los miARNs, ocasionando en las células el bloqueo del proceso de diferenciación, lo cual en sistemas *in vitro* afecta, la regeneración de tejidos, órganos y al proceso embriogénico (Vaucheret *et al.*, 2004;Lasse y Gunter, 2007;Qu *et al.*, 2008;Mallory y Vaucheret, 2009). Por ejemplo, en *A. thaliana* se ha demostrado que el proceso de transición embriogénica “estable o inestable” se encuentra influenciado por el balance de once miARNs (Willmann *et al.*, 2011). En tanto que la formación de órganos, como la hoja y la raíz, es bloqueada o parcialmente inhibida por la desregulación en la biogénesis de los miARNs (Williams *et al.*, 2005;Zhou *et al.*, 2007;Larue *et al.*, 2009)

Hasta el momento existen muy poco reportes sobre los miARNs y la variación somaclonal, no obstante, algunos autores sugieren que los miARNs podrían encontrarse relacionados con la variación somaclonal como un mecanismo de epigenético de reparación, que en sincronía con el mecanismo epigenético de la metilación regulan ciertas inestabilidades que podrían presentarse bajo ciertas condiciones *in vitro* (Hsu *et al.*, 2008;Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2011).

1.6 AGAVE SP.

El género *Agave* pertenece a la familia *Agavaceae*, plantas perennes y endémicas de Norte América. En México, el agave se encuentra distribuido en valles, llanuras, colinas, laderas pedregosas y lugares montañosos con altitudes moderadas y cultivadas en suelos con pH neutro o ligeramente alcalino. Los agaves, forman parte del patrimonio cultural e histórico de México, actualmente se han identificado aproximadamente 200 especies en el territorio nacional (Nava Cruz *et al.*, 2014; Velázquez Martínez *et al.*, 2014) (**Figura 1.2**). En México, el cultivo de *Agave spp.* representa una fuente económica importante, sin embargo, en las últimas décadas con la búsqueda de nuevas aplicaciones industriales, se ha comprometido parcialmente la sustentabilidad y preservación de este género (Piven Nickolai *et al.*, 2001; García Herrera *et al.*, 2010; Nava Cruz *et al.*, 2014).

Las plantas de agave presentan características biológicas esenciales como la capacidad de adaptabilidad y de subsistencia ante diversos extremos ambientales, asimismo, ciertas características metabólicas, bioquímicas, fisiológicas y morfológicas le han permitido el desarrollo vegetativo de modo individual y/o poblacional (Vargas Ponce *et al.*, 2009;García

Herrera *et al.*, 2010). Por ejemplo, el tipo de metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) que emplean estas plantas le permite disminuir el consumo total de agua y la transpiración. Absorbe CO₂ durante la noche y produce azúcares mediante la fotosíntesis durante el día (Winter *et al.*, 2014). Otras peculiaridades biológicas de estas plantas son las adaptaciones morfo/fisiológicas del tallo y la piña como tejido de almacenamiento, el tiempo de floración único y presente después de un largo ciclo de vida (aproximadamente 12 años), una baja eficiencia en la fecundación sexual, la producción y germinación de semilla, así como, la reproducción vegetativa a través de rizomas y bulbillos y el sistema radicular que penetra aproximadamente 30 cm en el suelo. Todas estas peculiaridades en conjunto ejercen papeles esenciales para modificar la adaptación medioambiental y modificar el tipo de respuesta ante factores bióticos y/o abióticos (Ramírez Malageña *et al.*, 2008; Vargas Ponce *et al.*, 2009; Torres Morán *et al.*, 2010).

Estudios moleculares realizados en especies de agave como *A. angustifolia* Haw, *A. tequilana* var. Azul, *A. fourcroydes*, *A. americana*, *A. sislana*, *A. deserti*, entre otras, han puesto en evidencia que existen variaciones genéticas entre poblaciones silvestres y domesticadas de este género (Piven Nickolai *et al.*, 2001; Barraza Morales *et al.*, 2006; Vargas Ponce *et al.*, 2009; Sánchez Teyer *et al.*, 2009; Torres Morán *et al.*, 2010).

Por otra parte, utilizando herramientas biotecnológicas también se han conseguido establecer protocolos eficientes para la micropropagación de especies agaveras con un mayor interés comercial (Robert Díaz *et al.*, 2006; Ramírez Malageña *et al.*, 2008; Torres Morán *et al.*, 2010). No obstante, se ha observado que durante la micropropagación vegetativa de esta especie se pueden presentar eventos como la variación somaclonal (Robert *et al.*, 1992; Martínez Palacios *et al.*, 2003; Infante *et al.*, 2003).

No cabe duda que la homogeneidad genética vegetativa en plantaciones propagadas sigue siendo hoy en día una variable muy importante sobre el crecimiento y desarrollo de estas plantaciones, pues este factor podría afectar significativamente a nuevas generaciones propagadas en sistemas convencionales o mediante técnicas biotecnológicas, mostrando nuevas variabilidades genéticas que podrían mejorar, limitar o cambiar en diversas características moleculares, bioquímicas, genéticas o epigenéticas, que afectan la susceptibilidad y adaptabilidad de estas especies a enfermedades microbianas y otras

amenazas a las que una plantación se encuentra expuesta. Los agaves son por tanto, plantas excepcionales, con una gran población diversificada que albergan en su genoma y epigenoma una enorme riqueza que ofrecen entre otras cosas, un amplio campo de investigación con potencial de aplicación biotecnológica (Nava Cruz *et al.*, 2014).

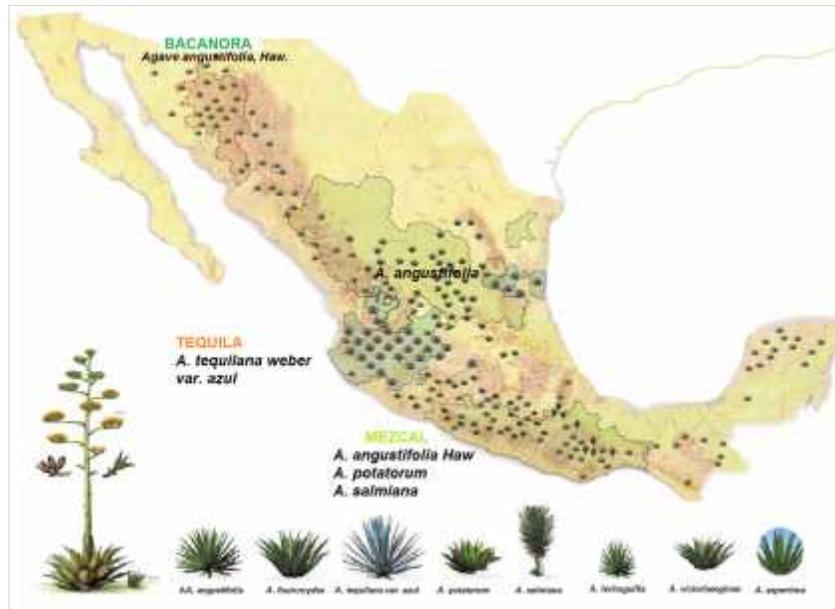


Figura 1.2. Distribución geográfica del *Agave angustifolia* variedad bacanora en la República Mexicana (Adaptado de www.conabio.gob.mx).

1.6.1 AGAVE *Angustifolia* Haw. como modelo de estudio

Entre las 200 especies de la familia *Agavaceae* identificadas en México, se encuentra *Agave angustifolia* Haw., una especie diploide, con 30 pares de cromosomas, perenne, distribuida en el territorio mexicano, pero encontrada particularmente entre las poblaciones silvestres en el desierto de Sonora, México (García Mendoza, 1995). Una de las especies del agave que más se ha explotado para la elaboración del mezcal. Sin embargo, a pesar que han sido identificadas aproximadamente 22 especies mezcaleras en México, sobresale *A. angustifolia* Haw, variedad bacanora, la cual es mayormente empleada para la elaboración de este tipo bebida. Sin embargo, con el aumento en la demanda para la

producción de esta bebida se dio paso a la sobreexplotación de la especie, lo que ha propiciado que este agave presente riesgo de erosión genética de los cultivares silvestres (Barraza Morales *et al.*, 2006; Sánchez Teyer *et al.*, 2009).

Los datos moleculares y genéticos disponibles sobre *A. angustifolia* sugieren que las variedades cultivadas tradicionalmente mantienen una diversidad genética similar a la encontrada en poblaciones silvestres (Barraza Morales *et al.*, 2006; Vargas-Ponce *et al.*, 2009; Sánchez Teyer *et al.*, 2009). Sin embargo, las diferencias genéticas encontradas en las plantas de agave en el campo, como en las plantas producidas *in vitro*, han sido relacionadas hacia algunos eventos de cambios fenotípicos o genéticos, que podrían ser tomados como presencia de variación somaclonal (Alfaro *et al.*, 2007; Infante *et al.*, 2006; Sánchez-Teyer *et al.*, 2009). Si bien las técnicas de micropropagación *in vitro* han sido empleados para aumentar la producción de diferentes especies agaveras, también mediante este sistema de propagación masiva se han logrado evidenciar posibles papeles como el de los retrotransposones que actúan a nivel genético y que podrían estar determinando cambios en el genoma del agave (Bousios *et al.*, 2007; Infante *et al.*, 2006; Madlung y Comai, 2004; Osorio-Zambrano *et al.*, 2006; San Miguel y Bennetzen, 1998), o modificaciones postraduccionales en las histonas, que podrían estar relacionadas en el desarrollo y productividad de diversas especies de agaváceas como *A. angustifolia* (De la Peña *et al.*, 2012).

En retrospectiva, la capacidad de adaptación de las planta ante cambios ambientales, condiciona el índice de incidencia de nuevos individuos albinos, ya que, esencialmente la plasticidad celular para regenerar y tolerar diversos factores, se encuentra condicionada a la integridad del genoma y al mecanismo de regulación de la programación celular condicionada por el estrés abiótico y biótico (Pillitteri *et al.*, 2016; Balzan *et al.*, 2014; Bilsborough *et al.*, 2011). Entonces ¿Qué mecanismos celulares subyacen de manera particular los patrones y la variabilidad del albinismo? ¿Cómo se establecen de manera simétrica y uniforme las zonas albinas y verdes en el tejido foliar? ¿Qué sucede en la zona contrastante, verde-albino, en donde se encuentran principalmente las células destinadas a contener cualquier grado de diferenciación de los plástidos? Estas son algunas de las preguntas claves para ampliar la comprensión del albinismo vegetal.

JUSTIFICACIÓN

Si bien diferentes estudios realizados en mutantes albinas han identificado como causa probable del albinismo vegetal al bloqueo en la síntesis de clorofila y la falta del desarrollo de los cloroplastos, en realidad aún no se han determinado las causas que causan el albinismo.

El proceso de diferenciación de los plástidos y su capacidad para rediferenciarse y convertirse en cualquier plástido se encuentra condicionado por su respuesta a diversos factores externos e internos. Por ello y con base en las diferentes funciones que desempeñan los plástidos, el sistema *in vitro* de *A. angustifolia*, el cual se presentan somaclonas variegadas y albinas estables, con grados de afectación en el desarrollo de cloroplastos y anomalías fisiológicas variados, representa un excelente sistema para el estudio de factores moleculares y epigenéticos asociados al albinismo.

Es de gran importancia el estudio anatómico de estas variantes y la organización estructural de las células meristemáticas es esencial, ya que se encuentra en constante división, soportan el crecimiento continuo de las plantas y en condiciones del albinismo no es del todo comprendido. De esta manera, el análisis molecular y epigenético de las células meristemáticas, en donde se localiza el precursor de todos los plástidos así como de la hoja madura de *A. angustifolia*, podrían ayudar a determinar si existe una relación con la función fotoquímica y fotosintética durante la variegación y el albinismo. Finalmente, en este trabajo se presenta la oportunidad para estudiar y determinar si existe una relación entre la regulación del mecanismo epigenético de los miARNs y los transcritos que codifican para las proteínas diferenciales en los fenotipos albinos. De esta manera se estará contribuyendo a la comprensión del mecanismo de regulación durante el albinismo en plantas.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cómo es la organización estructural de las células meristemáticas y la lámina foliar en los diferentes fenotipos (verde, variegado y albino) de *A. angustifolia*?
- ¿La deficiencia fotoquímica y fotosintética de las plantas albinas podría estar asociada a la desregulación de los pequeños ARNs?

- ¿El defecto en el desarrollo de los plástidos se encuentra determinado por una desregulación molecular entre genes nucleares y/o del cloroplasto?
- ¿Cuáles son los niveles de expresión de genes que codifican para enzimas /proteínas involucrados en la fotosíntesis, el desarrollo de los cloroplastos y el linaje estomático?
- ¿Cuáles son los niveles de expresión de los diferentes microARNs asociados a la actividad fotosintética y morfología foliar en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*?
- ¿Cuáles son las diferencias en la acumulación de las proteínas en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*?

HIPÓTESIS

Si los miARNs regulan la transcripción de los mensajeros de diversas proteínas a través de la degradación por complementariedad al ARNm. Entonces la acumulación diferencial de estos, afectaría la acumulación de proteínas esenciales en la fotosíntesis, el desarrollo de los cloroplastos y la epidermis en los fenotipos G, V y a de *A. angustifolia*.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los cambios moleculares y a los miARNs involucrados en la actividad de las proteínas esenciales en la eficiencia fotosintética en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia*.

OBJETIVOS ESPÉCIFICOS

- 1 Evaluar las diferencias anatómicas y estructurales de los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A), así como las regiones verde-variegado (GV) y albino-variegado (AV) de *A. angustifolia*. cultivado *in vitro*.
- 2 Analizar las variables fotoquímicas y fotosintéticas en los diferentes fenotipos (verde, variegado y albino) de *A. angustifolia*.
- 3 Evaluar el defecto en el desarrollo de los plástidos a través de la eficiencia fotoquímica, fotosintética y clorofilas de los diferentes fenotipos (verde, variegado y albino) de *A.*

angustifolia.

- 4 Analizar los niveles de expresión de genes que codifican para enzimas/proteínas involucrados en la fotosíntesis, el desarrollo de los cloroplastos y el linaje estomático.
- 5 Analizar cuantitativamente la acumulación de las proteínas PEPCase, RuBisCo, PSII y PSI, en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*.
- 6 Determinar los patrones proteicos en los diferentes fenotipos (verde, variegado y albino) de *A. angustifolia*.
- 7 Analizar los niveles de expresión de los microARNs, miR164, miR166, miR168, miR172, miR390 y miR824 asociados a la actividad fotosintética y morfología foliar en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental (**Figura 1.3**) consistió en el estudio morfológico, fisiológico, molecular, epigenético y de proteínas en los tres fenotipos (verde, variegado y albino) de *A. angustifolia*. El análisis en cada bloque incluye el estudio de la región meristemática y el tejido foliar. Mediante los ensayos moleculares y de los microARNs candidatos se determinó la desregulación de genes esenciales para el desarrollo de la hoja, los cloroplastos, asociados a la actividad de los pequeños ARNs en especies CAM.

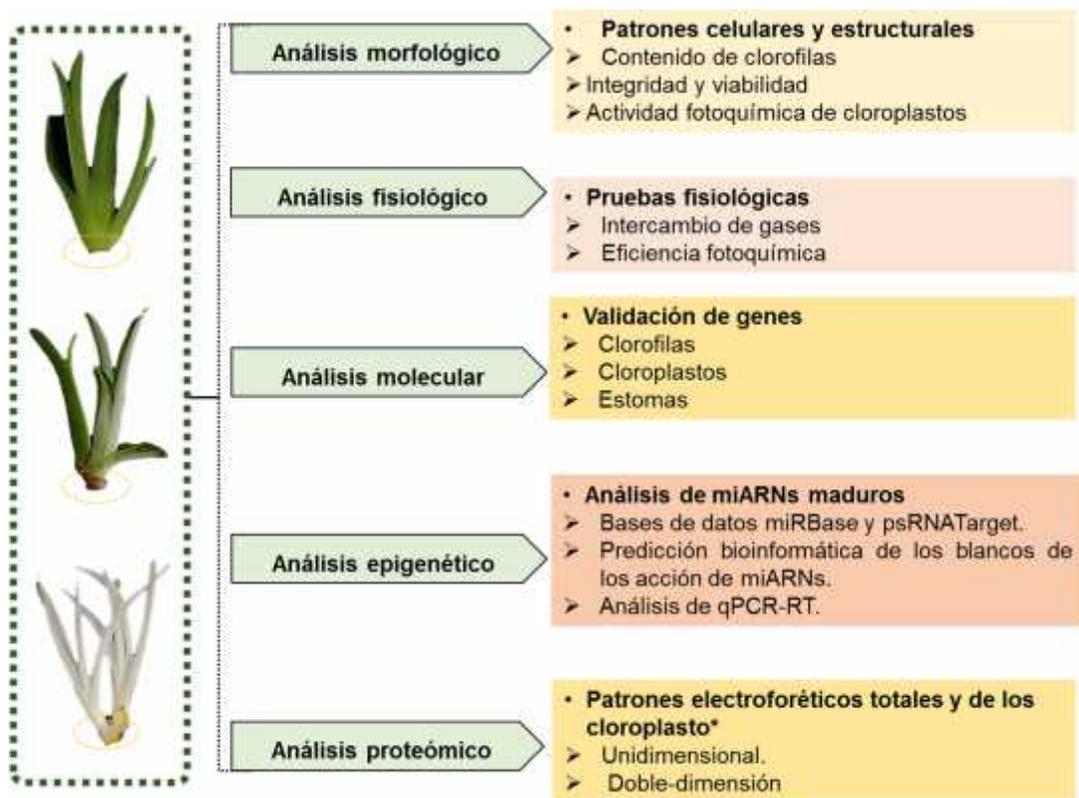


Figura 1.3. Diagrama de la estrategia experimental para el estudio histológico, morfológico, proteómico, molecular y epigenético en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia* Haw. *in vitro*.

CAPITULO II

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS VARIABLES SOMACLONALES VERDE, VARIEGADA Y ALBINA DE *A. angustifolia* HAW.

2.1 INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, el albinismo, es un crecimiento espontáneo y de baja incidencia, no obstante, durante la propagación alternativa de plantas elite por selección *in vitro* (p. ej., cultivo de anteras, embriogénesis somática y organogénesis), el desarrollo de brotes albinos es observado con mayor frecuencia (Makowska y Oleszczuk, 2014; Roy *et al.*, 2013; Torp y Andersen, 2009). Diferentes estudios sobre caracterización de hojas y mantenimiento de brotes en gramíneas han expuesto al albinismo y/o la sectorización verde-albino, como un evento de mayor frecuencia tras el desarrollo de una serie de restricciones moduladoras en el linaje celular, que conducen a una polarización irregular de “celdas celulares” con plástidos defectuosos y cloroplastos normales (Ankele *et al.*, 2005; Evenari, 1989). Sin embargo, particularmente, en el cultivo *in vitro* la composición química del medio de cultivo, la luz, la fijación del CO₂ y la biosíntesis de los esqueletos de carbono, podrían llevar al establecimiento del albinismo a través del cloroplastos anormales e interrupción de varios procesos fisiológicos en la planta (Miura *et al.*, 2010; Miura *et al.*, 2007).

Durante la última década, la detención del desarrollo del cloroplasto se encuentra asociado a distintas alteraciones en la expresión génica y a modificaciones epigenéticas (Cejudo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018b; Wang *et al.*, 2018a; Meyer, 2015; Kitada *et al.*, 2012). Por ejemplo, el silenciamiento de la expresión de los genes nucleares light-harvesting chlorophyll a/b binding (Lhc) y RUBISCO SUBUNIDAD MENOR (rbcS), en la mutante *hoja 1 amarilla-verde (ygl1)* de arroz y *Ali* en tabaco, afectan el desarrollo de la pigmentación de las hojas al regular la síntesis y la degradación de la clorofila (Zhang *et al.*, 2018b; Bae *et al.*, 2001). Sugimoto *et al.* (2004), demostraron que un desarrollo defectuoso de los cloroplastos podría conducir a la formación de diferentes mutantes con variegación en las hojas. Por ejemplo, en arroz, VIRESCENT 1 y 2 desarrollan hojas cloróticas a bajas

temperaturas, demostrándose que el nivel de transcritos para la proteína cloroplástica que regula el metabolismo del ARN cloroplástico y la guanilato quinasa, son esenciales para el establecimiento del sistema genético de los plástidos (Sugimoto *et al.*, 2007). Por ejemplo, en las mutantes *ab1* y *ab2* en *Bambusa edulis* se reduce en gran medida la proliferación celular a largo plazo, conduciendo a la generación de múltiples brotes albinos (Liu *et al.*, 2007) al producirse una serie de aberraciones en los genes de la *CLOROFILA SINTASA (CHLG)*, *MAGNESIO QUELATASA (MgCH)*, la proteína ribosómica L14 del cloroplasto 50S y la cadena beta de la ATP sintasa. No obstante, a pesar que han sido caracterizadas una serie de fenotipos mutantes con plena o deficiencia parcial de clorofila, los genes responsables del albinismo letal, parcial o transitorio son en gran parte desconocidos.

Por otra parte, en *Arabidopsis*, el uso de mutantes variegadas ha conducido a estudios de expresión tejido específica indicando que el desarrollo foliar y el desarrollo de los cloroplastos parece ser en parte atribuible a la regulación de los microARNs (Pulido y Laufs, 2010). En *Arabidopsis* y arroz, *mir408* es complementario a los mensajeros de los genes que codifican a las enzimas que eliminan a las ROS. Durante el desarrollo normal de las hojas variegadas *miR408* se encuentra desregulado en los sectores blancos, pero no en los verdes (Zhang *et al.*, 2017; Kamthan *et al.*, 2015; Pulido y Laufs, 2010).

En este capítulo se describen los resultados obtenidos de los análisis fisiológicos (morfología y estructura) y de expresión génica de los transcritos que codifican para proteínas/enzimas implicadas en la síntesis de la clorofila y en la fotosíntesis. Además, se presentan los niveles de transcripción de tres microARNs asociados al desarrollo foliar y la fotosíntesis. El análisis molecular (genes y microARNs) se realizó con el fin de determinar cómo se encuentra afectada la expresión de estos genes y se determinó si existe una relación entre los niveles de expresión y las diferencias fisiológicas observadas en las variables somaclonales con el albinismo.

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Cultivo *in vitro* de *A. angustifolia*

Los cultivos de *A. angustifolia* (Bacanora; clona 26S) se mantuvieron en medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), con la fuente nitrógeno modificada (MSB-5, 10 mM

KNO₃ y 5 mM NH₄NO₃), complementado con 0.11 μM de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4.43 μM de 6-benciladenina (6-BA), 0.175% de agar, 0.175% de gelrite y 3% de sacarosa, un pH de 5.75 y en condiciones de fotoperiodo (12h/12h) (70 μmol m⁻² s⁻¹) a 27 ± 2 °C (Robert Díaz *et al.*, 2006). Los cultivos fueron resembrados cada 4 semanas durante 5 ciclos consecutivos.

2.1.2 Análisis histológico del tejido foliar

Los tejidos de la región meristemática y de la hoja central (basal, media y, apical) de G, V (región verde VG y albina AV) y A, fueron diseccionados en cortes transversales y longitudinales de 5 mm. Los tejidos se colocaron por quintuplicado en dos volúmenes de solución fijadora [1% paraformaldehído (w/v) y 2% de glutaraldehído (w/v)] durante 24 h, a 4 °C. Se realizaron tres cambios de la solución fijadora cada 3 h, un lavado 1:2 de la solución fijadora y amortiguador de fosfatos (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM y KH₂PO₄ 1.5 mM, pH 7.4) y una incubación final con amortiguador de fosfatos durante 4 h a 4 °C. Las muestras fueron deshidratadas en solución de etanol de gradación creciente (30, 50, 70, 80 y 96%) y finalmente colocadas con 2 volúmenes de butanol. La inclusión de los tejidos fue realizada en parafina a 37 °C y los cortes fueron realizados con un grosor de 10 μm. Los cortes de parafina se colocaron sobre el portaobjetos electrocargados, procediendo a un secado a 35 °C ±5, toda la noche. La eliminación del medio de inclusión de la muestra se realizó a través de 3 lavados de xileno por 5 minutos, 2 lavados utilizando Ultraclear® por 10 minutos y 2 lavando con etanol al 96% durante 2 min. Finalmente, cada muestra fue sometida a rehidratación en solución decreciente de etanol (90, 85, 70, 30%/5 min) y agua (2 /5 min).

Los cortes se tiñeron con 1% de azul de toluidina, las laminillas fueron observadas con un microscopio óptico campo claro y utilizando los objetivos 40x y 100x con 50 μl de aceite de inmersión.

2.1.3 Eficiencia cuántica del fotosistema II

Las variables fotoquímicas se analizaron utilizando un fluorómetro de amplitud modulada (PAM, Walz, Effeltrich, Alemania). El rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fluorescencia de la Chl: F_v/F_m), la actividad potencial del FSII (F_v/F₀), rendimiento cuántico

efectivo del fotosistema II (F_{PSII}), transporte de electrones del FSII (ETR), coeficiente de extinción fotoquímico (qP) y no fotoquímico (qN). La F_v/F_m se obtuvo de la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) y la fluorescencia máxima (F_m), donde F_0 = fluorescencia inicial. El pulso de luz saturante fue de $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, las curvas se realizaron con nueve pulsos de luz actínica ($0-1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Previo a las mediciones las plantas se aclimataron en oscuridad durante 60 minutos.

2.1.4 Diseño de oligonucleótidos asociados a la fotosíntesis y clorofila

Las secuencias de los diferentes genes involucrados en la fotosíntesis y vía de las clorofilas se encontraron en el transcriptoma realizado por Gross *et al.* (2013) y anotados en la base de datos del NCBI de diferentes especies de *Agave* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (**Tabla 2.1**). A partir de estas secuencias se diseñaron los cebadores utilizando los programas Oligo explore 1.1.2 y Oligo Analyzer 1.0.3. Las secuencias de los cebadores generados y utilizados para el análisis de qRT-PCR se enumeran en la tabla 2.2.

Tabla 2.1 Secuencias usadas para el diseño de oligonucleótidos de los genes implicados en la biosíntesis de clorofilas y fotosíntesis.

Gen	Secuencia utilizada	Base de datos
Mg Subunidad H (MgH)	GAHU01014550.1	Transcriptoma de Agave/Genebank
Clorofilida a oxigenasa (CAO)	GAHU01069238.1	Transcriptoma de Agave/Genebank
Clorofila sintasa (CHLG)	GAHU01056846.1	Transcriptoma de Agave/Genebank
Glutamil ARNt reductasa (HEMA1)	SRA: SRR787640.1446305.2 SRA: SRR787638.8502607.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
Fotoclorofilida oxidoreductasa a (PORA)	SRA SRR789701.16001106.2 SRA SRR789710.12215504.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
7- Hidroximetil clorofila a reductasa (HCAR)	SRA SRR1371239.255112.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
Feofórbido a oxigenasa (PAO)	GAHU01030798.1	Transcriptoma de Agave/Genebank
ChiP	gnl SRA SRR1371239.118697.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
PsaA	GAHU01191159.1	Transcriptoma de Agave/Genebank
PsaB	gnl SRA SRR1371238.148001.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
PsbA	gnl SRA SRR1371238.271399.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
PsbB	gnl SRA SRR1371238.331937.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
RbcS	GAHU01011045.1	Transcriptoma de Agave/Genebank
RbcL	JX903133.1	Genebank

Tabla 2.2 Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el análisis qRT-PCR de los genes implicados en la biosíntesis de clorofilas y fotosíntesis.

Gen	Secuencias oligos	Tamaño teórico	Tm de amplificación (°C)
MgH	MgHF: GAGAGGGGCGAAAAGTGATAC	138	60
	MgHR: CCAACAAGAGCGAAACCAG		
CAO	CAOF: TTGGGACAGTGAATGAGG	205	60
	CAOR: GAGGTGGTTGAAAAGAAGG		
CHLG	CHLGF: GTCATCACAGGGTCTCATC	197	57
	CHLGR: TCCGTCTCTTGTTTAGCG		
HEMA1	HEMA1F: GGAGATGCGTGAAAAGC	150	60
	HEMA1R: CCTCGATGCCAAGACAG		
PORA	PORAF: CACGTCCCCTTGTTCCAG	159	60
	PORAR: CGCAGAGTCCTTGTTCC		
HCAR	HCARF: TACCCTTGCCCTAGTTGAG	152	60
	HCARR: CACGAGTTCCATTATCCAC		
PAO	PAOF: GTGGTGTGGGGATTG	190	60
	PAOR: ACGATGGAGCGAGTCTTG		
CHIP	F: AAGAGCGGACGAATGTGTG	62	169
	R: CGGGGTTAGAACGGTAGAAC		
PSA-A	F: GAGTGGCACGTACTIONTTTTATGGC	60	156
	R: GCGGCTTTGTGATAATGGAAC		
PSA-B	F: TCTTGCTCTAGCCTCTTTAGGG	62	134
	R: CTGCGATGTATTGGTGATGAG		
PSB-A	F: GATAACCAGCACCGAAAAC	60	156
	R: AGTAAAGACCCAGAAACAGG		
PSB-D	F: CCAACTCAAGCCGAAGAGAC	62	151
	R: CTACCCCAAGAGCACTCATC		
RUBL	F2: TATGGTCGTCCCCTATTG	55	215
	R2: TGATTTGCGCTGTTTCG		
RUBS	F1: TTACCTCCCTCCCTTGTC	55	193
	R1: GCTCCTTCAACCTGG		

2.1.5 RT-qPCR

El ARN total fue aislado de la base meristemática y de las hojas intermedias de los fenotipos G, V y A, utilizando el método del TRI reagent (Sigma, T9424), bajo las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN extraído se verificó en un gel de agarosa al 1%. Para la síntesis de ADNc se utilizó 1 µg de ARN total y el kit del sistema de síntesis de primera hebra ProtoScrip (E6560S). Para la reacción RT-qPCR se utilizaron 0.25 µl de cada cebador a 10 µM, junto con 12.5 µL de la mezcla maestra de PCR SYBR 2X (QuantiNova 208054) y 20 ng µL⁻¹ de ADNc en un volumen final de 25 µL. El programa de amplificación utilizado fue la PCR, activación de la polimerasa a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 9 °C durante 15 s, como temperatura de desnaturalización y la combinación de alineamiento/extensión durante 35 s acorde a una temperatura elegida en función del par de cebadores (**Tabla 2.2**) y una extensión final a 72 °C durante 1 min. Ubiquitin11 se usó como testigo siguiendo el mismo programa de amplificación utilizado por Us-camas (2017). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron utilizando el sistema de StepOne Software v2.2.2 –Real Time PCR (Applied Biosystems) y los resultados se analizaron utilizando el método 2^{-Ct} (Livak y Schmittgen, 2001). La cuantificación de la expresión génica relativa se realizó en los diferentes fenotipos utilizando tres réplicas biológicas, durante tres replicas experimentales.

2.1.6 Aislamiento de los ARNs pequeños (200-15 nt)

La extracción se realizó utilizando el protocolo reportado por Rosas-Cárdenas *et al.* (2011). Cada tejido vegetal (meristemo y hoja) fue macerado utilizando 2% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (p/p). El macerado fue homogenizado con 500 µL del amortiguador de extracción [100 mM tris-HCl (pH 9.0), 1% dodecil sulfato de sodio (SDS), 100 mM LiCl y 10 mM EDTA] y 500 µL de una solución saturada de fenol (pH 8.0), incubado por 5 min a 60 °C. El homogeneizado se centrifugó a 12,000 x g 10 min a 4 °C, la fase acuosa superior fue transferida a un tubo nuevo y mezclada con 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), centrifugando a 11,500 x g 10 min a 4 °C. Fueron colectados 350 µL de la fase superior y se incubó a 65 °C x 15 min, se adicionó 60 µL de 5 M de NaCl y 73 µL de polietilenglicol 8,000 al 40%, se mezcló por inmersión e incubó durante una hora a -20 °C, se centrifugó a 11,500 x g 10 min a 4 °C. Se colectaron 300 µL de la fase superior y se le adicionaron 600 µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v), se centrifugo a 11,500

x g 10 min a 4 °C, se colectaron 300 µL de la fase superior y adicionaron 50 µL de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) más 1,700 µL de etanol absoluto frío. Las muestras se incubaron por a -20 °C / 15h. Finalmente, se centrifugó a máxima revolución y se dejó secar la pastilla durante 60 min a 27 °C. Se hidrataron con 25 µL de H₂O libre de ARNasas, realizando el análisis de pureza y calidad del ARN mediante la medición de absorbancia en los parámetros A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , la integridad del ARNs se verificó en un gel de agarosa al 4%.

2.1.7 microARNs: Reacción de poliadenilación y síntesis DE ADNc

La síntesis del ADNc de los pequeños ARNs, fue realizada utilizando el kit Ncode® miRNA first strand cDNA synthesis (Invitrogen). Basados en las instrucciones del fabricante, 1.5 µg de ARNs fueron purificados utilizando las columnas NucleoSpin® miARN. Las concentraciones y purezas de las muestras fueron verificadas con el equipo Nanodrop (Thermo fisher Scientific) y analizadas en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) 12.5%, 8 M de urea, teñidas con Sybergold™ 1%. La síntesis del ADNc fue realizada en dos pasos, la reacción de poliadenilación y síntesis de la cadena complementaria. La poliadenilación se realizó mezclando 1 µg de los ARN LMW purificados, 5 µL de 5X miARNs amortiguador de reacción, 2.5 µL de MnCl₂ 25 mM, 1 µL de dATP 10 mM, 1 µL de Poly A polimerasa y H₂O grado biología molecular en un volumen final de 25 µL. Para la síntesis de ADNc, se mezclaron 4 µL del ARN poliadenilado, 1 µL del amortiguador de alineamiento y 3 µL de la secuencia universal RT miARNs (25 mM), las reacciones fueron incubadas a 65 °C x 5 min, posteriormente se adicionaron 10 µL de la mezcla 2X first- strand reaction mix y 2 µL de Super-script III RT/ARNsa out enzima, se incubaron a 50 °C x 1h, inactivando la enzima RT a 85°C x 5 min, la mezcla fue cuantificada y almacenada a -20 °C para su uso.

2.1.8 qPCR microARNs

Las reacciones de qPCR fueron llevadas a cabo utilizando el kit Ncode^(TM) qRT-PCR (Invitrogen). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se analizaron y seleccionaron diluciones seriadas del ADNc (0.01-1000ng µL⁻¹). Para las reacciones del qPCR tiempo real se utilizaron 10 µL de syber green qPCR mix, 0.4 µL de la sonda LNA (10 mM), 0.4 µL de primer universal qPCR miRNAs, 0.4 µL Rox (1:100), 2 µL del templado ADNc (1:10) manteniendo una relación final de los componentes (1x) en un volumen final de 20 µL. El

programa de amplificación utilizado para cada miARNs fue: una pre-amplificación a 50 °C por 120 segundos, una desnaturalización a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 60 segundos a una T_m específico para cada microARN (**Tabla 2.4**). Como gen normalizador se utilizó snU6, siguiendo el programa utilizado por Turner *et al.* (2013), la visualización para cada análisis se realizó utilizando los gráficos obtenidos en la melting curve obtenidos en las condiciones de 95 °C x 15 segundos, 60 °C x 60 segundos y 95 °C por 15 segundos por 40 ciclos.

2.1.9 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el software Origin 8.0. Los datos obtenidos en los experimentos fueron evaluados utilizando un análisis de varianza (ANOVA). El grado de significancia entre el valor de las medias se realizó mediante la prueba de Tukey con un 95% de confianza.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Cultivo *in vitro* de *A. angustifolia*

Las variantes somaclonales variegada (V) y albina (A) de *A. angustifolia* fueron obtenidas de manera espontánea durante la micropropagación (**Figura 2.1**). El crecimiento observado en G y V fue similar, no obstante, el fenotipo A presentó un menor crecimiento, con una base meristemática esponjosa y hojas más gruesas.



Figura 2.1 Variantes somaclonales albinas de *Agave angustifolia*. Los fenotipos; verde (G), variegado (V) y albino (A), contenidos en cajas magentas con 50 mL de medio de cultivo y en condiciones de fotoperiodo 12/12h.

2.3.2 Patrones celulares en la hoja y región meristemática de los fenotipos G, V y A

Entre las características asociadas al albinismo en las plantas, destaca principalmente la ausencia total o parcial de los cloroplastos y la desorganización tisular de los elementos celulares en hojas y meristemas. Con este objetivo, hemos analizado por microscopia óptica campo claro los tejidos, hojas y la base meristemática en los tres fenotipos, los resultados se muestran en las **Figuras 2.2 y 2.3**

Los resultados de los cortes transversales en la hoja G (**Figura 2.2**), mostraron en G la conservación de una anatomía foliar típica de las monocotiledóneas CAM. El tejido foliar de G, V y A, presentaron similitudes en el patrón de distribución en la región del parénquima en empalizada y lagunar esponjoso. Sin embargo, entre el tejido foliar de V y A se observaron diferencias en los patrones de distribución con respecto a G. Las hojas de G y V presentaron una epidermis superior e inferior monoestratificada, mientras que, en A, la epidermis superior presentó células de menor tamaño y una exodermis poco diferenciada. Además, el tejido A y AV de V, muestran una reducción en el número de haces vasculares y patrones irregulares en las células del floema y xilema.

El fenotipo G y la región GV de V presentó abundantes cloroplastos, sin embargo, en la lámina foliar de V se observó la línea de células mixtas (GV y AV de V), con un contenido irregular en el cloroplasto. De este modo, en A se observaron pequeñas estructuras isodérmicas con baja contenido de pigmentación, que indican el contenido de proplastídeos en una etapa inicial interrumpida (**Figura 2.2**). En la sección transversal del meristemo en G, V y A, se reveló que las hojas más viejas rodean las hojas más jóvenes de una manera envolvente con el meristemo en el centro de la estructura.

Además, en la zona meristemática central de V y A se desarrollaron patrones celulares irregulares (**Figura 2.3**). En G y V se observó una estructura isolateral con parénquima en empalizada organizado y células isodiamétricas regulares. Pero, sólo en G, se observaron

células dispuestas transversalmente de manera ordenada y compacta mientras que en V se observaron espacios intercelulares reducidos y tráqueas que diferencian la forma anillada y engrosamiento, que compromete el tamaño y la organización de los tejidos conductores (xilema y floema).

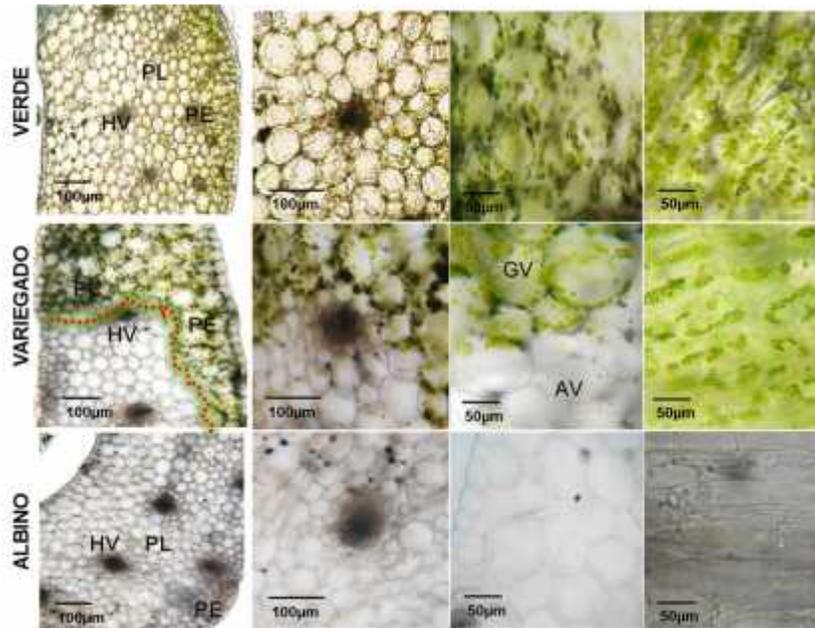


Figura 2.2. Cortes histológicos transversales de hojas de *Agave angustifolia* G, V y A *in vitro*. El haz vascular (HV), parénquima lagunoso (PL) y parénquima empalizado (PE). Las observaciones se realizaron con los objetivos 40x y 100x. Región abaxial de la hoja (Ab), región adaxial (Ad), la línea amarilla región central entre GV y AV del fenotipo V. El cuadro en rojo, parénquima de la empaliada y pequeñas plástidos.

En la base meristemática de A la mayor parte del crecimiento en longitud presentó patrones celulares irregulares, es decir, un parénquima aerífero con grandes espacios intercelulares, asociado con la capacidad de almacenamiento de agua (45% CRA), haces vasculares de menor tamaño y tejidos conductores desorganizados (**Figura 2.3a**). Estas diferencias en A y V fueron asociadas al crecimiento en masa y contenido de agua por fenotipo (**Figura 2.3b**). Los resultados sobre peso fresco, peso seco y contenido relativo de agua mostraron que A exhiben el menor crecimiento (peso seco) y presenta el mayor porcentaje del contenido de agua (40.37%) en comparación con G y V (20-23%) (**Figura 2.3b**).

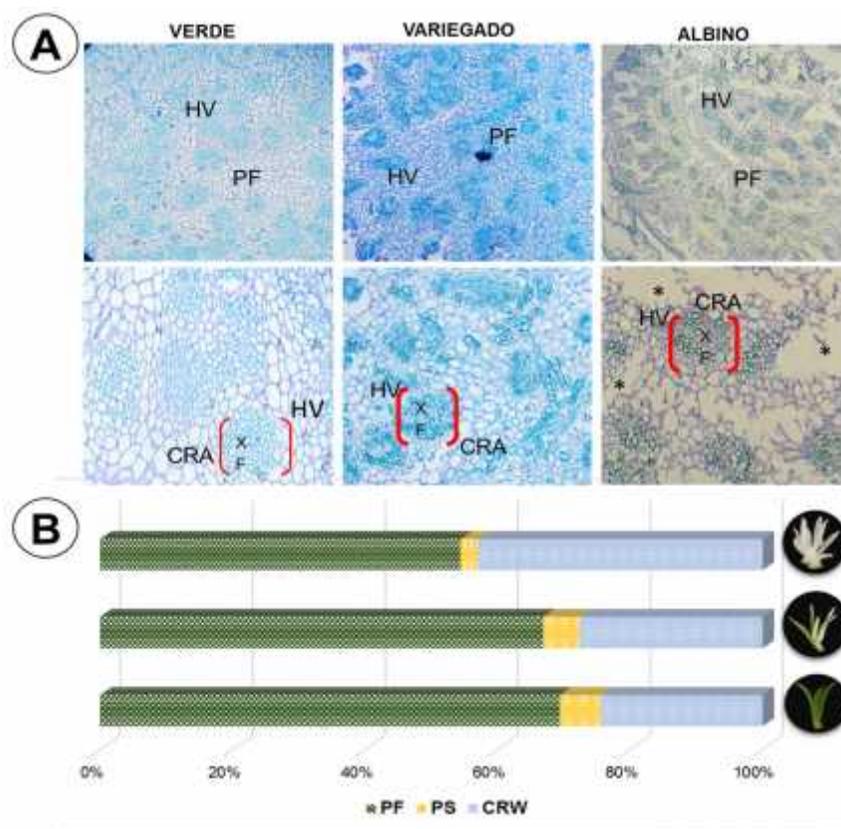


Figura 2.3. Disecciones histológicas de la región meristemática y análisis del crecimiento en plántulas de *Agave angustifolia in vitro*. A) Acercamientos realizados con los objetivos 10x y 40x en meristemos y 10x y 60x en hojas. Haces vasculares (HV), xilema (X) y floema (F), parénquima fundamental (PF) de los meristemos de las plantas verdes, variegadas y albinas, espacios intercelulares. B) Determinación porcentual del crecimiento, peso fresco (PF), peso seco (PS) y contenido relativo de agua (CRW).

2.3.4 Eficiencia fotoquímica y fotosintética

La fluorescencia de las clorofilas es una forma rápida y no destructiva para identificar las alteraciones del metabolismo fotosintético en las plantas G, V y A de *A. angustifolia*. Los parámetros fotoquímicos no fueron detectados en las plantas albinas, cabe mencionar que el fluorómetro de amplitud modulada cuantifica la distribución de la energía luminosa capturada por el complejo antena que está conformado por clorofilas. En este sentido se esperaba que las variegadas tuvieran valores diferentes a las verdes. Sin embargo, entre

los genotipos variegado y verde no se observaron diferencias significativas tanto en el coeficiente de extinción fotoquímico (0.21 y 0.21, respectivamente) como no fotoquímico (0.28 y 0.38, respectivamente). Pero, si hubo diferencias significativas en la actividad potencial del FSII (variegado: 2.6 y verde: 3.6) y en el rendimiento cuántico máximo del FSII (variegado: 0.71 y verde: 0.78) (**Tabla 2.3**). Los resultados sugieren que las plantas albinas carecen de mecanismos fotosintéticos para distribuir de manera eficiente la energía luminosa. Por otra parte, a pesar de la carencia de pigmentos fotosintéticos en la mitad de la hoja, las plantas variegadas distribuyeron la energía luminosa estadísticamente igual que las verdes, esto sugiere que las clorofilas de la parte verde en las plantas variegadas compensan la falta de pigmentos de la parte albina a la hora de distribuir la energía luminosa, debido a que canalizan una cantidad de energía similar que las plantas verdes hacia los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos. Sin embargo, las plantas variegadas y sin duda las albinas, tendrían problemas de aclimatación a la luz en comparación con las plantas verdes, debido a la baja eficiencia cuántica efectiva del FSII en las plantas con características de albinismo.

Tabla 2.3 Coeficiente de extinción fotoquímico (qP), Coeficiente de extinción no fotoquímico (NPQ), Actividad potencial del PSII (F_v/F_0) y Rendimiento cuantico máximo del FSII (F_v/F_m) de *Agave angustifolia* Haw. *in vitro*. Los datos son medias \pm EE. n = 7. Diferentes literales en la misma columna representan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$).

FENOTIPOS	Qp	NPQ	Fv/F0	Fv/Fm
VERDE	0.217 \pm 0.015 a	0.38 \pm 0.10 a	3.6 \pm 0.14 a	0.78 \pm 0.013 a
VARIEGADO	0.217 \pm 0.040 a	0.28 \pm 0.14 a	2.6 \pm 0.32 b	0.71 \pm 0.056 b
ALBINO	0.000 \pm 0.000 b	0.00 \pm 0.00 b	0.0 \pm 0.00 c	0.00 \pm 0.000 c

De acuerdo a los resultados, el fluorómetro de amplitud modulada no registró transporte de electrones (ETR) ni eficiencia cuántica efectiva del FSII (F_{FSII}) en las plantas albinas. Pero en ambas variables las plantas verdes superaron significativamente a las variegadas (**Figura 2.4**), es decir, las plantas variegadas no tienen la capacidad de las verdes para transportar electrones del fotosistema II al fotosistema I y tienen una tasa de saturación del fotosistema II menos eficiente que las plantas verdes.

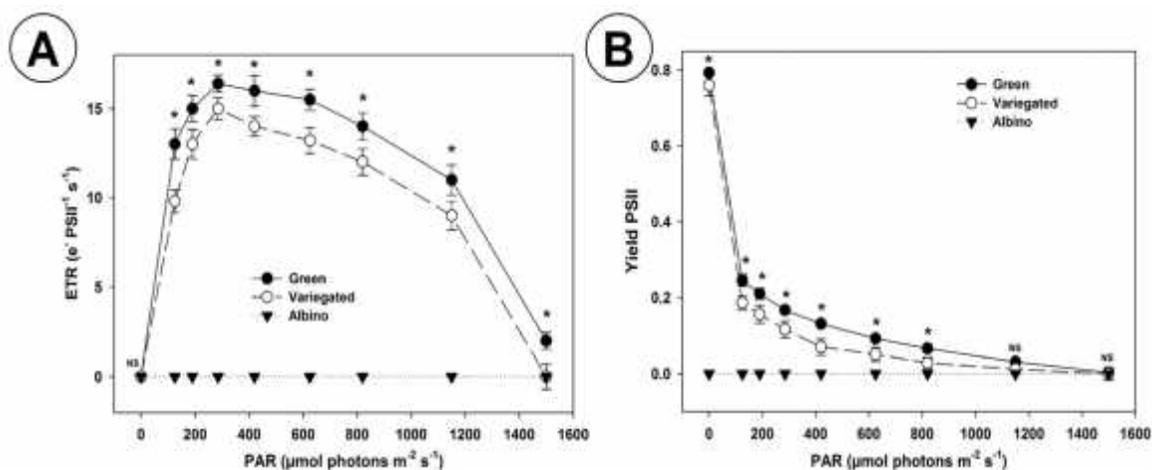


Figura 2.4. (A) Tasa de transporte de electrones (ETR) y (B) rendimiento cuántico efectivo del FSII (Φ_{PSII}) en respuesta a la radiación fotosintéticamente activa (PAR) en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia*. Medias \pm EE. NS no significativo. *: significativo (ANOVA, P 0.05).

2.3.5 Secuenciación de fragmentos de ADN amplificados

Los resultados se obtuvieron del tejido meristemático y hoja utilizando qRT-PCR. Una vez establecidas las condiciones de amplificación de los fragmentos por RT-PCR (**Tabla 2.2**), los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciar con la finalidad de confirmar la identidad. Los resultados de la secuenciación fueron analizados mediante el alineamiento de las secuencias con la base datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los resultados y porcentajes de similitud obtenidos se muestran en la **tabla 2.4**.

Tabla 2.4. Similitud de los fragmentos de PCR de cada gen amplificado con sus proteínas ortólogas.

Gen	Proteína ortóloga	# de accesoión	% de similitud
MgH	CHLH- <i>Dendrobium catenatum</i>	XP_020680299.1	88
CHLG	CHLG- <i>Asparagus officinalis</i>	XP_020267581.1	84
HEMA1	HEMA1- <i>Nelumbo nucifera</i>	XM_010256356.2	89
PORA	PORC- <i>Brassica napus</i>	XP_013696551.1	89
HCAR	HCAR- <i>Ananas comosus</i>	XP_020079787.1	95
PaO	PaO- <i>Elaeis guineensis</i>	XP_010918717.1	75
ChiP	ChiP- <i>Asparagus officinalis</i>	ONK75828.1	100
PSA-A	PsaA- <i>Glycine soja</i>	KHN10578.1	94
PSA-B	PsaB- <i>Prasinoderma coloniale</i>	YP_009057463.1	83
PSB-A	PsbA- <i>Kirengeshoma palmata</i>	AFA52040.1	90
PSB-D	PsbB- <i>Elegia fenestrata</i>	AAS59961.1	94
RUBL	RbcL- <i>Coptis quinquesecta</i>	AKE43557.1	98
RUBS	RbcS- <i>Oryza sativa Indica Group</i>	AAB70543.1	89

Se lograron secuenciar los fragmentos correspondientes a genes que codifican a enzimas y proteínas claves para la biosíntesis, ciclo y degradación de las clorofilas y la fotosíntesis (Figura 2.5).

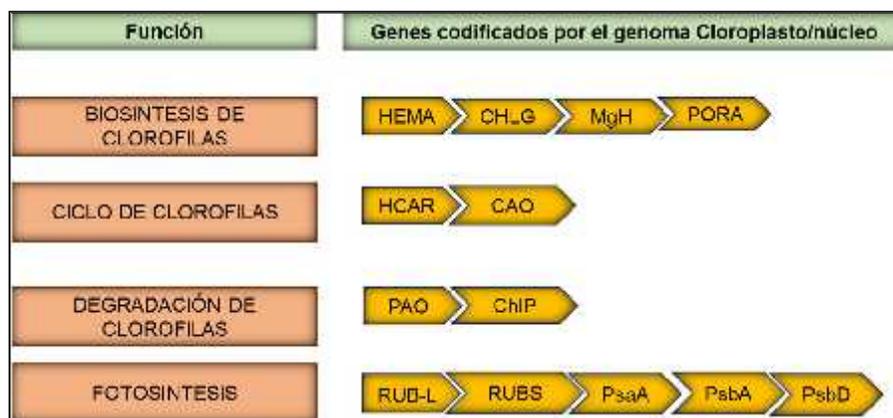


Figura 2.5. Genes candidatos asociados a la biosíntesis de clorofilas, ciclo de las clorofilas, degradación de clorofilas y fotosíntesis.

2.3.6 Análisis molecular de los niveles de expresión de genes asociados a vía de las clorofilas y fotosíntesis

Los niveles de expresión fueron analizados y comparados entre los tejidos de la base meristemática y las hojas de los fenotipos G, V y A. Los genes analizados codifican para enzimas y/o proteínas involucradas en la biosíntesis de clorofila y fotosíntesis obtenidos se muestran en las **figuras 2.6, 2.7 y 2.8**. Estos genes son: Mg subunidad H (MgH), clorofilida a oxigenasa (CAO), clorofila sintasa (CHLG), glutamil ARNt reductasa (HEMA1), fotoclorigilida oxidorreductasa a (PORA), 7-hidroximetil clorofila a reductasa (HCAR), feofórbido a oxigenasa (PAO), geranilgeranil difosfato reductasa cloroplástica (CHIIP), apoproteína A del PSI (PSA-a), apoproteína A2 del PSI (PSA-B), apoproteína del cloroplasto PSII (PSB-A), D2-proteína PSII (PSB-D), RUBISCO SUBUNIDAD MAYOR y MENOR (RUBL, RUBS).

La síntesis de clorofila es un proceso complejo que actualmente se encuentra dividido en cuatro etapas: biosíntesis de clorofilas, ciclo de las clorofilas, degradación de clorofila y fotosíntesis (**Figura 2.5**). Un proceso que se realiza en el cloroplasto y da inicio con la síntesis del glutamato hasta la protoporfirina IX de tetrapirrol, sin embargo, el punto de la bifurcación de la vías aún no está claro, pero sabemos que los pasos regulatorios clave involucran a la vía de formación de ALA (Tripathy y Pattanayak, 2012). A partir de este punto en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia* hemos analizado los niveles

transcripcionales del gen *HEMA* que codifica para el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), un precursor del grupo hemo que se transforma mediante una serie de reacciones enzimáticas (Schmied *et al.*, 2011). El gen *MgH*, que codifica para la enzima catalizadora de la inserción de un ion magnesio (Mg^{2+}) dentro de un anillo de pirrol (Tripathy y Pattanayak, 2012; Tanaka y Tanaka, 2011). El gen *CHLG*, transcripción esencial para mediar los últimos pasos de la biosíntesis de clorofila a y la expresión de *PORA*, asociada con la esterificación de clorofilida a o b con preferencia por geranilgeranildifosfato (GGPP) en lugar de fitildifosfato (PhyPP)(Shmakov *et al.*, 2016).

SÍNTESIS DE CLOROFILAS. En este análisis, durante el primer paso en *A. angustifolia* G, V y A, la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de clorofilas presentaron diferencias significativas en las hojas y en la base meristemática (**Figura 2.6**). Los niveles de expresión de *HEMA*, *CHLG* y *PORA*, presentaron niveles más bajos en el tejido foliar respecto al tejido meristemático en donde los niveles de expresión fueron mayores en el tejido A, mientras que, en el tejido meristemático de V, *PORA* presentó un incremento de aproximadamente 3 URE y en A de 4.5 URE. Por otra parte, al analizar los niveles de expresión en hoja, los niveles de expresión más bajos fueron observado en A, en donde *HEMA*, *MgH* y *PORA*, obtuvieron aproximadamente 0.5 URE, mientras que, en V, *MgH* presentó una expresión por debajo de 0.5 URE. Además, se determinó que *CHLG* presenta una sobreexpresión en meristemo y hoja de aproximadamente 1.5 URE y 3.5 URE respectivamente. Los niveles de expresión de estos genes que participan durante la biosíntesis de clorofila muestran una mayor disminución en A para el tejido foliar y un aumento significativo en la base meristemática. No obstante, el incremento observado en los niveles de *PORA*, *MgH* y *HEMA* muestran una mayor actividad en los tejidos V y A, cuando se les compara con el tejido G.

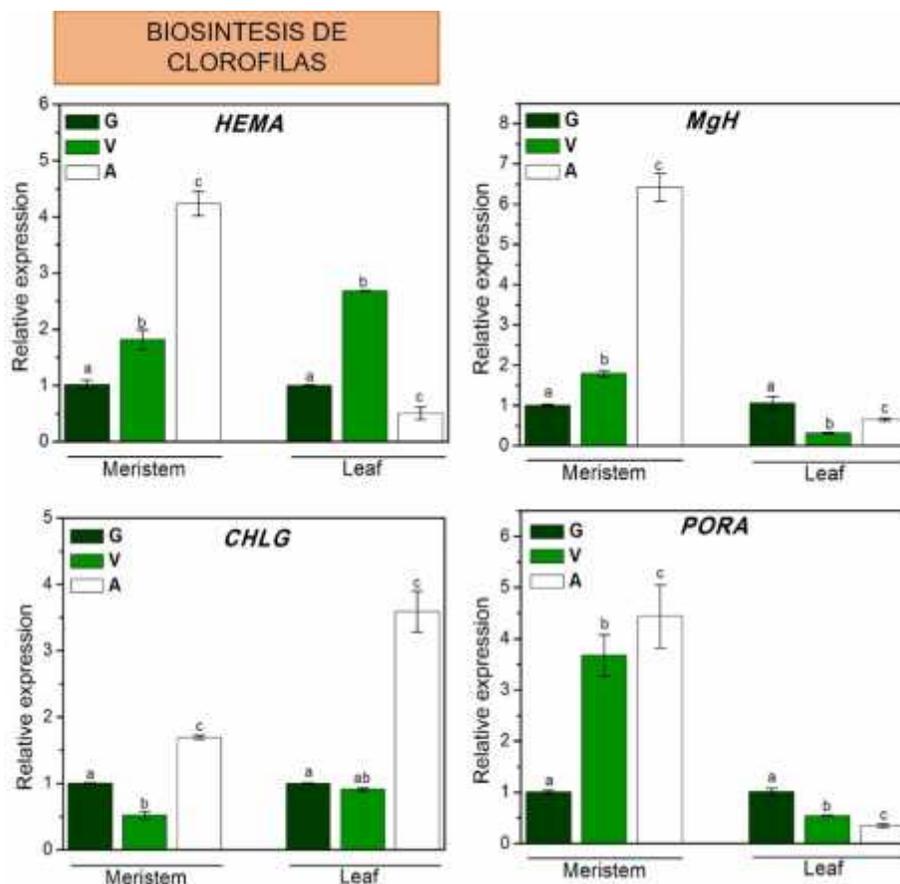


Figura 2.6. Niveles de expresión relativa de los genes que codifican para la biosíntesis de clorofilas: HEMA, MgH, CHLG, y PORA. El análisis se realizó en tejidos de la base meristemática y en hojas en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 5$.

CICLO DE LA CLOROFILA. El análisis de los niveles de expresión por RT-qPCR de genes relacionados con el ciclo de la clorofila (**Figura 2.7**) mostraron patrones de expresión diferenciales entre los tejidos de la base meristemática y las hojas de los fenotipos G, V y A. Los niveles de expresión *HCAR* (que codifica hidroximetilclorofila una reductasa) fueron bajos en meristemo y hoja de V, mientras que en A incrementaron dos veces con respecto a la expresión de G en la base meristemática y hoja. El análisis de la expresión de *CAO* (que codifica para una *clorofila sintasa*) presentó una mayor expresión con base en la región meristemática de V y una diferencia significativa en hoja, mientras que A presentó un

incremento significativo en base meristemática menor a V, pero mayor a G en la base meristemática. Entre los dos genes involucrados en el ciclo de la clorofila, HCAR mostró una correlación significativa con el contenido de clorofila [$r = 0.91$ ($p < 0.01$); **Tabla 4.1**].

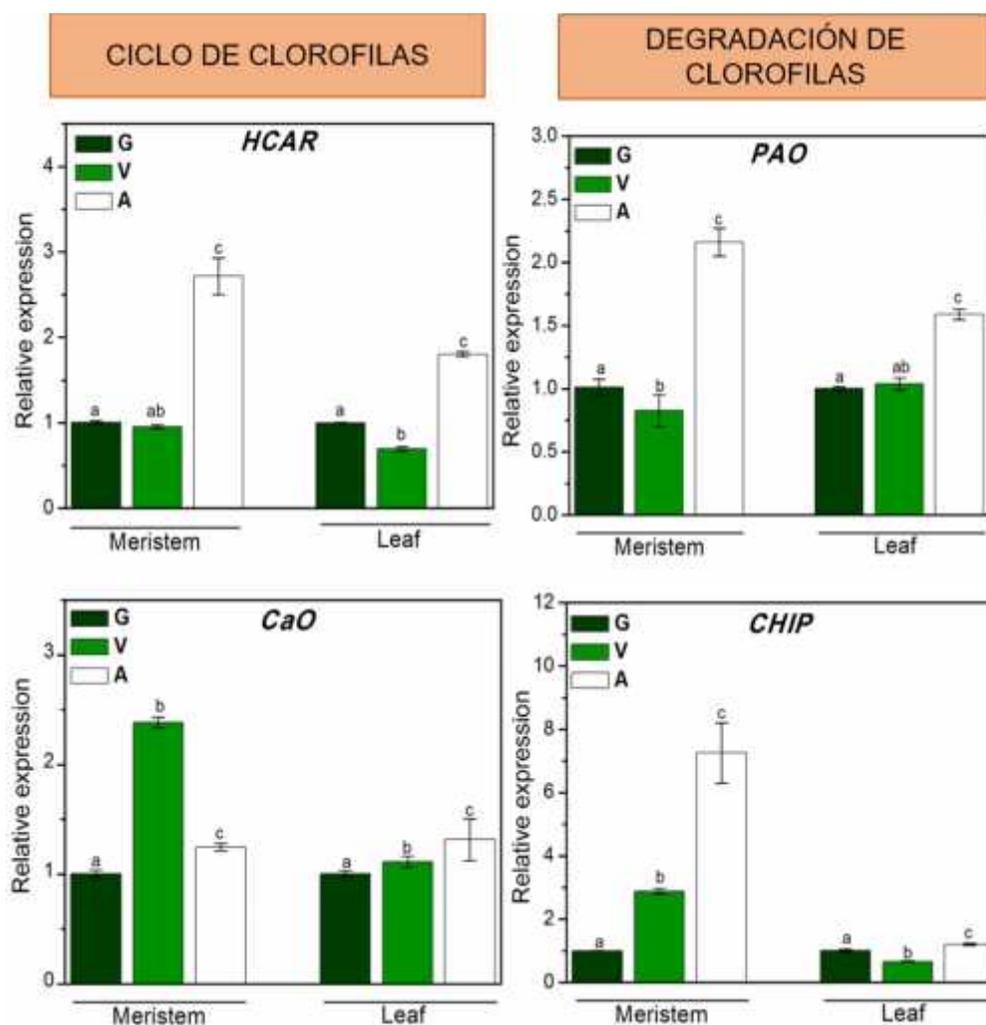


Figura 2.7. Niveles de expresión relativa de los genes que codifican para el ciclo y degradación de clorofilas: *HCAR*, *CaO*, *PAO* y *CHIP*. El análisis se realizó en tejidos de la base meristemática y en hojas de los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $p = 0.05$). $n = 5$

DEGRADACIÓN DE LA CLOROFILA. El análisis de los niveles de expresión por RT-qPCR de los genes relacionados con el ciclo de la clorofila (**Figura 2.7**) mostraron patrones de expresión diferenciales entre los tejidos de la base meristemática y hoja de los fenotipos G, V y A. Los niveles de expresión de PAO (que codifica para feoforbida a oxigenasa), es necesario como el regulador principal en la vía de degradación de la clorofila, ya que oxida la clorofila a, que eventualmente se convertirá en catabolitos de clorofila no fluorescentes, presentó un incremento significativo en el tejido meristemático y en la hoja en el fenotipo A. Mientras que en V disminuye significativamente en el tejido de los meristemos y en las hojas se mantiene en niveles similares a los observados en G (**Figura 2.7**). Los niveles de expresión de ChIP (que codifica para la geranylgeranyl difosfato reductasa cloroplástica), elemental para la catálisis de geranylgeranyl difosfato a fitol difosfato, ya que proporciona el fitol para la síntesis de tocoferol y clorofila, presentó el mayor incremento en la base meristemática de A y un aumento significativo en hoja, mientras en V presentó un ligero aumento en la base, pero una disminución en hoja con respecto a los niveles de expresión encontrados en G.

GENES ASOCIADOS A LA FOTOSÍNTESIS. El análisis del agrupamiento de los genes que codifican proteínas relacionadas con la fotosíntesis reveló dos patrones de expresión diferenciales en las hojas y en la base meristemática en los fenotipos G, V y A (**Figura 2.8**). Los genes analizados codifican para las proteínas centrales del fotosistema I (PsaA, PsaB) y el fotosistema II (PsbA y PsbD), además, se incluyeron las dos unidades de RUBISCO, subunidades mayor y menor, expresadas de igual manera diferencialmente en todos los tejidos examinados. Los genes PsaA y PsaB se expresaron diferencialmente en base y en la hoja, PsaA presentó valores similares a los de G en ambos tejidos, mientras que, en V, presentó un incremento significativo en la base meristemática y una disminución en las hojas con respecto a G y A. Por su parte PsaB, presentó mayores niveles de expresión en el tejido de la base meristemática en V y A, mientras en las hojas presentó un mayor incremento en V. Los genes del fotosistema II PsbA y PsbD presentaron tendencias similares en sus niveles de expresión tanto en hoja como en la base meristemática. En ambos casos, PsbA y PsbD, presentaron una mayor expresión en la base meristemática del fenotipo A, seguido de un ligero aumento en V en la misma zona analizada, respecto a lo encontrado en G. Mientras que en la hoja PsbA, no presentó diferencias significativas

entre G, V y A, *PsbD* presentó una disminución significativa menor a 0.5 URE en A y V con respecto a los niveles de expresión de G. La expresión de los genes *rubL* y *rubS* (que codifican para RUBISCO, son codificados por los genomas del cloroplasto y nuclear, respectivamente) presentaron diferencias significativas, *rubL* no presentó diferencias significativas en los fenotipos G y V de ambos tejidos analizados, mientras que en el fenotipo A presentó bajos niveles de expresión (0.3 URE). En tanto la expresión de *rubS*, presentó niveles elevados de expresión en la base meristemática en los fenotipos V y A, mientras que en hoja *rubS* presentó una mínima expresión en A, en contraste a G y V en donde se presentó niveles similares de expresión.

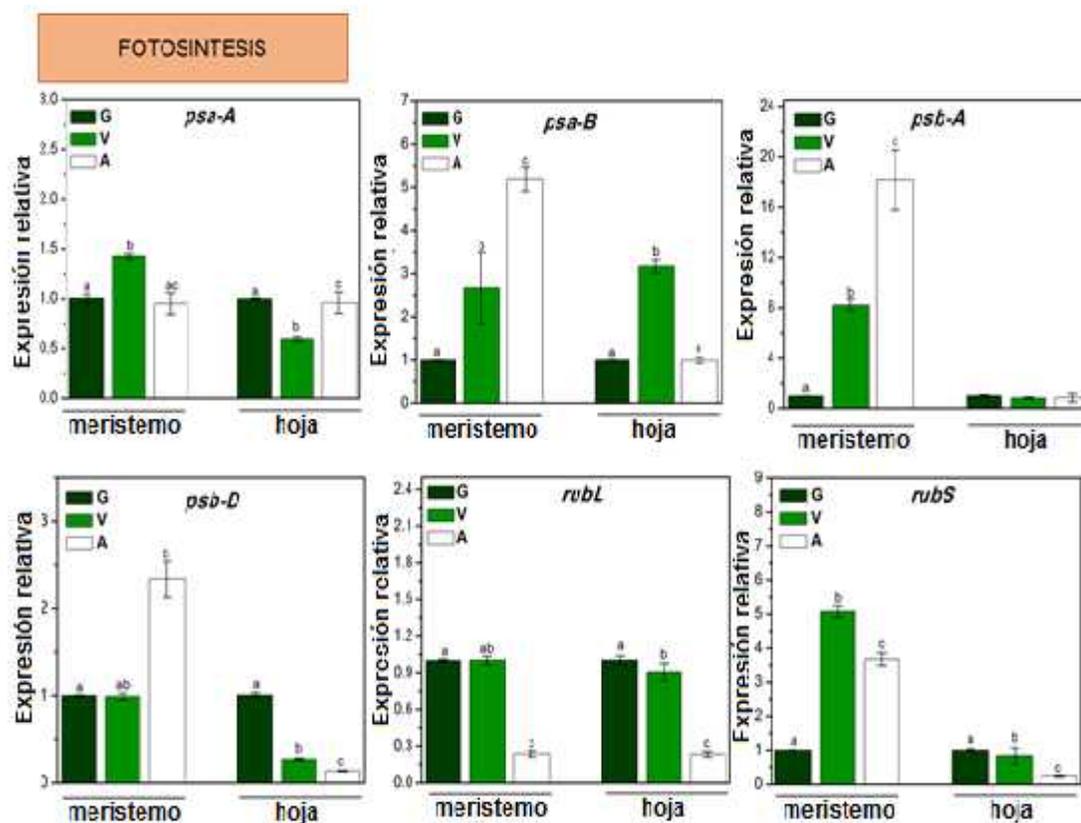


Figura 2.8. Niveles de expresión relativa de los genes que codifican para la fotosíntesis: *Psa-A*, *Psa-B*, *Psb-A*, *Psb-D*, *RubL* y *RubS*. El análisis se realizó en tejidos de la base meristemática y en las hojas de los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$). $n = 5$

2.3.7 Niveles transcripcionales de expresión de los microARNs, miR408, miR172 y miR156

El nivel transcripcional de los microARNs se analizó a partir de las secuencias maduras de miR156, miR172 y miR408. Las eficiencias por qPCR de los oligonucleótidos fueron comprobadas utilizando como gen de referencia snU6, obteniendo rangos aceptables (Figuras 2.9 y 2.10)

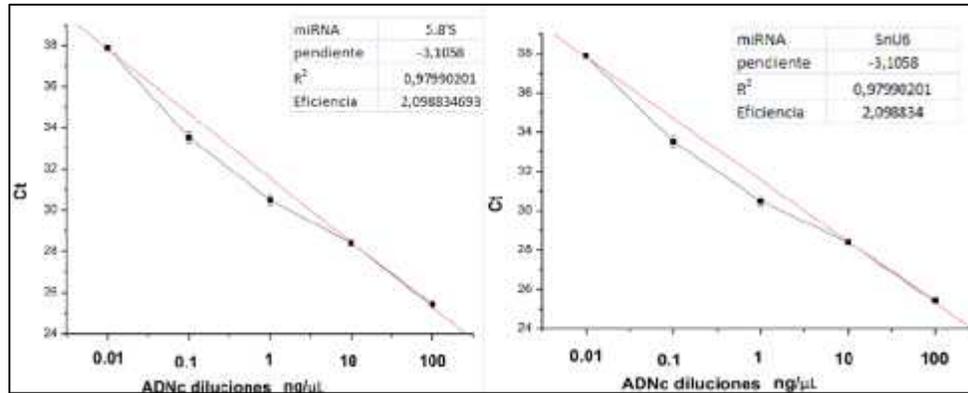


Figura 2.9. Eficiencias de los oligonucleótidos normalizadores para la expresión de microRNAs utilizando qPCR- tiempo real. La eficiencia del gen 5.8's y SnU6 referencia Ct: valor umbral del ciclo (media \pm SD; n = 3); E: eficiencias de qPCR $E = 10[-1/\text{slope}]$.

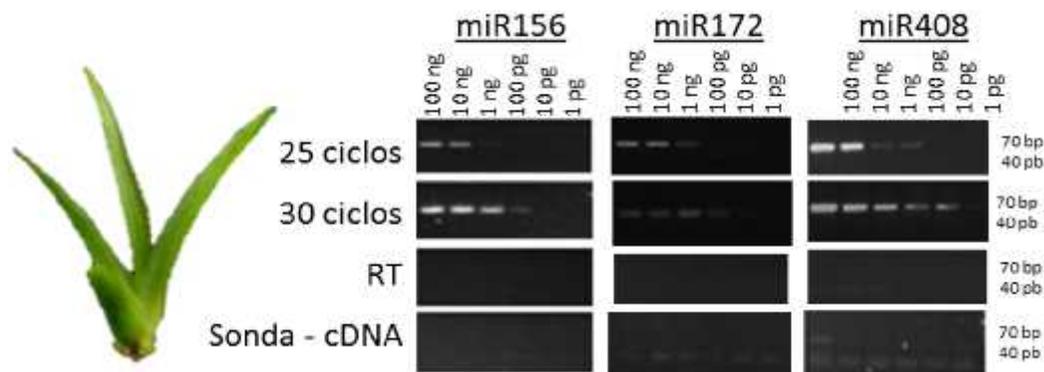


Figura 2.10. Optimización de las concentraciones del ADNc para el estudio de los microARNs; miR156, miR172 y miR408. Fragmentos obtenidos entre 70-40 pb que indican la concentración para la amplificación de microARNs maduros en *A. angustifolia*.

De acuerdo con los patrones de expresión en los tejidos de la zona meristemática-basal y de hoja de los fenotipos G, V y A, se presentaron dos patrones de expresión, la mayor actividad de los microARNs miR172 en V y miR408 en A en la región meristemática (**Figura 2.11**). Los niveles observados a la baja de miR408 en hoja V y A y el incremento significativo de miR172 y miR 156, sugieren el establecimiento de un segundo patrón en los niveles de expresión. Los resultados observados sugieren la regulación de microARNs en la actividad fotosintéticas, principalmente la actividad de miR408 podría encontrarse asociada a la fotosíntesis y el desarrollo foliar.

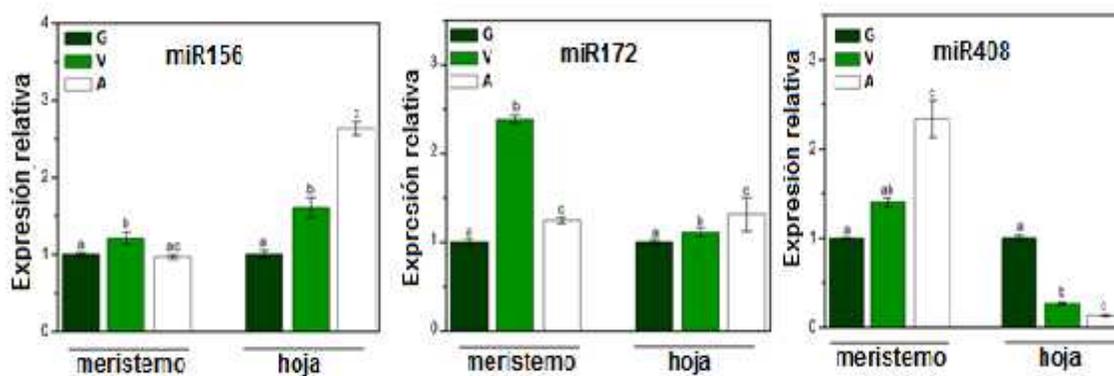


Figura 2.11. Niveles de expresión relativa de la secuencia madura de los microARNs: miR156, miR172 y miR408 asociados a la regulación de las clorofilas y de la fotosíntesis. El análisis se realizó en tejidos de la base meristemática y hojas en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia* *in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $p = 0.05$). $n = 5$.

2.4 DISCUSIÓN

En la naturaleza, la pérdida total de la pigmentación es definida como “albinismo”, un crecimiento de baja incidencia y una mínima tasa de supervivencia (Makowska y Oleszczuk, 2014; Roy *et al.*, 2013). En el cultivo *in vitro* de *A. angustifolia*, un sistema regenerado por largo tiempo mediante la organogénesis, ha mostrado azarosamente regenerantes albinas, estables y no reversibles (**Figura 2.1**). Las observaciones morfológicas y estructurales (**Figuras 2.2 y 2.3**) en V y A, revelaron patrones celulares anormales en el meristemo central respecto a lo observado en G, sugiriéndose que el metabolismo fisiológico (**Figuras 2.4 y 2.5**), y control transcripcional/molecular podrían encontrarse comprometidos

inicialmente por la capacidad celular de las células meristemáticas (**Figuras 2.6 – 2.8**). Estos resultados, coinciden parcialmente con lo reportado por Us-Camas *et al.* (2017), que sugiere que el contenido de los pigmentos fotosintéticos se encuentra asociado a la desregulación de genes claves de la biosíntesis de carotenoides y fotosíntesis. No obstante, Duarte-Aké *et al.* (2016) sugiere que el albinismo de *A. angustifolia*, podría encontrarse además condicionado por la disminución en los niveles de metilación en las plantas madres.

Particularmente, el crecimiento limitado (masa seca menor al 2%) y altos niveles CRW del 40% observados en el fenotipo A (**Figura 2.3 b**), sugiere que el albinismo en agave exhibe un mayor desplazamiento en los patrones celulares, durante el proceso de diferenciación en la base meristemática, comprometiendo el correcto desarrollo del tejido foliar. De manera similar, en el fenotipo de *Arabidopsis albino pale (albp)*, se ha demostrado que el engrosamiento foliar, y los niveles bajos de supervivencia, se encuentra asociando principalmente al aumento en el volumen del espacio aéreo y al tamaño de las células epidérmicas y mesófilas (Wang *et al.*, 2018a; Tsai *et al.*, 2017b; Hu *et al.*, 2015; Aluru *et al.*, 2006). Por otra parte, en arroz, la regeneración de primordios albinos *in vitro* está determinado por la variación de las concentraciones de citocininas que afectan el proceso de diferenciación celular en las líneas celulares de callos cultivada en diferentes medios de cultivo (Mohiuddin *et al.*, 2011). Por lo tanto, en *A. angustifolia*, al igual que varios autores, sugerimos que durante la micropropagación existe una alta estabilidad genética (Us-Camas *et al.*, 2017), por lo que el desarrollo de los fenotipos albinos podría encontrarse asociado con una respuesta adaptativa a las condiciones abióticas controladas en los sistemas *in vitro* (Wang *et al.*, 2018a; Sato *et al.*, 2011; Evenari, 1989).

Para las plantas, las variaciones en el crecimiento y el estado nutricional se encuentran asociados al descenso en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (B ba *et al.*, 2016; Kalaji *et al.*, 2014). En sistemas *in vitro*, similar a los resultados fotoquímicos de agave en V y A con respecto a G, (qP G: 0.217, V: 0.015, A:0.040 $\mu\text{m fotones}^{-1}$) (**Tabla 2.3 y Figura 2.4**), se ha sugerido que los cambios fotoquímicos son atribuidos a factores *in vitro* y al contenido de elementos nutricionales como el K^+ , Mg^{+2} y Fe^{+2} , cuyas alteraciones contribuyen a disrupciones en la ruta biosintética de la clorofila, la estequiometría entre PSII y PSI y la inactividad de proteínas de los PSI y PSII (Kalaji *et al.*, 2018; Abadía, 1992).

En sistemas *in vitro* se ha documentado que valores de F_v/F_m alrededor de 0.85 – 0.73 indica que el FSII se encuentra en estado óptimo (Cassana *et al.*, 2010; Baker, 2008). En *agave* cultivado *in vitro*, las plantas G y V de los tres fenotipos evaluados, mantuvieron valores elevados de fluorescencia en G de 0.78 ± 0.013 y V de 0.71 ± 0.056 (**Tabla 2.3**), estos datos sugieren que el FSII no se encuentra afectado por las condiciones *in vitro* (luz y temperatura). Sin embargo, similar a lo reportado por (Guo *et al.*, 2006), los valores imperceptibles de esta relación en A, pueden estar relacionados con daños en el aparato fotosintético. Mientras que la disminución de la actividad potencial del PSII (F_v/F_0) en V (2.6 ± 0.32) en contraste a G (3.6 ± 0.14), ha sido asociado al estrés que representa para una planta la falta de pigmentación lo cual restringe la actividad fotoquímica del PSII (Li *et al.*, 2018a).

El “apagado no fotoquímico” (NPQ) en G (0.38 ± 0.10) y V (0.28 ± 0.14), indica que la capacidad de disipación de la energía en forma de calor (Grieco *et al.*, 2012; Omasa *et al.*, 2009). Los datos fotoquímicos nos permiten sugerir que la eficiencia fotoquímica en la hoja V puede asociarse a los cambios estructurales en el meristemo y los procesos de división y expansión celular, que hacen que células mixtas (cloroplastos funcionales y anormales) desencadenen un mecanismo bioquímico compensatorio, permitiendo así que con mínimas diferencias V, presente relaciones fotoquímicos (qP, F_v/F_0), ETR y una eficiencia fotosintética similares al fenotipo verde (Wang *et al.*, 2018a; Yu *et al.*, 2008; Miura *et al.*, 2007; Aluru *et al.*, 2006).

De manera interesante, las diferencias hasta el momento observadas en V y las pronunciadas deficiencias fotoquímicas y fotosintéticas en A, coinciden de forma general a las líneas albinas en maíz, en los que el crecimiento de nuevos individuos albinos se ha relacionado al grado de desregulación en la programación genética nuclear y/o plástica, surgiéndose que la disminución de la plasticidad celular desencadena la incapacidad de producir cloroplastos, y que el tejido vuelva a ser verde (Sato *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2007; Sud y Dengler, 2000; Evenari, 1989). En *A. angustifolia* las anomalías en tejido foliar, células meristemáticas, desarrollo de cloroplastos y deficiencia fotosintética comprende las principales características del albinismo observado en las monocotiledóneas (Zhao *et al.*, 2017; Shmakov *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2009).

Adicionalmente, los datos cuantitativos de genes asociados al metabolismo de la clorofila y fotosíntesis exponen diferencias en los niveles de expresión entre los tejidos analizados de *A. angustifolia* G, V y A (**Figura 2.5, 2.6 y 2.7**). Nuestros resultados sugirieron que el fenotipo variegado y albino no se encuentra asociado totalmente a la inhibición génica de los elementos claves para la síntesis de clorofila y la fotosíntesis. No obstante, otros autores han demostrado que durante el albinismo una amplia desregulación en genes del cloroplasto, clorofilas y fotosíntesis establecen el grado del albinismo (Shmakov *et al.*, 2016). Por ejemplo, similar a lo reportado en *Arabidopsis*, el transcrito del gen *RbcL* se podría encontrar asociado a una señal reductora capaz de promover la degradación del mensajero (Carmo-Silva *et al.*, 2015). Por otra parte, la expresión de CHLG fue significativamente mayor en A, podrían correlacionarse positivamente al contenido de clorofila encontrados en V y G [$r = 0.98$ ($p < 0.01$)], mientras que la desregulación de los genes en la base y en la hoja de A, podrían estar correlacionados con la ausencia de cloroplastos y la deficiencia fotosintética mostrada en la **tabla 2.4**. Similar a lo reportado en arroz, en agave, la expresión de *HCAR* podría estar regulando el incremento en la actividad fotoquímica, alcanzando inclusive el reverdecimiento de fenotipos albinos (Ohmiya *et al.*, 2014). Así, también *PaO* (**Figura 2.5**) con niveles más altos en la base meristemática y en las hojas del fenotipo A, sugiere una alta descomposición de la clorofila a través de la vía PAO/filobilina (Christiansen y Gregersen, 2014).

La ausencia de clorofilas en A, se asoció estrechamente con la baja expresión de genes que codifican varias proteínas de unión a clorofila, incluidas las proteínas de biosíntesis y ciclo de clorofilas, mientras que la expresión de los genes *PsaA* se vio menos afectada que *PsbA* (**Figure 2.8**). Vale la pena recordar que la síntesis de las clorofilas y las proteínas de unión a la clorofila alcanzan a sintetizarse de forma coordinada, de lo contrario se ha demostrado que la clorofila libre incrementa el daño fotooxidativo en las células (Ghandchi *et al.*, 2016; Tripathy y Pattanayak, 2012).

Por otro lado, en modelos de soya y el arroz, se ha demostrado el papel clave sobre la actividad de los ARN pequeños, sugiriendo que las diferentes distribuciones de longitud de los ARN pequeños indican las diferentes características morfológicas entre varias especies de plantas (Gao *et al.*, 2017). Similar a lo observado en *Arabidopsis*, la expresión elevada de miR408 podría encontrarse asociada a la regulación negativa del FACTOR

REGULADOR DEL CRECIMIENTO 4 (FGC4), que conduce a un aumento en el peso y rendimiento de la planta en respuesta a la concentración de cobre y a la luz (Abdel-Ghany y Pilon, 2008). Nuestros datos muestran que los niveles de expresión en la base meristemática podrían correlacionarse a las anomalías estructurales en la base meristemática. Por el contrario miR172 y miR156 han sido asociados con el desarrollo de las hojas y los procesos fisiológicos entre las plantas C₃ y C₄ (Debernardi *et al.*, 2017). miR156 presentó mayores niveles de expresión en hojas de A, mientras que en meristemo presentó valores similares a los de G. La expresión de miR172 mostró niveles elevados de expresión en la base meristemática de V y un incremento significativo en A con respecto a G. Ambos microARNs (miR156 y miR172), al igual que en Arabidopsis, podrían estar asociados a la capacidad fotosintética de asimilación y fijación de CO₂. En Arabidopsis, los niveles de CO₂ y la temperatura alteran la expresión de los microARNs, afectando el crecimiento y el desarrollo de las plantas, particularmente, se ha demostrado que la red transcripcional regulada por miR156/157 y miR172 podría encontrarse asociada a los niveles de CO₂, condicionando el desarrollo de tejidos y acelerando la floración.

En conclusión, con base a este estudio, la expresión génica y el contenido de clorofila, sugerimos que la baja tasa de biosíntesis de clorofila y la alta tasa de degradación de la clorofila conducen a la ausencia de clorofilas en los fenotipos A y V. Además, la expresión relativa de miR408, miR156 y miR172 en base meristemática y hoja, sugiere que el balance de los microRNAs, podrían conducir a las alteraciones estructurales y morfológicas del tejido foliar, además de conducir a diversas interacciones entre genes nucleares y cloroplásticos en el proceso de adaptación fisiológica en V y A.

CAPÍTULO III

ESTUDIO FISIOLÓGICO Y MOLECULAR DE PLÁSTIDOS PRESENTES EN HOJAS DE LAS VARIANTES SOMACLONALES ALBINAS DE *A. angustifolia*

3.1 INTRODUCCIÓN

Los cloroplastos proveen los intermediarios metabólicos que apoyan el crecimiento de las plantas, por ejemplo, moléculas de señalización, aminoácidos, reguladores de crecimiento y sus precursores (Waters y Langdale, 2009). Por lo tanto, no es sorprendente que el cloroplasto juegue un papel importante en los procesos asociados al crecimiento de órganos y tejidos en todas las etapas del desarrollo de las plantas (Cejudo *et al.*, 2019). La integridad del cloroplasto se encuentra asociada a la eficacia de la cadena del transporte de electrones, los niveles de producción de ATP y acción reductora durante la fotosíntesis (Cejudo *et al.*, 2019; Waters y Langdale, 2009). La variación entre los periodos de luz y oscuridad condicionan los niveles del poder reductor del cloroplasto a través de la cadena fotoelectrónica y modificando así la cavidad interna del cloroplasto (Tanaka *et al.*, 2008; Tullberg *et al.*, 2000). En *Arabidopsis* y otras especies, la regulación redox del interior del cloroplasto es clave para el balance entre actividades oxidantes y reductoras, por lo cual resulta además sensible al estado fisiológico y funcional del organelo, como a factores ambientales que de igual manera condicionan el desarrollo de los cloroplastos (Jensen y Leister, 2014; Michelet *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 1997).

Los cloroplastos, se caracterizan por ser autónomos y proliferar a través de la división celular (Aranda-Sicilia *et al.*, 2016; Evenari, 1989). El desarrollo de este proceso inicia con la partición de los nucleoides (complejos ADN-proteína) y la fisión de las dos membranas de la envoltura (Börner *et al.*, 2015; Pogson *et al.*, 2015). Durante esta etapa se ha relacionado particularmente el balance entre la importación y el transporte de las proteínas codificadas por genes nucleares, que condicionan el desarrollo de la biogénesis y la homeostasis de los cloroplastos (Pogson *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2013; Bauer *et al.*, 2001). En general, la diferenciación inicial de los cloroplastos se presenta en la zona meristemática y del mesófilo, en donde se encuentran el precursor plastídico “los proplástidos”, categorizando la relación entre la conformación estructural del tejido meristemático y sus patrones celulares de división. Hasta el momento, se estudian principalmente los etioplastos, con la capacidad de

diferenciarse a cloroplastos cuando son expuestos a condiciones óptimas de luz (Valkov *et al.*, 2009). Los amiloplastos y leucoplastos, estructuras plastídicas no diferenciadas a cloroplastos, que pueden desarrollarse a partir de la inhibición o el bloqueo de la biogénesis de los cloroplastos el desarrollo de cloroplastos quiméricos en un mismo tejido foliar (Zhang *et al.*, 2016; Miura *et al.*, 2010).

Otros estudios moleculares y morfológicos apuntan hacia la inhibición de la ruta de biogénesis de los cloroplastos, sugiriéndose que la vía de biogénesis del cloroplasto involucra una reorganización dinámica de aproximadamente 3,000 proteínas codificadas por genes nucleares y aproximadamente 85 proteínas codificadas por el genoma plastídico y esenciales específicamente para los fotosistemas I y II (Barton *et al.*, 2018; Pogson *et al.*, 2015; Wangs *et al.*, 2014; Jensen y Leister, 2014). Además, en plantas con albinismo letal o transitorio, la falta de clorofila da como resultado el deterioro de la actividad fotosintética, el desarrollo anormal de tejidos y órganos de la planta y la muerte prematura (Grübler *et al.*, 2017). En cebada, la caracterización de las mutantes albino mostró que la intensidad lumínica condiciona los determinantes genéticos y los mecanismos moleculares del albinismo (Shmakov *et al.*, 2016). Estos descubrimientos genéticos y proteómicos sugieren que el balance en la comunicación recíproca cloroplasto-núcleo es clave para la diferenciación de los espacios transmembranales, el estroma, los tilacoides y el lumen que regulan y disipación la energía de los fotosistemas (Liu *et al.*, 2007; Ankele *et al.*, 2005; Dunford y Walden, 1991).

En este capítulo se describen los resultados obtenidos sobre el aislamiento de los plástidos. Mostramos los análisis fisiológicos (morfología y estructura), utilizando microscopia confocal y el análisis molecular sobre la expresión génica de los transcritos que codifican para enzimas/proteínas implicadas en la biogénesis de los cloroplastos. El análisis molecular (genes) se realizó con el fin de determinar cómo se encuentra afectada la expresión de estos genes y determinar si existe una relación entre sus niveles de expresión y las diferencias fisiológicas y el contenido de plástidos observados en las variantes somaclonales.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Las plántulas de *A. angustifolia* G, V y A, se cultivaron en medio modificado de Murashige y

Skoog (MSB-5) (Murashige y Skoog, 1962). El medio MSB-5 (fuente de nitrógeno KNO_3 10 mM y NH_4NO_3 5 mM) se complementa con 0.11 μM de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4.43 μM de 6-benciladenina (6BA), 0.175% de agar, 0.175% de gelrite, 3% de sacarosa y pH 5.75 (Robert *et al.*, 2006). Las plántulas *ex vitro* utilizadas como marco de referencia para *A. angustifolia in vitro* fue colectado en las instalaciones del CICY, Mérida, Yucatán, México.

3.2.2 Aislamiento de los cloroplastos en los fenotipos G, V Y A de *A. angustifolia*

El protocolo utilizado fue estandarizado en hojas de *A. angustifolia* Haw. El aislamiento de los plástidos y cloroplástidos, en los tres fenotipos analizados de *A. angustifolia* fue adaptado de (Gerwick *et al.*, 1977), y (Shi *et al.*, 2012). El diseño general de aislamiento y purificación de los orgánulos aislados fue optimizado a partir de 100g de tejido de los fenotipos verdes, variegados y 300 g en hojas albinas.

3.2.3 Amortiguadores para el aislamiento y purificación de los cloroplastos

A) amortiguador de aislamiento: HEPES 100 mM, pH 8, sorbitol 300 mM, ácido ascórbico 5 mM, NaCl 1 M, MgCl_2 5 mM, EDTA 5 mM, DTT 2 mM, ABS al 2%. **B)** amortiguador de lavado: HEPES 75 mM, pH 7.75, sorbitol 200 mM, NaCl 500 mM, 1% PVP-40, 0.1% ABS. **C)** amortiguador de sacarosa: soluciones de sacarosa 2 M, 1.75 M, 1.5 M, 1.25, 1 M en HEPES 50 mM, pH 8.0, sorbitol 300 mM, 0.1% ABS.

3.2.4 Amortiguadores para resuspensión de los cloroplastos

Cada pastilla final fue resuspendida en 0.5 mL / 1 mL del amortiguador D1 - D4, considerando el tipo de análisis a realizar.

D1) Lavado de impureza de los plástidos: MOPS 25 mM, PMSF 1 mM, EDTA 50 mM, pH 7.0, MgCl_2 2 mM, DTT 2 mM y finalmente agregar 90% de glicerol para observación por microscopía confocal. **D2)** proteínas de extracción: tris-HCl 50 mM (pH 7.4), MOPS 20 mM, PMSF 1 mM, DTT 2 mM, -mercaptoetanol al 2% y SDS al 2%. **D3)** extracción del ADNc: tris-HCl 100 mM (pH 8.0), NaCl 50 mM, EDTA 25 mM y DTT 1 mM. **D4)** extracción del ARN: tris-HCl 100 mM (pH 8.5), SDS al 1%, LiCl 100 mM y EDTA 10 mM.

3.2.5 Aislamiento de plástidos (el procedimiento fue realizado a 4 °C)

Las plantas *ex vitro* se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio al 1%, y H_2O , y

posteriormente el material *in vitro* y *ex vitro* fueron colocados en oscuridad por 48 h, a 4 °C. Las secciones de las hojas (<1 cm), fueron sumergidas en 50 mL del amortiguador A, por 10 min, aplicando vacío por 5 min (bomba SIEMENS). Posteriormente, la mezcla del tejido y amortiguador A, se homogeneizó por 2 min a una revolución baja velocidad, filtrando posteriormente la con filtros Miracloth 0.45 µm (Merck). Las muestras fueron centrifugadas a 150 x g x 3 min a 4 °C, para eliminar restos celulares de otros orgánulos y cloroplastos lisados. El sobrenadante fue colectado y centrifugado a 2,500 x g x 15 min a 4 °C, finalmente la pastilla de los cloroplastos íntegros fue resuspendida en 30 mL del amortiguador B, y centrifugadas a 2,500 x g x 15 min a 4 °C, por dos ocasiones, resuspendiendo finalmente la pastilla en 15 mL del amortiguador B.

3.2.6 Gradiente de sacarosa

La purificación de los plástidos de los fenotipos G, V y A, se realizó utilizando gradientes discontinuos de sacarosa preparados con el amortiguador C y diferentes concentraciones de sacarosa (2M, 1.75 M, 1.5 M, 1.25 M y 1 M). Los gradientes realizados presentaron las interfases correspondientes a P1 (2 -1.75 M) cloroplastos maduros; P2, (1.75-1.5 M) cloroplastos juveniles con tilacoides desarrollados; P3, (1.5-1.25 M) y P4 (1.25 M -1 M), plástidos inmaduros. Para la separación de los plastidos aislados fueron colocados 5 mL de la suspensión de cloroplastos en la fase superior del gradiente, centrifugando a 4,500 x g x 25 min a 4 °C utilizando un rotor oscilante (HB-4, Sorvall RC 5B). Las fases intermedias se colectaron con pipetas Pasteur, mezclando posteriormente cada fase con dos volúmenes del amortiguador C. La centrifugación final fue realizada a 3,500 x g x 10 minutos a 4 °C.

3.2.7 Intercambio de gases

Las variables fotoquímicas sobre el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fluorescencia de la Chl: F_v/F_m), la actividad potencial del FSII (F_v/F_0), rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (F_{FSII}), coeficiente de extinción fotoquímico (qP) y no fotoquímico (qN). La F_v/F_m se obtuvo de la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) y la fluorescencia máxima (F_m), donde F_0 = fluorescencia inicial fueron analizando utilizando el equipo PAM. El pulso de luz saturante fue de 8000 µmol m⁻² s⁻¹, las curvas se realizaron con nueve pulsos de luz actínica (0-1500 µmol m⁻² s⁻¹). Antes de las mediciones los plastidos se aclimataron en oscuridad durante 60 minutos, se midieron siete muestras de cada fenotipo (G, V y A).

3.2.8 Microscopía de confocal de plástidos aislados

La integridad y pureza de los cloroplastos aislados se realizó por microscópica confocal. Los cloroplastos fueron estabilizados en el amortiguador D1 y 2% de glutaraldehído en el amortiguador de fosfato de potasio (10 mM; pH 7.8). La observación microscópica se realizó utilizando un microscopio Olympus FV1000 (Olympus Corporation), con líneas de excitación laser a 405 nm y 633 nm. Las fotografías se obtuvieron utilizando el software de visualización FV10 ASW 3.1 (Olympus). La digitalización de las imágenes se realizó a una resolución de 1,024 x 1,024 píxeles y una velocidad de escaneo de 12.5 s / píxel.

3.2.9 Cuantificación de clorofila

El aglomerado con los cloroplastos fue resuspendido en 5 mL. Cada tubo fue cubierto con una lámina de papel de aluminio y mantenido en frío durante 1 h. Recoger 0.5 mL de la suspensión obtenida en el tubo de ensayo y mezclar con 5 mL de acetona al 80%, agitar y dejar reposar 5 mín, posteriormente se centrifugó a 500 g, 4 °C por 2 minutos y tomar el sobrenadante en una celda de cuarzo electroforética. Medir la absorbancia de la solución a 465 y 663 nm. %. Los valores obtenidos se sustituyen en la ecuación [clorofila (mg mL⁻¹)] = absorbancia x [total del volumen de acetona usado/vol*(mL) de la suspensión de los cloroplastos] x 0.029.

3.2.10 Diseño de cebadores asociados a la biogénesis del cloroplasto

Las secuencias de los diferentes genes involucrados en la biogénesis del cloroplasto y fotosíntesis se buscaron en el transcriptoma realizado por Gross *et al.* (2013) y anotados en la base de datos del NCBI de diferentes especies de *Agave* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (**Tabla 3.1**). A partir de estas secuencias, los cebadores se diseñaron utilizando los programas Oligo explore 1.1.2 y Oligo Analyzer 1.0.3. Las secuencias de los cebadores generados y utilizados para el análisis de qRT-PCR se enumeran en la **tabla 3.2**.

Tabla 3.1 Secuencias usadas para el diseño de oligonucleótidos de genes implicados en la biogénesis de los cloroplastos

Gen	Secuencia utilizada	Base de datos
RPS7	SRA:SRR1371239.147739.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
RPS4	SRA:SRR1371236.452373.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
Ycf4	SRA:SRR789755.26724782.2 SRA: SRR789754.6424362.	Transcriptoma de Agave/Genebank
sAPX	SRA:SRR789743.28890196.1	Transcriptoma de Agave/Genebank
tAPX	>gnl SRA SRR789753.9753643.2	Transcriptoma de Agave/Genebank
FC1	GAHU01033377.1	Transcriptoma de Agave/Genebank
GLK	SRA SRR789754.25397789.1	Transcriptoma de Agave/Genebank
GUN1	SRA:SRR789755.401253.1	Transcriptoma de Agave/Genebank

Tabla 3.2 Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el análisis qRT-PCR de genes implicados en la biogénesis de los cloroplastos

Gen	Secuencia de oligos 5' → 3'	Tm	Tamaño teórico
RSP7	F: GCCATTCGTTGGTTATTAGGG	62.6	128
	R: TGAGTCTCTTCCTTTTTGCG	60.5	
Rsp4	F: AAAGCCAAAGGGTCAACAG	61.7	179
	R: CGAGGTTTGCAGCGATAAC	60.1	
Ycf4	F: AGGTTCAATTAGGATTCTTAGTGGTTGG	64.7	195
	R1: TCGAATCGATCATAACCACTACCTAC	63.4	
FC1	F: GTTGGGGTGCTTCTCTTGAAC	63.3	230
	R: GCCTGCTCATTTGTTATCTTCC	62.2	
GLK	F: TGATGCTCAACCTCAAGTGAG	62.7	141
	R: TTGGCTACACCCTGCTTTTGTGA	63.9	
Gun1	F: CGTCAAGTTTGGGAGAATG	59.1	121
	R: CCTTCGGAGACAATAGATCG	59.6	
sAPX	F: GGGCTTAACGACCAGGATATAG	61	211
	R1: CTAGCAGATCTTCATCCCTTCT	59	
tAPX	F: AACTAAAGAGGGACCTGGAG	59.6	126
	R1: CAGTAGGCAAACTAGCAGATC	58.2	

3.2.11 RT-qPCR

El ARN total se aislado del tejido meristemático y hojas intermedias en los fenotipos G, V y A, utilizando el método del TRI Reagent (Sigma, T9424). La calidad del ARN se verificó en gel de agarosa al 1%. Para la síntesis de ADNc se utilizó 1 µg de ARN total y el kit del sistema de síntesis ProtoScrip (E6560S). Para la reacción RT-qPCR se utilizaron 0.25 µL de cada cebador a 10 µM, junto con 12.5 µL de la mezcla maestra de PCR SYBR 2X y 20 ng µL⁻¹ de ADNc en un volumen final de 25 µL. El programa de amplificación utilizado fue la PCR activación de la polimerasa a 95 °C durante 2 min, 30 ciclos a 95 °C durante 15 s, el alineamiento/extensión durante 35 s acorde a una temperatura elegida en función del par de cebadores (**Tabla 3.2**) y una extensión final a 72 °C durante 1 min. Ubiquitin11 se usó como un gen de mantenimiento, siguiendo el mismo programa de amplificación utilizado por Uscamas (2017). Las reacciones RT-qPCR se realizaron utilizando el Sistema de StepOne Software v2.2.2 –Real Time PCR (Applied Biosystems) y los resultados se analizaron utilizando el método 2^{-Ct} (Livak y Schmittgen, 2001). La cuantificación de la expresión génica relativa se realizó en los diferentes fenotipos utilizando tres réplicas biológicas y tres replicas experimentales.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Aislamiento y purificación de los plastidos en variantes somaclonales G, V Y A de *A. angustifolia*

En la actualidad, una amplia variedad de organismos y tipos de preparación son utilizados para aislar y comprender los mecanismos y el funcionamiento de los cloroplastos. El protocolo desarrollado en *A. angustifolia* nos permitió obtener cloroplastos funcionales e integros. Es importante destacar que los cloroplastos se aislaron de plantas que habían sido cultivados en medio Murashige y Skoog (MS), durante cinco ciclos de cultivos. Además del protocolo de aislamiento de cloroplastos, presentamos nuestro método de rutina para el análisis fisiológico y microscópico, lo cual ha demostrado que el protocolo es ampliamente reproducible.

La purificación de los organulos plastidiales (**Figura 3.1**), nos llevó a la observación de diferentes estadios de maduración de los plastidos aislados en G y V, en donde, se observaron gerontoplastos, cloroplastos maduros y plástidos juveniles < 3 µm, en contraste con A, en

donde se observaron estructuras con tamaños $< 2 \mu\text{m}$, sugiriéndose, el desarrollo temprano de proplástidos, el primer estadio de diferenciación de proplástido a plástido.

Adicionalmente, hemos determinado que reducción de la absorbancia por el contenido de clorofilas entre los fenotipos, estará directamente relacionado con la tasa fotosintética de la suspensión de cloroplastos (**Figuras 3.2 y 3.3**). En donde se ha observado que mayor rendimiento fotosintético en G y V, se encuentran contenidos en las fases intermedias 2 y 3 del gradiente de sacarosa, y por lo tanto el transporte de electrones y los equivalentes reductivos en los fotosistemas de los cloroplastos, se han relacionado a la capacidad fotosintética en G y V para aceptar electrones probablemente procedentes de la fotólisis del agua.

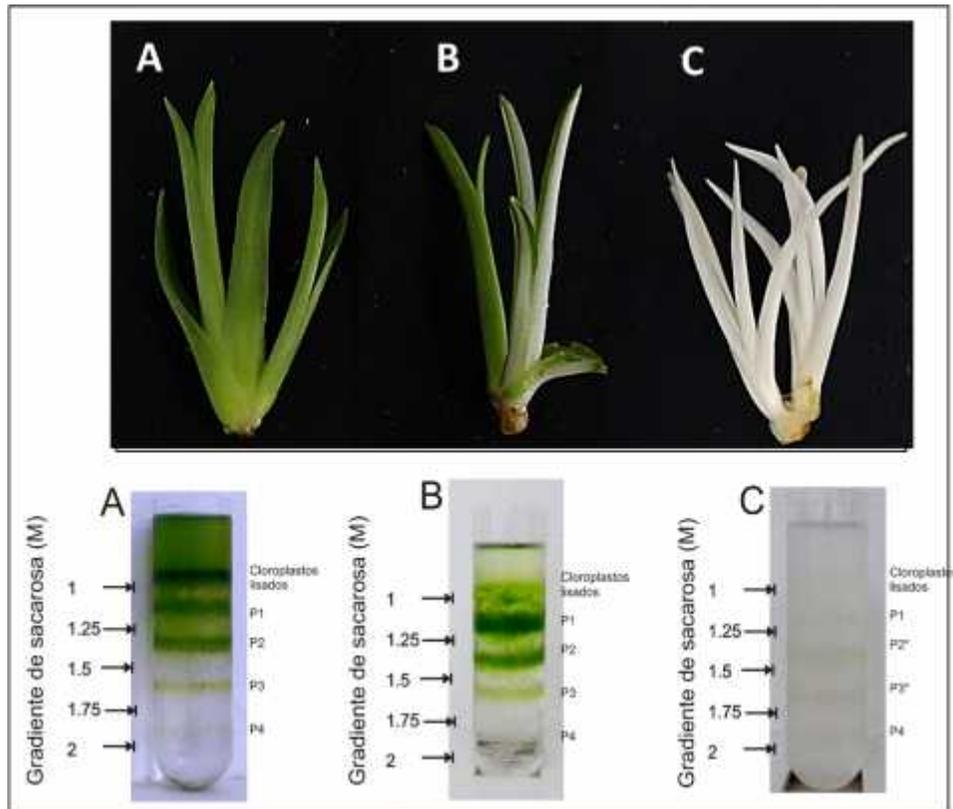


Figura 3.1 Aislamiento y fraccionamiento de los cloroplastos a través de un gradiente de sacarosa en los tres fenotipos de *A. angustifolia*, A) verde, B) variegado y en C) albino. Las fases visualizadas p1-p4, corresponden a los estadios de conversión de cloroplastos maduros (P4), cloroplastos jóvenes (P3), cloroplastos inmaduros (P2) y proplástidos (P1). Los asteriscos indican las fases 2 y 3 de los plástidos fraccionados en plantas albinas.

El análisis de la autofluorescencia de clorofilas (**Figura 3.2**) y la determinación de las concentraciones de clorofila a y b usando la espectrofotometría (**Figura 3.3**), el contenido de clorofilas se asocia al estado de diferenciación del cloroplasto. Es decir, el mayor contenido de clorofila (**Figura 3.2**) en plantas *ex vitro* e *in vitro* fenotipo G presenta niveles elevados en la primera fase, sugiriendo que la fracción correspondiente a cloroplastos maduros y de mayor capacidad fotosintética. Mientras que en V, las fases con mayor contenido de clorofilas, corresponden a las fracciones 2 y 3 y observándose un mayor número de cloroplastos maduros, con respecto a lo encontrado en G. Sin embargo, en las fases aisladas del tejido V, se observaron organelos con características en tamaño y forma a los cloroplastos, sin embargo, no emitieron autofluorescencia tras la observación por microscopía confocal. Sugerimos que estos cuerpos no fluorescentes son plástidos tipo leucoplastos y proteinoplastos. Finalmente, las fases purificadas del fenotipo A presentaron pequeñas estructuras con tamaños menores a $< 2 \mu\text{m}$, sin emitir autofluorescencia (**Figura 3.2**) o contenido de clorofilas (**Figura 3.3**).

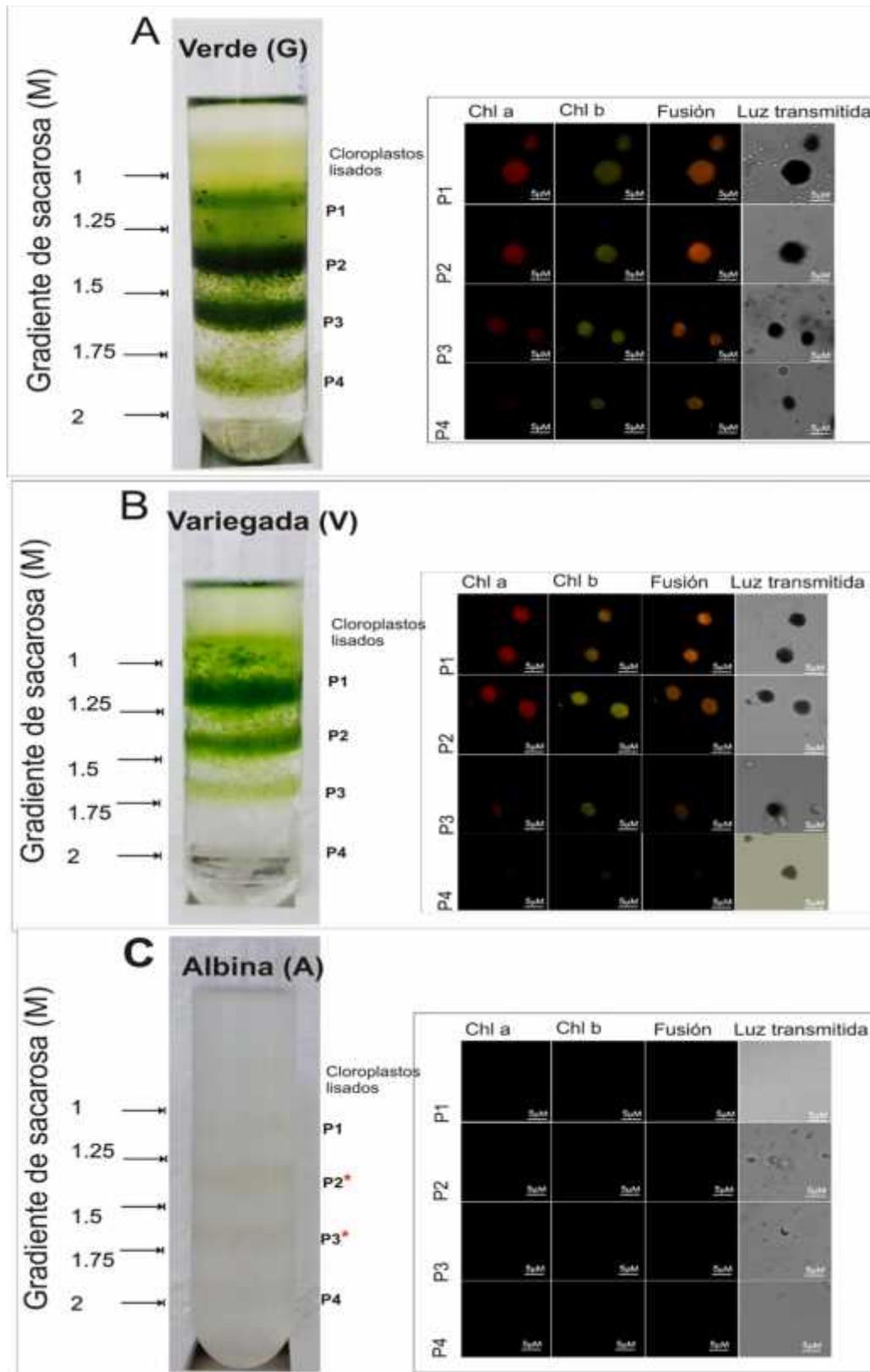


Figura 3.2. Fraccionamiento de los plástidos y cloroplastos aislados de los fenotipos G, V y A de *Agave angustifolia in vitro*. A) Gradiente de densidad diferencial de sacarosa del fenotipo G. B) Gradiente de densidad diferencial de sacarosa en el fenotipo V..C) Gradiente de densidad diferencial de sacarosa del fenotipo A. Situados a la derecha, en cada gradiente A, B y C, se muestra las microscopia confocal de cada fases desde la uno hasta la cuatro (P1-P4), analizadas en las longitudes de ondas para el analisis de la autofluorescencia de las clorofilas a (646 nm) y b (663 nm), así como la visualización de luz transmitida (brighth light).

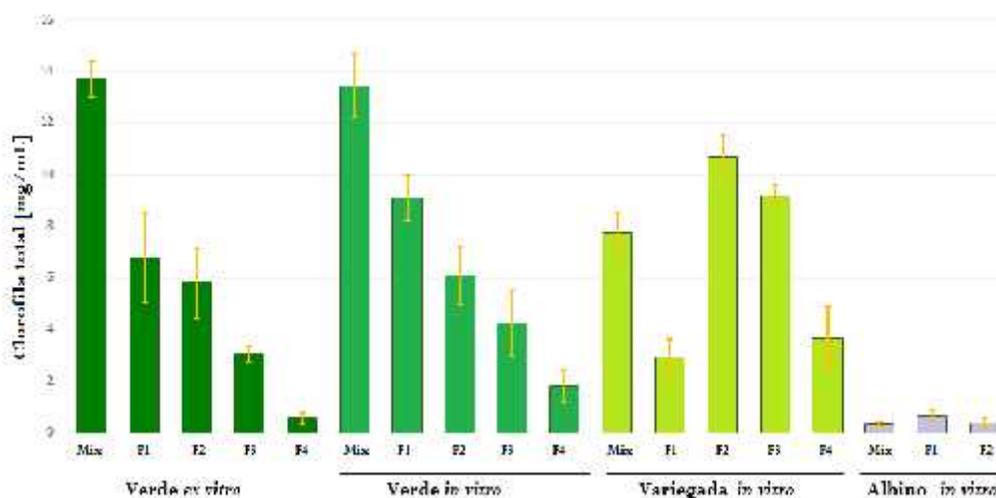


Figura 3.3. Cuantificación de clorofilas totales en las fases purificadas de las suspensiones de cloroplastos en los tres fenotipos de *A. angustifolia*.

3.3.2 Plástidos aislados: Actividad fotoquímica y fotosintética

Con el objeto de analizar en mayor profundidad el rendimiento fotoquímico de los cloroplastos y plástidos aislados en agave, se analizaron las variables qP, qN, actividad potencial mínima y máxima del PSII (**Figuras 3.4 y 3.5**). Como sabemos, estos parámetros se encuentran relacionados a los complejos proteínicos asociados a las membranas de la tilacoides y su valor resulta ser esencial durante la producción del agente reductor (NADPH_2) y síntesis de ATP. Los datos qP y qN obtenidos reflejan el mecanismo de adaptación y rendimiento fotoquímico de los cloroplastos a nivel de cambio de pH a nivel transtilacoidal, donde se podría estar indicando el funcionamiento e inactivación de los centros de reacción y

conformacionales de los pigmentos presentes en las membranas tilacoidales, como se observa en las fases G y V, existe una relación entre los datos de disociación fotoquímica y no fotoquímica.

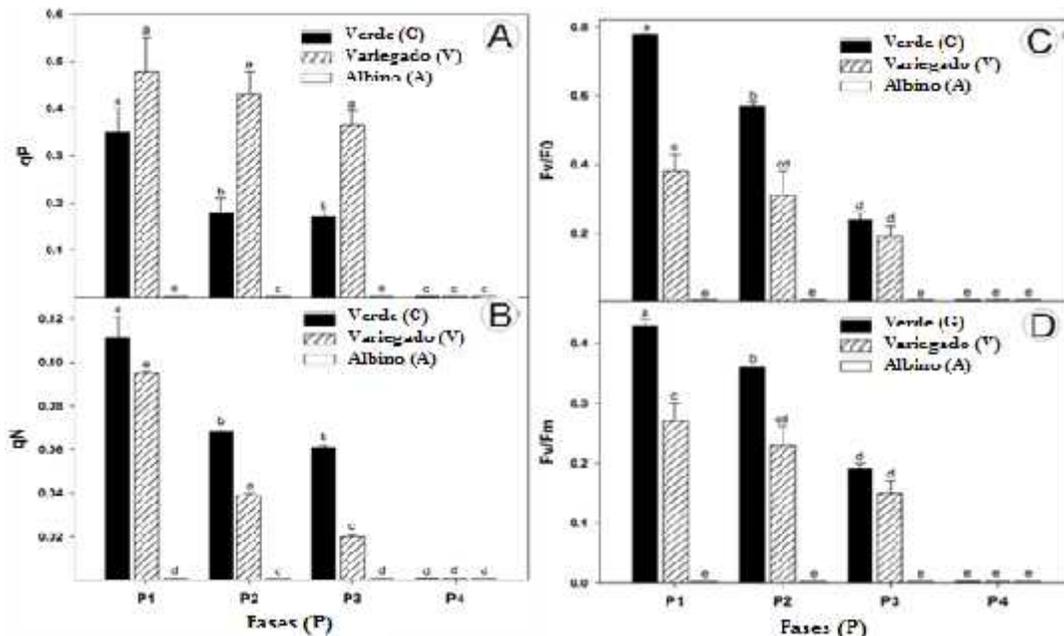


Figura 3.4. Análisis fotosintético de las fracciones de los plástidos y cloroplastos aislados en los fenotipos G, V y A. **A)** representa el coeficiente de extinción no fotoquímica (qP); **B)** Coeficiente de extinción fotoquímico (qN); **C)** Actividad potencial de PSII (F_v / F_0) y **D)** rendimiento cuántico fotoquímico máximo del PSII (F_v / F_m). Los datos muestran la media \pm SE. Las letras en el gráfico indican las diferencias estadísticas significativas con base a la prueba Tukey, $\alpha = 0.05$.

Por otra parte, los datos obtenidos por los métodos de fluorescencia muestran que el rendimiento cuántico obtenido en cada una de las fases podría relacionarse con la actividad fotoquímica primaria utilizada cuando todos los centros de reacción del PSII están oxidados o "abiertos" (F_v / F_m). En contraste con los datos mostrados en las fases de los fenotipos G y V, las fases 2 y 3, obtenidas de las plantas A, no presentaron una mínima actividad fotoquímica. Este dato, puede corroborarse una vez más determinando una curva respuesta del rendimiento cuántico fotoquímico en el fotosistema II (PSII) en relación con la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (**Figura 2.15**), donde se observa un comportamiento lineal a

0.000 en las fases analizadas del fenotipo A, en comparación con el comportamiento presente en las fases de los fenotipos G y V de *Agave angustifolia*.

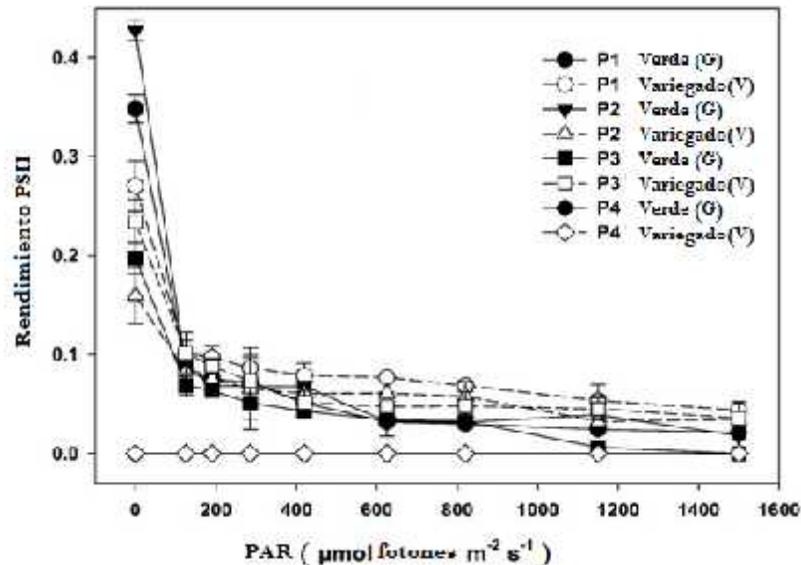


Figura 3.5. Curvas de respuesta del rendimiento cuántico fotoquímico efectivo del fotosistema II (PSII), en relación con la densidad de flujo de fotones fotosintéticos en las fracciones de los cloroplastos aislados en *Agave angustifolia*. Los datos muestran la media \pm SE.

3.3.3 Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados

Una vez amplificados los fragmentos por RT-PCR (**Tabla 3.2**), fueron enviados a secuenciar con la finalidad de confirmar su identidad. Los resultados de la secuenciación fueron analizados mediante el alineamiento de las secuencias con la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los resultados y porcentajes de similitud obtenidos se muestran en la **tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Similitud de los fragmentos de PCR de cada gen amplificado con sus proteínas ortólogas.

Gen	Proteína ortóloga	# de accesión	% de similitud
RPS7	Ribosomal protein S7 (rps7) gene, complete cds; chloroplast	JQ274261.1	96
RPS4	Hosta ventricosa ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; plastid	XP_020267581.1	95
Ycf4	Manfreda virginica photosystem I assembly protein ycf4 (ycf4) gene, complete cds; chloroplast	XM_010256356.2	99
sAPX	stromal ascorbate peroxidases Allium fistulosum	BAP76079.1	96
tAPX	Carica papaya L-ascorbate peroxidase T, chloroplastic	XM_022040675.1	93
FC1	ferrochelataste-1, chloroplastic-like: Dendrobium catenatum	XP_020677609.1	82
GLK	Asparagus officinalis- probable transcription factor GLK1 mRNA	LOC109825394	89
GUN1	pentatricopeptide repeat-containing protein, chloroplastic- Asparagus officinalis	XP_020254341.1	100

3.3.4 Análisis molecular de los niveles de expresión de los genes asociados al desarrollo de los cloroplastos

Los niveles de expresión fueron analizados y comparados entre los tejidos de la base meristemática y las hojas de los fenotipos G, V y A. Los genes analizados codifican para enzimas y/o proteínas involucradas en la biogénesis del cloroplasto: proteína ribosomal S7 (rps7), proteína ribosomal S4 (rps4), proteína ensamble del fotosistema I-ycf4 (ycf4), L-ascorbato peroxidasa T (tAPX), ascorbato peroxidasa estromal (sAPX), ferroquelatasa-1 (FC1), factor de transcripción GLK1-mRNA (GLK) y pentatricopeptide repeat-containing protein, chloroplastic (GUN1) fueron clasificados por su asociación al proceso de conversión plastídica (**Figura 3.6**) y sus niveles de expresión se presentan en la **figura 3.7**.

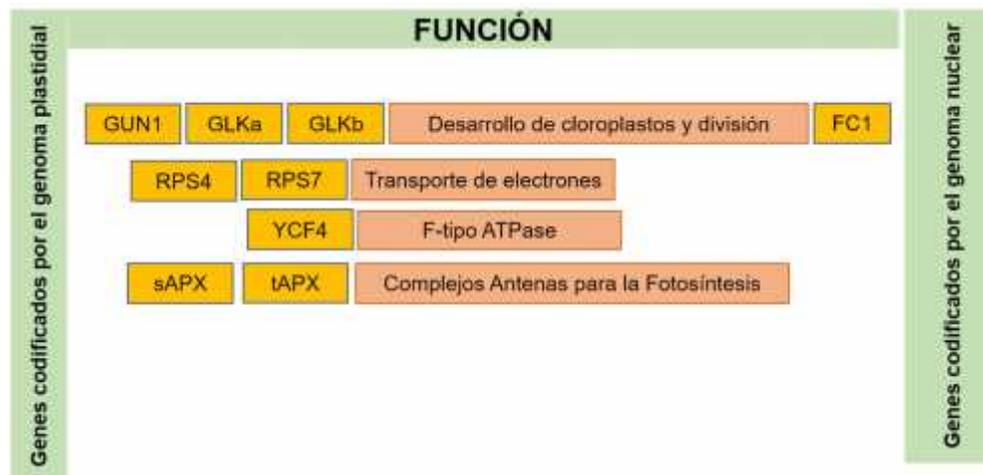


Figura 3.6. Clasificación de los genes asociados al desarrollo de los cloroplastos. El diagrama muestra el origen nuclear o plastídico de los genes: proteína ribosomal S7 (*rps7*), proteína ribosomal S4 (*rps4*), proteína ensamblaje del fotosistema I-ycf4 (*ycf4*), L-ascorbato peroxidasa T (*tAPX*), ascorbato peroxidasa estromal (*sAPX*), ferroquelatasa-1 (*FC1*), factor de transcripción GLK1-mRNA (*GLK*), y pentatricopeptide repeat-containing protein, chloroplastic (*GUN1*), analizados en las variantes somaclonal de *A. angustifolia*.

El desarrollo de los cloroplastos es esencial para el desarrollo de las plantas, pues no solo realizan fotosíntesis y hacen que la planta sea fotoautótrofa, sino también en sus estructuras internas se llevan a cabo otros procesos bioquímicos, como la síntesis de pigmentos, lípidos y reguladores del crecimiento vegetal y la detección de estímulos ambientales (Pogson *et al.*, 2015). La biogénesis de los cloroplastos se inicia a partir de proplástidos en los meristemos de los brotes e involucra una serie de eventos importantes, por esta razón el análisis molecular de los genes asociados al desarrollo del cloroplasto fue clasificado por su papel e importancia en este proceso (**Figura 3.6**).

Resulta esencial el análisis sobre los genes que participan en la señalización recíproca, pues son esenciales para la división de la información genética, el desarrollo y las funciones del cloroplasto. Se determinó el nivel de expresión de *GUN1*, un gen que codifica para una proteína de dominio PPR (pentatricopéptidos repetidos de proteínas), localizada en el cloroplasto y que se une al ADN (Sakamoto *et al.*, 2008). Los resultados mostraron que un incremento en los niveles de expresión de *GUN1* en la base de los meristemos y en las hojas del fenotipo A, mientras que en V solo se observa un incremento significativo en la base del

meristemo, con respecto a G. Los niveles de expresión del gen *GLK*, que codifica para un factor de transcripción nuclear conocido como GLK1 y es requerido para la transcripción de genes que codifican proteínas de cloroplasto, (Waters *et al.*, 2009) fueron mínimos en la base del meristemo y en las hojas del fenotipo A, mientras que en V se observaron bajos niveles de expresión en ambos tejidos, con respecto a lo encontrado en G. Los niveles de expresión del gen *FC1*, que codifica para la proteína ferroquelatasa-1 y participa activamente en la coordinación recíproca para la expresión de genes nucleares asociados a la fotosíntesis en los cloroplastos, los datos en agave muestran que *FC1* tiene un mayor incremento en ambos tejidos del fenotipo A, mientras que en el fenotipo V se presenta una disminución significativa en los niveles de expresión en hoja y base meristemática, con respecto a G.

Por otra parte, las proteínas ribosómicas S4 y S7 establecen sistemas de regulación con otros genes con secuencias de proteínas divergentes que los genes para la fotosíntesis, por ejemplo, *RPS4-atpD* y *RPS7-atpE* (Xu *et al.*, 2015). Los niveles de expresión del gen *rps4*, (que codifica a la proteína 4 de la pequeña subunidad ribosómica cloroplástica), en *A. angustifolia*, presentó los mayores niveles de expresión en ambos tejidos analizados del fenotipo A, mientras que en V los niveles se redujeron significativamente en las hojas y en la base del meristemo con respecto a lo observado en G. Los niveles de expresión del gen *rps7*, que codifica la proteína de S7 de la pequeña subunidad del ribosoma cloroplasto, aumentan con respecto a los valores mostrados en G, los máximos niveles de expresión se presentaron en ambos tejidos del fenotipo A, mientras que en V disminuyó en la base meristemática y aumentó en las hojas. El análisis de expresión del gen *Ycf4*, (que codifica para la proteína *ycf4*, clave para el ensamblaje del complejo del fotosistema I y la recolección de energía), presentó niveles máximos de expresión en la base del meristemo del fenotipo A y bajos niveles en las hojas, similar al nivel de V. Por otra parte, V presentó una disminución significativa en ambos tejidos comparados con G.

Finalmente se analizó la expresión de genes que codifican para las enzimas APX, que se encuentran en al menos cinco compartimentos distintos: el citosol (cAPX), el microcuerpo (mAPX), el peroxisoma (pAPX), el estroma (sAPX) de los cloroplastos y las membranas tilacoides (tAPX) de los cloroplastos (Li *et al.*, 2012). Hemos determinado los niveles transcripcionales de sAPX y tAPX, ya que desempeñan papeles importantes en la fotosíntesis

cuando las plantas presentan altos niveles de ROS, como se ha observado en el albinismo. Los resultados muestran que *sAPx* y *tAPX* mostraron altos niveles de expresión en la base del meristemo de A, mientras que en hoja *sAPX* y *tAPX* disminuyen en las hojas.

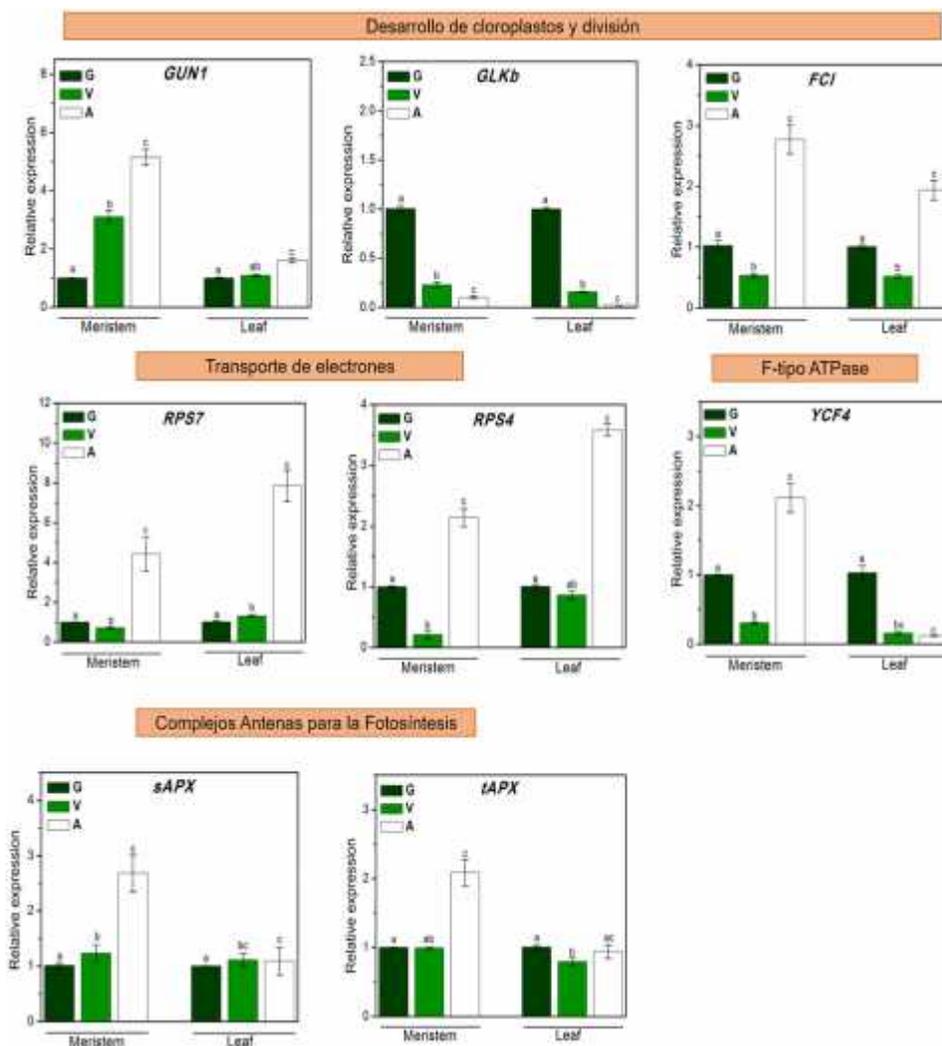


Figura 3.7. Niveles de expresión relativa de los genes que codifican para el desarrollo del cloroplasto: proteína ribosomal S7 (*rps7*), proteína ribosomal S4 (*rps4*), proteína ensamblado del fotosistema I-*ycf4* (*ycf4*), L-ascorbato peroxidasa T (*tAPX*), ascorbato peroxidasa estromal (*sAPX*), ferroquelatasa-1 (*FC1*), factor de transcripción golden like-1 GLK1-mRNA (*GLK*) y pentatricopeptide repeat-containing protein chloroplastic (*GUN1*). El análisis se realizó en tejidos de la base del meristemo y en las hojas de los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$). $n = 5$

3.4 DISCUSIÓN

El análisis de la biogénesis del cloroplasto sigue siendo un desafío muy complejo, si bien existe una amplia variedad de organismos y protocolos estandarizados para el aislamiento de los cloroplastos, la eficiencia de su aislamiento y purificación se ve comprometida por las características fisiológicas del tejido, así como por la selección de amortiguadores adecuados para su conservación y viabilidad (Pogson *et al.*, 2015). En *A. angustifolia*, la combinación y optimización de protocolos existentes condujo al diseño de un método eficiente y apropiado, a través del cual se obtuvo un sistema de cloroplastos intacto (funcionales e íntegros) (**Figura 3.1**). Varios autores coinciden en que el proceso de aislamiento de estos orgánulos tiene éxito, cuando se observan resultados reproducibles y un buen rendimiento en el número de cloroplastos (Takamatsu *et al.*, 2018; Joly y Carpentier, 2011; Fan *et al.*, 2009). Comparable a lo reportable por Joly y Carpentier (2011) en espinaca, las fracciones intactas de cloroplastos aisladas a través del sistema discontinuo de sacarosa en *A. angustifolia*, son completamente funcionales a través de la determinación de la fluorescencia de las clorofilas (**Figura 3.2**), el contenido de clorofilas (**Figura 3.3**) y la actividad fotoquímica (**Figura 3.4 y 3.5**) de las fracciones obtenidas, y sugieren que los organelos aislados son adecuados para su uso posterior para el análisis de proteínas, ADN plasmídicos, ARNm y pequeños ARNs.

En *Arabidopsis*, los cloroplastos aislados presentan altas cantidades de proteínas precursoras unidas a la membrana después de la importación, por lo cual los cloroplastos con una alta integridad son un sistema ideal para aislar las membranas tilacoidales (Takamatsu *et al.*, 2018). Hemos sugerido que los cloroplastos obtenidos en agave podrían ser ideales para preparar fácilmente, con uso de inhibidores, las membranas tilacoidales, y obtener compuestos claves en el funcionamiento del estroma, por ejemplo, NADP⁺, ferredoxina, y enzimas del ciclo de Calvin (Takamatsu *et al.*, 2018; Fitzpatrick y Keegstra, 2001).

El equilibrio de los pigmentos fotosintéticos en las plantas es dinámico y crucial para el mantenimiento de la fotosíntesis dentro de la célula (Joly y Carpentier, 2011). En los cloroplastos aislados se ha demostrado que la clorofila y algunos carotenoides son lipófilos y se presentan como complejos de pigmento-proteína dentro de la membrana de los tilacoides (Fitzpatrick y Keegstra, 2001). Por lo que, durante el aislamiento de los cloroplastos, resulta esencial garantizar la integridad de la membrana del cloroplasto, pues ésta debe romperse

posterior al aislamiento para que los pigmentos puedan separarse de sus proteínas. En la **figura 3.2** se mostrará la integridad de los cloroplastos; el tamaño y forma de los organelos en cada fase presentó rendimientos asociados al estado de maduración en G y V. Los resultados, además sugieren que en el fenotipo A las estructuras incoloras aisladas podrían ser identificadas como proplástidos (que es el progenitor de todos los plastidios), o proteinoplastos (grupo de plastidios incoloros importantes para el almacenamiento). Mientras que en V, similar a lo observado en A, podría contener proplástidos, leucoplastos o proteinoplastos en menor proporción ya que como se observa en G, V presenta un mayor número de cloroplastos maduros y fotosintéticamente activos.

De forma similar a los cloroplastos aislados de espinaca, la determinación de las concentraciones de clorofila a y b por espectrofotometría (**Figura 3.3**), sugiere la asociación del contenido de clorofilas al estado de diferenciación del cloroplasto. Es decir, el mayor contenido de clorofila (**Figura 3.2**) en G, en la primera fase, sugiere que esta fracción, corresponde a cloroplastos maduros y de mayor capacidad fotosintética (Fitzpatrick y Keegstra, 2001). Mientras tanto en V, las fases con mayor contenido de clorofilas, corresponden a las fracciones 2 y 3 y se observa un mayor número de cloroplastos maduros, con respecto a lo encontrado en G.

En mutantes de *Arabidopsis* y arroz, se ha observado que los fenotipos variegados, a pesar de que desarrollan de manera eficiente la fotosíntesis, el balance entre las zonas con plástidos irregulares y no fotosintéticos, suscita un mecanismo de compensación fotoquímica, en los cloroplastos de la zona verde, así como una mayor actividad proteómica y genética, estableciendo así un sistema de compensación (Wang *et al.*, 2018a; Aluru *et al.*, 2006; Rodermel, 2002; Darlington, 1929). Por otra parte, el análisis de las fases purificadas del fenotipo A presentaron pequeñas estructuras con tamaños menores a 2 μm , sin emitir autofluorescencia (**Figura 3.2**) o contenido de clorofilas (**Figura 3.3**), podría sugerir que estas pequeñas estructuras, podrían presentar ultraestructuralmente las alteraciones en membranas tilacoidales y granas como se ha reportado en mutantes albinos y variegados de cebada y trigo (Wang *et al.*, 2018b; Wang *et al.*, 2018a; Hu *et al.*, 2015; Sud y Dengler, 2000; Döring *et al.*, 1999).

La relación sobre el rendimiento fotoquímico de los cloroplastos y plástidos aislados en agave,

(Figura 3.4 y Figura 3.5) está relacionada con los niveles transcripcionales de genes esenciales para el desarrollo y funcionamiento de los cloroplastos (Figura 3.6 y 3.7). Los datos qP y qN en las fases (P1, P2, P3, P4) de los fenotipos G, V y A, sugirieron que el mecanismo de adaptación en V y rendimiento fotoquímico de los cloroplastos en V, desarrollan un cambio de pH a nivel transtilacoidal, lo cual podría estar conduciendo a modificaciones en los centros de reacción (Figura 3.4). Además, los datos obtenidos sobre el rendimiento cuántico en cada una de las fases de G y V, podría indicar que la actividad fotoquímica primaria de V, sobreestimula la actividad de todos los centros de reacción del PSII, compensando así los niveles de un estado oxidado o "abierto" (F_v/F_m) (Figura 3.5). En un estudio sobre la regulación transcripcional de los genes dependientes de fitocromo, se demostró que la regulación de la actividad fotoquímica en el cloroplasto se encuentra mayormente condicionada por la regulación de factores de transcripción, que establecen un sistema de balance entre el núcleo y el cloroplasto y esencialmente la comunicación recíproca que indica la señal de inducción a la fotomorfogénesis (Pogson *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2011; Aluru *et al.*, 2006).

Estudios genéticos han identificado a varios actores esenciales para la generación de señales para el desarrollo del cloroplasto, y aunque se sabe muy poco sobre los componentes de señalización o los factores de transcripción que regulan la expresión de cientos de genes nucleares y del cloroplasto, el desarrollo de los cloroplastos requiere de un equilibrio entre ambas genomas (Zubo *et al.*, 2018; Börner *et al.*, 2015; Pogson *et al.*, 2015; Day y Goldschmidt-Clermont, 2011; Sakamoto *et al.*, 2008). La biogénesis de los cloroplastos comienza con los proplástidos, situados en los meristemas, e involucra una serie de eventos importantes, nuestros resultados sobre el análisis transcripcional en agave, sugieren que el albinismo podría estar asociado a dos dinámicas de expresión entre los fenotipos V y A (Figura 3.7). En agave, se mostró que la sobreexpresión de GUN1 y FC1, localizada en el cloroplasto y claves para la comunicación recíproca (Sakamoto *et al.*, 2008), presenta una mayor actividad en la base del meristemo en el fenotipo A, no obstante la reducción de FC1 en hoja del fenotipo V podría, además, estar asociada a la expresión de genes nucleares y estar condicionando el aumento en la fotosíntesis (Wang *et al.*, 2018b; Gunning *et al.*, 2006; Tregunna *et al.*, 1964). Sin embargo, los bajos niveles de expresión de *GLK*, que codifica para el factor transcripcional nuclear GLK1, podría estar sugiriendo que en A se encuentra

interrumpida la transcripción de genes que codifican proteínas del cloroplasto, ya que la transcripción de GLK, es un punto elemental para la señal de inicio a la fotomorfogénesis (Waters *et al.*, 2009).

Por otro lado, las proteínas ribosomales S4 y S7 son necesarias para la regulación de genes para la fotosíntesis, proteínas de la cadena de transporte de electrones, unión de clorofila o complejos de antenas (Xu *et al.*, 2015), estos genes presentaron una sobreexpresión en agave A y bajos niveles en V. El análisis de expresión del gen *Ycf4*, (que codifica para la proteína *ycf4*, clave para el ensamblaje del complejo del fotosistema I y la recolección de energía, presentó máximos niveles de expresión en la base meristemática del fenotipo A y bajos niveles en hoja, similar al nivel de V. Por otra parte, V presentó una disminución significativa en ambos tejidos comparados con G. Sin embargo, los resultados en el fenotipo A sugieren la sobreexpresión de los genes analizados y la ausencia del gen *Ycf4*, lo cual sugiere que sin su expresión la fotosíntesis sería ineficiente y afectaría el crecimiento de la planta. Finalmente se analizó la expresión de genes que codifican para enzimas tipo APX. Estas enzimas se encuentran en al menos cinco compartimentos distintos: el citosol (cAPX), el microcuerpo (mAPX), el peroxisoma (pAPX), el estroma (sAPX) de los cloroplastos y el membranas tilacoides (tAPX) de cloroplastos (Li *et al.*, 2012).

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EPIGENÉTICA DEL DESARROLLO ESTOMÁTICO EN LAS VARIABLES SOMACLONALES ALBINAS DE *A. angustifolia* Haw.

4.1 INTRODUCCIÓN

La biología del complejo estomático en las plantas se encuentra asociado a numerosos factores medio ambientales (luz, CO₂, humedad y temperatura) (Chater *et al.*, 2017; Rudall *et al.*, 2017; Casson y Gray, 2008; Glover, 2000). De acuerdo a lo presentado por Pillitteri y Dong (2013), las plantas superiores conservan el complejo estomático individual y la anatomía foliar. No obstante, las variaciones morfológicas entre estomas anomocíticos (sin células subsidiarias), paracíticos (con células subsidiarias) y tetrácíticos, sigue siendo poco comprendida (Rudall y Knowles, 2013). En las plantas monocotiledóneas, estudios comparativos en la ontogenia estomática (Timonin, 1995; Williams, 1979), han asociado la modelación del linaje estomático a eventos de evolución y desarrollo de las plantas. Así pues, la reducción observada en las divisiones en las células madre meristemáticas (MMC) en las plantas monocotiledóneas (p.ej. maíz, trigo, orquídeas), se le ha relacionado a una condición de “plesiomorfía” y divergencia filogenética temprana (Rudall *et al.*, 2017; Rudall y Knowles, 2013).

En piña (Ming *et al.*, 2015), yuca (Heyduk *et al.*, 2016), *A. americana* (Raveh *et al.*, 1998), *A. tequilana* (Santamaría *et al.*, 1995), *A. angustifolia* (Us-Camas *et al.*, 2017; Duarte-Aké *et al.*, 2016; Monja-Mio *et al.*, 2015) y *Kalanchôe* (Xu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017), las variaciones epidérmicas y la organización morfo-anatómicas, sugiere que diferentes aspectos del desarrollo estomático están asociados al mecanismo del desarrollo de la hoja. Por ejemplo, las células meristemáticas son células morfológicamente indiferenciadas que se desarrollan basipetalmente estableciendo un patrón estomático ordenado, la polarización foliar y el establecimiento de nervaduras paralelas (Rudall *et al.*, 2017), no obstante, este desarrollo podría ser excluido en algunas monocotiledóneas (Qu *et al.*, 2017; Rudall *et al.*, 2017; Haworth *et al.*, 2011).

El linaje estomático requiere de un control transcripcional preciso (Qu *et al.*, 2017; Simmons y Bergmann, 2016; Peterson *et al.*, 2010). Hoy sabemos que en plantas mono- y dicotiledóneas el papel regulador de las proteínas tipo helix-loop-helix (bHLH) y las regulaciones interespecíficas de los heterodímeros SPEECHLESS (SPCH), MUTE y FAMA, son esenciales para el proceso de división celular en los precursores celulares del linaje estomático (Damour *et al.*, 2010; Peterson *et al.*, 2010; MacAlister *et al.*, 2006). Por otra parte, los factores de transcripción tipo ICE1 / SCREAM (SCRM) SCRM2 y proteínas tipo AMPK (AMP-activated protein kinase) ampliamente expresados en el desarrollo de la epidermis, pueden estar condicionados a variables ambientales (Pillitteri *et al.*, 2011; Peterson *et al.*, 2010; Serna, 2009). Además, recientemente, factores como, ERECTA(ER), PATRIMONIO EPIDERMAL FACTOR (EPF), STOMAGEN, YODA y TOO MANY MOUTH (TMM) y PANGLOSS1 (PAN1) en las monocotiledóneas, han expuesto nuevas regulaciones durante el desarrollo de las células guardia y patrones de distribución estomática (Hepworth *et al.*, 2018; Rudall *et al.*, 2017; Peterson *et al.*, 2010). Por ejemplo, en maíz, la regulación de las señales intrínsecas del receptor-like kinases PAN1/2, regulador de las divisiones celulares de la MMC, se ha sugerido su homología a las funciones asociadas a *STOMAGEN* en las plantas dicotiledóneas (Sutimantanapi *et al.*, 2014)

Por otra parte, durante el desarrollo (Casson y Gray, 2008), los mecanismos de señalización epigenética podrían actuar como un regulador durante la transcripción de SPCH, FAMA y MUTE (Lee *et al.*, 2014a; Kagan y Sachs, 1991) Kagan y Sachs, 1991; Kutter *et al.*, 2007; Simmons y Bergmann, 2016). Por ejemplo, en hojas maduras se le ha asociado con la actividad de represión de la trimetilación. La lisina 27 en la histona H3 (H3K27me3) sugiere la reprogramación de GC y SC a través de la regulación de nuevos eventos de actividad meristemática y divisiones irregulares de SMC en ambientes de elevada humedad y elevado contenido de CO₂ (Lee *et al.*, 2014a). Por otro lado, los microARNs, han sido propuestos recientemente como posibles moduladores de la densidad y la distribución estomática (Kutter *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, De Meaux *et al.* (2008) demostraron que la señalización de miR824 podría encontrarse asociada al establecimiento de células de guardia a través de la regulación de los niveles de transcripción de AGL16. Así pues, durante el desarrollo estomático el papel de AGL16 y la

regulación de miR824 podría estar regulando negativamente las divisiones primarias del linaje estomático, lo que sugiere que la desregulación en la señalización de miR824 podría llevar al establecimiento de células guarda incompletas, o a un estado pleiotrópico en programas de desarrollo morfo genético (De Meaux *et al.*, 2008).

Por otra parte, la caracterización de dos microARNs en *Arabidopsis*, miR165 y miR166, supuestamente reguladores de los mensajes de la familia HD-ZIP III, se ha asociado a la polaridad celular (Jover-Gil *et al.*, 2012). Sin embargo, la regulación de los blancos de expresión para genes del linaje estomático y las divisiones celulares podría encontrarse asociada a la función de estos microRNA (Pulido y Laufs, 2010; Kidner y Martienssen, 2004). Sin embargo, aún se requieren estudios sobre la naturaleza transitoria y asincrónica de las células del linaje estomático y las características fisiológicas y la función biológica del complejo estomático en las plantas CAM. En un objetivo más amplio, explicar si las funciones de los genes en el linaje estomático que se reconocen en *Arabidopsis* se conservan/expresan de manera transitoria y se pueden asociar con el mecanismo epigenético de microARNs en fenotipos variados y albino de *Agave angustifolia*, ha sido clave en este trabajo.

En este capítulo presentamos la conservación de los genes reguladores en el linaje estomático en las variantes albino somaclonal de *A. angustifolia*. La caracterización molecular de estas variantes con albinismo reveló una interacción con vías conocidas en la conservación de células de linaje y estomatología en hoja. Propones la función de genes como *SPCH*, *MUTE*, *FAMA* y de señalización para las quinasas *MPK4* y *MPK6* similares a los receptores de la familia *ERECTA* y *TMM*, como controles claves del desarrollo de las hojas, la epidermis y las células guarda. Nuestro trabajo muestra un efecto de miR824 y miR166 durante el desarrollo de la hoja. La sobreexpresión de miR824 y miR166 reveló que los niveles elevados de estos miARN pueden comprometer *per se* el desarrollo de la hoja durante el establecimiento de las células madre estomáticas en plantas monocotiledóneas y con un metabolismo CAM.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal *in vitro*

Las variantes somaclonales variegada (V) y albina (A) de *A. angustifolia*, fueron obtenidas naturalmente durante la micropropagación del cultivo *in vitro* de *A. angustifolia*. Las plantas utilizadas fueron multiplicadas y mantenidas durante cinco ciclos en cajas magentas con 50 mL de medio MSB-5: sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con la fuente de nitrógeno modificada (Robert *et al.*, 2006), suplementado con ácido 2, 4 diclorofenoxiacético (0.11 μM) y 6-benziladenina (22.2 μM), con 3% de sacarosa y gelificado con 0.2% agar y 0.2% phytigel. El cultivo se mantuvo en condiciones de fotoperiodo 12 h ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a una temperatura constante de 25 ± 2 °C. Con base en el tipo de análisis, las plantas verdes G, V y A, fueron colectadas en fresco durante el quinto ciclo y congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

4.2.2 Cuantificación de pigmentos

Utilizando 80% de acetona fría y en condiciones de oscuridad, se recogieron 200 mg de tejido foliar (peso fresco) de cada fenotipo (G, V y A). Se mezclaron 1.5 mL de acetona fría al 80% y se maceró en un mortero, el extracto se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento se lavó con acetona fría al 80% hasta que el sedimento no mostró coloración. El sobrenadante se recogió en tubos de ensayo y se diluyó a 5 mL. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU650) a 663 nm (clorofila a), 646 nm (clorofila b) y 470 nm (carotenoides). La concentración de carotenoides y clorofilas se calculó según lo descrito por Wellburn (1994).

4.2.3 Morfología estomática

La morfología y densidad estomática fue determinada usando la técnica descrita en agave (Monja-Mio *et al.*, 2015). El material de estudio se colectó de la parte intermedia de la roseta de las plantas (G, V y A). De hojas completamente desarrolladas se tomaron fragmentos de un cm^2 en la región media de ambos lados de la hoja (abaxial/adaxial). Los tejidos se fijaron al vacío con formaldehído al 10% durante 24 h. La solución fijadora es eliminada y posteriormente se realizaron dos lavados con amortiguador de fosfatos 0.2 M (pH 7.1) durante 1 h. Los tejidos se sometieron posteriormente a la deshidratación creciente de

etanol (30, 50, 70, 85 y 96%) durante 1 h y tres cambios seguidos usando etanol anhidrido puro. Las muestras deshidratadas fueron secadas a punto crítico (-31.3 °C) y metalizadas con una capa de oro de 120 nm. La visualización posterior se realizó utilizando el SEM y un total de 72 micrografías estomáticas fueron analizadas utilizando la herramienta de ajuste de línea ImageJ. El conteo fue realizado por triplicado, el promedio de la longitud, ancho y densidad estomática estuvo basado en 10 mediciones estomáticas por región foliar.

4.2.4 Contenido relativo de agua (CRW)

La determinación del contenido relativo se realizó utilizando ocho plantas de cada fenotipo de *A. angustifolia in vitro* (G, V y A), con un tamaño de 4 cm de altura. Se pesaron (Fw, peso fresco) y durante 1 hora fueron inmersas en una solución de agua bidestilada bajo condiciones de luz. En el testigo se registró el peso cada 10 minutos (Tw, peso turgente), posteriormente se congelaron usando N₂ líquido. El peso seco (Dw) se determinó sometiendo a liofilización durante 24 h las plantas y finalmente el contenido relativo de agua (RWC) fue calculado de acuerdo a la fórmula de Matin *et al.* (1989); $RWC (\%) = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100$

La apertura estomática fue determinada utilizando la técnica rápida de impresión (Geisler *et al.*, 2000). Durante el experimento, una hoja de la parte intermedia de la roseta de las plantas (G, V y A) fue colectada cada 20 minutos. Las impresiones epidérmicas se cubrieron con un porta objetos y se sellaron con esmalte de uñas transparente. Las impresiones epidérmicas se fotografiaron bajo un microscopio invertido de campo brillante modelo 19.0204 (CNOEC) con una cámara CCD HV-D30 adaptada (Hitachi). Las imágenes estomáticas se analizaron más tarde para determinar el tamaño de la abertura utilizando el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

4.2.5 Fotoquímica

La asimilación fotosintética neta (AN) y la conductancia estomática (G_{sy} tasa de transpiración (E) se midieron en siete hojas intermedias completamente desarrolladas de las plantas (G, V y A). Las medidas en cada fenotipo corresponden a la media de cinco repeticiones obtenidas de hojas completamente expandidas y expuestas a la radiación,

CO₂ y a una densidad de flujo de fotones fotosintético incidente (PPFD) (IRGA – LICOR, LI-6400). El valor de la limitación estomática (Ls) es $1-C_i / Ca$ (en la que, Ca , es el incremento de la concentración de CO₂, $395 \pm 5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$).

4.2.6 Intercambio de gases

Las variables de intercambio de gases (fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración, CO₂ intercelular) se realizaron utilizando 7 hojas por fenotipo G, V y A. Las mediciones se llevaron a cabo con un medidor portátil de fotosíntesis LI-COR LI6400 con suministro e incremento constante de CO₂ (200 a 1,600 mmol s⁻¹). Las medidas en cada fenotipo corresponden a cinco repeticiones, expuestas a una densidad de flujo de fotones fotosintético incidente (PPFD). Tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Conductancia ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Concentración de CO₂ intercelular ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). Tasa de transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

4.2.7 Diseño de los cebadores

Las secuencias de los diferentes genes involucrados en el desarrollo estomático se obtuvieron del transcriptoma realizado por Gross *et al.* (2013) y anotados en la base de datos del NCBI de diferentes especies de *Agave* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (**Tabla 4.1**). A partir de estas secuencias, los cebadores se diseñaron utilizando los programas Oligo explore 1.1.2 y Oligo Analyzer 1.0.3. La secuencia de los cebadores generados y utilizados para el análisis de qRT-PCR se enumera en la **tabla 4.2**. Los fragmentos amplificados se enviaron para secuenciarse y sus identidades se corroboraron mediante los análisis BLASTn y BLASTx (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.2.8 qRT-PCR

El ARN total fue aislado de la base de los meristemas y de las hojas intermedias de la roseta de plantas (G, V y A) utilizando el reactivo TRI (Sigma, T9424) y bajo las instrucciones del fabricante, la calidad del ARN extraído se verificó en gel de agarosa al 1%. De acuerdo con las instrucciones del fabricante se utilizó 1 μg de ARN total y el kit del sistema de síntesis de primera hebra ProtoScrip (E6560S). Para la reacción qRT-PCR se utilizaron 0.25 μL de cada cebador a 10 μM , junto con 12.5 μL de la mezcla maestra de PCR SYBR 2X (QuantiNova 208054) y 20 ng μL^{-1} de ADNc en un volumen final de 25 μL .

El programa de amplificación utilizado para la PCR fue, activación de la polimerasa a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95 °C durante 15 s, como temperatura de desnaturalización y la combinación de templado/extensión durante 35 s acorde a una temperatura elegida en función del par de cebadores (**Tabla 4.3**) y una extensión final a 72 °C durante 1 min. La ubiquitina¹¹ se usó como testigo (Us-Camas *et al.*, 2017), siguiendo el mismo programa de amplificación. Las reacciones qRT-PCR se realizaron utilizando el Sistema de StepOne Software v2.2.2 –Real Time PCR (Applied Biosystems) y los resultados se analizaron utilizando el método 2^{-Ct} (Livak y Schmittgen, 2001). La cuantificación de la expresión génica relativa se realizó en los diferentes fenotipos utilizando tres réplicas biológicas, durante tres replicas experimentales.

4.2.9 qRT-PCR micro-ARNs

Los cebadores para miR166 y miR824 se encontraban en la región ascendente, con el fin de determinar la eficacia de la qPCR de los miRNAs y el gen de referencia ubiquitina, se multiplicaron diez diluciones seriadas de la plantilla de ADNc (0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng μ L). El valor del umbral de ciclo (Ct) (media \pm DE; n = 3) se representó en función de la concentración de la plantilla. La eficiencia de PCR correspondiente (E) se calculó de acuerdo con la ecuación: $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$. La regresión fue de más de 0.98; la pendiente de la gráfica en el rango de -3.6 a -3.1 es aceptable, es decir, la eficiencia de PCR de 1.85 a 2.15. La ecuación para la cuantificación relativa de la expresión de miRNA fue: relación = $[(E \text{ miRNA})^{D_{Ct.miRNA}}] / [(E)^{D_{Ct}}]$, $D_{Ct} = C_{t \text{ calibrador}} - C_{t \text{ tratamiento con ubiquitina}}$ (EC como calibrador). Para el análisis de qPCR del gen blanco, la eficacia de la PCR se supuso constante, igual a 2. Por lo tanto, la ecuación fue la relación = $2^{-DD_{Ct}}$, $DD_{Ct} = D_{Ct \text{ actina}} - D_{Ct \text{ target}}$, $D_{Ct} = C_{t \text{ calibrador}} - C_{t \text{ (calibrador)}}$. Treatment D_{Ct} . actin Mir-X miRNA First-Strand Synthesis and SYBR qRT-PCR User.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Cultivo *in vitro* de *A. angustifolia*

Las variantes somaclonales de las plantas variegadas (V) y albinas (A) de *Agave angustifolia*, cultivados *in vitro*, mostraron diferencias en el crecimiento respecto al fenotipo verde (G) (**Figura 1a, b, c**). El fenotipo V mostró hojas más delgadas y una variegación tipo simétrica a lo largo de la hoja, el acercamiento realizado de las regiones verde (GV) y

albina (AV) de V (**Figura 1b**), en conjunto con la observación microscópica (**Figura 1e**), en donde se observó la ausencia de cloroplastos en AV de V y en A. Además, una característica distintiva de las células epidérmicas fue el engrosamiento de GV en V de hasta 3-5 μm y en AV de V y A células epidérmicas menor a 1 μm en comparación a G, el cual presentó células epidérmicas típicas alrededor de 2 μm .

Por otra parte, el fenotipo A, presentó hojas engrosadas y frágiles, con menor rigidez en comparación a G y V, además de una mínima diferenciación de las células epidérmicas (flecha roja) y la ausencia total de cloroplastos (**Figura 1; b, f**). Consistente con la observación microscópica, el fenotipo A presentó un contenido de pigmentos extremadamente bajos (Chl a: 0.56, Chl b: 0.85 y Cx + c: 0.52 $\mu\text{g. G-1 WF}$) con respecto a los fenotipos G (Chl a: 177, Chl b: 62 y Cx + c: 51 $\mu\text{g.g-1 WF}$) y V (Chl a: 101, Chl b: 25 y Cx + c: 33 $\mu\text{g.g-1 WF}$) (**Tabla 1**).

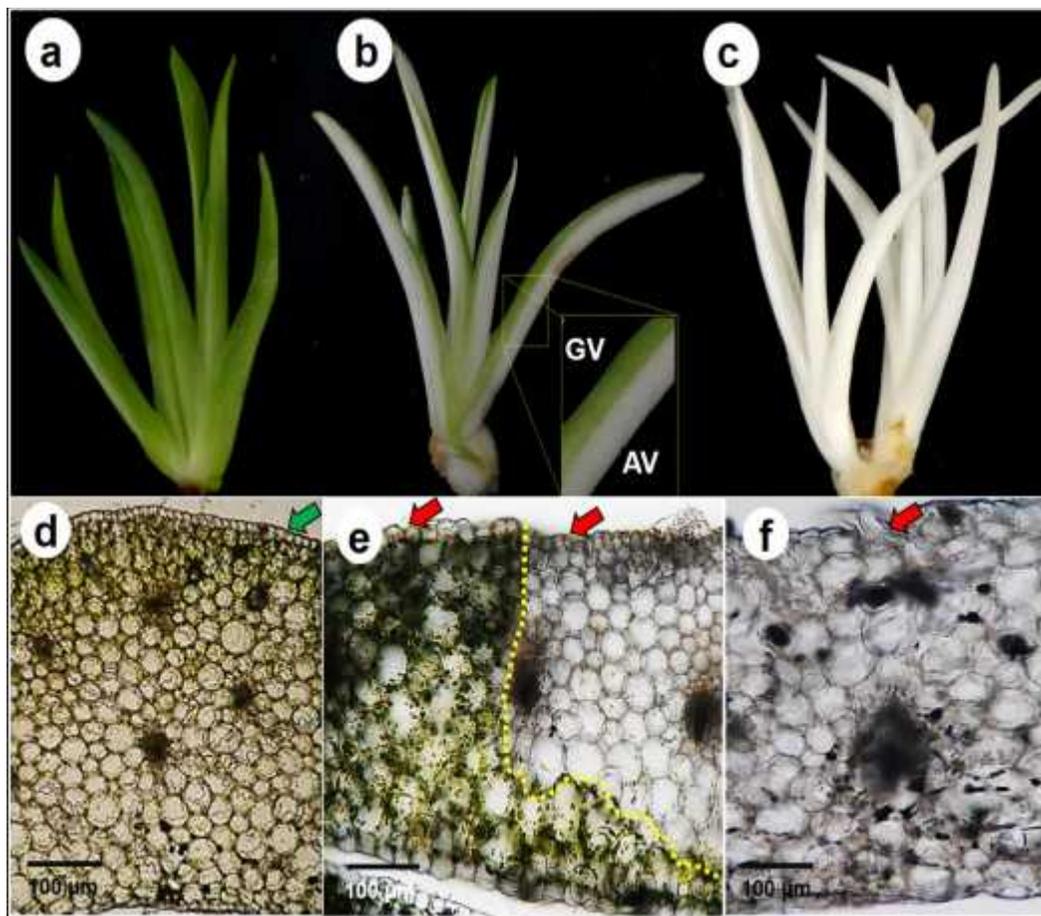


Figura 4.1. Variantes somaclonales albinas de *Agave angustifolia* en el quinto ciclo de cultivo. En a) fenotipo verde (G); b) fenotipo variegado (V), dónde GV y AV son las regiones verdes y albinas a lo largo de la hoja, c) fenotipo albino; d, e y f) cortes transversales mostrando la organización celular del mesófilo, células epidérmicas y contenido de cloroplastos. Las flechas verdes y rojas indican la primera capa de células asociadas a la epidermis foliar.

Tabla 4.1 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia*. *In vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 10.

Pigmento	G ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	V ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	A ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)
Chl a	177.98 \pm 10.33 ^a	101.74 \pm 6.30 ^b	0.56 \pm 0.12 ^c
Chl b	62.98 \pm 5.64 ^a	25.47 \pm 1.39 ^b	0.85 \pm 0.26 ^c
Chl total	240.96 \pm 8.19 ^a	127.21 \pm 7.37 ^b	1.41 \pm 0.34 ^c
Carotenoides	51.27 \pm 7.27 ^a	33.02 \pm 3.18 ^a	0.52 \pm 0.05 ^b
Chl a/b	3.13 \pm 0.26 ^a	4.13 \pm 0.21 ^a	0.65 \pm 0.40 ^b
Cx+c/Chl (a + b)	0.18 \pm 0.02 ^a	0.22 \pm 0.01 ^a	0.67 \pm 0.03 ^b

4.3.2 Morfología estomática

En *A. angustifolia* cultivado *in vitro*, las células epidérmicas adaxial y abaxial se observaron de forma lineal en G y cóncava en V y A, y el complejo estomático se encontró distribuido en ambas superficies de la hoja. El aparato estomático en G se encontró cerrado, compuesto por dos células guardias de forma arriñonada que rodean al ostiolo, con cuatro células subsidiarias y cavidad subestomática a lo largo de la hoja (basal, media y apical) (**Figura 4.2; a-c**). La morfología del complejo estomático en V y A presentaron características distintivas en las células guardia respecto a G, además de un desarrollo anormal, con cambios significativos en el tamaño del complejo estomático en las diferentes regiones analizadas. Los valores obtenidos en los parámetros de longitud, anchura y apertura estomática en G (ad/ab; anchura: 22.5/24.1 μm ; longitud: 34/31.6 μm ; apertura: 0.5/0.36 μm). VG de V (ad/ab; anchura: 30.8/32.5 μm ; longitud: 40/31.6 μm ; apertura: 6.3/6.31 μm), AV de V (ad/ab; anchura: 30/27.5 μm ; longitud: 35/33.6 μm ; apertura: 6.5/5.6 μm) y A (ad/ab; anchura: 32.5/33.3; longitud: 38.33/41.66 μm ; apertura: 10.5/9.36 μm) del

complejo estomático confirmaron las diferencias entre las superficies de la hoja (adaxial y abaxial) entre las regiones VG/VA y A respecto a G (**Figura 4.3**). La apertura estomática semi-abierta en GV de V y abiertos en AV de V y A (**Figura 4.2, d-i**) morfológicamente presentaron un mayor tamaño en la zona media de la hoja con respecto a G (**Figura 4.3**). Así mismo, en AV de V, se exhibe la pérdida de dos células subsidiarias, estableciéndose complejos estomáticos tipo paracíticos. Particularmente en A la pared cóncava que bordea el poro se observó engrosada, con células guardia de mayor tamaño y deformes acompañado de dos células subsidiarias (**Figura 4.2, j, k, l**).

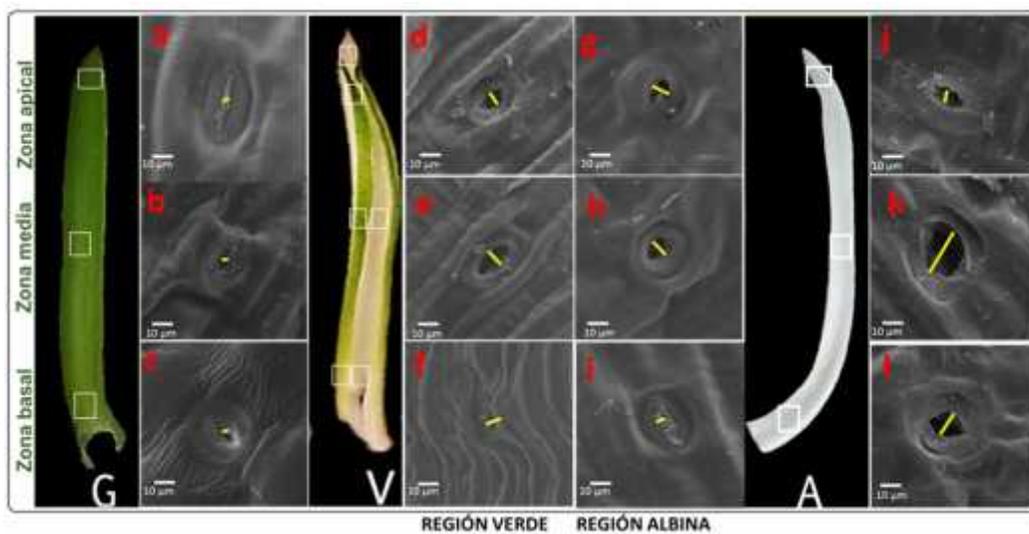


Figura 4.2. Fotomicrografías de MEB de la superficie laminar en las regiones, basal, media y apical de *A. angustifolia* (G, V y A). a, b, c) Complejo estomático en hoja del fenotipo G. d, e, f) complejo estomática, región verde del fenotipo V, g, h, i) región albina del fenotipo V. j, k, l) complejos estomáticos en fenotipo A. Líneas amarillas indican la apertura estomática, escala de 10 μm (barras blancas).

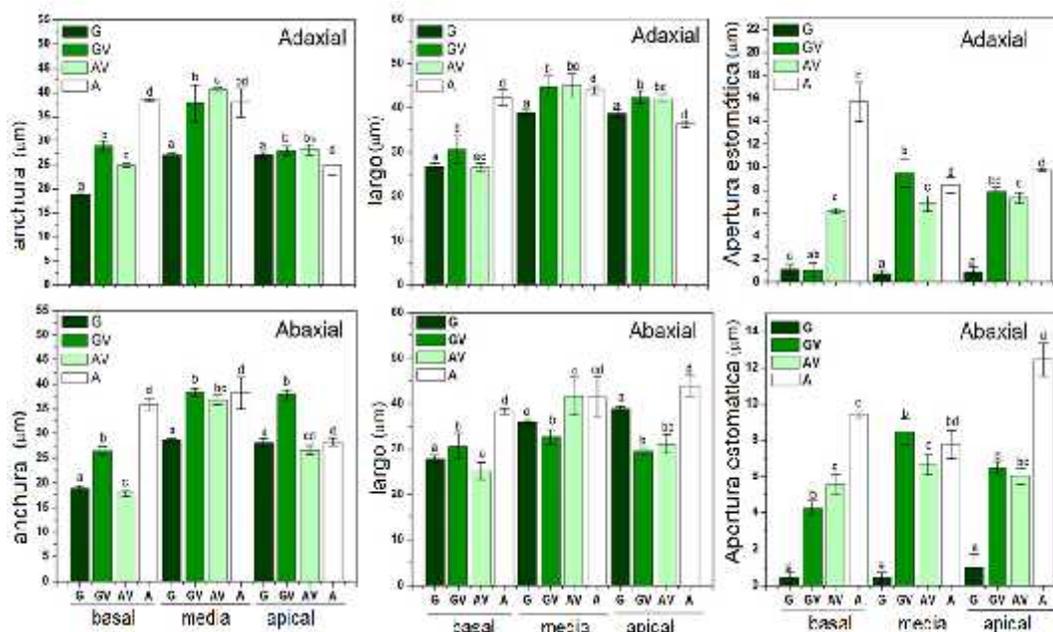


Figura 4.3. Mediciones morfológicas ancho, largo y apertura del complejo estomático en las zonas basal, media y apical de *A. angustifolia* G, V y A. Las letras indican las diferencias significativas entre fenotipos por región analizada (Tukey, $p = 0.05$). $n = 8$

4.3.3 Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua (RWC) en *A. angustifolia*, durante una hora de imbibición realizada a las 08:00 h (**Figura 4.4a**), presentó valores constantes en G y V durante los primeros 10 minutos (G 97% y V 95 %), con tendencias similares hasta los 30 minutos (G 95% y V 95%), posteriormente a los 40 minutos V se reduce significativamente (90%). Por otra parte, en A se presentó una tendencia decreciente del minuto 10 al minuto 40, alcanzando al minuto 60 valores promedios del 82%. El comportamiento constante observado en G y V en los primeros 30 min, con un cambio mínimo de disminución en el RWC, respecto a la disminución de 15% observada en A, y la tendencia en V y A al minuto 60, con el 15% y 30% respectivamente, correlacionan con el movimiento de apertura estomática en cada fenotipo. Las observaciones microscópicas de GV y AV de V en conjunto a los resultados RWC, exhiben la limitación del movimiento estomático en V e irregularidades significativas en A (Figura 4.4 b).

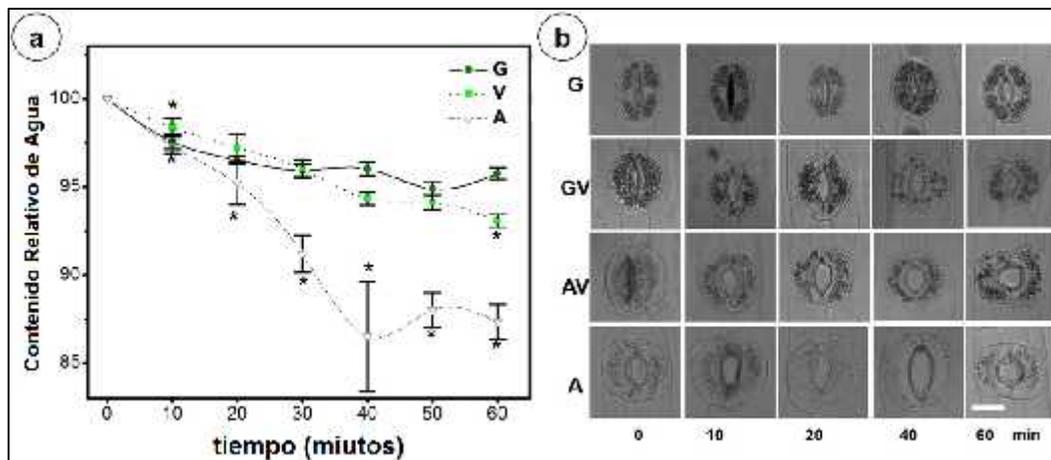


Figura 4.4. a) Contenido relativo de agua (RWC) y b) seguimiento del control estomático durante 60 minutos en G, V y A de *A. angustifolia*. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre fenotipos (Tukey, $\alpha = 0.05$). N = 8. Barra blanca, escala 20 μm .

4.3.4 Variables fotoquímicas e intercambio de gases

A una concentración elevada de CO_2 atmosférico de $1,600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la respuesta de A_N , E , G_s , WUE , en *A. angustifolia* (G, V y A), presentó diferentes niveles altamente significativos ($P < 0.05$). Igualmente lo fue entre las variables fotoquímicas estudiadas en los tres fenotipos: fotosíntesis (A_{sat} , A_{max}), CO_2 interno en la cavidad subestomática (V_{cmax} , J_{max}) y limitación estomática (**Figuras 4.5, 4.6 y Tabla 4.2**). Los valores obtenidos en las tasas de fotosíntesis, saturación máxima fotosintética (A_{sat} : G, 1.3; V, 1.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y radio máximo fotosintético (A_{max} : G, 2.3; V, 2.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en G y V, si se comparan con los valores mínimos de A (A_{sat} 0.3, A_{max} 0.5), indican que el fenotipo A, carece de actividad fotosintética (**Tabla 4.2**). Del mismo modo, los valores de máxima velocidad de carboxilación de RuBP por Rubisco (V_{cmax} : G, 9.8; V, 8.1; A, 4.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y máxima capacidad de regeneración de RuBP (J_{max} : G, 19.3; V, 14.7; A, 4.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con mayores niveles en G y V, y mínimos en A, exhiben la limitación fotosintética asociada en A al desarrollo de los tilacoides (**Tabla 4.2**).

Aunque en ambos casos, G y V, se presentaron los valores medios más altos de ambos parámetros (V_{cmax} y J_{max}), la limitación estomática a la fotosíntesis (l), era significativamente mayor en el fenotipo A (58.7%) respecto a G y V, con valores de 14.3 %

y 34.3% respectivamente (**Tabla 4.2**). Los valores encontrados, se traducen en diferencias interespecíficas significativas en el mecanismo fisiológico del movimiento estomático y de manera pronunciada los valores en A, comprometen la capacidad bioquímica en las plantas albinas.

Tabla 4.2 Variables fotoquímicas asociadas al funcionamiento del complejo estomático y la fotosíntesis. Saturación máxima fotosintética (A_{sat}), radio máximo fotosintético (A_{max}), máxima velocidad de carboxilación de RuBP por Rubisco (V_{cmax}), máxima capacidad de regeneración de RuBP (J_{max}) y limitación estomática (l) de *A. angustifolia in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$). $n = 5$

Fenotipos	A_{sat}	A_{max}	V_{cmax}	J_{max}	l
	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	(%)
G	$1.3 \pm 0.3a$	$2.3 \pm 0.2a$	$9.8 \pm 0.4a$	$19.3 \pm 0.5a$	$14.3 \pm 2.3b$
V	$1.2 \pm 0.1a$	$2.3 \pm 0.2b$	$8.1 \pm 0.7a$	$14.7 \pm 2.4a$	$34.3 \pm 6.8ab$
A	$0.3 \pm 0.06b$	$0.5 \pm 0.08b$	$4.8 \pm 0.1b$	$4.8 \pm 0.4b$	$58.7 \pm 10.4a$

Tal como se observa en la **figura 4.5**, las curvas de respuestas de Gs y E, ante el incremento en el CO_2 atmosférico ($1,600 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) presentó una tendencia constante en cada fenotipo. El análisis de las curvas de respuesta al CO_2 atmosférico (C_a) sobre la conductancia estomática (g_s) y la transpiración (E) mostró diferencias significativas entre los tres fenotipos. El fenotipo G presentó valores inferiores en G_s de $0.10 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y en E de $1.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en comparación con V y A, donde se encontraron valores mayores en g_s (V: $0.32 \mu\text{mol CO}_2 / \text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ y A, $0.25 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y E (V, $4.1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y A, $3.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (**Figura 4.5**). Por otra parte, los valores encontrados en WUE, en G ($0.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), V ($0.25 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) y en A ($0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) a los $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de CO_2 y una máxima respuesta al incremento de $800 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de CO_2 en G ($1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), V ($0.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) y en A ($0.05 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), seguida de una desaceleración en

cada fenotipo indica que la saturación en hojas de agave *in vitro* se presenta a 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de CO_2 . Las diferencias altamente significativas entre G, V y A para G_s , E , y WUE, nos indica que el mecanismo de cierre y apertura de estomas está ligado al fenotipo en *A. angustifolia* (Figuras 4.5 y 4.6).

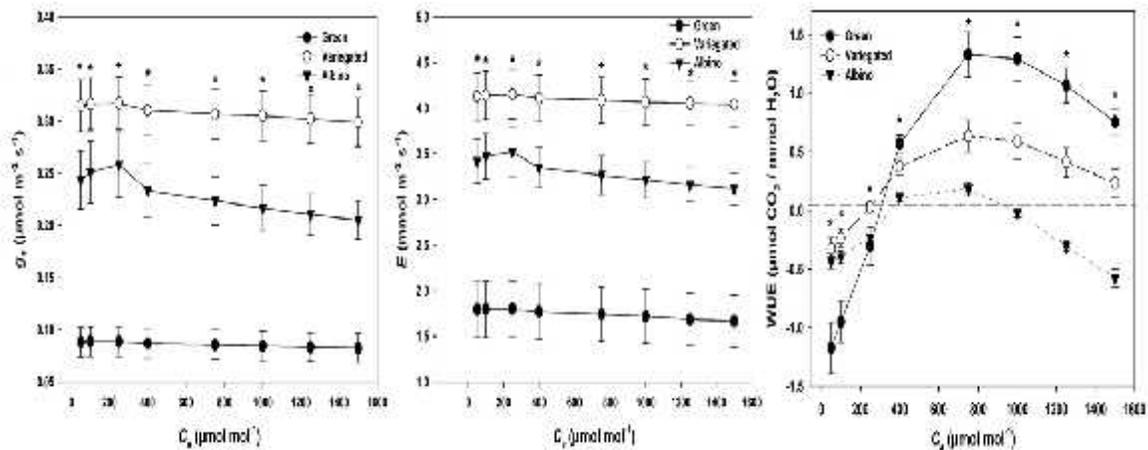


Figura 4.5. Conductancia estomática (g_s), transpiración (E) y uso eficiente del agua (WUE) en plantas de *A. angustifolia in vitro*. Curvas en respuesta al incremento en la concentración de CO_2 atmosférico (C_a). Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$). $n = 5$

Por otra parte, la curva de respuesta de la tasa fotosintética al incremento de CO_2 intracelular ($A_N - C_i$) y al flujo de densidad fotónica ($A_N - \text{PPFD}$) estuvieron elevadas en G y V, en tanto en A fue mucho menor (Figura 4.6). La máxima saturación fotosintética entre los fenotipos se obtuvo a 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en respuesta al incremento de CO_2 y a los 400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ante el incremento del flujo de densidad fotónica. Tal como se observa en la figura 4.6, las tendencias de respuesta a partir de la máxima saturación de C_i y a una baja irradiación de 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ las curvas presentaron una respuesta lineal, sin embargo, en respuesta a C_i la tendencia es seguida de una desaceleración posterior a los 800 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, los datos mostraron por lo tanto el punto de compensación a la luz en cada fenotipo, sugiriendo que en A los valores conllevan a la foto-inhibición. Además, los fenotipos G y V presentaron las mayores tasas de fotosíntesis (A_N) (Figura 4.6) y WUE,

sin embargo, G presentó valores muy bajos de G_s y E , en tanto V y A presentaron valores similares en G_s y E (**Figura 4.5**), indicando la relación entre estas variables de respuesta y el grado de apertura de los estomas (**Figura 4.2**). Por lo tanto, la relación entre las tendencias y valores obtenidos varía entre G, V y A, lo que confirma el efecto del fenotipo en el intercambio de gases por la planta y el grado del albinismo *in vitro*.

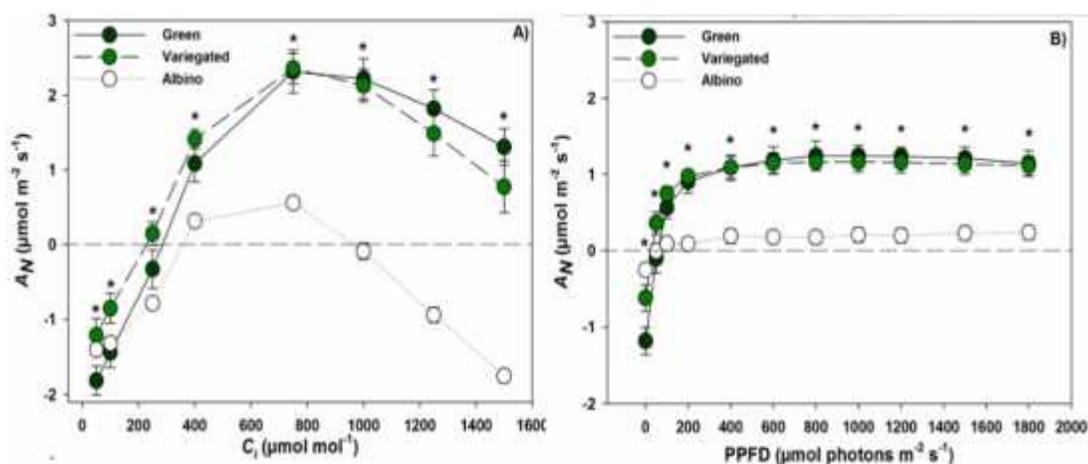


Figura 4.6. Curva de respuesta de CO_2 ($A_N\text{-}C_i$) y flujo de densidad fotónica $A_N\text{-PPFD}$ en plantas de *A. angustifolia* *in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$). $n = 5$

4.3.5 Niveles transcripcionales de expresión de genes asociados al desarrollo estomático

Se analizaron los niveles de transcripción de once genes controladores del desarrollo estomático en tejido meristemático y en hoja utilizando qRT-PCR. El diseño de los oligonucleótidos que codifican a los genes del desarrollo estomático se basaron en la búsqueda del transcriptoma de *Agave* reportado por Gross (2013) (**Tabla 4.3**). Las condiciones de amplificación de los fragmentos por RT-PCR (**Tabla 4.4**) y el análisis realizado mediante el alineamiento de la secuencia con la base datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), posterior a la secuenciación, evidenció el porcentaje de similitud y la identidad de los fragmentos (**Tabla 4.5**)

Tabla 4.3. Secuencias usadas para el diseño de oligonucleótidos de genes implicados en el desarrollo estomático.

Gen	Numero de accesoión	Especie	Base de datos
Zeaxanthin epoxidase (ZEP) (ABA1)	SRR789754.35248782.2 SRR1371239.78272.2	<i>Agave americana</i>	Agave transcriptome/Genebank
ERECTA	SRR1371239.47311.2	<i>A. americana</i>	Agave transcriptome/Genebank
FAMA	GAHU01142511.1	<i>A. tequilana</i> and <i>A. deserti</i>	Agave transcriptome/Genebank
YODA	GAHU01054384.1	<i>A. tequilana</i> and <i>A. deserti</i>	Agave transcriptome/Genebank
AGAMOUS (AGL16)	SRA:SRR1371240.1145872 61.2	<i>A. americana</i>	Agave transcriptome/Genebank
Mitogen-activated protein kinase 4 (MPK4)	SRA:SRR1371238.449707.2	<i>A. americana</i>	Agave transcriptome/Genebank
Mitogen-activated protein kinase 6 (MPK6)	SRA:SRR1371236.19329.2 SRA:SRR1371239.4917.2	<i>A. americana</i>	Agave transcriptome/Genebank
FOUR LIPS (FLP)	SRA:SRR789755.1584146.2 SRA:SRR789755.16845778. 2 SRA:SRR789755.18383693. 2	<i>A. tequilana</i>	Agave transcriptome/Genebank
Too many mouths (TMM)	GAHU01065897.1	<i>A. tequilana</i> and <i>A. deserti</i>	Agave transcriptome/Genebank
MUTE	SRA:SRR1371240.1280805 19.2 SRA:SRR1371240.9277717 0.1 SRA:SRR1371240.9209565 5.2	<i>A. salmiana</i>	Agave transcriptome/Genebank
SPEECHLESS (SPHC)	SRA:SRR1371240.1371384 65.2 SRA:SRR1371240.9919768 0.1	<i>A. americana</i>	Agave transcriptome/Genebank

Tabla 4.4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el análisis qRT-PCR de genes implicados en el desarrollo estomático.

Gen	Secuencia	Tamaño del producto (pb)	Tm (°C)
ABA1	ABA1F: GATGTGGGTGCTGGAAAAAT ABA1R: TGCATCGCATGGATAGAATC	246	60
ERECTA	ERECTAF: ACCGATCTTGGGCAACTTG ERECTAR: AGCTCAGCTGGAATGTGTC	153	60
FAMA	FAMAF: GTGGTGTGGAGGTGAAGAAC FAMAR: CTGCTGGGATTGATGGATG	344	60
YODA	YODAF: GCCCACAACAGATTACCAC YODAR: CGACACAGCACCCTATG	250	57.5
AGL16	AGL16F1: TCACTGTCCTCTGCGATGCT AGL16R1: TATCCATGCCATCCAGCTC	249	60
MPK4	MPK4F: CATTTCGGCGAGTGTATTGC MPK4R: CGATACCACCGAGTGACAAC	147	63
MPK6	MPK6F: TGAGGCAGCTTCCACAGTAC MPK6R: GCAAACAGGCTCGTCATTG	184	62
FLP	FLPF: AGATCGCCACATCGTCTCTT FLPR: GCCTCGCATAGAATCATATCC	211	60
TMM	TMMF: TCCCTGGAGAACAATAGGC TMMR: CAGACCCATCAACACAAAGC	187	62
MUTE	MUTEF:GAGAAGGCAGATGAATGAGC MUTER: CGTCTGGAAGGTTTGTGG	223	62
SPHC	SPHF: CACACTTGATAAGACCGTGTTCA SPHR: GAATGTTTGTGGAATCTCATCTGC	100	63
UBI11	UBI11F: GACGGGCGCCAACCTTGCGGATTAC UBI11R: TCCTGGATCTTCGCCTTGACATTG	200	62

Tabla 4.5 Similitud de los fragmentos de PCR de cada gen amplificado con sus proteínas ortólogas.

Gen	Proteína ortóloga	Número de accesión	Similitud (%)
ABA1	ZEP- <i>Asparagus officinalis</i>	XP_020269203.1	88
ERECTA	ERECTA- <i>Ananas comosus</i>	XP_020081626.1	94
FAMA	FAMA- <i>Musa acuminata</i> subsp. <i>Malaccensis</i>	XP_018677740.1	87
YODA	YODA-like- <i>Phoenix dactylifera</i>	XP_008804032.1	79
AGL16	MADS16- <i>Ananas comosus</i>	OAY75349.1	92
MPK4	MPK4- <i>Capsicum chinense</i>	PHU28050.1	85
MPK6	MPK6- <i>Brachypodium distachyon</i>	XP_003574247.1	82
FLP	MYB124- <i>Asparagus officinalis</i>	XP_020257328.1	83
TMM	TMM-like- <i>Asparagus officinalis</i>	XP_020249625.1	81
MUTE1	MUTE- <i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010256206.1	78
SPHC	SPEECHLESS- <i>Tarenaya hassleriana</i>	XP_010537121.1	81

Los niveles de expresión encontrados en los tejidos de la base meristemática y hoja de los fenotipos G, V y A, de los genes que codifican para enzimas y/o proteínas involucradas en el desarrollo estomático se muestran en la **figura 4.7**. El análisis estadístico mostró que los niveles de expresión en *SPCH*, *MUTE1* y *FAMA* identificados como genes maestros del linaje estomático, presentan diferencias significativas respecto al fenotipo G. Observamos que A aumenta sus niveles de expresión en la base de los meristemas y en la hoja en *SPCH* y *MUTE1*, en tanto que V disminuye en ambos tejidos respecto a lo encontrado en G. Sin embargo, *FAMA* presenta un incremento solo en la base de los meristemas, mientras V presenta una mayor expresión en hoja con diferencias significativas respecto a G. Por otra parte, *YODA*, *TMM* y presentaron en A y V una disminución muy significativa en comparación con G en el tejido de la hoja, mientras que en la base de los meristemas *TMM* no presentó ninguna diferencia significativa. *ERECTA*, *FLP* y *MPK4/6* los patrones observados presentaron un mayor incremento en A, en tanto V presentó pequeñas diferencias significativas a la baja en la base de los meristemas y en la hoja con respecto a G.

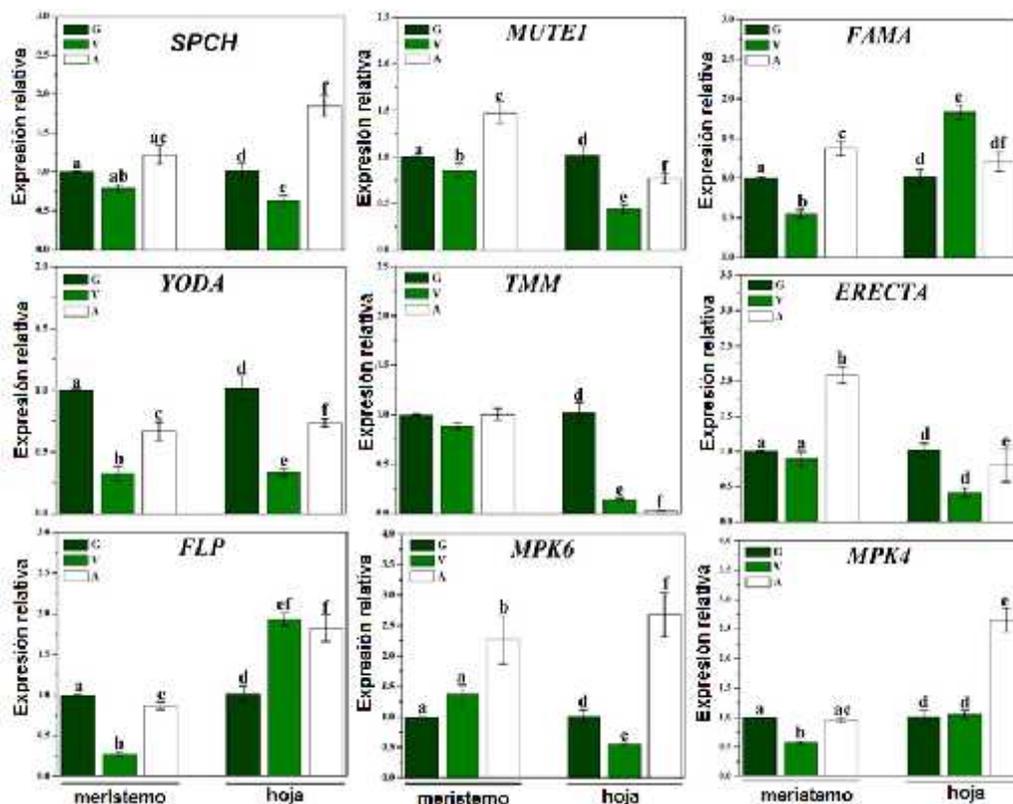


Figura 4.7. Niveles de expresión relativa de los genes que codifican para el desarrollo estomático. *SPCH*, *MUTE1*, *FAMA*, *YODA*, *TMM*, *ERECTA*, *FLP*, *MPK6*, *MPK4* fueron analizados en tejidos de la base de los meristemos y en la hoja en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$). $n = 5$

4.3.6 Niveles transcripcionales de expresión de dos micro-ARNs asociados al desarrollo estomático

El potencial de los microARNs se analizó a partir de las secuencias maduras de miR824 y miR166, las eficiencias por qPCR de los oligonucleótidos fue comprobada utilizando como gen de referencia snU6 (**Figura 4.8**). De acuerdo con los patrones de expresión en los tejidos de la zona meristemática-basal y hoja de los fenotipos G, V y A, se presentaron dos patrones de expresión, la mayor actividad de los microARNs se mostró en la región meristemática con mayor abundancia en A, para miR824 con 5.2 URE y en V para miR166 con 1.5 URE. El segundo patrón obtuvo expresiones con picos bajos en hoja, en el que A

presentó 1.3 URE para miR824, en tanto que el miR166 estuvo en niveles por debajo de una unidad relativa en V y A (**Figura 4.9**). De la misma manera y basados en los reportes realizados en *A. thaliana* y maíz se analizaron los niveles de expresión de dos blancos de acción asociados a los miR824 y mir166, observándose que los niveles de transcritos encontrados en AGL16 y ABA1 (**Figura 4.10**), podrían encontrarse asociados a la regulación negativa de los micros-RNAs.

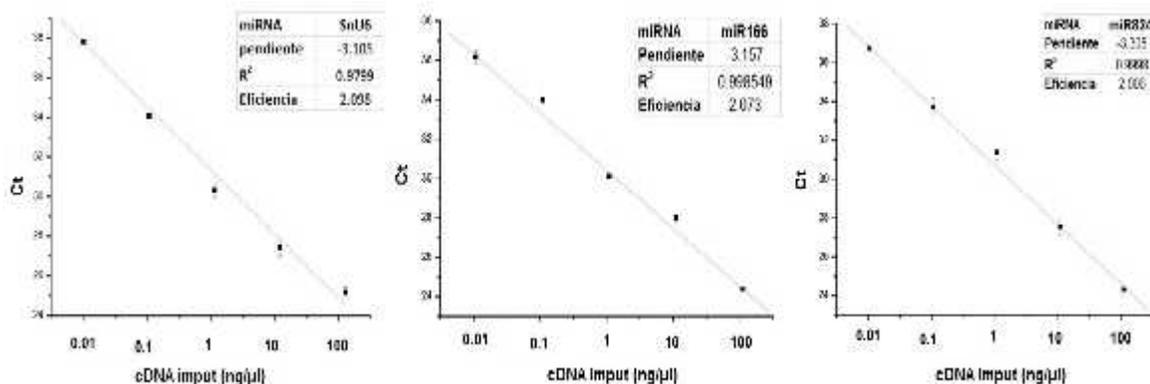


Figura 4.8. Eficiencia de los oligonucleótidos utilizados para la expresión de miR824 y miR166. qPCR de los dos miRNAs y el gen SnU6 referencia Ct: valor umbral del ciclo (media \pm SD; n = 3); E: eficiencias de qPCR $E = 10[-1/\text{slope}]$.

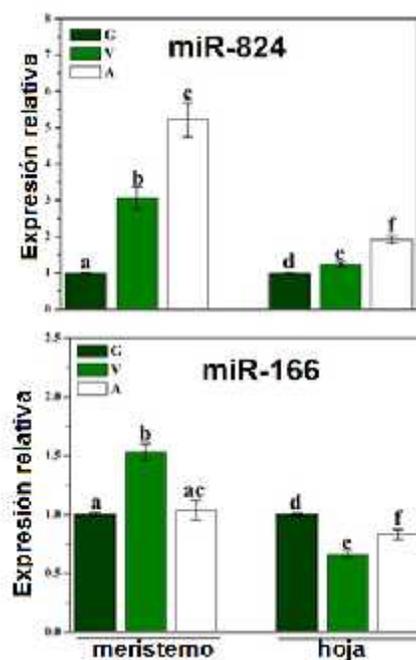


Figura 4.9. Niveles de expresión relativa de los miR824 y miR166 involucrados en el control del desarrollo estomático. Los niveles de expresión fueron analizados en tejidos de la base meristemática y en hoja en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$). $n = 5$

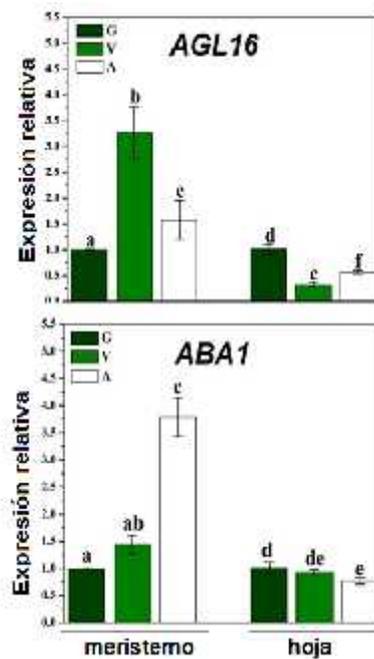


Figura 4.10. Niveles de expresión relativa de *AGL16* y *ABA1* asociados al desarrollo estomático. Los niveles de expresión fueron analizados en tejidos de la base meristemática y en hoja en los fenotipos G, V y A de *A. angustifolia in vitro*. Los datos son la media \pm SE. Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$). n = 5

4.4 DISCUSIÓN

A primera vista el fenotipo G precisa de rasgos anatómicos afines a las hojas CAM, con una organización en las células del mesófilo, cloroplastos funcionales, grandes vacuolas y un complejo estomático tipo tetracítico (Santamaría *et al.*, 1995). No obstante, las observaciones microscópicas realizadas en los fenotipos V y A de *A. angustifolia in vitro*, mostraron diferencias significativas en las células epidérmicas y la anatomía foliar en comparación a lo observado en G (**Figura 4.1**). La presencia de células epidérmicas de menor tamaño en A y AV de V y complejos estomáticos anormales y bajos niveles de los pigmentos fotosintéticos (**Tabla 4.1, Figura 4.2**), confirmaron la asociación del albinismo en *A. angustifolia* al grado de respuesta fisiológica encontradas en V y A. Nuestros resultados coinciden parcialmente con los estudios realizados por Monja-Mio *et al.* (2015) y Duarte-Aké *et al.* (2016) en sistemas *in vitro* de *Agave*, en donde, se han reportado irregularidades de la hoja *in vitro*, afectando el contenido de ceras epicuticulares y la anatomía del complejo estomático, de tal manera que el almacenamiento del ácido málico durante la apertura estomática nocturna presenta cambios significativos ante irregularidades morfológicas en el movimiento estomático (Wangs *et al.*, 2014; Andrés *et al.*, 2014; Jamieson y Willmer, 1984).

A partir de las diferencias altamente significativas analizadas en las variables fotoquímica, intercambio de gases, transpiración y el uso eficiente del agua analizados en los tres fenotipos, en V y A (**Figuras 4.4, 4.5 y 4.6**), se sugiere que la adaptación y supervivencia en cada fenotipo es probablemente un gran desafío en la estructura interna ideal de la ingeniería CAM (Hepworth *et al.*, 2018; Rudall *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016a; Roy *et al.*, 2013). En *A. angustifolia* (Us-Camas *et al.*, 2017), *A. americana* (Raveh 1998), *Hordeum vulgare* (Caldwell 2004; Döring 1999), *Arabidopsis* (Gould 2018; Wang 2018) y *Triticum aestivum* (Zheng 2018), las anomalías encontradas en los fenotipos G, V y A de *A.*

angustifolia podrían encontrarse asociadas a la desregulación de genes esenciales en la biosíntesis de clorofilas y carotenoides (Us-Camas *et al.*, 2017). Sin embargo, el cambio significativo del tamaño (**Figura 4.3**) y diferenciación de las células epidérmicas, las baja densidad estomática y alteraciones en la orientación paralela-transversal-oblicua en los patrones estomáticos y la respuesta limitada de las células guarda laterales aberrantes podría estar asociado a la desregulación molecular y epigenética (Simmons y Bergmann, 2016; Meyer, 2015; Kagan y Sachs, 1991). Por otra parte, el desarrollo anormal de las células guardia podrían estar conduciendo al patrón inverso del movimiento estomático diurno, reforzando nuestra idea de un comportamiento facultativo C3 – CAM durante el establecimiento de la variegación y transición al estado albino (Wang Ruijuan, 2018; Borlang, 1998; Zhang Ting, 2018; Heyduk, 2016). En *Kalanchoe*, piña y agave se ha sugerido que la eficiencia de la fotosíntesis en CAM se encuentra asociada a la respuesta estomática y que el sistema de comunicación celular circadiano al metabolismo del mesófilo y contenido de malato, son elementos determinantes para la respuesta de las células guarda (Zhu Meizhi, 2018; Paul Abraham, 2016; Ming, 2015; Simmons, 2016, Trickter, 2013).

Actualmente, la estrategia en la adaptación a los cambios ambientales como la sequía y el control en la evapotranspiración a través del cierre estomático diurno en las plantas CAM, se atribuye consistentemente a la anatomía vascular y combinación del ajuste osmótico en los cloroplastos y concentración del malato, para la activación de los canales de salida de H^+ e impulso de los osmorreguladores aniónicos Cl^- , K^+ y Mg^{+2} (Zoulias *et al.*, 2018; Woolfenden *et al.*, 2018; Wangs *et al.*, 2014; Zeiger, 1983). De acuerdo a nuestros resultados, la señalización del CO_2 detectada por las células guarda y células del mesófilo (**Figura 4.5**) (Lake, 2002; Woodward, 2001; Glover, 2000), impulsan el cierre estomático estableciendo valores bajos en la conductancia estomática (Miyazawa *et al.*, 2006) y transpiración, con una relación inversa en la eficiencia sobre WUE (Wang y Bader, 2018; Wang *et al.*, 2018b; Zhang *et al.*, 2018b) y tasa fotosintética neta, característica del metabolismo CAM (**Figura 4.6**). Por otra parte, la respuesta observada en la regulación del contenido relativo del agua (**Figura 4.4**) nos permitió relacionar la capacidad de regulación osmótica en las células guarda y los efectos interactivos de otros factores implicados en el intercambio de gases entre la hoja y Ca, como el uso eficiente del agua, conductancia

estomática, y transpiración. Sin embargo, a partir de la limitada capacidad de la tasa fotosintética y asociaciones fisiológicas por los altos contenidos de agua en plantas A y V parece generarse un costo metabólico, en relación al desarrollo de estomas más sensibles a los cambios en Ca, como se muestra en la relación de WUE y los altos niveles de transpiración, asociados claramente las respuestas de un metabolismo C3 facultativo (Serna, 2013).

Hoy en día, la utilización de mutantes en *Arabidopsis*, con diferentes grados de interrupción en el desarrollo de la estructura foliar y estomas, ha demostrado que la alteración en la programación celular del linaje, condiciona fuertemente el tamaño estomático, densidad estomática y distribución estomática, modificando trascendentalmente la respuesta de las células guarda a la asimilación del CO₂ atmosférico e intercambio de CO₂ intercelular en la hoja (Barbierie et al., 2012; Orsint, 2012; Shtein et al., 2017, Merced Amelia, 2016). Por lo tanto ¿Cuál es el sistema de señalización para comenzar o continuar un proceso de diferenciación estomática en *A. angustifolia* y sus variantes albinas? La maquinaria transcripcional del desarrollo estomático parece ser flexible y determinada por los factores ambientales como la luz, la humedad, auxinas, citocininas y CO₂ (Males y Griffiths, 2017; Yang et al., 2017; Borland et al., 2014; Le et al., 2014).

La influencia e interacción de estos factores y la duplicación y/o divergencia de genes del linaje estomático en CAM, podrían estar otorgando una rápida expansión celular, facilitando la separación del destino celular en las células precursoras del meristemoide (Zoulias et al., 2018; Sutimantanapi et al., 2014). Consistente a esto, la expresión de genes estomáticos y alteraciones fisiológicas entre los fenotipos de *A. angustifolia* (**Figura 4.7**), sugieren que la desorientación celular y complejos estomáticos irregulares son consecuencia de la desregulación epigenética-molecular y no una variabilidad genética (Us-Camas et al., 2017). Una posible alternativa son los mecanismos epigenéticos de los microARNs, pequeñas moléculas de RNAs que han sido actualmente asociados al funcionamiento de las células guardias y alteraciones morfológicas en la hoja. En las **figuras 4.8 y 4.9** se presentan niveles que podrían condicionar significativamente la asimilación del CO₂, limitando el control sobre el uso de agua, es una consecuencia en la programación molecular de las células precursoras del linaje estomático (Birnbaum y Roudier, 2017; Richards et al., 2017; Kinoshita y Seki, 2014; Tricker et al., 2012; Kagan y

Sachs, 1991).

Los resultados sugieren que los dos perfiles transcripcionales determinados para los miR824 y miR166 varían de manera importante (**Figura 4.9**). La regulación en la zona basal de las células meristemáticas, con alta capacidad proliferativa y propiedades de regenerar el tejido foliar, tiene las características propias de las MMC y los tipos principales de células epidérmicas (células de pavimento, GMC y SMC) (Serna, 2013; Pillitteri *et al.*, 2011). De otra manera, los niveles transcripcionales bajos en los genes YODA , FLP, MPK4 y la sobreexpresión de MPK6 en la zona basal variegada en contraste a la zona basal albina con una desregulación a la alta y el perfil transcripcional en el establecimiento del complejo estomático maduro y los patrones de distribución (**Figura 4.3**) con la sobreexpresión en FAMA, FLP y MPK4 en la hoja variegada y el aumento significativo en SPCH, FAMA, ERECTA, FLP, MPK4 y MPK6 en hojas albinas, sin embargo, la desregulación con una marcada tendencia a la inhibición en V y A fue la evidenciada en TMM. Por lo tanto, aunque a primera vista *A. angustifolia* conserva la mayoría de los genes del linaje estomático reportados en plantas C3 y C4, el balance y la sintonía adecuada son la clave para las divisiones asimétricas, simétricas y laterales necesarias para la formación del complejo estomático (**Figuras 4.6 y 4.8**) (Rudall *et al.*, 2017; Merced y Renzaglia, 2016; Serna, 2013; Pillitteri *et al.*, 2011; Geisler *et al.*, 2000).

Una pérdida o ganancia en la actividad transcripcional de los genes SPCH/MUTE/FAMA controladores de las primeras divisiones celulares en *A. angustifolia*, podrían condicionar la simetría de las células madres meristemáticas en las especies CAM (Raissig *et al.*, 2017; Lau *et al.*, 2014; Peterson *et al.*, 2010; Ohashi-Ito y Bergmann, 2006). No obstante, las asociaciones positivas o negativas establecidas a través de YODA/ ERECTA/MPK6/MPK4 a SPCH y FAMA podrían encontrarse estrechamente relacionadas a la reducción de divisiones asimétricas y regular negativamente la organización en las células meristemáticas y los patrones de distribución (Zoulias *et al.*, 2018; Lau *et al.*, 2014; Peterson *et al.*, 2010; Serna, 2009; Casson y Gray, 2008; Ohashi-Ito y Bergmann, 2006). Al igual que en otras monocotiledóneas como Kalanchoe, maíz, trigo y mutantes transitorias de Arabidopsis, en las que se han sugerido nuevos roles y actividades ortóloga en los genes SPCH, MUTE y FAMA (Zoulias *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018; Rudall *et al.*, 2017; Serna, 2013; Farquharson, 2012), en *A. angustifolia*, además de estar modulando la

diferenciación, podrían estarse desarrollando señales complejas para la actividad de otros factores transcripcionales como *ERECTA*, *YODA* y *FLP*, y al igual que en otras monocotiledóneas podrían estar ejerciendo un control sobre las divisiones laterales para las SC y sistema de comunicación célula-célula (Zoulias *et al.*, 2018; Pillitteri *et al.*, 2011; Gray y Hetherington, 2004).

En otro caso, la observación en la actividad de *ERECTA* condicionada al ambiente y a la concentración de ABA, resulta interesante que se ha sugerido que su actividad negativa establece una relación funcional a la señalización de las kinasas (MPK4, MPK6) durante el inicio del desarrollo estomático y la maduración de las células guarda (Xu *et al.*, 2018; Serna, 2009; Wang *et al.*, 2007). Hemos podido constatar una inhibición muy significativa de TMM, aunque su actividad puede encontrarse asociada a *YODA* y *ERECTA* (Casson y Gray, 2008; Geisler *et al.*, 2000; Yang y Sack, 1995) en *Arabidopsis* las mutaciones en estos genes podrían aumentar las primeras divisiones celulares conduciendo a una alta producción de estomas, no obstante y de manera interesante al presentarse eliminaciones en *SPCH*, *FLP*, *TMM* (Merced y Renzaglia, 2016; Kutter *et al.*, 2007), las células guardas podrían exhibir malformaciones, así como densidades estomáticas bajas, coincidiendo parcialmente al comportamiento encontrado en hojas variegadas y albinas con la pérdida de dos células subsidiarias asociadas a la desregulación de *MPK6/FLP* y bajas densidades estomáticas dirigidas a *TMM/AGL16* y *miR824*. Hemos mostrado que la densidad estomática baja, el desarrollo de complejos estomáticos paracíticos con células guarda deformes y una mínima diferenciación de la epidermis de las hojas albinas, las cuales dependen, en parte a la regulación mediada por la actividad de *TMM* y el rol de microARNs (Debernardi *et al.*, 2017; Wai *et al.*, 2017; Chávez Montes *et al.*, 2014; Pulido y Laufs, 2010). *Agamous-like16* (*AGL16*), cuyo control transcripcional es realizado por la degradación de su ARNm se encuentra relacionado a la secuencia madura de *miR824*, identificado como un microRNA conservado y la expresión de *AGL16/miR824* deriva en los meristemoides (Kutter *et al.*, 2007). Esta actividad y el aumento en la actividad mostrada en la zona basal meristemática podría estar condicionado la expresión reducida de *AGL16* en hojas, asociándose morfológicamente a la baja densidad estomática de la región albina y hoja totalmente albina. Del mismo modo que en *Zea mays* (Farquharson, 2012; Spoehr, 1942) y gramíneas (Hepworth *et al.*, 2018; Rudall *et al.*, 2017; Shtein *et al.*, 2017) en *A.*

angustifolia, es necesario un preciso control transcripcional durante la primera división asimétrica de las MMC y da origen a las GMC encontradas en la zona meristemática basal. La regulación se ha relacionado a la actividad de YODA/FLP/MPK4, consecuentemente en monocotiledóneas en las que se llevan a cabo de 1 a 3 divisiones simétricas para establecer las GC, las divisiones laterales al paralelo, esenciales para reclutar dos o cuatro células epidérmicas estructurales y tras una polarización celular establecen las SMC precursoras de las SC podría estar confiriéndose a través de pulsos transitorios a la actividad de H3K27me3 y producir cambios en la expresión de SPCH, FLP y FAMA pues éstos codifican al factor de transcripción tipo bHLH (Lee *et al.*, 2014a; Xie *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2005).

Sin duda y en una nueva retrospectiva molecular, en *A. angustifolia* y otras especies CAM se están generando nuevos hallazgos sobre la reprogramación de la expresión transcripcional de genes involucrados en el desarrollo y movimiento estomático y la fijación de CO₂ y la programación epigenética como sistema regulador de varios procesos biológicos esenciales para las plantas. La propuesta final, presenta como el modelo en la señalización e interacción molecular-epigenética en el desarrollo estomático.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS VARIANTES SOMACLONALES ALBINAS DE *Agave angustifolia* CULTIVADO *IN VITRO*

5.1 INTRODUCCIÓN

Agave angustifolia Haw, es una planta suculenta perenne ampliamente cultivadas a partir de bulbillos y en sistemas *in vitro*. Utilizada artesanalmente para la producción de una bebida popular de alcohol “el mezcal”. Durante la micropropagación *in vitro*, estudios recientes realizados por Duarte-Aké *et al.* (2016) y Us-Camas *et al.* (2017), han reportaron el desarrollo de variables somáticas con diferentes grados de albinismo. Aunque el albinismo puede ocurrir como resultado de una mutación natural, durante la micropropagación de especies agrónomicamente importantes, el albinismo ha sido clasificado como una variación somaclonal (Torp y Andersen, 2009; Darlington, 1929). El albinismo, como una variable somaclonal en cultivos micropropagados por años podría encontrarse asociado a la integridad del ADN, la composición química del medio de cultivo, factores como luz, humedad, temperatura (Datta, 2005; Dunford y Walden, Yao *et al.*, 1995; Yao y Cohen, 2000). El albinismo ha sido reportado en el cultivo de anteras en cebada (Dunford y Walden, 1991), trigo (Tuveson *et al.*, 1989), *Arabidopsis* (Chory *et al.*, 1991; Larkin *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2010), tabaco (Stetler y Laetsch, 1965) y tomate (Scolnik *et al.*, 1987a). Sin embargo, estudios en plantas albinas de bambú (Liu *et al.*, 2007) y plátano (Zaffari *et al.*, 1998a) han permitido asociar el papel de las citocininas al desarrollo anormal de los cloroplastos y deficiencias fotosintéticas que conducen al albinismo letal.

De la misma manera, el estudio de enzimas y proteínas claves en la ruta de la clorofila, ha expuesto el bloqueo enzimático en diferentes etapas como variables enzimáticas que conducen a diferentes grados del albinismo. Además, la desregulación asociada al grado de afectación en los cloroplastos ha conducido a la reevaluación del albinismo en las plantas superiores (Isah, 2019; Li *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2009; Mouritzen y Holm, 1994). El análisis de los cambios en la actividad enzimática ha expuesto a la superóxido dismutasa, la RuBisCo subunidad grande/pequeña, las proteínas de unión a clorofila y a catalasa con

bajos niveles críticos en el albinismo, no obstante las actividades en relación a la peroxidasa y proteinasa se han observado en altos niveles (Shi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016; de Luna-Valdez *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2011; Majeran *et al.*, 2008). En *Camelia sinensis* y trigo el estudio de complejos pigmento-proteína en hojas albinas, reveló que la supresión de elementos claves como la clorofila P700, un complejo proteico de unión de clorofilas a/b y proteínas esenciales en las antenas captadoras de la luz, podría ser una de las causas del albinismo (Cheng *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2016a; Rodríguez *et al.*, 2013). Además, Us-Camas *et al.* (2017) encontró en *A. angustifolia* diferencias puntuales en la expresión génica en hojas con albinismo, exponiendo así la afectación en genes controladores de la síntesis de clorofilas y codificadores de proteínas como Rubisco subunidad mayor y menor, la magnesio quelatasa y PEP-carboxilasa.

En este capítulo analizamos el contenido proteico utilizando la electroforesis bidimensional (2-DE), para lo cual se usó primero el aislamiento y análisis de proteínas expresadas diferencialmente en las tres variables fenotípicas albinas de *A. angustifolia*. Además, se analizaron proteínas Rubisco subunidad mayor, PEP-carboxilasa y proteínas PsAD1-D2. Este estudio sugiere las posibles alteraciones ultraestructurales de los cloroplastos en las variables V y A. El objetivo de estos estudios fue obtener una mejor comprensión del mecanismo del albinismo en *A. angustifolia*.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Aislamiento de proteínas totales para 2-DE

Para la extracción de proteínas de hojas jóvenes en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* se empleó un protocolo modificado (Schagger *et al.*, 1994; Ruiz-May *et al.*, 2011; Luján *et al.*, 2009), utilizando fenol/acetato de amonio-metanol (Issacson, *et al.* 2006) y TCA/acetona (Santoni, *et al.* 1994). Se pesaron y maceraron 3 g de material vegetal de *A. angustifolia* con N₂ líquido. La muestra se trasladó a un tubo Miracloth previamente enfriado con 10 mL de amortiguador de extracción compuesto por 0.8 M sacarosa, 0.1 M KCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, β-mercaptoetanol (30 µL/mL) e inhibidores de proteasas (20 µL/mL). Una vez mezclada la muestra se adicionaron 2 volúmenes de fenol saturado con Tris pH 8.0, se agitaron en vórtex por 30 min a 4 °C y posteriormente se centrifugaron a 6,000 x g durante 30 min a 4 °C. Se colectó la fase fenólica y se le realizó

tres veces más la extracción con 2 volúmenes de amortiguador de extracción respectivamente, agitando por 15 min a 4 °C y centrifugando a 6,000 x g durante 30 min a 4 °C. Una vez obtenida la fase fenólica de las tres muestras y se adicionaron 2 volúmenes de 0.1 M acetato de amonio en metanol absoluto (-20 °C) y se almacenó durante 12 h a -20 °C. Después de la precipitación de las proteínas se centrifugó por 20 min a 6,000 x g en frío y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó tres veces con 3 mL de metanol absoluto y se centrifugó por 10 min a 10,000 x g, posteriormente se lavó dos veces más con 1.5 mL de acetona absoluta. Se secó la pastilla y posteriormente se resuspendió en 350 µL de tampón de IEF (7 M urea, 2 M tiourea), se procedió a cuantificar la cantidad de proteína y posteriormente se prepara la muestra con el amortiguador de lisis adicionando a la muestra de anfolitos Destreak 1.2%, IPG amortiguador pH 3-10 al 0.5% y DTT 2 M y dejando reposar por 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionaron 20 µL de *N,N*-dimetil acrilamida para alquilar la muestra y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente.

5.2.2 Cuantificación de proteínas

Las proteínas totales se cuantificaron siguiendo el método de Peterson (1997). En general, este método consiste en realizar una curva patrón con albúmina sérica bovina, BSA (1 mg ml⁻¹) como proteína estándar, manejando un rango de concentraciones de 10 a 100 µg de la proteína por mililitro. A la curva patrón y a las muestras se les agregaran 100 µL de DOC (ácido desoxicólico) al 0.15% (p/v) mezclando con la ayuda de un vortex. Las muestras se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se les adicionaran 100 µL de TCA (ácido tricloroacético) al 72% (p/v) mezclando y dejando reposar por 15 minutos a -20 °C. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron a 16,000 x g y 3,500 x g respectivamente durante 15 minutos a 4 °C, desechando el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla. La pastilla precipitada se resuspende en 1 ml de agua destilada. Seguidamente, a cada muestra se le adicionó 1 mL del reactivo A que contiene CTC [CuSO₄.5H₂O 0.1% (p/v), NaCO₃ 10% (p/v), 0.2% (p/v)], NaOH 0.8 N (p/v), SDS 10% (p/v) y H₂O], dejándolo en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, a cada muestra se le adicionaron 500 µL del reactivo B que contiene el reactivo de Folin-Ciocalteu 1:5 (v/v), dejando reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, por último, para determinar la concentración de la proteína, se midió la

absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro Genesis 10 UV a 750 nm.

5.2.3 Electroforesis SDS-PAGE

Para observar el perfil proteico de las muestras, se mezclaron en un tubo Eppendorf 10 µg de cada muestra (G, V, A, GV y AV) con 10 µL de amortiguador de carga Laemmli (Laemmli, 1970) a 5X [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% (p/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 5% -mercaptoetanol y 0.01% (p/v) de azul de bromofenol]. La mezcla se calienta por 5 minutos a baño María (100 °C). Las proteínas serán separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% [gel de separación: 2.5 mL H₂O, 2.5 mL amortiguador de separación, 5 mL acrilamida al 30%; 50 µL de persulfato de amonio, (APS) al 10%, 15 µL TEMED. Gel de empacamiento: 2.3 mL H₂O, 1 mL amortiguador de empacamiento, 30 µL APS al 10%, 15 µL de TEMED], realizando la corrida a 100 voltios por 120 minutos. El gel de poliacrilamida se tiñe con azul de Coomassie [50% MeOH, 45% H₂O, 5% ácido acético, 0.05% azul de Coomassie] y plata para visualizar las bandas obtenidas.

5.2.4 Western blotting

Se disuelven 20 µg de proteína en 10 µL de colorante de carga SDS-PAGE (2x) y desnaturalizar a 100 °C durante 5 min. Las proteínas se separan posteriormente utilizando un gel desnaturalizante SDS-PAGE al 15% y realizar la corrida electroforética por 90 V durante 2 h. El análisis de inmunotransferencia inicia colocando el gel, el papel de filtro y la membrana de nitrocelulosa en amortiguador de transferencia durante 30 min con agitación suave. Se realiza el montaje del gel horizontalmente en forma de "sándwich" entre dos papeles filtro y la electrotransferencia semiseca se realiza durante 45 minutos a una constante de 15 V. La transferencia es verificada utilizando la tinción de proteína reversible de Ponceau-S-Red al 0.005% (Sigma). Finalmente, la tinción es removida realizando un lavado con NaOH 0.1 N, seguida de dos lavados con amortiguador PBS, continuando con el protocolo de inmunodetección.

Tabla 5.1 Anticuerpos utilizados contra, PEP-carboxilasa y D1/D2 en tres fenotipos diferentes de *Agave angustifolia* y además sus respectivos tiempos de detección. Todos estos anticuerpos están disponibles en Abcam.

Anticuerpo primario	Número de catálogo	Dilución en PBST	Tiempo de detección
Anti-PEP-carboxilasa	Ab34793	1:30,000	1 min
Anti-PSAD1 + PSAD2	ab65553	1:5,000	5 - 10 min
Anti-RuBisCo L	Ab62391	1: 15,000	5 - 10 min
Anticuerpo secundario			
Conjugado HTP de cabra-anticonejo IgG	ab6721	1: 20,000	

5.2.5 Inmunodetección

Todas las incubaciones se realizaron a 4 °C y en agitación suave constante. Cada una de las membranas fue lavada durante 10 minutos en PBS, seguido de 15 minutos en PBST. Se realizó una incubación de la membrana durante 60 min en PBST con 5% de leche sin grasa (suero bloqueador), a temperatura ambiente con agitación lenta. Posteriormente, se lavó la membrana dos veces con PBST durante 10 min a agitación lenta e incubó en PBST con 5% de leche en polvo sin grasa y el anticuerpo primario (**Tabla 5.1**) durante 1 hora o toda la noche a 4 °C con agitación lenta acorde al anticuerpo. Cada membrana se lavó tres veces, durante 10 minutos con PBST. Se incubó durante 60 minutos en PBST con 5% de leche en polvo sin grasa y el anticuerpo secundario a 4 °C con agitación lenta, se lavó tres veces, 10 min cada una, en PBST y un lavado final durante 10 minutos en PBS, procediendo a la detección por quimioluminiscencia.

5.2.6 Detección por quimioluminiscencia

Para proceder a la inmunodetección, se retira el PBS de la membrana, procediendo a mezclar las soluciones A y B del sustrato quimioluminiscente en volúmenes iguales. Para obtener los mejores resultados, las soluciones se mezclan durante 30 segundos y la solución se esparce en la superficie de la membrana. La señal se desarrolló en tiempos estimados de 30 segundos a 10 minutos. La membrana se colocó entre las hojas de plástico

limpio y finalmente en un casete de película y la membrana se expone durante uno o varios minutos a las películas de rayos X. La película es expuesta en la solución de revelado hasta obtener el contraste de imagen deseado, se lava con agua y se introduce durante unos minutos en la solución de fijación. Enjuagar y dejar que seque la película durante unos minutos.

5.3 RESULTADOS

Durante el análisis realizado para geles de una dimensión (**Figura 5.1**) se observaron diferencias significativas entre los perfiles proteicos de A y V, con respecto a lo obtenido en G. Entre las diferencias más significativas encontradas en A en contraste a los perfiles observados en G y V, se encuentran las proteínas con masa molecular de 100-175 kDa, seguido de una mayor acumulación en las proteínas de 50 a 37 kDa y un tercer grupo de 25 a 10 kDa. Sin embargo, se observó que otras proteínas con una masa molecular de 65, 37 y 25 kDa se conservan en G, V y A.

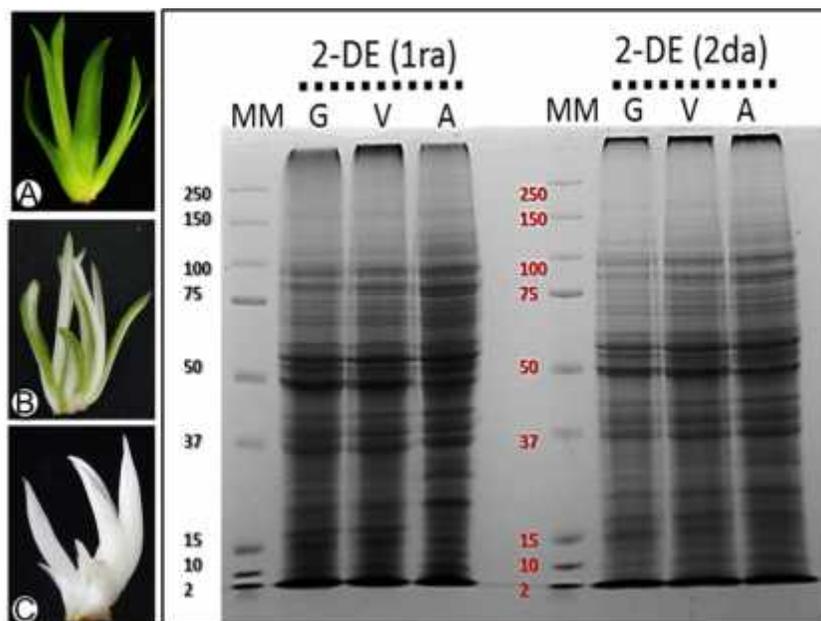


Figura 5.1 Visualización del perfil electroforético total en fenotipos de *Agave angustifolia in vitro*). 20 µg de proteínas analizadas en gel desnaturalizante SDS-PAGE al 12.5%, replicas experimentales de muestras de *A. angustifolia in vitro*, verde (G), variegada (V), albina (A) para el estudio de doble dimensión y western blots.

El análisis electroforético bidimensional de la proteína total en hojas de los tres fenotipos de *A. angustifolia*, realizado al menos por triplicado, mostró un alto nivel de reproducibilidad. Los geles representativos se muestran en la **Figura 5.2**. Entre todas las muestras analizadas, se detectaron reproduciblemente más de 750 manchas de proteínas en geles teñidos con nitrato de plata. El análisis cuantitativo realizado de las manchas con el programa Imagen J, reveló que 61 puntos de proteína mostraron un cambio significativo, en la intensidad en A y V con respecto a lo observado en G. Selectivamente 69 puntos han sido expuestos en las **tablas 5.2 y 5.3**, mostraron cambios cualitativos de menor o mayor intensidad. Los puntos observados como únicas en la planta albina, pero no V y G, conllevan a la reevaluación y búsqueda de identidades putativas de las manchas únicas y mayormente acumuladas en G y A. En total, 16 manchas compartidas entre los fenotipos G, V y A, 08 manchas compartidas entre los fenotipos G y V, 4 manchas compartidas entre los fenotipos G y A, seis manchas compartidas entre los fenotipos V y A, 5 manchas únicas en G, una mancha única en V, 10 manchas únicas en A.

En total, las proteínas expresadas diferencialmente se podrían clasificar en proteínas putativas de los fotosistemas I y II. Por otra parte, las manchas de proteína asociadas a una regulación ascendente en V y A, podrían incluir proteínas esenciales en las diferentes rutas metabólicas, de tal manera que las manchas de proteína del patrón III (conservadas en V y A) y IV (únicas en A) podrían estar relacionadas con el crecimiento de la hoja albina y/o biogénesis de los cloroplastos.

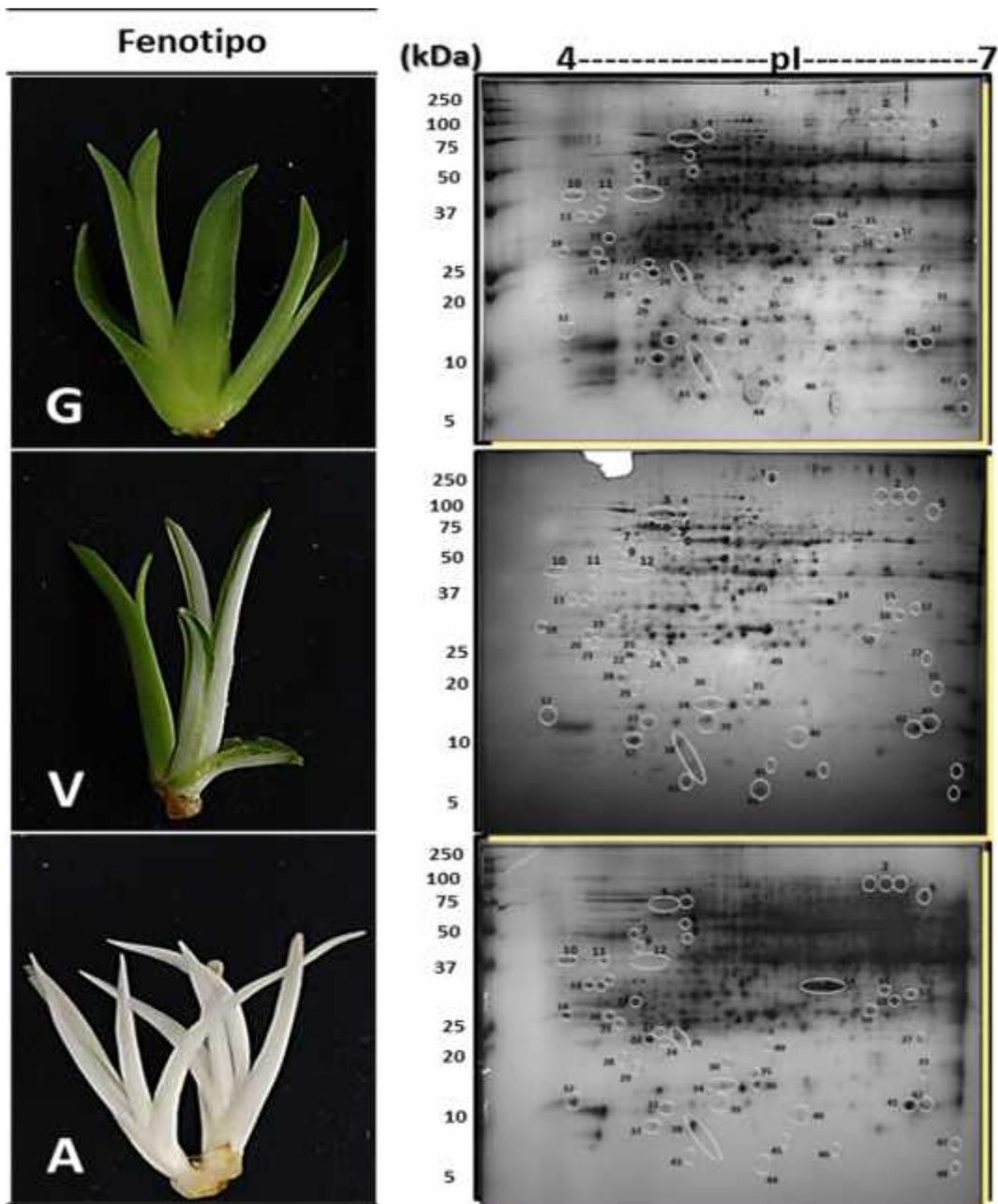


Figura 5.2. Gel de electroforesis bidimensional de proteínas separadas en tres fenotipos de *Agave angustifolia*. En a) el fenotipo G, el fenotipo V en b) y fenotipo albino en c). Las proteínas se separaron en una tira de IPG (pH 4-7) y en la segunda dimensión en un gel al 12.5%. Las proteínas que mostraron un cambio de expresión significativo (> 1.5 veces, valor de $P < 0.05$) fue observado en A y V y están marcadas con círculos blancos.

Tabla 5.2. Análisis cuantitativo de los spots en los tres fenotipos de *A. angustifolia*. Los asteriscos indican menor o mayor acumulación.

no. Spots	MM (kDa)	G	v	A	no. Spots	MM (kDa)	G	v	A
1	250	*	**	ND	26	26	**	*	*
2	150	*	*	**	27	25	ND	ND	*
3	75	**	*	ND	28	23	*	**	ND
4	75	*	*	**	29	22	**	ND	ND
5	75	ND	ND	**	30	23	ND	ND	*
6	60	**	*	ND	31	18	ND	*	*
7	50	**	*	***	32	18	ND	*	**
8	50	*	ND	ND	33	17	***	**	*
9	50	**	ND	*	34	19	**	*	**
10	45	ND	ND	*	35	19	ND	*	*
11	40	ND	ND	*	36	19	*	*	**
12	40	*	ND	ND	37	16	*	**	*
13	35	ND	ND	*	38	16	**	**	*
14	30	*	*	**	39	16	***	**	*
15	30	ND	*	*	40	16	ND	*	*
16	30	ND	ND	*	41	17	*	*	**
17	30	**	ND	*	42	17	**	**	*
18	27	*	*	**	43	12	**	*	ND
19	30	*	ND	**	44	13	ND	**	ND
20	27	ND	*	**	45	15	*	ND	ND
21	22	*	ND	*	46	15	*	*	ND
22	24	**	*	***	47	14	*	**	ND
23	24	*	ND	ND	48	13	*	**	ND
24	25	***	*	ND	49	18	ND	ND	*
25	26	**	*	*	50	23	ND	ND	**

Finalmente, a partir de las diferencias cualitativas evidenciadas en el perfil electroforético total de las proteínas presentes en las muestras de agave, se decidió analizar mediante el uso de anticuerpos específicos el comportamiento de enzimas esenciales para el funcionamiento de la fotosíntesis. Por ejemplo, la estabilidad de la enzima citoplasmáticas PEP-carboxila, proteínas cloroplastídicas como la PSAD1/D2 y RuBP subunidad mayor, codificada por genes del cloroplasto y la subunidad menor codificadas por genes nucleares. El resultado obtenido muestra que en las plantas en los tres fenotipos y las regiones analizadas por separado de la planta V, mantiene una abundancia constante en todos los tejidos, lo cual nos sugiere que proteínas codificadas por genes nucleares se sintetizan constantemente como un medio de supervivencia en plantas A y compensatorias en la

planta V y sus regiones. Así mismo, al analizar las subunidades de acoplamiento al fotosistema I, la PSAD1/D2, para la cual se necesitan del desarrollo correcto de los cloroplastos, se esperaba que en las plantas A, se encontrara ausente completamente, sin embargo, al analizar la región albina (RA), se observó una ligera abundancia de la subunidad PSAD2 y una ausencia de PSaD1.

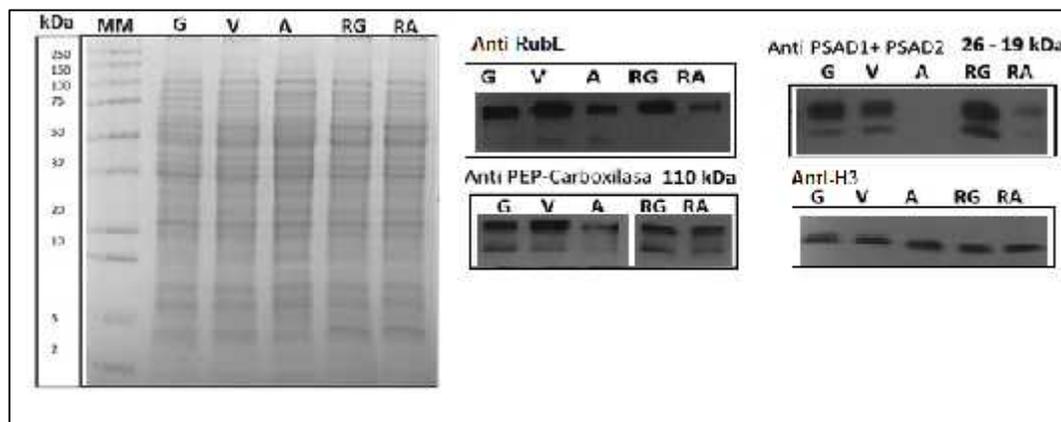


Figura 5.3. Visualización del contenido de 20 µg de proteínas totales por fenotipos de *Agave angustifolia in vitro*. 1ª) Perfil electroforético analizado de las muestras en los carriles 2-6 muestras de *A. angustifolia in vitro*, verde (G), variegada (V), albina (A), región verde y albina de la planta variegada RG y RA, respectivamente. Los geles son de poliacrilamida al 12.5% y teñido con azul de Coomassie, en el carril número 1 se muestra la escala de marcador molecular utilizado para las proteínas. 1b-1c indican el análisis de proteínas citoplasmáticas como la PEP-carboxilasa y cloroplastídicas como la PSAD1/D2, esenciales para la actividad fotosintética en las plantas.

5.4 DISCUSIÓN

El albinismo se ha reportado en diversas especies de plantas superiores, como *Arabidopsis*, tabaco, maíz, trigo y agave. Los estudios transcriptómicos han identificado en la actualidad una amplia lista de genes que responden al albinismo, revelando así, una compleja red involucrada en el albinismo (Shi *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2016a). En *Kalanchoe* y *Camelia sinensis*, se ha mostrado que el mecanismo regulador de los cambios en el color de la hoja y los niveles de aminoácidos durante el desarrollo de la hoja en la hoja, con variegación o albinismo total (Cheng *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2016a). Sin embargo, debido

al modelo de estudio, metabolismo fotosintético y regulación post-transcripcional, el nivel de ARNm no siempre se correlaciona bien con el nivel de proteína (Shi *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2016a; Majeran *et al.*, 2008). Nuestro análisis proteómico de las proteínas totales proporciona nuevos conocimientos sobre el albinismo de la hoja variegada y albina (**Figuras 5.1 y 5.2**). En este estudio se realizó una comparación de los perfiles proteicos por doble dimensión en hoja G, V, y A. Se cuantificaron más de 700 manchas y se seleccionaron 69 manchas de proteínas expresadas de manera diferencial de los geles y se analizaron cuantitativamente mediante Imagen J para determinar la intensidad entre las manchas de los fenotipos analizados. Hemos sugerido, con base a los datos de pH y masa molecular, proteínas implicadas posiblemente en el metabolismo primario y energético. Estudios similares en trigo y *Camelia sinensis*, sugirieron que la mayoría de las proteínas totales desreguladas se encontraron involucradas en el metabolismo primario y el metabolismo energético, incluido el metabolismo del carbono, nitrógeno, azufre y fotosíntesis (Qiu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016b; Rodríguez *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011). De tal manera, que las irregularidades observadas en V y A, podrían encontrarse asociados a procesos metabólicos primarios y energéticos desempeñando un papel importante acorde al grado del albinismo en la hoja.

El aumento en el nivel de expresión de varias proteínas y enzima durante el albinismo podría indicar un aumento en la producción de energía para varios procesos de defensa relacionados al estrés *in vitro*. Aunque otros estudios realizados en agave albino (unidad 2 y 3) han evidenciado que durante el albinismo la fotosíntesis parece estar inhibida y desregulada en V. La supresión de la transición plástido-cloroplasto y el daño a grana en el cloroplasto son puntos clave, en nuestro análisis proteómico, ya que las manchas seleccionadas podrían corresponder o estar asociadas a proteínas esenciales del metabolismo energético; como por ejemplo, la subunidad grande de RuBisCO, PEP-carboxilasa y PSA-D1/D2, con cambios de expresión heterogéneos en el análisis bidimensional en V y A. Cabe señalar que los puntos 205 y 613 podrían ser productos de la degradación de la subunidad grande de RuBisCO, porque sus masas moleculares observadas eran mucho más pequeñas que sus masas teóricas, por lo cual se analizaron a través de la inmunodetección (**Figura 5.3**), con anticuerpos específicos para asociar la desregulación putativa a la intensidad de manchas encontradas. Patrones similares fueron

observados en maíz y arroz albino (Rodríguez *et al.*, 2013), los resultados presentados en los puntos (puntos 8903 y 8909) fueron identificados como la subunidad grande de la RuBisCO, con masas moleculares observadas y teóricas similares (Qiu *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011). En nuestros resultados parece que las dos manchas asociadas a la subunidad grande de RuBisCO, en conjunto al análisis de inmunodetección, ha permitido corroborar las diferencias a la baja en el fenotipo A y un aumento en V, respecto a lo encontrado en G, estos resultados sugieren que una disminución de la actividad fotosintética podría conducir a una menor producción de carbohidratos en A y V (**Figura 5.3**). Por otra parte, los fenotipos V y A requiere de energía adicional para activar los diversos mecanismos de resistencia ante un crecimiento anormal. Se ha demostrado que en las plantas la mayor parte de la enzima PEPCasa se combina al ciclo del ácido tricarboxílico (Börner *et al.*, 2015; de Luna-Valdez *et al.*, 2014; Borland *et al.*, 1998; Evenari, 1989).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones

- A partir del estudio físico y microscópico realizado se comprobó que la lámina foliar de plantas de *Agave angustifolia* G, V y A, obtenidas espontáneamente durante la micropropagación, presentaron diferencias significativas en la estructura anatómica. El fenotipo V desarrolló hojas más delgadas y una variegación simétrica a lo largo de la hoja, en tanto A presentó un crecimiento más retardado y una epidermis poco diferenciada.
- La acumulación y la dramática disminución de los pigmentos fotosintéticos (chl a, b y carotenoides) entre los fenotipos de agave, podría estar asociado a la baja actividad fotosintética encontrada en A.
- La inactividad fotosintética encontrada en los plástidos de A y el análisis molecular de genes nucleares y del cloroplasto, sugieren que la regulación en la expresión de GLK y D1, D2, asociados al desarrollo de los cloroplastos en los tejidos albinos, podría encontrarse regulada a un nivel transcripcional diferente.
- El aumento en los niveles de expresión de los genes que codifican para la biosíntesis y degradación de clorofilas en conjunto a los resultados fotoquímicos y fotosintéticos, refuerzan la idea de un sistema compensatorio fotosintético en V y de fotoprotección y fotoinactivación en los tejidos albinos.
- Las diferencias encontradas en el tamaño y distribución estomática y el papel vital en la capacidad de las plantas para equilibrar transpiración y el rendimiento fotosintético observado en *A. angustifolia*, han expuesto cambios morfológicos y fisiológicos significativos. Los datos sugieren que las respuestas fisiológicas se encuentran asociadas al grado del albinismo en cada fenotipo. Sin embargo, aún se debe evaluar la influencia de otras variables como la influencia de las auxinas y citocininas para determinar una respuesta de desarrollo estomático.

- Hemos visto, en cuanto a los niveles de expresión de genes asociados al linaje celular estomático, que además de los controladores claves SPCH, MUTE y FAMA, se ha sugerido el papel clave de TMM y la familia ER para regular la cascada de señalización MAPK 4/6. Sugiriéndose que la señal establecida podría afectar a varios eventos claves del destino celular de una célula madre meristemática a convertirse en una GMC, modificando en consecuencia el número de entradas y/o divisiones que dan origen al linaje estomático, o al número de divisiones amplificadoras.
- La evaluación de los microARNs asociados a la fotosíntesis y el desarrollo estomático sugieren que la modulación epigenética podría estar asociada al desarrollo morfológico anormal en el tejido foliar. Sin embargo, los niveles encontrados de los miR172, miR166 podrían sugerir sistemas de autorregulación entre otros microARNs conservados y su vía de biogénesis.
- La acumulación diferencial de proteínas totales analizadas por primera dimensión y doble-dimensión permitió mostrar los patrones cuantitativos de proteínas posiblemente desreguladas en los fenotipos A y V. Además, el análisis realizado para detectar proteínas de Rubisco L, PEPcase y D1 /D2, nos permite sugerir que el sistema fotosintético abatido en el fenotipo A, se encuentra asociado esencialmente a la falta de cloroplastos y plástidos funcionales.

6.2 Perspectivas

- Realizar pruebas fisiológicas suplementando concentraciones diferenciales de citocininas asociadas al desarrollo de los cloroplastos y células guarda.
- Analizar los niveles de expresión de genes asociados a la cadena del transporte de electrones.
- Analizar de forma ultraestructural las suspensiones de cloroplastos y evaluar *in situ* los transcritos de genes claves en el desarrollo de las membranas tilacoidales.
- Analizar los precursores y blancos de acción de los microARNs asociados a la fotosíntesis y desarrollo estomático.
- Analizar e identificar las proteínas diferencialmente acumuladas entre los fenotipos V y A de agave.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadía J (1992). Leaf responses to Fe deficiency: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 15, 1699-1713
- Abdel-Ghany SE y Pilon M (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 15932-15945.
- Ainsworth EA y Rogers A (2007). The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell and Environment*, 30, 258-270.
- Alawady AE y Grimm B (2005). Tobacco Mg protoporphyrin IX methyltransferase is involved in inverse activation of Mg porphyrin and protoheme synthesis. *The Plant Journal*, 41, 282-290.
- Aluru MR, Yu F, Fu A y Rodermel S (2006). *Arabidopsis* variegation mutants: New insights into chloroplast biogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1871-1881.
- Anderson JM, Park YI y Chow WS (1997). Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum*, 100, 214-223.
- Anderson LE y Avron M (1976). Light modulation of enzyme activity in chloroplasts. *Plant Physiol.*, 57, 209-213.
- Andrés Z, Pérez-Hormaeche J, Leidi EO, Schlücking K, Steinhorst L, McLachlan DH, Schumacher K, Hetherington AM, Kudla J, Cubero B y Pardo JM (2014). Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, E1806-E1814.
- Ankele E, Heberle-Bors E, Pfosser MF y Hofinger BJ (2005). Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 651-665.
- Aranda-Sicilia MN, Aboukila A, Armbruster U, Cagnac O, Schumann T, Kunz H-H, Jahns P, Rodríguez-Rosales MP, Sze H y Venema K (2016). Envelope K⁺/H⁺ antiporters AtKEA1 and AtKEA2 function in plastid development. *Plant Physiology*, 172, 441.
- Armbruster U, Pesaresi P, Pribil M, Hertle A y Leister D (2011). Update on chloroplast research: New tools, new topics, and new trends. *Molecular Plant*, 4, 1-16.
- Bąba W, Kalaji HM, Kompała-Bąba A y Goltsev V (2016). Acclimatization of photosynthetic apparatus of tor grass (*Brachypodium pinnatum*) during expansion. *PLOS ONE*, 11, e0156201.
- Babiychuk E, Vandepoele K, Wissing J, Garcia-Diaz M, De Rycke R, Akbari H, Joubès J, Beeckman T, Jänsch L, Frentzen M, Van Montagu MCE y Kushnir S (2011). Plastid gene expression and plant development require a plastidic protein of the mitochondrial transcription termination factor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 6674-6679.
- Badami PS, Mallikarjuna N y Moss JP (1997). Interspecific hybridization between *Cicer arietinum* and *C. pinnatifidum*. *Plant Breeding*, 116, 393-395.
- Bae C-H, Abe T, Matsuyama T, Fukunishi N, Nagata N, Nakano T, Kaneko Y, Miyoshi K, Matsushima H y Yoshida S (2001). Regulation of chloroplast gene expression is affected in *ali*, a novel tobacco albino mutant. *Annals of Botany*, 88, 545-553.
- Bae H (2001). Response of plant growth and development to different light conditions in three model plant systems. Oxford. pp. 322.

- Baker NR (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*. Annual Review of Plant Biology, 59, 89-113.
- Balzan S, Johal GS y Carraro N (2014). The role of auxin transporters in monocots development. Frontiers in Plant Science, 5, 393-393.
- Barsan C, Sanchez-Bel P, Rombaldi C, Egea I, Rossignol M, Kuntz M, Zouine M, Latché A, Bouzayen M y Pech J-C (2010). Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. Journal of Experimental Botany, 61, 2413-2431.
- Barton KA, Wozny MR, Mathur N, Jaipargas EA y Mathur J (2018). Chloroplast behaviour and interactions with other organelles in *Arabidopsis thaliana* pavement cells. Journal of Cell Science, 131, jcs202275.
- Bauer J, Hiltbrunner A y Kessler F (2001). Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 58, 420-433.
- Becraft PW (1999). Development of the leaf epidermis, en: Current Topics in Developmental Biology, RA Pedersen, GP Schatten, (eds), Vol 45. Academic Press, pp 1-40.
- Bendich AJ (1987). Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? BioEssays, 6, 279-282.
- Benz J y Rüdiger W (1981). Chlorophyll biosynthesis: various chlorophyllides as exogenous substrates for chlorophyll synthetase. Zeitschrift für Naturforschung C, 36, 51-57.
- Bernal-Bayard P, Hervás M, Cejudo FJ y Navarro JA (2012). Electron transfer pathways and dynamics of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC). Journal of Biological Chemistry, 287, 33865-33872.
- Bilsborough GD, Runions A, Barkoulas M, Jenkins HW, Hasson A, Galinha C, Laufs P, Hay A, Prusinkiewicz P y Tsiantis M (2011). Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 3424-3429.
- Birnbaum KD y Roudier F (2017). Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants. Regeneration (Oxford, England), 4, 15-20.
- Bisalputra T, Downton W y Tregunna E (1969). The distribution and ultrastructure of chloroplasts in leaves differing in photosynthetic carbon metabolism. I. *Wheat, Sorghum, and Aristida (Gramineae)*. Canadian Journal of Botany, 47, 15-21.
- Borek M, Bączek-Kwinta R y Rapacz M (2016). Photosynthetic activity of variegated leaves of *Coleus × hybridus* hort. cultivars characterised by chlorophyll fluorescence techniques. Photosynthetica, 54, 331-339.
- Borland AM, Hartwell J, Weston DJ, Schlauch KA, Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Yang X y Cushman JC (2014). Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. Trends in Plant Science, 19, 327-338.
- Borland AM, Técsi LI, Leegood RC y Walker RP (1998). Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterisation and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. Planta, 205, 342-351.
- Börner T, Aleynikova AY, Zubo YO y Kusnetsov VV (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1847, 761-769
- Byrne M y Taylor WC (1996). Analysis of Mutator-induced mutations in the *thelocyp* gene of maize. Molecular and General Genetics MGG, 252, 216-220.

- Caredda S, Doncoeur C, Devaux P, Sangwan RS y Clément C (2000). Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sexual Plant Reproduction*, 13, 95-104.
- Carmo-Silva E, Scales JC, Madgwick PJ y Parry MAJ (2015). Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource use efficiency. *Plant, Cell and Environment*, 38, 1817-1832.
- Carter R, Woolfenden H, Baillie A, Amsbury S, Carroll S, Healicon E, Sovatzoglou S, Braybrook S, Gray JE, Hobbs J, Morris RJ y Fleming AJ (2017). Stomatal opening involves polar, not radial, stiffening of guard cells. *Current Biology*, 27, 2974-2983.e2972.
- Cassana FF, Falqueto AR, Braga EJ, Peters JA y Bacarin MA (2010). Chlorophyll a fluorescence of sweet potato plants cultivated in vitro and during ex vitro acclimatization. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22, 167-170.
- Casson S y Gray JE (2008). Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, 178, 9-23.
- Castelfranco PA y Beale SI (1981). Chlorophyll biosynthesis, en: *Photosynthesis*. Elsevier, pp 375-421
- Cejudo FJ, Ojeda V, Delgado-Requerey V, González M y Pérez-Ruiz JM (2019). Chloroplast redox regulatory mechanisms in plant adaptation to light and darkness. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Clément C y Pacini E (2001). Anther plastids in *Angiosperms*. *Botanical Review*, 67, 54-73.
- Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin J-M, Knaff DB y Miginiac-Maslow M (2003). The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins new functions and new insights into specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 23747-23752.
- Cortleven A, Leuendorf JE, Brenner WG, Schmülling T, Schaller H y Martin LBB (2017). Analysis of CFB, a cytokinin-responsive gene of *Arabidopsis thaliana* encoding a novel F-box protein regulating sterol biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 68, 2769-2785.
- Cortleven A, Marg I, Yamburenko M, Schlicke H, Hill K, Grimm B, Schaller G y Schmülling T (2016). Cytokinin regulates etioplast-chloroplast transition through activation of chloroplast-related genes. Vol 172.
- Cortleven A y Schmülling T (2015). Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 66, 4999-5013.
- Chao Y, Kang J, Zhang T, Yang Q, Gruber MY y Sun Y (2014). Disruption of the homogentisate solanesyltransferase gene results in albino and dwarf phenotypes and root, trichome and stomata defects in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 9, e94031.
- Chater CC, Caine RS, Fleming AJ y Gray JE (2017). Origins and evolution of stomatal development. *Plant Physiology*, 174, 624-638.
- Chávez Montes RA, Rosas-Cárdenas dFF, De Paoli E, Accerbi M, Rymarquis LA, Mahalingam G, Marsch-Martínez N, Meyers BC, Green PJ y de Folter S (2014). Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. *Nature Communications*, 5, 3722.
- Cheng S, Fu X, Liao Y, Xu X, Zeng L, Tang J, Li J, Lai J y Yang Z (2019). Differential accumulation of specialized metabolite l-theanine in green and albino-induced yellow tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Food Chemistry*, 276, 93-100.
- Choudhury NK y Behera RK (2001). Photoinhibition of Photosynthesis: Role of Carotenoids in Photoprotection of Chloroplast Constituents. *Photosynthetica*, 39, 481-488.

- Christiansen MW y Gregersen PL (2014). Members of the barley NAC transcription factor gene family show differential co-regulation with senescence-associated genes during senescence of flag leaves. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4009-4022.
- Damour G, Simonneau T, Cochard H y Urban L (2010). An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell and Environment*, 33, 1419-1438.
- Dangoor I, Peled-Zehavi H, Wittenberg G y Danon A (2012). A chloroplast light-regulated oxidative sensor for moderate light intensity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24, 1894-1906.
- Darlington CD (1929). Variegation and albinism in *Vicia faba*. *Journal of Genetics*, 21, 161-168.
- Davis PA y Hangarter RP (2012). Chloroplast movement provides photoprotection to plants by redistributing PSII damage within leaves. *Photosynthesis Research*, 112, 153-161.
- Day A y Ellis N (1985). Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. Vol 9, pp 671-678.
- Day A y Goldschmidt-Clermont M (2011). The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 540-553.
- De Luna Valdez LA, Martínez Batallar AG, Hernández Ortiz M, Encarnación-Guevara S, Ramos-Vega M, López-Bucio JS, León P y Guevara-García AA (2014). Proteomic analysis of chloroplast biogenesis (clb) mutants uncovers novel proteins potentially involved in the development of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Journal of Proteomics*, 111, 148-164.
- De Meaux J, Hu JY, Tartler U y Goebel U (2008). Structurally different alleles of the ath miR824 microRNA precursor are maintained at high frequency in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 8994-8999.
- De Pascale S, Ruggiero C, Barbieri G y Maggio A (2003). Physiological responses of pepper to salinity and drought. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 48-54.
- De Santis-Maciossek G, Kofer W, Bock A, Schoch S, Maier RM, Wanner G, Rüdiger W, Koop H-U y Herrmann RG (1999). Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes rpoA, B and C1: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *The Plant Journal*, 18, 477-489.
- Debernardi JM, Lin H, Chuck G, Faris JD y Dubcovsky J (2017). microRNA172 plays a crucial role in wheat spike morphogenesis and grain threshability. *Development*, 144, 1966-1975.
- Derks A, Schaven K y Bruce D (2015). Diverse mechanisms for photoprotection in photosynthesis. Dynamic regulation of photosystem II excitation in response to rapid environmental change. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847, 468-485.
- Djami Tchatchou AT, Sanan Mishra N, Ntushelo K y Dubery IA (2017). Functional roles of micrornas in agronomically important plants-potential as targets for crop improvement and protection. *Frontiers in Plant Science*, 8, 378-378.
- Döring HP, Lin J, Uhrig H y Salamini F (1999). Clonal analysis of the development of the barley (*Hordeum vulgare L.*) leaf using periclinal chlorophyll chimeras. *Planta*, 207, 335-342.
- Drake JE, Power SA, Duursma RA, Medlyn BE, Aspinwall MJ, Choat B, Creek D, Eamus D, Maier C, Pfautsch S, Smith RA, Tjoelker MG y Tissue DT (2017). Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis for four tree species under drought: A comparison of model formulations. *Agricultural and Forest Meteorology*, 247, 454-466.
- Du YY, Liang YR, Wang H, Wang KR, Lu J, Zhang GH, Lin WP, Li M y Fang QY (2006). A study on the chemical composition of albino tea cultivars. Vol 81, pp 809-812.
- Duarte Aké F, Castillo Castro E, Pool FB, Espadas F, Santamaría JM, Robert ML y De-la-Peña C (2016). Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in *Agave angustifolia*

- Haw.* albino variant somaclones during the micropropagation process. *Plant Cell Reports*, 35, 2489-2502.
- Dunford R y Walden RM (1991). Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. *Current Genetics*, 20, 339-347.
- Espineda CE, Linford AS, Devine D y Brusslan JA (1999). The *AtCAO* gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll b synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10507-10511.
- Estévez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jiménez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y y León P (2000). Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124, 95-104.
- Evenari M (1989). The history of research on white-green variegated plants. *Botanical Review*, 55, 106-139.
- Fan P, Wang X, Kuang T y Li Y (2009). An efficient method for the extraction of chloroplast proteins compatible for 2-DE and MS analysis. *ELECTROPHORESIS*, 30, 3024-3033.
- Farber M, Attia Z y Weiss D (2016). Cytokinin activity increases stomatal density and transpiration rate in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 67, 6351-6362.
- Farquharson KL (2012). Polarization of subsidiary cell division in maize stomatal complexes. *The Plant Cell*, 24, 4313-4313.
- Finkemeier I y Leister D (2001). Plant chloroplasts and other plastids. e LS.
- Fitzpatrick LM y Keegstra K (2001). A method for isolating a high yield of *Arabidopsis* chloroplasts capable of efficient import of precursor proteins. *The Plant Journal*, 27, 59-65.
- Gao S, Zhao W, Li X, You Q, Shen X, Guo W, Wang S, Shi G, Liu Z y Jiao Y (2017). Identification and characterization of miRNAs in two closely related C4 and C3 species of *Cleome* by high-throughput sequencing. *Scientific Reports*, 7, 46552.
- García-Alcázar M, Giménez E, Pineda B, Capel C, García-Sogo B, Sánchez S, Yuste-Lisbona FJ, Angosto T, Capel J, Moreno V y Lozano R (2017). Albino T-DNA tomato mutant reveals a key function of *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS1)* in plant development and survival. *Scientific Reports*, 7, 45333.
- Geber MA y Dawson TE (1997). Genetic variation in stomatal and biochemical limitations to photosynthesis in the annual plant, *Polygonum arenastrum*. *Oecologia*, 109, 535-546.
- Geisler M, Nadeau J y Sack FD (2000). Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in *Arabidopsis* are disrupted by the *Too Many Mouths* mutation. *The Plant Cell*, 12, 2075-2086.
- Ghandchi FP, Caetano-Anolles G, Clough SJ y Ort DR (2016). Investigating the control of chlorophyll degradation by genomic correlation mining. *PLOS ONE*, 11, e0162327.
- Glover BJ (2000). Differentiation in plant epidermal cells. *Journal of Experimental Botany*, 51, 497-505.
- Gonzalez N, Vanhaeren H y Inzé D (2012). Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in Plant Science*, 17, 332-340.
- Gould KS, Jay-Allemand C, Logan BA, Baissac Y y Bidel LPR (2018). When are foliar anthocyanins useful to plants? Re-evaluation of the photoprotection hypothesis using *Arabidopsis thaliana* mutants that differ in anthocyanin accumulation. *Environmental and Experimental Botany*, 154, 11-22.

- Gray JE y Hetherington AM (2004). Plant development: YODA the stomatal switch. *Current Biology*, 14, R488-R490.
- Green B y Parson W (2003). Light-harvesting antennas in photosynthesis.
- Grieco M, Tikkanen M, Paakkanen V, Kangasjärvi S y Aro E-M (2012). Steady-state phosphorylation of light-harvesting complex ii proteins preserves photosystem I under fluctuating white light. *Plant Physiology*, 160, 1896-1910.
- Gross SM, Martin JA, Simpson J, Abraham-Juarez MJ, Wang Z y Visel A (2013). *De novo* transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC genomics*, 14, 563-563.
- Grübler B, Merendino L, Twardziok SO, Mininno M, Alloreant G, Chevalier F, Liebers M, Blanvillain R, Mayer KFX, Lerbs-Mache S, Ravel S y Pfannschmidt T (2017). Light and plastid signals regulate different sets of genes in the albino mutant *pap7-1*. *Plant Physiology*, 175, 1203-1219.
- Guarino F, Ciatelli A, Brundu G, Heinze B y Castiglione S (2015). Epigenetic diversity of clonal white poplar (*Populus alba* L.) populations: Could methylation support the success of vegetative reproduction strategy? *PLOS ONE*, 10, e0131480.
- Gunning B, Koenig F y Govindjee PM (2006). A dedication to pioneers of research on chloroplast structure, en: *The Structure and Function of Plastids*. Springer.
- Guo YP, Zhou HF y Zhang LC (2006). Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Scientia Horticulturae*, 108, 260-267.
- Han C-d, Patrie W, Polacco M y H. Coe E (1993). Aberrations in plastid transcripts and deficiency of plastid DNA in striped and albino mutants in maize. Vol 191, pp 552-563.
- Haworth M, Elliott-Kingston C y McElwain JC (2011). Stomatal control as a driver of plant evolution. *Journal of Experimental Botany*, 62, 2419-2423.
- Hepworth C, Caine RS, Harrison EL, Sloan J y Gray JE (2018). Stomatal development: focusing on the grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 41, 1-7.
- Heyduk K, Burrell N, Lalani F y Leebens-Mack J (2016). Gas exchange and leaf anatomy of a C₃-CAM hybrid, *Yucca gloriosa* (*Asparagaceae*). *Journal of Experimental Botany*, 67, 1369-1379.
- Hu D, Li Y, Jin W, Gong H, He Q y Li Y (2017). Identification and characterization of a plastidic adenine nucleotide uniporter (OSBT1-3) required for chloroplast development in the early leaf stage of rice. *Scientific reports*, 7, 41355.
- Hu F, Zhu Y, Wu W, Xie Y y Huang J (2015). Leaf variegation of *Thylakoid Formation1* suppressed by mutations of specific σ -factors in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 168, 1066-1075.
- Huang C, Yu QB, Lv RH, Yin QQ, Chen G-Y, Xu L y Yang ZN (2013). The reduced plastid-encoded polymerase-dependent plastid gene expression leads to the delayed greening of the *Arabidopsis fln2* mutant. *PLOS ONE*, 8, e73092.
- Hung CY, Sun YH, Chen J, Darlington DE, Williams AL, Burkey KO y Xie J (2010). Identification of a Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase homologue, EaZIP, differentially expressed in variegated *Epipremnum aureum* 'Golden Pothos' is achieved through a unique method of comparative study using tissue regenerated plants. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1483-1493.
- Isah T (2019). Changes in the biochemical parameters of albino, hyperhydric and normal green leaves of *Caladium bicolor* cv. "Bleeding hearts" *in vitro* long-term cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 191, 88-98.

- Iwasaki M y Paszkowski J (2014). Epigenetic memory in plants. *The EMBO Journal*, 33, 1987-1998.
- J. Hofinger B, Ankele E, Güllly C, Heberle-Bors E y Pfosser M (2000). The involvement of the plastid genome in albino plant regeneration from microspores in wheat, pp 215-228.
- Jain SM, Brar DS y Ahloowalia B (1998). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Vol 32. Springer.
- Jamieson AP y Willmer CM (1984). Functional stomata in a variegated leaf chimera of *Pelargonium zonale* L. without guard cell chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, 35, 1053-1059.
- Javelle M, Vernoud V, Rogowsky PM y Ingram GC (2011). Epidermis: the formation and functions of a fundamental plant tissue. *New Phytologist*, 189, 17-39.
- Jensen PE y Leister D (2014). Chloroplast evolution, structure and functions. *F1000prime reports*, 6, 40-40.
- Johnson KL, Faulkner C, Jeffree CE y Ingram GC (2008). The phytocalpain defective kernel 1 is a novel *Arabidopsis* growth regulator whose activity is regulated by proteolytic processing. *The Plant Cell*, 20, 2619-2630.
- Joly D y Carpentier R (2011). Rapid isolation of intact chloroplasts from spinach leaves, en: *Photosynthesis Research Protocols*, R Carpentier, ed. Humana Press, Totowa, NJ, pp 321-325.
- Jones LW y Kok B (1966). Photoinhibition of chloroplast reactions. I. Kinetics and action spectra. *Plant Physiology*, 41, 1037-1043.
- Jover-Gil S, Candela H, Robles P, Aguilera V, Barrero JM, Micol JL y Ponce MR (2012). The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal–distal, venation and stomatal patterning in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 53, 1322-1333.
- Kagan ML y Sachs T (1991). Development of immature stomata: Evidence for epigenetic selection of a spacing pattern. *Developmental Biology*, 146, 100-105.
- Kahlau S y Bock R (2008). Plastid transcriptomics and translaticomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: Chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. *The Plant Cell*, 20, 856.
- Kalaji HM, Bąba W, Gediga K, Goltsev V, Samborska IA, Cetner MD, Dimitrova S, Piszcz U, Bielecki K, Karmowska K, Dankov K y Kompała-Bąba A (2018). Chlorophyll fluorescence as a tool for nutrient status identification in rapeseed plants. *Photosynthesis Research*, 136, 329-343.
- Kalaji HM, Oukarroum A, Alexandrov V, Kouzmanova M, Brestic M, Zivcak M, Samborska IA, Cetner MD, Allakhverdiev SI y Goltsev V (2014). Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. *Plant physiology and biochemistry*, 81, 16-25.
- Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M y Datta A (2015). Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 6, 208-208.
- Kaul RB (1977). The role of the multiple epidermis in foliar succulence of peperomia (*Piperaceae*). *Botanical Gazette*, 138, 213-218.
- Keenan TF, Hollinger DY, Bohrer G, Dragoni D, Munger JW, Schmid HP y Richardson AD (2013). Increase in forest water-use efficiency as atmospheric carbon dioxide concentrations rise. *Nature*, 499, 324.
- Kidner CA y Martienssen RA (2004). Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, 428, 81.
- Kinoshita T y Seki M (2014). Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant and Cell Physiology*, 55, 1859-1863.

- Kitada T, Kuryan BG, Tran NNH, Song C, Xue Y, Carey M y Grunstein M (2012). Mechanism for epigenetic variegation of gene expression at yeast telomeric heterochromatin. *Genes and Development*, 26, 2443-2455.
- Knudson L y Lindstrom EW (1919). Influence of sugars on the growth of albino plants. *American Journal of Botany*, 6, 401-405.
- Koskela MM, Brünje A, Ivanauskaite A, Grabsztunowicz M, Lassowskat I, Neumann U, Dinh TV, Sindlinger J, Schwarzer D, Wirtz M, Tyystjärvi E, Finkemeier I y Mulo P (2018). Chloroplast acetyltransferase NSI is required for state transitions in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 30, 1695-1709.
- Kumari M, J. Clarke H, Small I y Siddique K (2009). Albinism in plants: A major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. Vol 28, pp 393-409.
- Kusumi K y Iba K (2014). Establishment of the chloroplast genetic system in rice during early leaf development and at low temperatures. *Frontiers in Plant Science*, 5, 386-386.
- Kutter C, Schöb H, Stadler M, Meins F y Si-Ammour A (2007). MicroRNA-mediated regulation of stomatal development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19, 2417-2429.
- Lai LB, Nadeau JA, Lucas J, Lee E-K, Nakagawa T, Zhao L, Geisler M y Sack FD (2005). The *Arabidopsis* R2R3 MYB proteins *FOUR LIPS* and *MYB88* restrict divisions late in the stomatal cell lineage. *The Plant Cell*, 17, 2754-2767.
- Lake JA, Woodward FI y Quick WP (2002). Long-distance CO₂ signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 183-193.
- Larkin JC, Marks MD, Nadeau J y Sack F (1997). Epidermal cell fate and patterning in leaves. *The Plant Cell*, 9, 1109.
- Larkin P y Scowcroft W (1983). Somaclonal Variation and Crop Improvement, en: *Genetic Engineering of Plants*, T Kosuge, C Meredith, A Hollaender, C Wilson, (eds), Vol 26. Springer US, pp 289-314.
- Larkin PJ y Scowcroft WR (1981). Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60, 197-214.
- Lau OS, Davies KA, Chang J, Adrian J, Rowe MH, Ballenger CE y Bergmann DC (2014). Direct roles of *SPEECHLESS* in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science (New York, N.Y.)*, 345, 1605-1609.
- Lawlor DW (2002). Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, 89 Spec No, 871-885.
- Le J, Liu XG, Yang KZ, Chen XL, Zou JJ, Wang HZ, Wang M, Vanneste S, Morita M, Tasaka M, Ding ZJ, Friml J, Beekman T y Sack F (2014). Auxin transport and activity regulate stomatal patterning and development. *Nature Communications*, 5, 3090.
- Lee E, Lucas JR, Goodrich J y Sack FD (2014a). *Arabidopsis* guard cell integrity involves the epigenetic stabilization of the *FLP* and *FAMA* transcription factor genes. *The Plant Journal*, 78, 566-577.
- Lee HY, Byeon Y, Lee K, Lee H-J y Back K (2014b). Cloning of *Arabidopsis* serotonin N-acetyltransferase and its role with caffeic acid O-methyltransferase in the biosynthesis of melatonin *in vitro* despite their different subcellular localizations. *Journal of Pineal Research*, 57, 418-426.
- Li K, Pang CH, Ding F, Sui N, Feng ZT y Wang BS (2012). Overexpression of Suaeda salsa stroma ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* chloroplasts enhances salt tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 78, 235-245.

- Li L, Aro E-M y Millar AH (2018a). Mechanisms of photodamage and protein turnover in photoinhibition. *Trends in Plant Science*, 23, 667-676.
- Li N, Yang Y, Ye J, Lu J, Zheng X y Liang Y (2016). Effects of sunlight on gene expression and chemical composition of light-sensitive albino tea plant. *Plant Growth Regulation*, 78, 253-262.
- Li Q, Huang J, Liu S, Li J, Yang X, Liu Y y Liu Z (2011). Proteomic analysis of young leaves at three developmental stages in an albino tea cultivar. *Proteome science*, 9, 44-44.
- Li W, Zhang S y Shan L (2007). Responsibility of non-stomatal limitations for the reduction of photosynthesis—response of photosynthesis and antioxidant enzyme characteristics in alfalfa (*Medicago sativa L.*) seedlings to water stress and rehydration. *Frontiers of Agriculture in China*, 1, 255.
- Li X, He Y, Yang J, Jia Y-H y Zeng H-L (2018b). Gene mapping and transcriptome profiling of a practical photo-thermo-sensitive rice male sterile line with seedling-specific green-reversible albino leaf. *Plant Science*, 266, 37-45.
- Lin C-S, Liang CJ, Hsiao HW, Lin MJ y Chang WC (2007). *In vitro* flowering of green and albino *Dendrocalamus latiflorus*. *New Forests*, 34, 177-186.
- Liu NT, Jane WN, Tsay HS, Wu H, Chang WC y Lin CS (2007). Chloroplast genome aberration in micropropagation-derived albino *Bambusa edulis* mutants, ab1 and ab2. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88, 147-156.
- Liu X, Lan J, Huang Y, Cao P, Zhou C, Ren Y, He N, Liu S, Tian Y, Nguyen T, Jiang L y Wan J (2018). WSL5, a pentatricopeptide repeat protein, is essential for chloroplast biogenesis in rice under cold stress. *Journal of Experimental Botany*, 69, 3949-3961.
- Livak KJ y Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402-408.
- Luo L, Zhou WQ, Liu P, Li CX y Hou SW (2012). The development of stomata and other epidermal cells on the rice leaves. *Biologia Plantarum*, 56, 521-527.
- Ma C, Cao J, Li J, Zhou B, Tang J y Miao A (2016a). Phenotypic, histological and proteomic analyses reveal multiple differences associated with chloroplast development in yellow and variegated variants from *Camellia sinensis*. *Scientific reports*, 6, 33369.
- Ma J, Deng M, Lv SY, Yang Q, Jiang QT, Qi PF, Li W, Chen GY, Lan XJ y Wei YM (2016b). Identification of QTLs associated with tissue culture response of mature wheat embryos. *SpringerPlus*, 5, 1552-1552.
- MacAlister CA y Bergmann DC (2011). Sequence and function of basic helix-loop-helix proteins required for stomatal development in *Arabidopsis* are deeply conserved in land plants. *Evolution and Development*, 13, 182-192.
- MacAlister CA, Ohashi-Ito K y Bergmann DC (2006). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, 445, 537.
- Majeran W, Zybaïlov B, Ytterberg AJ, Dunsmore J, Sun Q y van Wijk KJ (2008). Consequences of C4 differentiation for chloroplast membrane proteomes in maize mesophyll and bundle sheath cells. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7, 1609-1638.
- Makowska K y Oleszczuk S (2014). Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Reports*, 33, 385-392
- Males J y Griffiths H (2017). Stomatal biology of CAM plants. *Plant Physiology*, 174, 550-560.
- Maple J y Møller SG (2006). Plastid division: evolution, mechanism and complexity. *Annals of Botany*, 99, 565-579.

- Matin MA, Brown JH y Ferguson H (1989). Leaf Water Potential, Relative Water Content, and Diffusive Resistance as Screening Techniques for Drought Resistance in Barley. *Agronomy Journal*, 81, 100-105.
- Merced A y Renzaglia KS (2016). Patterning of stomata in the moss *Funaria*: a simple way to space guard cells. *Annals of Botany*, 117, 985-994.
- Meyer P (2015). Epigenetic variation and environmental change. *Journal of Experimental Botany*, 66, 3541-3548.
- Meyer Y, Belin C, Delorme Hinoux V, Reichheld JP y Riondet C (2012). Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants and redox signaling*, 17, 1124-1160.
- Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, Francia F, Danon A, Marchand C, Fermani S y Trost P (2013). Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Frontiers in Plant Science*, 4, 470.
- Ming R, VanBuren R, Wai CM, Tang H, Schatz MC, Bowers JE, Lyons E, Wang M-L, Chen J, Biggers E, Zhang J, Huang L, Zhang L, Miao W, Zhang J, Ye Z, Miao C, Lin Z, Wang H, Zhou H, Yim WC, Priest HD, Zheng C, Woodhouse M, Edger PP, Guyot R, Guo H-B, Guo H, Zheng G, Singh R, Sharma A, Min X, Zheng Y, Lee H, Gurtowski J, Sedlazeck FJ, Harkess A, McKain MR, Liao Z, Fang J, Liu J, Zhang X, Zhang Q, Hu W, Qin Y, Wang K, Chen L-Y, Shirley N, Lin Y-R, Liu L-Y, Hernandez AG, Wright CL, Bulone V, Tuskan GA, Heath K, Zee F, Moore PH, Sunkar R, Leebens-Mack JH, Mockler T, Bennetzen JL, Freeling M, Sankoff D, Paterson AH, Zhu X, Yang X, Smith JAC, Cushman JC, Paull RE y Yu Q (2015). The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nature Genetics*, 47, 1435.
- Miura E, Kato Y, Matsushima R, Albrecht V, Laalami S y Sakamoto W (2007). The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in *Arabidopsis* yellow variegated mutants. *The Plant Cell*, 19, 1313.
- Miura E, Kato Y y Sakamoto W (2010). Comparative transcriptome analysis of green/white variegated sectors in *Arabidopsis* yellow variegated2: responses to oxidative and other stresses in white sectors. *Journal of Experimental Botany*, 61, 2433-2445.
- Miyazawa SI, Livingston NJ y Turpin DH (2006). Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*). *Journal of Experimental Botany*, 57, 373-380.
- Mohiuddin AKM, Karim NH, Sultana S y Ferdous Z (2011). Recovery of green plantlets from albino shoot primordia derived from anther culture of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Tropical life sciences research*, 22, 1-12.
- Monja-Mio KM, Pool FB, Herrera GH, EsquedaValle M y Robert ML (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. ‘Bacanora’ plantlets during the in vitro to ex vitro transition process. *Scientia Horticulturae*, 189, 32-40.
- Moualeu-Ngangue DP, Chen T-W y Stützel H (2017). A new method to estimate photosynthetic parameters through net assimilation rate–intercellular space CO₂ concentration (A–C_i) curve and chlorophyll fluorescence measurements. *New Phytologist*, 213, 1543-1554.
- Mouritzen P y Holm PB (1994). chloroplast genome breakdown in microspore cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) occurs primarily during regeneration. *Journal of Plant Physiology*, 144, 586-593.
- Murashige T y Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with *Tobacco* tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

-
- Nelissen H, Gonzalez N y Inzé D (2016). Leaf growth in dicots and monocots: so different yet so alike. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 72-76.
- Noormets A, Sôber A, Pell EJ, Dickson RE, Podila GK, Sôber J, Isebrands JG y Karnosky DF (2001). Stomatal and non-stomatal limitation to photosynthesis in two trembling aspen (*Populus tremuloides Michx.*) clones exposed to elevated CO₂ and/or O₃. *Plant, Cell and Environment*, 24, 327-336.
- Oberhuber W y Bauer H (1991). Photoinhibition of photosynthesis under natural conditions in ivy (*Hedera helix L.*) growing in an understory of deciduous trees. *Planta*, 185, 545-553.
- Ohashi-Ito K y Bergmann DC (2006). *Arabidopsis FAMA* controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *The Plant Cell*, 18, 2493-2505.
- Ohmiya A, Hirashima M, Yagi M, Tanase K y Yamamizo C (2014). Identification of genes associated with chlorophyll accumulation in flower petals. *PLOS ONE*, 9, e113738.
- Omasa K, Konishi A, Tamura H y Hosoi F (2009). 3D confocal laser scanning microscopy for the analysis of chlorophyll fluorescence parameters of chloroplasts in intact leaf tissues. *Plant and Cell Physiology*, 50, 90-105.
- Oster U y Rüdiger W (1997). The G4 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a chlorophyll synthase of etiolated plants. *Botanica Acta*, 110, 420-423.
- Oster U, Tanaka R, Tanaka A y Rüdiger W (2000). Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (*CAO*) from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 21, 305-310.
- Pantin F, Renaud J, Barbier F, Vavasseur A, Le Thiec D, Rose C, Bariac T, Casson S, McLachlan Deirdre H, Hetherington Alistair M, Muller B y Simonneau T (2013). Developmental priming of stomatal sensitivity to Abscisic acid by leaf microclimate. *Current Biology*, 23, 1805-1811.
- Peng Y, Zhang Y, Lv J, Zhang J, Li P, Shi X, Wang Y, Zhang H, He Z y Teng S (2012). Characterization and fine mapping of a novel rice albino mutant low temperature *albino 1*. *Journal of Genetics and Genomics*, 39, 385-396.
- Peterson KM, Rychel AL y Torii KU (2010). Out of the mouths of plants: The molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *The Plant Cell*, 22, 296-306.
- Pierik RLM (1997). *In vitro* culture of higher plants. Springer.
- Pillitteri LJ y Dong J (2013). Stomatal development in *Arabidopsis*. *The arabidopsis book*, 11, e0162-e0162.
- Pillitteri LJ, Guo X y Dong J (2016). Asymmetric cell division in plants: mechanisms of symmetry breaking and cell fate determination. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73, 4213-4229.
- Pillitteri LJ, Peterson KM, Horst RJ y Torii KU (2011). Molecular profiling of stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric cell division and commonalities among stem cell populations in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, 3260-3275.
- Pinnola A y Bassi R (2018). Molecular mechanisms involved in plant photoprotection. *Biochemical Society Transactions*, 46, 467-482.
- Pogson BJ, Ganguly D y Albrecht-Borth V (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847, 1017-1024.
- Pogson BJ, Woo NS, Förster B y Small ID (2008). Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends in Plant Science*, 13, 602-609.
-

- Pulido A y Laufs P (2010). Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1277-1291.
- Pulido P, Spínola MC, Kirchsteiger K, Guinea M, Pascual MB, Sahrawy M, Sandalio LM, Dietz K-J, González M y Cejudo FJ (2010). Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, 61, 4043-4054.
- Qiu Z, Kang S, He L, Zhao J, Zhang S, Hu J, Zeng D, Zhang G, Dong G, Gao Z, Ren D, Chen G, Guo L, Qian Q y Zhu L (2018). The newly identified heat-stress sensitive albino 1 gene affects chloroplast development in rice. *Plant Science*, 267, 168-179.
- Qu X, Peterson KM y Torii KU (2017). Stomatal development in time: the past and the future. *Current Opinion in Genetics and Development*, 45, 1-9.
- R Wang K, Shao S, Lu J y Liang YR (2010). Development of specific RAPD markers for identifying albino tea cultivars '*Qiannianxue*' and '*Xiaoxueya*'. Vol 9.
- Raissig MT, Matos JL, Anleu Gil MX, Kornfeld A, Bettadapur A, Abrash E, Allison HR, Badgley G, Vogel JP, Berry JA y Bergmann DC (2017). Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata. *Science*, 355, 1215-1218
- Ramundo S, Rahire M, Schaad O y Rochaix J-D (2013). Repression of essential chloroplast genes reveals new signaling pathways and regulatory feedback loops in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*, 25, 167.
- Raveh E, Wang N y Nobel PS (1998). Gas exchange and metabolite fluctuations in green and yellow bands of variegated leaves of the monocotyledonous CAM species *Agave americana*. *Physiologia Plantarum*, 103, 99-106.
- Reyes-Prieto A, Weber AP y Bhattacharya D (2007). The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu. Rev. Genet.*, 41, 147-168.
- Rho T, Yu D, Jin Kim S, Chun C y Jae Lee H (2012). Estimation of carboxylation efficiency from net CO₂ assimilation rate as a function of chloroplastic CO₂ concentration in strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. *Maehyang*) leaves. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 52, 1-6.
- Richards CL, Alonso C, Becker C, Bossdorf O, Bucher E, Colomé-Tatché M, Durka W, Engelhardt J, Gaspar B, Gogol-Döring A, Grosse I, van Gurp TP, Heer K, Kronholm I, Lampei C, Latzel V, Mirouze M, Opgenoorth L, Paun O, Prohaska SJ, Rensing SA, Stadler PF, Trucchi E, Ullrich K y Verhoeven KJF (2017). Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. *Ecology Letters*, 20, 1576-1590.
- Rissler HM, Collakova E, DellaPenna D, Whelan J y Pogson BJ (2002). Chlorophyll biosynthesis. Expression of a second chl I gene of magnesium chelatase in *Arabidopsis* supports only limited chlorophyll synthesis. *Plant Physiology*, 128, 770-779.
- Robert ML, Herrera-Herrera JL, Castillo E, Ojeda G y Herrera-Alamillo MA (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species, en: *Plant Cell Culture Protocols*, VM Loyola-Vargas, F Vázquez-Flota, (eds). Humana Press, Totowa, NJ, pp 165-178.
- Rodermel S (2002). *Arabidopsis* variegation mutants. *The arabidopsis book*, 1, e0079-e0079.
- Rodrigues WP, Silva JR, Ferreira LS, Machado Filho JA, Figueiredo FA, Ferraz TM, Bernardo WP, Bezerra LB, de Abreu DP y Cespom L (2018). Stomatal and photochemical limitations of photosynthesis in coffee (*Coffea spp.*) plants subjected to elevated temperatures. *Crop and Pasture Science*, 69, 317-325.

- Rodríguez VM, Velasco P, Garrido JL, Revilla P, Ordás A y Butrón A (2013). Genetic regulation of cold-induced albinism in the maize inbred line *A661*. *Journal of Experimental Botany*, 64, 3657-3667.
- Rosas-Cárdenas F, Durán-Figueroa N, Vielle-Calzada J-P, Cruz-Hernández A, Marsch-Martínez N y de Folter S (2011). A simple and efficient method for isolating small RNAs from different plant species. *Plant Methods*, 7, 4.
- Roy M, Gonneau C, Rocheteau A, Berveiller D, Thomas J-C, Damesin C y Selosse M-A (2013). Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals *in situ*. *Ecological Monographs*, 83, 95-117.
- Rudall PJ, Chen ED y Cullen E (2017). Evolution and development of monocot stomata. *American Journal of Botany*, 104, 1122-1141.
- Rudall PJ y Knowles EVW (2013). Ultrastructure of stomatal development in early-divergent angiosperms reveals contrasting patterning and pre-patterning. *Annals of Botany*, 112, 1031-1043.
- Sachs T y Novoplansky N (1993). The development and patterning of stomata and glands in the epidermis of *Peperomia*. *The New Phytologist*, 123, 567-574.
- Sakamoto W, Miyagishima S-Y y Jarvis P (2008). Chloroplast biogenesis: control of plastid development, protein import, division and inheritance. *The arabidopsis book*, 6, e0110-e0110.
- Santamaría JM, Herrera JL y Robert ML (1995). Stomatal physiology of a micropropagated CAM plant; *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regulation*, 16, 211-214.
- Šantrůček J, Vráblová M, Šimková M, Hronková M, Drtinová M, Květoň J, Vrábl D, Kubásek J, Macková J, Wiesnerová D, Neuwirthová J y Schreiber L (2014). Stomatal and pavement cell density linked to leaf internal CO₂ concentration. *Annals of Botany*, 114, 191-202.
- Sato M, Hosokawa M y Doi M (2011). Somaclonal variation is induced de novo via the tissue culture process: A study quantifying mutated cells in *Saintpaulia*. *PLOS ONE*, 6, e23541.
- Scott P, Lyne RL y ap Rees T (1995). Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*, 197, 435-441.
- Schimper A (1885). Über die entwicklung der chlorophyllkorner und farbkörper. *Bot Zeit*, 1-246.
- Schimper AFW (1883). Über die entwicklung der chlorophyllkorner und farbkörper. *Bot Zeit*, 41, 105-112.
- Schmied J, Hedtke B y Grimm B (2011). Overexpression of HEMA1 encoding glutamyl-tRNA reductase. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1372-1379.
- Schulze J (2007). Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron: a review. *Fruit Veg Cereal Sci Biotechnol*, 1, 64-79.
- Serna L (2009). Cell fate transitions during stomatal development. *BioEssays*, 31, 865-873.
- Serna L (2013). Antagonistic regulation of the meristemoid-to-guard mother-cell-transition. *Frontiers in Plant Science*, 4, 401-401.
- Sganga MW y Bauer CE (1992). Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell*, 68, 945-954.
- Shanmugabalaji V, Chahtane H, Accossato S, Rahire M, Gouzerh G, Lopez-Molina L y Kessler F (2018). Chloroplast biogenesis controlled by *DELLA-TOC159* interaction in early plant development. *Current Biology*, 28, 2616-2623.e2615.

- Shao M, Bai G, Rife TW, Poland J, Lin M, Liu S, Chen H, Kumssa T, Fritz A, Trick H, Li Y y Zhang G (2018). QTL mapping of pre-harvest sprouting resistance in a white wheat cultivar *Danby*. *Theoretical and Applied Genetics*, 131, 1683-1697.
- Sheng P, Tan J, Jin M, Wu F, Zhou K, Ma W, Heng Y, Wang J, Guo X, Zhang X, Cheng Z, Liu L, Wang C, Liu X y Wan J (2014). *Albino midrib 1*, encoding a putative potassium efflux antiporter, affects chloroplast development and drought tolerance in rice. Vol 33.
- Shi K, Gu J, Guo H, Zhao L, Xie Y, Xiong H, Li J, Zhao S, Song X y Liu L (2017). Transcriptome and proteomic analyses reveal multiple differences associated with chloroplast development in the spaceflight-induced wheat albino mutant mta. *PLOS ONE*, 12, e0177992.
- Shin YH, Yang R, Shi YL, Li XM, Fu QY, Lu JL, Ye JH, Wang KR, Ma SC, Zheng XQ y Liang YR (2018). Light-sensitive albino tea plants and their characterization. *HortScience*, 53, 144-147.
- Shmakov NA, Vasiliev GV, Shatskaya NV, Doroshkov AV, Gordeeva EI, Afonnikov DA y Khlestkina EK (2016). Identification of nuclear genes controlling chlorophyll synthesis in barley by RNA-seq. *BMC Plant Biology*, 16, 245.
- Shtein I, Shelef Y, Marom Z, Zelinger E, Schwartz A, Popper ZA, Bar-On B y Harpaz-Saad S (2017). Stomatal cell wall composition: distinctive structural patterns associated with different phylogenetic groups. *Annals of Botany*, 119, 1021-1033.
- Silva H, Sagardia S, Ortiz M, Franck N, Opazo M, Quiroz M, Baginsky C y Tapia C (2014). Relationships between leaf anatomy, morphology, and water use efficiency in *Aloe vera* (*L*) *Burm* f. as a function of water availability. *Revista chilena de historia natural*, 87, 1-10.
- Simmons AR y Bergmann DC (2016). Transcriptional control of cell fate in the stomatal lineage. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, 1-8.
- Skirvin RM, McPheeters KD y Norton M (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience*, 29, 1232-1237.
- Solangi SK, Solangi MK, Qureshi ST, Solangi N, Solangi AH y Qamar M (2018). Estimation of auxins and cytokinins requirements in sugarcane soma clones for effective in vitro regeneration procedure. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 10, 10-18.
- Solís C, de Jiménez ES, Loyola-Vargas VM, Cárabez A y Lotina-Hennsen B (1989). The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C3 and a C4 plant. *Plant and Cell Physiology*, 30, 609-616.
- Sosnowski J, Malinowska E, Jankowski K, Król J y Redzik P (2019). An estimation of the effects of synthetic auxin and cytokinin and the time of their application on some morphological and physiological characteristics of *Medicago x varia T. Martyn*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 66-73.
- Spoehr HA (1942). The culture of albino maize. *Plant Physiology*, 17, 397-410.
- Steward FC, Mapes MO, Kent AE y Holsten RD (1964). Growth and Development of Cultured Plant Cells. *Science*, 143, 20-27.
- Su J, Zhang M, Zhang L, Sun T, Liu Y, Lukowitz W, Xu J y Zhang S (2017). Regulation of stomatal immunity by interdependent functions of a pathogen-responsive MPK3/MPK6 cascade and Abscisic acid. *The Plant Cell*, 29, 526-542.
- Sud RM y Dengler NG (2000). Cell lineage of vein formation in variegated leaves of the C4 grass *Stenotaphrum secundatum*. *Annals of Botany*, 86, 99-112.
- Sugimoto H, Kusumi K, Noguchi K, Yano M, Yoshimura A y Iba K (2007). The rice nuclear gene, *VIRESCENT 2*, is essential for chloroplast development and encodes a novel type of guanylate kinase targeted to plastids and mitochondria. *The Plant Journal*, 52, 512-527.

- Sugimoto H, Kusumi K, Tozawa Y, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S y Iba K (2004). The virescent-2 mutation inhibits translation of plastid transcripts for the plastid genetic system at an early stage of chloroplast differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 45, 985-996.
- Sutimantanapi D, Pater D y Smith LG (2014). Divergent roles for maize PAN1 and PAN2 receptor-like proteins in cytokinesis and cell morphogenesis. *Plant Physiology*, 164, 1905-1917.
- Takamatsu T, Baslam M, Inomata T, Oikawa K, Itoh K, Ohnishi T, Kinoshita T y Mitsui T (2018). Optimized method of extracting rice chloroplast DNA for high-quality plastome resequencing and de novo assembly. *Frontiers in Plant Science*, 9, 266-266.
- Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C y Machida Y (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in Arabidopsis embryos and juvenile plants. *Development*, 128, 4681-4689.
- Tanaka H, Watanabe M, Sasabe M, Hiroe T, Tanaka T, Tsukaya H, Ikezaki M, Machida C y Machida Y (2007). Novel receptor-like kinase ALE2 controls shoot development by specifying epidermis in *Arabidopsis*. *Development*, 134, 1643-1652.
- Tanaka R y Tanaka A (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807, 968-976.
- Tanaka Y, Sasaki N y Ohmiya A (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54, 733-749.
- Tang Y, Wang F, Zhao J, Xie K, Hong Y y Liu Y (2010). Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants. *Plant Physiology*, 153, 632.
- Tao J, Chen SY y Zhang JS (2016). Simple methods for screening and statistical analysis of leaf epidermal cells in dicotyledonous plants. *Bio-protocol*, 6, e1916.
- Timonin AC (1995). Ontogenetic basis for classification of stomatal complexes — a reapprach. *Flora*, 190, 189-195.
- Toivola J, Nikkanen L, Dahlström KM, Salminen TA, Lepistö A, Vignols F y Rintamäki E (2013). Overexpression of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in Arabidopsis enhances leaf growth and elucidates in vivo function of reductase and thioredoxin domains. *Frontiers in Plant Science*, 4, 389.
- Torp AM y Andersen SB (2009). Albinism in microspore culture, en: *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, A Touraev, BP Forster, SM Jain, (eds). Springer Netherlands, Dordrecht, pp 155-160.
- Tregunna EB, Krotkov G y Nelson CD (1964). Further evidence on the effects of light on respiration during photosynthesis. *Canadian Journal of Botany*, 42, 989-997.
- Tricker PJ, Gibbins JG, Rodríguez López CM, Hadley P y Wilkinson MJ (2012). Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *Journal of Experimental Botany*, 63, 3799-3813.
- Tripathy BC y Pattanayak GK (2012). Chlorophyll biosynthesis in higher plants, en: *Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation*, JJ Eaton-Rye, BC Tripathy, TD Sharkey, (eds). Springer Netherlands, Dordrecht, pp 63-94.
- Tsai CC, Wu YJ, Sheue CR, Liao PC, Chen YH, Li SJ, Liu JW, Chang HT, Liu WL, Ko YZ y Chiang YC (2017a). Molecular basis underlying leaf variegation of a moth oochid mutant (*Phalaenopsis aphrodite subsp. formosana*). *Frontiers in Plant Science*, 8.

- Tullberg A, Alexciev K, Pfannschmidt T y Allen JF (2000). photosynthetic electron flow regulates transcription of the *psab* gene in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts through the redox state of the plastoquinone pool. *Plant and Cell Physiology*, 41, 1045-1054.
- Turner M, Adhikari S y Subramanian S (2013). Optimizing stem-loop qPCR assays through multiplexed cDNA synthesis of U6 and miRNAs. *Plant Signaling and Behavior*, 8, e24918.
- Urban L, Aarouf J y Bidel LPR (2017). Assessing the effects of water deficit on photosynthesis using parameters derived from measurements of leaf gas exchange and of chlorophyll a fluorescence. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2068-2068.
- Us Camas R, Castillo Castro E, Aguilar Espinosa M, Limones Briones V, Rivera Madrid R, Robert Díaz ML y De la Peña C (2017). Assessment of molecular and epigenetic changes in the albinism of *Agave angustifolia* Haw. *Plant Science*, 263, 156-167.
- Valkov VT, Scotti N, Kahlau S, MacLean D, Grillo S, Gray JC, Bock R y Cardi T (2009). Genome-wide analysis of plastid gene expression in potato leaf chloroplasts and tuber amyloplasts: Transcriptional and posttranscriptional control. *Plant Physiology*, 150, 2030-2044.
- Valledor L, Pascual J, Meijón M, Escandón M y Cañal MJ (2015). Conserved epigenetic mechanisms could play a key role in regulation of photosynthesis and development-related genes during needle development of *Pinus radiata*. *PLOS ONE*, 10, e0126405.
- Van Campen JC, Yaapar MN, Narawattana S, Lehmeier C, Wanchana S, Thakur V, Chater C, Kelly S, Rolfe SA, Quick WP y Fleming AJ (2016). Combined chlorophyll fluorescence and transcriptomic analysis identifies the P₃/P₄ transition as a key stage in rice leaf photosynthetic development. *Plant Physiology*, 170, 1655-1674.
- Varone L, Ribas-Carbo M, Cardona C, Gallé A, Medrano H, Gratani L y Flexas J (2012). Stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis in seedlings and saplings of Mediterranean species pre-conditioned and aged in nurseries: Different response to water stress. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 235-247.
- Vass I (2012). Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, 209-217.
- Vatén A y Bergmann DC (2012). Mechanisms of stomatal development: An evolutionary view. *EvoDevo*, 3, 11-11.
- Vencill WK, Hatzios KK y Wilson HP (1989). Growth and physiological responses of normal, dwarf, and albino corn (*Zea mays*) to clomazone treatments. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 35, 81-88.
- Von Wettstein D, Gough S y Kannangara CG (1995). Chlorophyll biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 1039.
- Wai CM, VanBuren R, Zhang J, Huang L, Miao W, Edger PP, Yim WC, Priest HD, Meyers BC, Mockler T, Smith JAC, Cushman JC y Ming R (2017). Temporal and spatial transcriptomic and microRNA dynamics of CAM photosynthesis in *Pineapple*. *The Plant Journal*, 92, 19-30.
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC y Zhang S (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19, 63-73.
- Wang J, Lu W, Tong Y y Yang Q (2016a). Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of *Lettuce* (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. *Frontiers in Plant Science*, 7, 250-250.
- Wang J, Wang J, Zhang C, Yan Y, Wu W y Ma Z (2013). Identification of conserved MicroRNAs and their targets in *Phalaenopsis orchid*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60, 845-854.

- Wang R, Zhao J, Jia M, Xu N, Liang S, Shao J, Qi Y, Liu X, An L y Yu F (2018a). Balance between cytosolic and chloroplast translation affects leaf variegation. *Plant Physiology*, 176, 804.
- Wang Y, Zhang J, Shi X, Peng Y, Li P, Lin D, Dong Y y Teng S (2016b). Temperature-sensitive albino gene TCD5, encoding a monooxygenase, affects chloroplast development at low temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 67, 5187-5202.
- Wang Y, Zheng W, Zheng W, Zhu J, Liu Z, Qin J y Li H (2018b). Physiological and transcriptomic analyses of a yellow-green mutant with high photosynthetic efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional and Integrative Genomics*, 18, 175-194.
- Wang Z y Bader M (2018). Associations between shoot-level water relations and photosynthetic responses to water and light in 12 moss species. Vol 10.
- Wangs SW, Li Y, Zhang XL, Yang HQ, Han XF, Liu ZH, Shang ZL, Asano T, Yoshioka Y, Zhang CG y Chen YL (2014). Lacking chloroplasts in guard cells of crumpled leaf attenuates stomatal opening: both guard cell chloroplasts and mesophyll contribute to guard cell ATP levels. *Plant, Cell and Environment*, 37, 2201-2210.
- Warthmann N, Chen H, Ossowski S, Weigel D y Hervé P (2008). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLOS ONE*, 3, e1829.
- Waters MT y Langdale JA (2009). The making of a chloroplast. *The EMBO Journal*, 28, 2861-2873.
- Waters MT, Wang P, Korkaric M, Capper RG, Saunders NJ y Langdale JA (2009). GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21, 1109-1128.
- Wellburn AR (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313.
- Whatley JM (1993). The endosymbiotic origin of chloroplasts, en: *International Review of Cytology*, KW Jeon, J Jarvik, (eds), Vol 144. Academic Press, pp 259-299.
- Williams NH (1979). Subsidiary cells in the *Orchidaceae*: their general distribution with special reference to development in the *Oncidieae*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 78, 41-66.
- Wojnarowicz G, Caredda S, Devaux P, Sangwan R y Clément C (2004). Barley anther culture: Assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. Vol 161, pp 747-755.
- Woolfenden HC, Baillie AL, Gray JE, Hobbs JK, Morris RJ y Fleming AJ (2018). Models and mechanisms of stomatal mechanics. *Trends in Plant Science*, 23, 822-832.
- Wu XM, Liu MY, Xu Q y Guo WW (2011). Identification and characterization of microRNAs from citrus expressed sequence tags. *Tree Genetics and Genomes*, 7, 117-133.
- Xie Z, Lee E, Lucas JR, Morohashi K, Li D, Murray JAH, Sack FD y Grotewold E (2010). Regulation of cell proliferation in the stomatal lineage by the *Arabidopsis* MYB FOUR LIPS via direct targeting of core cell cycle genes. *The Plant Cell*, 22, 2306-2321.
- Xing S, Miao J, Li S, Qin G, Tang S, Li H, Gu H y Qu LJ (2010). Disruption of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (*DXR*) gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in *Arabidopsis*. *Cell Research*, 20, 688.
- Xu JH, Liu Q, Hu W, Wang T, Xue Q y Messing J (2015). Dynamics of chloroplast genomes in green plants. *Genomics*, 106, 221-231.

- Xu M, Chen F, Qi S, Zhang L y Wu S (2018). Loss or duplication of key regulatory genes coincides with environmental adaptation of the stomatal complex in *Nymphaea colorata* and *Kalanchoe laxiflora*. Horticulture research, 5, 42-42.
- Y Du Y, Zhong H, L Wu W, Q Lu X y Liang J (2008). Effect of temperature on accumulation of chlorophylls and leaf ultrastructure of low temperature induced albino tea plant. Vol 7, pp 1881-1885.
- Yang M y Sack FD (1995). The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 7, 2227-2239.
- Yang X, Hu R, Yin H, Jenkins J, Shu S, Tang H, Liu D, Weighill DA, Cheol Yim W, Ha J, Heyduk K, Goodstein DM, Guo H-B, Moseley RC, Fitzek E, Jawdy S, Zhang Z, Xie M, Hartwell J, Grimwood J, Abraham PE, Mewalal R, Beltrán JD, Boxall SF, Dever LV, Palla KJ, Albion R, Garcia T, Mayer JA, Don Lim S, Man Wai C, Peluso P, Van Buren R, De Paoli HC, Borland AM, Guo H, Chen J-G, Muchero W, Yin Y, Jacobson DA, Tschaplinski TJ, Hettich RL, Ming R, Winter K, Leebens-Mack JH, Smith JAC, Cushman JC, Schmutz J y Tuskan GA (2017). The *Kalanchoë* genome provides insights into convergent evolution and building blocks of crassulacean acid metabolism. Nature Communications, 8, 1899.
- Yin T, Pan G, Liu H, Wu J, Li Y, Zhao Z, Fu T y Zhou Y (2011). The chloroplast ribosomal protein L21 gene is essential for plastid development and embryogenesis in *Arabidopsis*. Vol 235, pp 907-921.
- Yu F, Fu A, Aluru M, Park S, Xu Y, Liu H, Liu X, Foudree A, Nambogga M y Rodermel S (2007). Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. Plant, Cell and Environment, 30, 350-365.
- Yu F, Liu X, Alsheikh M, Park S y Rodermel S (2008). Mutations in *SUPPRESSOR OF VARIATION1* a factor required for normal chloroplast translation, suppress *var2* mediated leaf variegation in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 20, 1786.
- Yu Q-B, Huang C y Yang Z-N (2014). Nuclear-encoded factors associated with the chloroplast transcription machinery of higher plants. Frontiers in Plant Science, 5.
- Zakar T, Laczko-Dobos H, Toth TN y Gombos Z (2016). Carotenoids assist in cyanobacterial photosystem ii assembly and function. Frontiers in Plant Science, 7, 295-295.
- Zeiger E (1983). The biology of stomatal guard cells. Annual Review of Plant Physiology, 34, 441-474.
- Zhang JP, Yu Y, Feng YZ, Zhou YF, Zhang F, Yang YW, Lei MQ, Zhang YC y Chen YQ (2017). MiR408 Regulates Grain Yield and Photosynthesis via a Phycocyanin Protein. Plant Physiology, 175, 1175-1185.
- Zhang Q, Tang D, Liu M y Ruan J (2018a). Integrated analyses of the transcriptome and metabolome of the leaves of albino tea cultivars reveal coordinated regulation of the carbon and nitrogen metabolism. Scientia Horticulturae, 231, 272-281.
- Zhang T, Feng P, Li Y, Yu P, Yu G, Sang X, Ling Y, Zeng X, Li Y, Huang J, Zhang T, Zhao F, Wang N, Zhang C, Yang Z, Wu R y He G (2018b). VIRESCENT-ALBINO LEAF 1 regulates leaf colour development and cell division in rice. Journal of Experimental Botany, 69, 4791-4804.
- Zhang Y, Wang P, Shao W, Zhu J-K y Dong J (2015). The BASL polarity protein controls a MAPK signaling feedback loop in asymmetric cell division. Developmental Cell, 33, 136-149.
- Zhang Z, Tan J, Shi Z, Xie Q, Xing Y, Liu C, Chen Q, Zhu H, Wang J, Zhang J y Zhang G (2016). *Albino Leaf1* that encodes the sole octotricopeptide repeat protein is responsible for chloroplast development. Plant Physiology, 171, 1182-1191.

- Zhao P, Wang K, Zhang W, Liu HY, Du LP, Hu HR y Ye XG (2017). Comprehensive analysis of differently expressed genes and proteins in albino and green plantlets from a wheat anther culture. *Biologia Plantarum*, 61, 255-265.
- Zorenc Z, Veberic R, Slatnar A, Koron D, Miosic S, Chen M-H, Haselmair-Gosch C, Halbwirth H y Mikulic-Petkovsek M (2017). A wild 'albino' bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) from *Slovenia* shows three bottlenecks in the anthocyanin pathway and significant differences in the expression of several regulatory genes compared to the common blue berry type. *PLOS ONE*, 12, e0190246.
- Zoulias N, Harrison EL, Casson SA y Gray JE (2018). Molecular control of stomatal development. *Biochemical Journal*, 475, 441-454.
- Zubko M y Day A (2002). Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase, and DNA amplification, within ribosome-deficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants. Vol 267, pp 27-37.
- Zubo YO, Blakley IC, Franco-Zorrilla JM, Yamburenko MV, Solano R, Kieber JJ, Loraine AE y Schaller GE (2018). Coordination of chloroplast development through the action of the GNC and GLK transcription factor families. *Plant Physiology*, 178, 130.
- Zuo Z, Li X, Xu C, Yang J, Zhu X, Liu S, Song F, Liu F y Mao H (2017). Responses of barley Albina and Xantha mutants deficient in magnesium chelatase to soil salinity. *Plant, Soil and Environment*, 63, 348-354.