



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS DIFERENCIAL DE EXPRESIÓN GÉNICA
DE LOS FOTOSISTEMAS I Y II EN CLOROPLASTOS
Y PROPLÁSTIDOS AISLADOS DE PLÁNTULAS *IN*
VITRO VERDES Y ALBINAS DE *AGAVE*
ANGUSTIFOLIA HAW.

Tesis que presenta

LUIS FERNANDO NÚÑEZ BECERRIL

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: **Biotecnología**)

Mérida, Yucatán, México

2024

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Luis Fernando Núñez Becerril** titulado “**Análisis diferencial de expresión génica en fotosistemas I y II en cloroplastos y proplástidos aislados de plántulas *in vitro* verde y albino de *Agave angustifolia* Haw.**” fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de investigación de agrobiotecnología, en el laboratorio de epigenética del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. 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 17 de enero de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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 de Yucatán, 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.

Firma: _____



Luis Fernando Núñez Becerril

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Clelia De la Peña Seaman, y forma parte de los proyectos CONAHCYT CB-2016 285898 y CB-2016 286368.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada, número 812862.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), que me brindó la oportunidad de ser un estudiante en una institución de tan alta reputación.

A mi comité de tutorial y revisión de tesis: a la Dra. Clelia De la Peña Seaman, a la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, al Dr. Rene Garruña Hernández, al Dr. Luis Sáenz Carbonell y a la Dra. Rosa Us Camas, por su invaluable asistencia, atención y retroalimentaciones constructivas.

A la técnica de mi laboratorio, Verónica Limones Briones, por el apoyo en el mantenimiento de las plantas *in vitro* y por siempre tener la disposición de orientarme y escucharme.

A mis compañeros de laboratorio, cuyo apoyo, compañerismo y disposición para compartir conocimientos y experiencias me han nutrido intelectual y emocionalmente.

DEDICATORIAS

A mi familia, que a pesar de la distancia siempre están en mis pensamientos.

A mis padrinos Imelda y Luis, cuyo apoyo ha sido fundamental en mi camino.

A mi querida madre, por su esfuerzo incansable y su amor sin límites. Por brindarme su apoyo incondicional y depositar en mí su confianza inquebrantable. Por ser mi faro en la vida, guiándome en momentos difíciles y celebrando conmigo en momentos de alegría.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Constancia otorgada por la participación en el taller de fundamentos de la microscopia organizado por Mexican Bioimaging Workshops en modalidad virtual, el cual fue impartido el 13 y 14 de octubre del 2022 en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

Constancia otorgada por la participación en las sesiones de cartel del XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica, el cual tuvo lugar el día 16 a 22 de octubre del 2022 en la ciudad de Mérida, Yucatán.

Constancia otorgada por la participación y primer lugar en el Seminario de Estudiantes de la Unidad de Biotecnología, el cual se realizó en la modalidad en línea el día 30 de mayo del 2023 en la plataforma de Bluejeans.

Constancia otorgada por la publicación del artículo de divulgación titulado “Desvelando los secretos de los cloroplastos con ayuda de la bioinformática” en la Revista del Centro de Graduados del Instituto Tecnológico de Mérida el 30 de junio de 2023.

Constancia otorgada por la participación en la actividad de divulgación denominada “Ruta de la Ciencia”, la cual tuvo lugar el día 17 de octubre en Oxkutzcab, Yucatán.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS.....	4
LISTADO DE TABLAS.....	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1. Origen y función de los plástidos en plantas vasculares.....	3
1.2. Biogénesis y desarrollo de los cloroplastos	4
1.3. Plastoma: El genoma de los plástidos	7
1.4. Desarrollo del cloroplasto: Ensamblaje del Fotosistema I (FSI)	8
1.5. Desarrollo del cloroplasto: Ensamblaje del Fotosistema II (FSII)	8
1.6. Agave angustifolia Haw.	9
1.7. JUSTIFICACIÓN	12
1.8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	12
1.9. HIPÓTESIS	12
1.10. OBJETIVO GENERAL.....	12
1.11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13

1.12. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	13
CAPITULO II.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Material vegetal.....	15
2.2 Aislamiento de cloroplastos totales.....	15
2.3. Separación de cloroplastos mediante gradiente de sacarosa	16
2.4. Microscopía y análisis de plástidos.....	17
2.5. Diseño de oligonucleótidos.....	17
2.6. Análisis bioinformático.....	18
2.7. Análisis RT-PCR y RT-qPCR	19
2.7.1. Extracción y verificación del ARN	19
2.7.2. Digestión del ADN genómico y síntesis de ADNc.....	19
2.7.3. RT-qPCR	20
2.8. Análisis estadístico.....	20
CAPITULO III.....	21
RESULTADOS.....	21
3.1. Aislamiento de cloroplastos y proplástidos de plántulas in vitro.....	21
3.2. Separación de cloroplastos y proplástidos indiferenciados	23
3.3 Análisis de dominios conservados.....	26
3.4. Análisis de motivos conservados.....	28
3.5. Análisis de expresión por RT-PCR y RT-qPCR	29

CAPITULO IV	34
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	34
4.1. DISCUSIÓN	34
4.1.1. Estandarización del aislamiento de cloroplastos y proplástidos de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	34
4.1.2. Análisis de RT-PCR y RT-qPCR en genes asociados al ensamblaje de los fotosistemas I y II	35
4.2. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	39
4.2.1. Conclusiones	39
4.2.2. Perspectivas	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Diferenciación desde proplástido.	6
Figura 1.2. Plastoma de <i>Agave angustifolia</i>	11
Figura 1.2. Estrategia experimental.	14
Figura 3.1. Visualización de cloroplastos totales aislados bajo microscopio óptico en campo claro.	22
Figura 3.2. Visualización microscópica de la muestra obtenida del protocolo de aislamiento en muestras de la variedad somaclonal albina.	23
Figura 3.3. Gradiente de sacarosa y muestras de cloroplastos de la variedad somaclonal verde.	24
Figura 3.4. Visualización de cloroplastos en diferentes fases en la variedad somaclonal verde.	25
Figura 3.5. Separación de proplástidos y cloroplastos mediante un gradiente de sacarosa.	26
Figura 3.6. Análisis de los dominios conservados de las proteínas involucradas en el ensamblaje de los fotosistemas I y II.	27
Figura 3.7. Motivos conservados en las secuencias de interés de los fotosistemas.	29
Figura 3.7. Análisis por RT-PCR en gel de agarosa.	30
Figura 3.8. Mapa de calor de la expresión diferencial de los genes analizados en ambas variedades somaclonales.	33

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Oligonucleótidos de genes de interés utilizados para el análisis RT-PCR y RT-qPCR.....	18
Tabla 3.1. Dominios Conservados.	27
Tabla 3.2. Eficiencia estimada de los oligonucleótidos por qRT-PCR.	31

ABREVIATURAS

NEP: Polimerasa codificada por el núcleo.

PEP: Polimerasa codificada por el plástido.

FSI: Fotosistema I

FSII: Fotosistema II

LSC: Copia de Secuencia Larga

SSC: Copia de Secuencia Corta

IR-A: Región invertida A

IR-B: Región invertida B

F1G: Fase 1 Verde

F2G: Fase 2 Verde

F3G: Fase 3 Verde

F4G: Fase 4 Verde

F2A: Fase 2 Albina

F3A: Fase 3 Albina

RESUMEN

Todas las plantas vasculares poseen plástidos en sus células, los cuales son organelos que presentan su propio ADN denominado plastoma. Estos plástidos tienen la capacidad de cambiar su morfología, anatomía y fisiología según las necesidades de la planta. En su etapa temprana los plástidos son conocidos como proplástidos, originándose a partir de tejido meristemático con un diámetro de aproximadamente 0.5 μm .

Esta tesis se centra en el análisis de la expresión diferencial de genes involucrados en el ensamblaje de los fotosistemas I y II en dos variantes somaclonales de *Agave angustifolia* Haw.: una verde y otra albina. Se llevó a cabo el aislamiento de cloroplastos a partir de plántulas cultivadas *in vitro*, seguido de su separación en distintas fases de crecimiento mediante un gradiente de sacarosa. Se seleccionaron genes claves, incluyendo *psaB*, *psaI* y *ycf3* para el fotosistema I y *psbA*, *psbD* y *psbH* para el fotosistema II, para el análisis de expresión génica por RT-qPCR en cloroplastos y proplástidos aislados de ambas variantes.

Se encontró que la expresión de estos 6 genes clave para el ensamblaje de los fotosistemas I y II aumenta durante la maduración de los cloroplastos en la variedad somaclonal verde y en dos fases de crecimiento de proplástidos de la variedad somaclonal albina. Sin embargo, en la variedad somaclonal albina, el gen *ycf3* presentó un patrón de expresión invertido en comparación con la variedad somaclonal verde. Esto sugiere que este gen podría estar vinculado al fenotipo albino de la variedad somaclonal de *A. angustifolia*.

ABSTRACT

All vascular plants possess plastids in their cells, which are organelles that have their own DNA called plastome. These plastids can change their morphology, anatomy, and physiology according to the needs of the plant. In their early stage, plastids are known as proplastids, originating from meristematic tissue and with a diameter of approximately 0.5 μm .

This thesis focuses on the analysis of the differential expression of genes involved in the assembly of photosystems I and II in two somaclonal variants of *Agave angustifolia* Haw.: one green and the other albino. Chloroplast isolation was carried out from *in vitro* cultured seedlings, followed by their separation in different growth phases using a sucrose gradient. Key genes, including *psaB*, *psal*, *psbA*, *psbD*, *psbH* and *ycf3*, were selected for expression analysis by RT-qPCR in chloroplast and proplastid isolated from both variants.

It was found that the expression of 6 keys genes involved in the assembly of photosystems I and II increases during chloroplast maturation in the green somaclonal variety and in two proplastid growth phases of the albino somaclonal variety. However, in the albino somaclonal variety, the *ycf3* gene exhibited an inverted expression pattern compared to the green somaclonal variety. This suggest that this gene may be linked to the albino phenotype of somaclonal variety of *A. angustifolia*.

INTRODUCCIÓN

En todas las plantas, los plástidos conforman una familia de organelos capaces de diferenciarse y especializarse, desempeñando diversas funciones como la síntesis y almacenamiento de metabolitos o macromoléculas (K. Pyke, 2007). La clasificación de los plástidos depende de factores como su ubicación en la planta, resultando en dos categorías principales: plástidos no fotosintéticos, como leucoplastos y cromoplastos, y plástidos fotosintéticos, siendo los cloroplastos los más abundantes en las plantas. Estos últimos tienen la capacidad de transformar la energía lumínica en energía química a través de la fotosíntesis (Stirbet *et al.*, 2020) y pueden originarse a partir de su forma más inmadura, el proplástido, o a partir de una forma transitoria, el etioplasto, que surge en condiciones de oscuridad (Choi *et al.*, 2021). El origen de este organelo se remonta a aproximadamente 1500 millones de años, en un proceso endosimbiótico entre un organismo heterótrofo y una cianobacteria fotótrofa. Esta simbiosis ha dejado rasgos distintivos, como la presencia de ADN propio y una maquinaria transcripcional con características procariotas (Dobrogojski *et al.*, 2020). Además de su papel central en el metabolismo fotosintético y la producción de energía, los cloroplastos desempeñan una función crucial en el desarrollo y crecimiento de las plantas, participando no solo en la fotosíntesis, sino también en la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, ácidos nucleicos o fitohormonas (M. Han *et al.*, 2021; Tripathi *et al.*, 2019).

El diámetro de los plástidos varía dependiendo de su estado de desarrollo y especialización. En los meristemos de plantas vasculares, los proplástidos tienen un diámetro que oscila entre 0.5 y 2 μm , mientras que los cloroplastos completamente maduros pueden alcanzar hasta 7-10 μm , dependiendo de la especie (An *et al.*, 2021; Galina, 2017; K. Pyke, 2007; Staehelin, 2003). La calidad de luz es un factor crucial para el proceso de maduración de los cloroplastos, ya que está asociada al rango de longitudes donde se encuentra un mayor rendimiento fotosintético (Zhen y van Iersel, 2017).

En respuesta a la luz, la polimerasa codificada por el núcleo (NEP) se traslada al plástido, desencadenando la transcripción de la polimerasa codificada por el plástido (PEP). Este evento, induce el ensamblaje de complejos proteicos relacionados con el metabolismo fotosintético, especialmente los fotosistemas I (FSI) y II (FSII) (Jarvis y López-Juez, 2013;

Loudya *et al.*, 2021). La importancia de subunidades específicas para estos fotosistemas se ha destacado en diversos estudios en mutantes (Levey *et al.*, 2014; Nickelsen y Rengstl, 2013; Schöttler *et al.*, 2017), las cuales pueden ser transcritas a partir de genes localizados en el núcleo de la célula y en el plastoma.

A pesar de que la investigación de los cloroplastos o proplástidos aislados puede presentar desafíos inherentes debido a su escala microscópica, se han desarrollado protocolos para el aislamiento de cloroplastos intactos (An *et al.*, 2021; Bhattacharya *et al.*, 2020; Gerwick *et al.*, 1977; Shi *et al.*, 2012), análisis que en su mayoría se enfocan a nivel de proteínas. A partir de este aislamiento total, se ha logrado la separación de diferentes tamaños de cloroplastos mediante un gradiente de sacarosa (Hernández-Castellano, 2020; Takabe *et al.*, 1979), ofreciendo así una alternativa viable para analizar cloroplastos en distintos estadios de desarrollo. Sin embargo, la presencia de cutícula gruesa y el meristemo ensanchado de *A. angustifolia* requieren de la estandarización del método de aislamiento.

En este estudio se realiza la estandarización del aislamiento y separación de cloroplastos y proplastidos en distintas fases de crecimiento, obtenidos de las variedades somaclonales verde y albina de *A. angustifolia*. Esto con el propósito de poder realizar un análisis de RT-qPCR enfocado a genes clave en el ensamblaje del FSI y FSII a lo largo del desarrollo del cloroplasto. Este estudio, es pionero en la comparación de la expresión génica de proplastidos aislados de plantas albinas en diferentes etapas de crecimiento, tiene el potencial para sentar bases para futuras investigaciones relacionadas a la diferenciación de los cloroplastos.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1. ORIGEN Y FUNCIÓN DE LOS PLÁSTIDOS EN PLANTAS VASCULARES

En el interior de las células de todas las plantas vasculares, se encuentran organelos conocidos como plástidos, un término de origen griego, “*plastikos*”, acuñado por Schimper (1882). Este nombre alude a la plasticidad que presentan estos organelos, la cual varía dependiendo de su localización y las condiciones de la planta. Los plástidos desempeñan un papel crítico en el desarrollo y metabolismo de las plantas, siendo esenciales para la fotosíntesis y contribuyendo a las principales vías metabólicas asociadas al crecimiento y desarrollo, como la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, fitohormonas y metabolitos secundarios (M. Han *et al.*, 2021; Tripathi *et al.*, 2019).

El origen de los plástidos probablemente se remonta a un proceso de adaptación endosimbiótico que tuvo lugar hace aproximadamente 1500 millones de años. En este evento, un organismo heterótrofo incorporó a otro con características similares a una cianobacteria fotótrofa (Daniell *et al.*, 2016; Gray, 2017; McFadden, 1999). Como resultado, en las plantas vasculares actuales, los plástidos son organelos semiautónomos que conservan su propio genoma, conocido como plastoma. Estos organelos tienen la capacidad de diferenciarse morfológicamente para realizar funciones específicas. Aunque todos los plástidos se originan a partir del proplástido, su diferenciación no es unidireccional, lo que permite clasificarlos según su función (Fig. 1.1).

Entre los diversos tipos de plástidos, destacan los leucoplastos, amiloplastos y proteinoplastos, encargados del almacenamiento y síntesis de nutrientes; los cromoplastos, involucrados en la floración; y los cloroplastos y etioplastos, responsables de las respuestas a la luz y la fotosíntesis (Biswal *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2021; Yoo *et al.*, 2020). Los proplástidos, a pesar de ser los menos especializados en la familia de los plástidos, desempeñan un papel crucial en las plántulas en crecimiento al dividirse y proliferar. Esto abastece a las células que, con el desarrollo de la planta, estarán disponibles para diferenciarse según la localización y las condiciones ambientales (Choi *et al.*, 2021).

Además, los proplástidos tienen la particularidad de actual como la vía de transmisión del organelo, heredado a través de la línea materna o paterna (K. Pyke, 2007).

1.2. BIOGÉNESIS Y DESARROLLO DE LOS CLOROPLASTOS

Los cloroplastos, fundamentales para la fotosíntesis y con un impacto ecológico global (Stirbet *et al.*, 2020), son prominentes en las células de las plantas vasculares adultas, especialmente en las hojas y estomas, y se caracterizan por contener clorofila, la molécula de su coloración verde (Taiz *et al.*, 2015). En las plantas no se ha documentado la formación de cloroplastos de *novo*; más bien, los plástidos se transmiten a través de los gametos, implicando que los proplástidos proliferen en las células vegetales mediante división. Este fenómeno ocurre comúnmente durante la germinación, cuando la plántula se prepara para la escotomorfogénesis o la fotomorfogénesis, dependiendo de las condiciones de luz (Cackett *et al.*, 2022; K. A. Pyke, 2010; Tripathi *et al.*, 2019). Durante este periodo, los proplástidos comienzan a diferenciarse transitoriamente en etioplastos, careciendo de pigmentos y presentando un cuerpo prelamenar (Choi *et al.*, 2021; Galina, 2017; K. Pyke, 2007). Al ser expuestos a la luz, los etioplastos o proplástidos inician una cascada de señalización que da inicio al proceso conocido como biogénesis del cloroplasto (Hernández-Verdeja *et al.*, 2020).

La cascada de señalización está regulada completamente por la calidad y cantidad de luz que los fotorreceptores perciben a través de diferentes longitudes de onda (Battle *et al.*, 2020; Taiz *et al.*, 2015). Estos fotorreceptores, vinculados a diferentes longitudes de onda, han sido asociados con respuestas a cambios en la luz diurna (Tripathi *et al.*, 2019). Durante el inicio del día, la incidencia predominante es de luz azul (200-400 nm), interactuando con los criptocromos, mientras que al atardecer, la luz roja (600-800 nm) predomina, interactuando con el fitocromo (Taiz *et al.*, 2015). Los fitocromos inactivos (Pr), sintetizados en el citoplasma, al interactuar con la luz roja, se isomerizan a su forma activa (Prf) y se traslocan al núcleo, donde interactúan con factores de transcripción vinculados a la fotomorfogénesis, como HY5 y GLK (Cackett *et al.*, 2022; Taiz *et al.*, 2015).

Al recibir la luz, la biogénesis del cloroplasto inicia a partir del etioplasto o proplástido, donde el cuerpo prelamenar comienza a desarrollarse en el sistema de membranas responsable de la fotosíntesis, denominado tilacoides (Cackett *et al.*, 2022; Choi *et al.*, 2021; Liebers *et al.*, 2017; Pogson *et al.*, 2015; Semenova, 2018, 2022; Tripathi *et al.*, 2019). Asimismo,

con el propósito de proteger el ADN, este se agrupa en estructuras llamadas nucleoides, que se adhieren a los tilacoides (Biswal *et al.*, 2013). A partir de este punto, el cloroplasto comienza la etapa de crecimiento, donde las proteínas codificadas por el plastoma, fundamentales en la fotosíntesis (incluyendo el Fotosistema I (FSI), el Fotosistema II (FSII), el complejo NADH y la ATPasa), proliferan y se distribuyen a lo largo de las membranas de los tilacoides (Taiz *et al.*, 2015). Estas membranas, principalmente compuestas de galactolípidos y otras proteínas, como los complejos antena LHC, necesitan ser importadas del citosol, ya que son codificadas por el ADN del núcleo de la célula (Loudya *et al.*, 2021; Yoo *et al.*, 2020).

En su etapa inicial de crecimiento, el cloroplasto presenta una menor cantidad de tilacoides y clorofila, sin embargo, a medida que avanza su desarrollo, se observa una acumulación progresiva de estos componentes (Loudya *et al.*, 2021). Este incremento en el número de tilacoides conduce a un aumento en las dimensiones del cloroplasto. Al alcanzar su estado de madurez, el cloroplasto puede exhibir dimensiones que oscilan entre 5-10 μm de longitud, un valor que puede variar dependiendo del organismo específico (An *et al.*, 2021; Bhattacharya *et al.*, 2020; Taiz *et al.*, 2015).

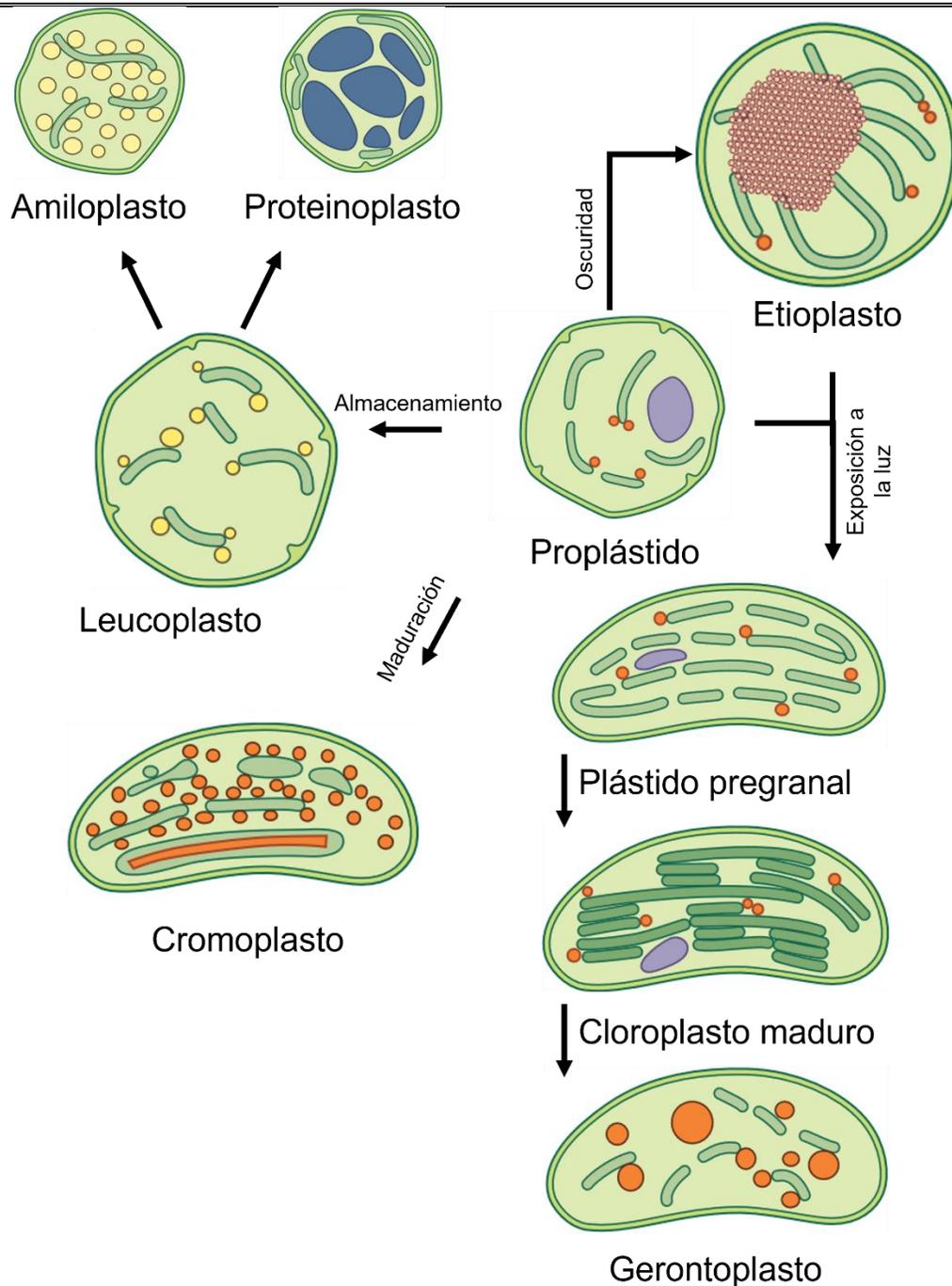


Figura 1.1. Diferenciación desde proplástido. La familia de los organelos denominados plástidos tienen un inicio en el proplástido y responden dependiendo de las necesidades y condiciones a las que se expone la planta. Al recibir oscuridad se puede desarrollar a etioplasto, sin embargo, al exponerse a la luz se revierte para desarrollarse hacia cloroplasto. También pueden diferenciarse en leucoplastos que permiten almacenar

nutrientes, o en cromoplastos los cuales abundan en las flores y frutos. Figura modificada de Buchanan et al. (2015).

1.3. PLASTOMA: EL GENOMA DE LOS PLÁSTIDOS

El genoma del plástido, conocido como plastoma, reside dentro del propio organelo, siendo esencial para procesos como la fotosíntesis, la expresión de genes nucleares y la biogénesis del cloroplasto (Nishimura, 2023). Aunque depende de la expresión génica del núcleo, sigue desempeñando un papel crucial en la función cloroplástica. Usualmente, el plastoma presenta una organización cuatripartita muy conservada, compuesta por la secuencia de copia larga (LSC), la secuencia de copia corta (SSC), la región invertida A (IR-A) y la región invertida B (IR-B) (H. Han *et al.*, 2022). La variabilidad de las secuencias entre los plástidos de una misma célula puede generar heteroplasma durante la división celular, lo que podría contribuir a fenotipos etiolados o parcialmente albinos (Park *et al.*, 2023).

Aunque la regulación de los genes del plastoma pueden ocurrir en etapas posteriores a la transcripción, se ha reportado que el inicio de la biogénesis del cloroplasto está vinculado a la actividad de la polimerasa codificada por el núcleo (NEP), que facilita la transcripción de la polimerasa codificada por el plástido (PEP) (Cahoon *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2020). Sin embargo, la influencia de los genes nucleares sobre la composición del cloroplasto es significativa, ya que alrededor del 98% de las proteínas del cloroplasto deben ser importadas desde el núcleo (Ji *et al.*, 2021; Pogson y Albrecht, 2011)

Se ha observado que NEP suele transcribir genes de PEP (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*) y genes constitutivos (*accD*) (Börner *et al.*, 2015; Yoo *et al.*, 2020). A pesar de que NEP se considera como una respuesta ante la disminución de la actividad de PEP, se ha reportado que NEP puede compensar su función (Börner *et al.*, 2015). Por otro lado, PEP es responsable de transcribir genes de los fotosistemas (*psa* para el FSI y *psb* para el FSII) (Dobrogowski *et al.*, 2020; Yagi y Shiina, 2014). Además, la actividad de PEP se incrementa durante las primeras etapas de crecimiento del cloroplasto (Loudya *et al.*, 2021).

1.4. DESARROLLO DEL CLOROPLASTO: ENSAMBLAJE DEL FOTOSISTEMA I (FSI)

La formación del Fotosistema I (FSI) requiere de la interacción de proteínas transcritas tanto en el núcleo como en el plástido, dando lugar a un complejo proteico que se incorpora en la membrana de los tilacoides, con una mayor concentración en la periferia del cloroplasto, donde incide mayor cantidad de luz (Taiz *et al.*, 2015).

Aunque no se ha logrado una caracterización completa del proceso de ensamblaje, se conoce que este inicia con la expresión de los genes *psaA* y *psaB*, los cuales conforman el heterodímero central del FSI (Schöttler *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015). Posteriormente, los genes *psaC*, *psaD* y *psaE* se transcriben, los cuales están vinculadas a la unión de la ferredoxina (Schöttler *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015). Como paso final, los genes *psaI*, *psaJ*, *PsaF* y *PsaH*, que conforman las proteínas auxiliares con diversas funciones, también conocidas como el complejo intermediario, y se localizan cerca de las proteínas de antena LHCI (Schöttler *et al.*, 2011, 2017). A lo largo de este proceso de ensamblaje del fotosistema, se ha encontrado la importancia de *ycf3* y *ycf4*, ya que su ausencia conduzca a una pérdida significativa de concentración de FSI (Schöttler *et al.*, 2011).

En diversos estudios, se ha observado que la supresión de estos genes puede ser letal. Para los genes *psaA* y *psaB* no hay suficientes reportes de mutantes deletéreas, sin embargo, son dos genes indispensables porque conforman el centro de reacción del FSI, donde se lleva a cabo el transporte de electrones (Yang *et al.*, 2015). En *Nicotiana tabacum* el gen *psaI* se encontró vinculado a la estabilización del ensamblaje durante la reparación del FSI, ya que al encontrarse silenciado y en condiciones de estrés lumínica provoca enanismo en las plantas y una baja concentración de FSI (Schöttler *et al.*, 2017). El gen *psaJ*, se ha reportado que al encontrarse silenciado provoca un fenotipo ligeramente más etiolado y menor presencia de FSI en los cloroplastos (Hansson *et al.*, 2007).

1.5. DESARROLLO DEL CLOROPLASTO: ENSAMBLAJE DEL FOTOSISTEMA II (FSII)

El ensamblaje del FSII implica la interacción de proteínas de origen nuclear y del plastoma. Al igual que el FSI, se encuentra incorporado en la membrana de los tilacoides, encontrándose en una mayor concentración en la parte central de las membranas en donde incide menor cantidad de luz (Taiz *et al.*, 2015).

En el caso del FSII, el centro de reacción forma un homodímero compuesto por las proteínas D1 y D2, codificadas por los genes *psbA* y *psbD*, respectivamente. Esta unión requiere la interacción de la proteína ALB3 con la membrana de los tilacoides (Nickelsen y Rengstl, 2013). Posteriormente, las proteínas CP43 y CP47, codificadas por los genes *psbB* y *psbC*, se acoplan a los lados del centro de reacción, funcionando como punto de anclaje para las proteínas antena LHCII (Nickelsen y Rengstl, 2013).

Dada la importancia del ensamblaje del FSII, se han realizado estudios para conocer los efectos perjudiciales en las plantas con genes silenciados. Específicamente, la supresión completa del gen *psbD* se ha asociado con un fenotipo letal, mientras que un silenciamiento parcial resulta en un fenotipo con enanismo (Fu *et al.*, 2021). Por otro lado, la inhibición del gen *psbH* se ha vinculado a un fenotipo letal, y la introducción del gen a través de transformación nuclear permite la recuperación y reverdecimiento de la planta, sugiriendo que al silenciar *psbH* también disminuyen los niveles de clorofila (Levey *et al.*, 2014).

1.6. AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW.

El género *Agave* incluye plantas monocotiledóneas pertenecientes a la familia *Asparagaceae*, siendo ampliamente distribuido en México, donde más del 80% de las especies son endémicas de este país. Este género posee un gran interés comercial, ya que algunas de sus especies son utilizadas para la producción de bebidas como tequila, mezcal o bacanora, aprovechando el azúcar presente en ellas, así como la fibra, que se utiliza en la industria textil (Monja-Mio *et al.*, 2019).

En particular, *Agave angustifolia* es destacado por su uso en la elaboración de bebidas, generalmente obtenido de su hábitat natural. Su ciclo de vida presenta desafíos en la propagación mediante semillas o esquejes, complicando su cultivo convencional (Monja-Mio *et al.*, 2019). El cultivo *in vitro* resulta una estrategia efectiva para la propagación y aumento de rendimiento agrícola (Gutierrez Caro, 2015; Monja-Mio *et al.*, 2021). Aunque en entornos agrícolas o silvestres algunas especies de *Agave* pueden presentar fenotipos parcialmente amarillos o blancos, el interés principal en estas plantas se centra casi exclusivamente en el mercado ornamental. Hasta la fecha, no hay reportes de especies de este género que presenten un fenotipo albino total en vida silvestre o en cultivos agrícolas.

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), el cultivo *in vitro* se utiliza para diversas especies vegetales, incluida *A. angustifolia*. A lo largo de varias generaciones de cultivo *in vitro*, se generó una variante somaclonal variegada de esta especie, y a partir de esta variante, se obtuvo una variedad somaclonal albina (Duarte-Aké *et al.*, 2016). Esta última presenta un fenotipo completamente blanco, carece de clorofila y presenta cloroplastos subdesarrollados (Hernández-Castellano *et al.*, 2020). A pesar de estas características, la variedad albina puede sobrevivir en condiciones *in vitro* controladas, utilizando los nutrientes del medio de cultivo. Esto la convierte en un excelente modelo de estudio para investigar la biogénesis y desarrollo del cloroplasto. Además, los recientes avances en genómica, como el genoma del plástido publicado (Qin *et al.*, 2021), ofrecen nuevas oportunidades para el estudio y la explotación de estas especies, lo que podría llevar a aplicaciones futuras en el ámbito de la biotecnología vegetal.

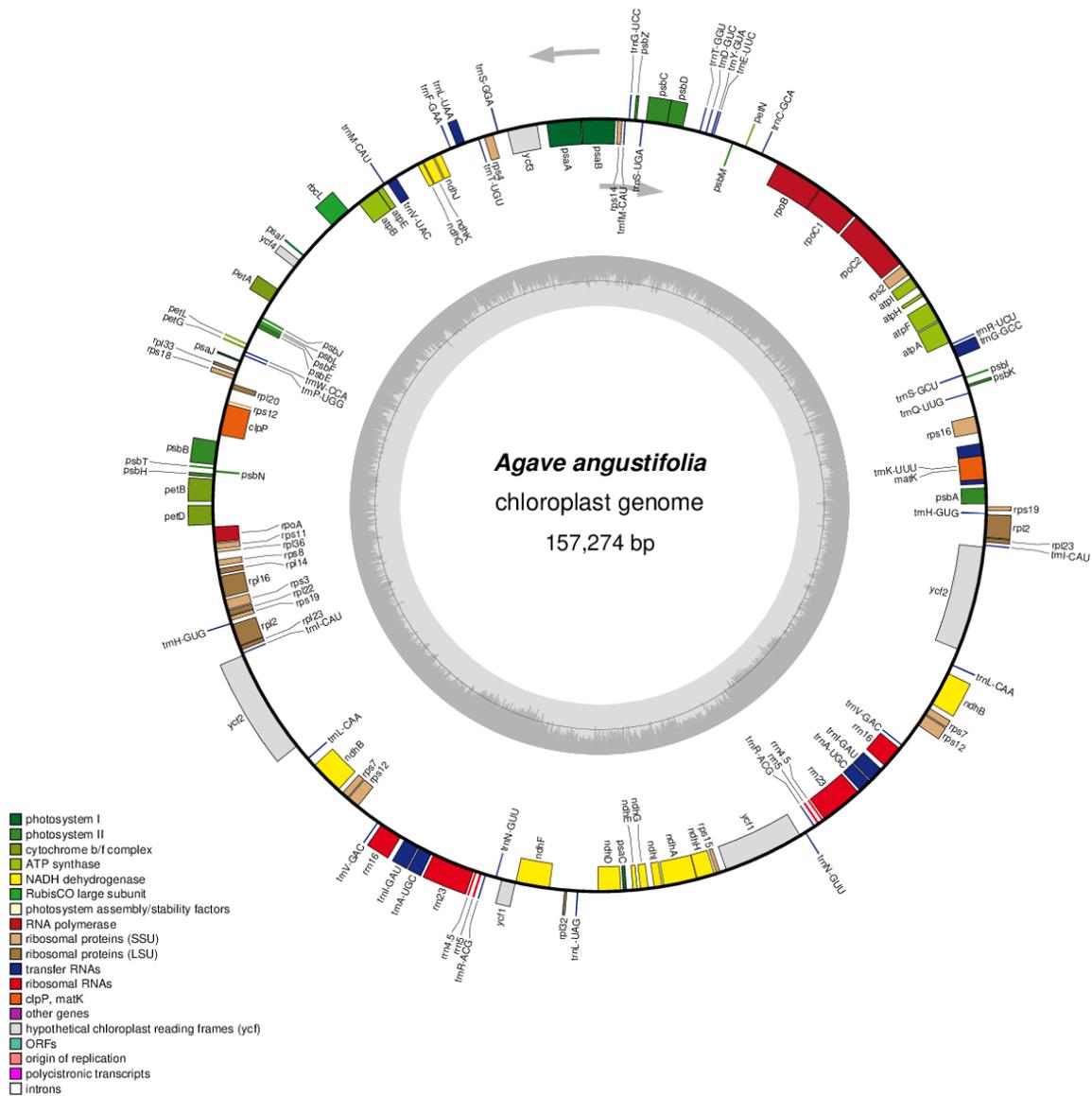


Figura 1.2. Plastoma de *Agave angustifolia*. El ADN del plástido de *Agave angustifolia* presenta una disposición cuatripartita (LSC, SSC, IR-A e IR-B) y una longitud de 157,274 pares de bases. La ilustración se graficó utilizando el software online OGDRAW (Greiner *et al.*, 2019).

1.7. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la expresión génica en las fases de desarrollo de cloroplastos y proplástidos aislados de plántulas *in vitro* de las variedades somaclonales verde y albina de *A. angustifolia* presentan una oportunidad única para revelar las diferencias clave vinculadas a la diferenciación hacia cloroplastos. El análisis detallado de genes clave en el ensamblaje de fotosistemas durante distintas etapas de desarrollo podría revelar mecanismos genéticos específicos que regulan la transición a cloroplastos maduros. Al ser el primer estudio en analizar la expresión génica comparativa en proplástidos aislados de plántulas con fenotipo albino, este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones centradas en comprender a fondo el desarrollo del cloroplasto y su relación con fenotipos carentes de clorofila.

1.8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo varía el nivel de expresión de genes fundamentales para el ensamblaje de los fotosistemas I y II (*psaB*, *psaI*, *psbA*, *psbD*, *psbH*, y *ycf3*) en cloroplastos y proplástidos aislados, separados por fases de crecimiento, en los fenotipos verde y albino de *A. angustifolia*?

1.9. HIPÓTESIS

Si la expresión de genes clave asociados al ensamblaje de los fotosistemas I y II aumenta durante la maduración de los cloroplastos, entonces se espera que la expresión de estos genes se mantenga en niveles bajos en los cloroplastos inmaduros y proplástidos aislados de la variedad somaclonal albina.

1.10. OBJETIVO GENERAL

Determinar las diferencias en la expresión de los genes involucrados en el ensamblaje de los fotosistemas I y II (*psaB*, *psaI*, *psbA*, *psbD*, *psbH*, y *ycf3*) en cloroplastos y proplástidos aislados, separados por fases de crecimiento, de las variedades somaclonales verde (G) y albino (A) de *Agave angustifolia* Haw.

1.11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Obtener un procedimiento eficiente de aislamiento de cloroplastos y proplástidos en diferentes fases de crecimiento, en la variedad somaclonal verde (G) y albina (A) de *A. angustifolia*.
- II. Evaluar la expresión de los genes *psaB*, *psaI*, *psbA*, *psbD*, *psbH*, y *ycf3* en distintas fases de crecimiento de los cloroplastos y proplástidos aislados de la variedad somaclonal verde (G) y albina (A) de *A. angustifolia*.

1.12. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental (Figura 1.2) consistió en llevar a cabo el aislamiento de cloroplastos de las variedades somaclonales (verde y albino), de *A. angustifolia*, siguiendo el protocolo previamente establecido por Hernández-Castellano (2020). El proceso se inicia con el aislamiento de cloroplastos totales a partir de plántulas cultivadas *in vitro* de *A. angustifolia*. Se procesan 30 gr de material vegetal para la variedad somaclonal verde y 60 gr para la variedad somaclonal albina mediante una licuadora de inmersión. Se requiere el doble de material para la planta albina por su escasa cantidad de plástidos. Posteriormente, la muestra se filtra con tela de gasa, y mediante una centrífuga se obtienen los cloroplastos totales. Estos se colocan cuidadosamente sobre un gradiente de sacarosa con cinco diferentes concentraciones (2 M, 1.75 M, 1.5 M, 1.25 M, 1 M).

A través de centrifugación en el gradiente de sacarosa, partiendo de la variedad somaclonal verde se obtienen cuatro diferentes tamaños que representan cuatro diferentes fases de crecimiento de los plástidos. Partiendo de la variedad somaclonal albina, se obtienen dos fases de cloroplastos inmaduros. En total a las seis fases, 4 pertenecientes a la verde y 2 a la albina, se extrae ARN y se sintetiza ADN complementario para poder analizar en RT-PCR y RT-qPCR los genes *psaB*, *psaI*, *ycf3*, *psbA*, *psbD* y *psbH*. Este análisis proporcionará un patrón detallado de expresión génica relacionada con el ensamblaje de los fotosistemas, permitiendo identificar posibles diferencias entre las variedades somaclonales verde y albina en términos de desarrollo de los cloroplastos.

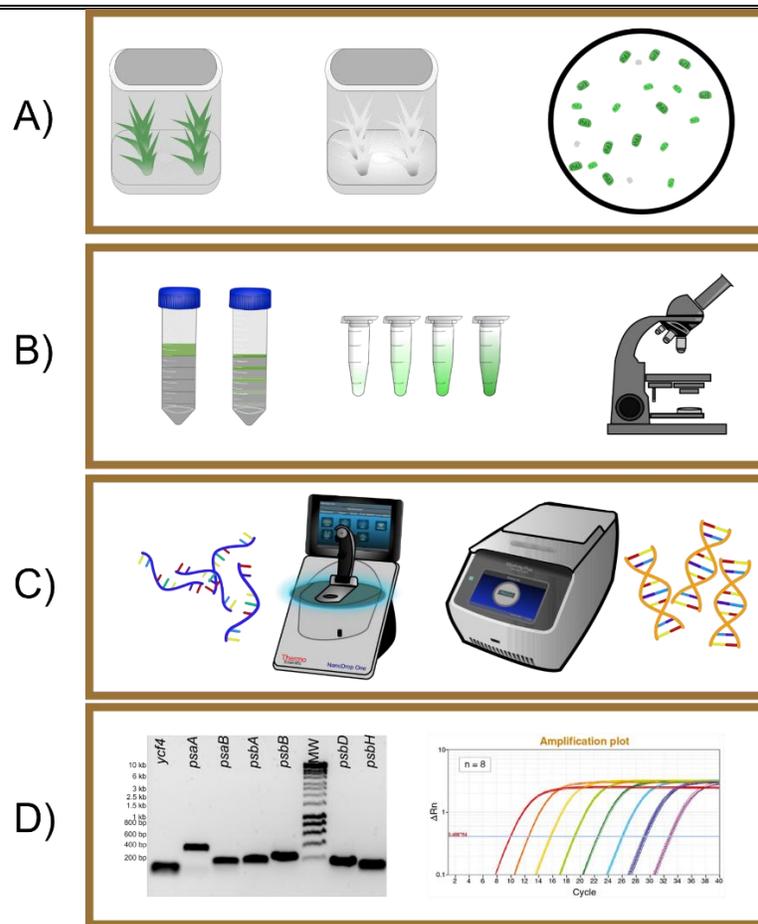


Figura 1.2. Estrategia experimental. A) A partir de dos variedades somaclonales de *A. angustifolia* se obtienen los cloroplastos intactos totales. B) Los cloroplastos totales son separados a través de un gradiente de sacarosa para obtener 4 diferentes tamaños que representan 4 fases diferentes de crecimiento. C) A cada una de las fases de cloroplastos se extrae ARN y se sintetiza ADN complementario. D) El ADN es analizado a través de RT-PCR y RT-qPCR, evaluando los genes *psaB*, *psaI*, *ycf3*, *psbA*, *psbD* y *psbH*.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Las variedades somaclonales verde y albino de *A. angustifolia* Haw., pertenecientes a la colección del laboratorio de epigenética del CICY, fueron cultivadas en medio Murashige & Skoog modificado (MS-B) (Murashige & Skoog, 1962), con una fuente de nitrógeno compuesta por 10 mM de KNO₃ y 5 mM de NH₄NO₃. El medio se complementó con 0.11 µm de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4.43 µm de 6-bencilaminopurina (6-BA), 0.175% de agar, 0.175% de gelrite y 3% de sacarosa (Robert *et al.*, 2005). El cultivo estuvo bajo condiciones de fotoperiodo 12:12 a una intensidad lumínica de 40 µmol/m²s y a 25 ± 2 °C hasta que las plántulas alcanzaron una altura de 3-5 cm en aproximadamente 2 meses. Las plántulas se transfirieron de las magentas a la báscula, pesando 30 g para la variedad somaclonal verde y 60 g para la variedad somaclonal albina.

2.2 AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS TOTALES

El aislamiento de cloroplastos se llevó a cabo mediante el método estandarizado por Hernández-Castellano, (2020), con algunas modificaciones en los amortiguadores y la cantidad de material vegetal. Para la variedad somaclonal verde se utilizaron 30 g de plántulas completas, mientras que para la variedad somaclonal albina se utilizaron 60 g.

Las plántulas disectadas en pequeños segmentos de 1 cm, sumergidas en aproximadamente 15ml de amortiguador de aislamiento (HEPES 100 mM, pH 8, sorbitol 300 mM, ácido ascórbico 5 mM, NaCl 1 M, MgCl₂ 5 mM, EDTA 5 mM, DTT 2 mM, PVP-40 1%, BSA 0.05 %), se sometieron a vacío durante 10 min. Luego, las plántulas se homogeneizaron con una licuadora de inmersión Oster® en pulsos cortos para evitar dañar los cloroplastos y proplástidos. La homogeneización (aprox. 50 ml) se filtró con tela de gasa y se centrifugó a 150 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml y se centrifugó a 3,500 g durante 15 min a 4 °C, precipitando los cloroplastos. Posteriormente, la pastilla conteniendo los cloroplastos se resuspendió, con ayuda de una micropipeta, utilizando el amortiguador de lavado (HEPES 75 mM, pH 7.75, Sorbitol 200 mM, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM, PVP-40 1%, BSA 0.01 %, DTT 2 mM) en sucesivos

lavados y se centrifugó a 3,500 g durante 15 min a 4 °C y se repitió el lavado dos veces más. Finalmente, se resuspendió en 5 ml de tres posibles amortiguadores: para poder visualizar en el microscopio se utilizó el de visualización (MOPS 25 mM, PMSF 1 mM, EDTA 50 mM, pH 7, MgCl₂ 2 mM, DTT 2 mM, glicerol 90%), para realizar extracción de ARN total a la muestra se utilizó el de extracción de ARN (Tris-HCl 100 mM, LiCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%) y para realizar la separación por fases de crecimiento se utilizó el amortiguador de separación (HEPES 30 mM, sorbitol 300 mM, BSA 0.05%).

2.3. SEPARACIÓN DE CLOROPLASTOS MEDIANTE GRADIENTE DE SACAROSA

Se preparó cinco diferentes concentraciones de sacarosa (2 M, 1.75 M, 1.5 M, 1.25 M y 1 M), de cada una se colocaron 5 ml en tubos de 50 ml en orden ascendente, donde la muestra con menor concentración se encontraba en la parte superior del tubo y la más concentrada en la parte inferior del tubo. Sobre el gradiente se añadieron 5 ml de la muestra de cloroplastos totales disueltos en amortiguador de separación. Se utilizó una centrífuga con cabezal de columpio para la separación de las fases a 3,220 g por 50 min a 4 °C.

A través del gradiente, entre cada concentración de sacarosa, se colectaron aproximadamente 4 ml de cada fase separada utilizando una jeringa en tubos de 2 ml. Se añadió un volumen de amortiguador de lavado y se centrifugó a 3,500 g durante 15 min a 4 °C dos veces para reducir la concentración de sacarosa. Después de la segunda centrifugación, los cloroplastos se resuspendieron en 5 ml de tres posibles amortiguadores. Para visualizar la muestra en microscopio se utilizó el amortiguador de visualización (MOPS 25 mM, PMSF 1 mM, EDTA 50 mM, pH 7, MgCl₂ 2 mM, DTT 2 mM, glicerol 90%), para realizar extracción de ARN se utilizó el amortiguador de extracción de ARN (Tris-HCl 100 mM, LiCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%) y para realizar la separación a través del gradiente de sacarosa, se utilizó el amortiguador de separación (HEPES 30 mM, sorbitol 300 mM, BSA 0.05 %).

Las muestras obtenidas de la variedad somaclonal verde se etiquetaron como fase 4 (F4G), que contenía los cloroplastos de mayor tamaño; la fase 3 (F3G), con cloroplastos en proceso de maduración; la fase 2 (F2G), con cloroplastos en crecimiento; y la fase 1 (F1G), con los menos desarrollados y de menor tamaño. Estas etiquetas corresponden a las interfases de las concentraciones de sacarosa (F4G se encuentra entre 1 y 1.25 M; F3G se encuentra entre 1.25 y 1.5 M; F2G se encuentra entre: 1.5 y 1.75 M; F1G se encuentra

entre 1.75 y 2 M). Las muestras obtenidas de la variedad somaclonal albina se etiquetaron como fase 3, que corresponde a los proplástidos aislados de mayor tamaño, y fase 2 a los de menor tamaño.

2.4. MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE PLÁSTIDOS

La visualización microscópica de los cloroplastos se llevó a cabo utilizando un microscopio VE-T2 de Velab™ (CDMX, México) en las muestras de aislamiento total de ambas variedades somaclonales, verde y albina, suspendidas en el amortiguador de visualización. El microscopio cuenta con un adaptador fijado para microscopio y una cámara digital industrial con una resolución de 14 Mp y un sensor a color de tamaño 1/2.3" Aptina Cmos (AMZ Optics, Ningbo, China), lo que permitió la visualización en tiempo real a través de una computadora utilizando el software ImageView proporcionado por el fabricante.

La evaluación del rendimiento de los plástidos se realizó mediante una cámara de Neubauer (BRAND®, Wertheim, Alemania), siguiendo el protocolo de Kubis *et al.* (2008). Las imágenes capturadas con el microscopio se almacenaron en formato TIFF y fueron sometidas a un análisis utilizando el software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Este proceso permitió una evaluación detallada de la morfología y la distribución de los plástidos en las muestras.

2.5. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se seleccionaron genes que codifican para proteínas involucradas en el ensamblaje de los fotosistemas. Para el FSII se seleccionaron las proteínas D1 (*psbA*) y D2 (*psbD*) que conforman el centro de reacción, así como la proteína PsbH (*psbH*), vital para la estabilidad del FSII. Para el FSI, se seleccionaron la apoproteína A2 (*psaB*), encargada de la unión a P700, y las proteínas PsaI (*psaI*) y Ycf3 (*ycf3*), esenciales durante el ensamblaje del FSI.

Los oligonucleótidos para los genes *psaI*, *psbH* y *ycf3* se diseñaron utilizando el plastoma de referencia de *A. angustifolia*, con la accesión NC_059876.1 (Qin *et al.*, 2021). Los oligonucleótidos utilizados para los genes *psaB*, *psbA* y *psbD* fueron los reportados por Hernández-Castellano (2020), siendo localizados dentro del plastoma de referencia (NC_059876.1) mediante el uso del software BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Tabla 2.1. Oligonucleótidos de genes de interés utilizados para el análisis RT-PCR y RT-qPCR.

Gen	Secuencia de oligos (5´- 3´)	Tm (°C)	Tamaño teórico (pb)
<i>psaB</i>	F: TCTTGCTCTAGCCTCTTTAGGG R: CTCATCACCAATACATCGCAG	58 °C	134
<i>psal</i>	F: GAGGTACCCATTCTATGACAG R: GATTGTCTAGATCCGACGGGA	58 °C	136
<i>psbA</i>	F: GATAACCAGCACCGAAAAC R: CCTGTTTCTGGGTCTTTACT	58 °C	156
<i>psbD</i>	F: CCAACTCAAGCCGAAGAGAC R: GATGAGTGCTCTTGGGGTAG	58 °C	151
<i>psbH</i>	F: CCAAGACAAACTACCGTAGGGAAT R: AGCCATTGCGACTCCCATAA	58 °C	105
<i>ycf3</i>	F: ACAGAGATGGGATGTTCGGCTC R: CGCGACCAGAAATTGATCCCT	58 °C	90

2.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La caracterización detallada de las secuencias de los genes *psaB*, *psal*, *psbA*, *psbD*, *psbH* y *ycf3*, fundamentales en el ensamblaje de los fotosistemas I y II, se llevó a cabo mediante un análisis bioinformático. En este proceso, se realizó la búsqueda de dominios conservados utilizando la base de datos InterPro (Paysan-Lafosse *et al.*, 2023) para graficarlos en el software IBS 1.0 (Liu *et al.*, 2015). Adicionalmente, partiendo de las mismas secuencias, se realizó una búsqueda de motivos utilizando el software MEME (Bailey *et al.*, 2015). Los parámetros de la búsqueda de motivos fueron los predeterminados y se incluyó como puntos de referencia las secuencias de las especies *A. angustifolia*, *A. americana*, *A. fourcroydes*, *A. sisalana*, *Amborella trichopoda*, *Anana comosus*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Carica papaya*, *Dendrobium catenatum*, *Elaeis guineensis*, *Medicago truncatula* y *Nicotiana tabacum*.

2.7. ANÁLISIS RT-PCR Y RT-QPCR

2.7.1. Extracción y verificación del ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo en 1ml de cada fase obtenida de cloroplastos posterior a la separación en el gradiente de sacarosa. Se emplearon 500 μ l de la solución TRI Reagent[®] (SigmaAldrich) según las recomendaciones del fabricante. Se mezcló con ayuda de un vortex y se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregaron 100 μ l de 1-bromo-2-cloropropanol a la mezcla y se incubó durante 15 min a 24 °C para posteriormente centrifugar a 12,000 g por 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase que contiene el ARN de cada muestra a un tubo eppendorf y se agregó 500 μ l de isopropanol frío. Las muestras se incubaron durante 15 min en hielo y se centrifugaron a 12,000 g durante 8 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavaron las muestras con 500 μ l de etanol al 75% frío. Las muestras se centrifugaron a 7,500 g durante 5 min a 4 °C, se descartó el etanol y las pastillas, conteniendo el ARN, se dejaron secar por aproximadamente 15 min a temperatura ambiente. El ARN se resuspendió en 30 μ l de agua ultrapura libre de nucleasas y se incubó a 55 °C durante 10 min. La calidad del ARN se confirmó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %, y cuantificación con Nanodrop OneC (ThermoFischer Scientific, Massachussets, EUA).

2.7.2. Digestión del ADN genómico y síntesis de ADNc

Se realizó una digestión de ADN genómico a con el kit TURBO DNA-free Invitrogen (ThermoFischer Scientific, Massachussets, EUA), seguida por una cuantificación. La síntesis de ADNc se efectuó a partir de 300 ng/ μ l de ARN por cada fase de los cloroplastos aislados, usando el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (ThermoFischer Scientific, Massachussets, EUA). La calidad del ADNc se verificó con una PCR punto final, utilizando una concentración de 500 ng/ μ l de ADN por cada fase de cloroplasto, 2.5 μ l de amortiguador DreamTaq (ThermoFischer Scientific, CAT # EP0702), 0.25 μ l de cada oligonucleótido (10 μ M), 0.5 μ l de dNTP (10 μ M), 0.125 de polimerasa DreamTaq, completando a un volumen total 25 μ l con agua ultrapura libre de nucleasas. El programa utilizado en el termociclador MiniAmp Plus (Applied Biosystems, Massachussets, EUA) comenzó con una desnaturalización a 95 °C por 2 min, seguido de 28 ciclos a 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, y para finalizar con una última elongación de 72 °C por

10 min. Posteriormente, 10 μ l de la muestra resultante se transfirió a un gel de agarosa al 2% y se corrió a 90 V para la verificación del peso molecular.

2.7.3. RT-qPCR

Para la RT-qPCR, se partió de una concentración de 500 ng/ μ l por cada fase. La mezcla contenía 0.25 μ l de cada iniciador (5 μ M), 12.5 μ l de PCR SYBR Master Mix (Applied biosystems CAT # 436759) y una concentración de 500 ng/ μ l de ADNc en un volumen final de 25 μ l. El programa utilizado en el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFischer Scientific, Massachussets, EUA) comenzó con una desnaturalización a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95 °C por 30s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, finalizando con una última elongación de 72 °C por 10 min. También se agregó al programa la curva melt con los parámetros predeterminados del software. Se utilizaron 3 réplicas de cada una de las muestras y se descargaron los datos crudos obtenidos del programa StepOne Software (ThermoFischer Scientific, Massachussets, EUA).

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos crudos de las amplificaciones fueron analizados mediante el software LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009). Este proceso permitió cuantificar la eficiencia de cada reacción, y siguiendo las recomendaciones del manual, se aplicó un límite del 5% para determinar la eficiencia de los oligonucleótidos. Posteriormente, durante cada reacción de cada gen, las muestras que exhibieron una eficiencia significativamente diferente fueron descartadas del análisis cuantitativo. Para el análisis estadístico y el gráfico de heatmap, se empleó el paquete nativo de R 4.1.0 (R Core Team, 2021) denominado heatmap.

CAPITULO III**RESULTADOS****3.1. AISLAMIENTO DE CLOROPLASTOS Y PROPLÁSTIDOS DE PLÁNTULAS IN VITRO**

El protocolo de aislamiento de cloroplastos se estandarizó utilizando 30 g de plántulas completas para la variedad somaclonal verde y 60 g para la variedad somaclonal albina. Esto tenía como fin buscar optimizar el rendimiento y facilitar la separación posterior a través del gradiente de sacarosa. En el caso de los cloroplastos aislados de la variedad somaclonal verde (Fig. 3.1 A, B), se estimó un rendimiento aproximado de 18,150 cloroplastos por ml de muestra, evaluado a 40X mediante una cámara de Neubauer. La integridad de la membrana de los cloroplastos y proplástidos de ambas variedades somaclonales se confirmaron a 100X. Es importante destacar que las muestras se procesaron inmediatamente, ya que el almacenamiento a 4°C mostró daños en las membranas de los cloroplastos de la variedad somaclonal verde (Fig. 3.1 C, D). Además, se cuantificó el tamaño de los cloroplastos para la variedad somaclonal verde mediante el área, utilizando el software ImageJ. Los resultados revelaron que los plástidos variaron desde 0.5 μm^2 hasta 11 μm^2 .

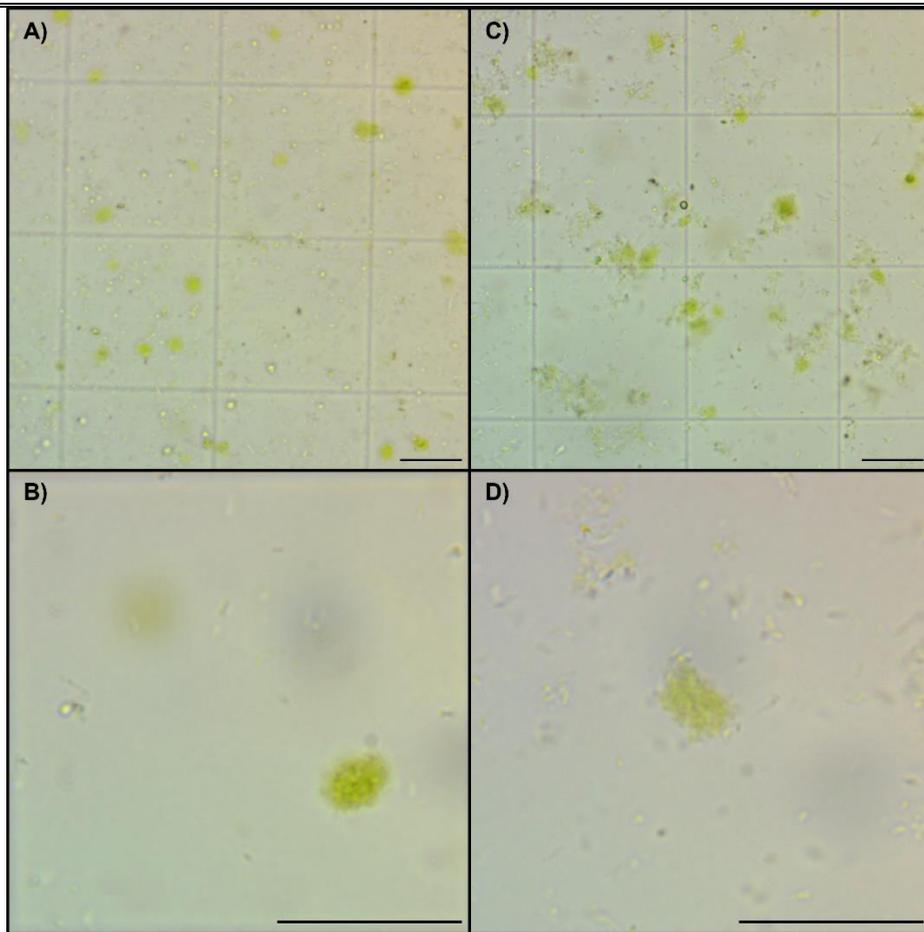


Figura 3.1. Visualización de cloroplastos totales aislados bajo microscopio óptico en campo claro. Imagen de cloroplastos totales antes del almacenamiento a 4°C, capturada en campo claro a 40X (A) y 100X (B). Cloroplastos totales después del almacenamiento a 4°C después de más de 24 horas, visualizados en campo claro a 40X (C) y 100X (D). La barra de escala indica una longitud de 10 µm.

El procedimiento para aislar los proplástidos de la variedad somaclonal albina fue idéntico al empleado para la variedad somaclonal verde, con la diferencia que se partió de 60 g de plántula. Sin embargo, la captura visual de los plástidos resultó desafiante debido a la morfología indiferenciada de los proplástidos y la dificultad en la distinción entre partículas y plástidos (Fig. 3.2). Mediante el análisis con el software ImageJ, se determinó el área de los proplastidos, observados antes de someterse al gradiente de sacarosa, oscilaban entre 0.4 – 5 µm².

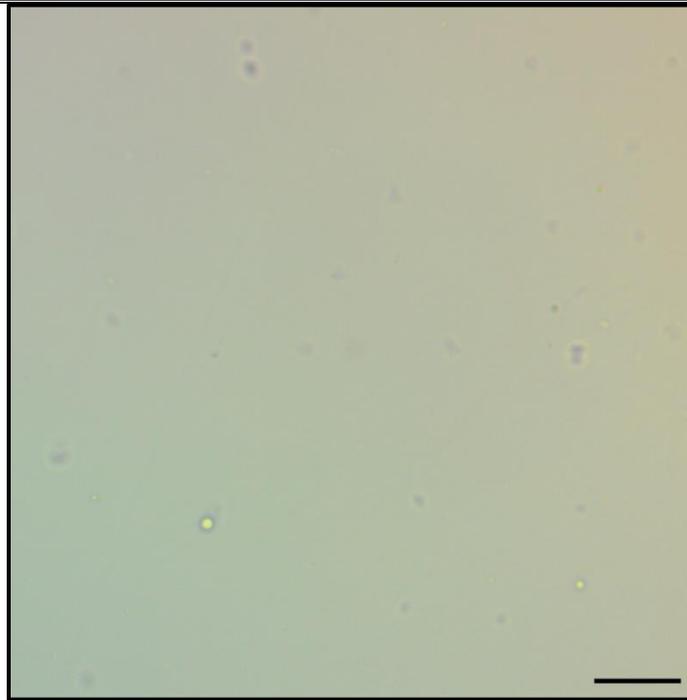


Figura 3.2. Visualización microscópica de la muestra obtenida del protocolo de aislamiento en muestras de la variedad somaclonal albina. Las partículas que se observan, a pesar de carecer de coloración, presentan características similares a los cloroplastos inmaduros aislados en la variedad somaclonal verde. La barra de escala mide 10 μm .

3.2. SEPARACIÓN DE CLOROPLASTOS Y PROPLÁSTIDOS INDIFERENCIADOS

Los plástidos aislados de las variedades somaclonales verde y albina se centrifugaron sobre el gradiente de sacarosa. La centrifugación facilitó la separación de las fases y se extrajeron aproximadamente 3 - 4 ml de cada una, transfiriendo el volumen en dos tubos de 2 ml (Fig. 3.3). En el caso de la variedad somaclonal verde, se obtuvieron 4 fases (Fig. 3.3 C) denominadas: F1G, F2G, F3G, y F4G.

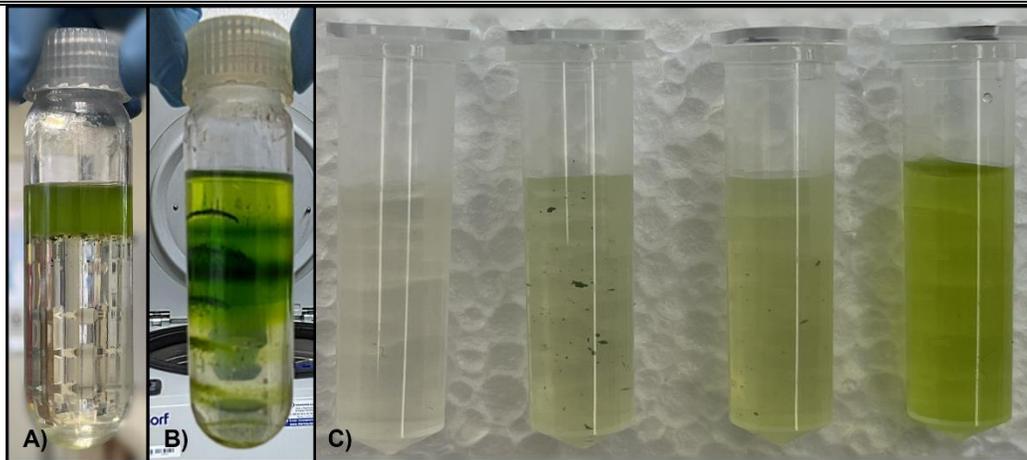


Figura 3.3. Gradiente de sacarosa y muestras de cloroplastos de la variedad somaclonal verde. A) Muestra de cloroplastos puesta sobre el gradiente de sacarosa, con concentraciones de 2 M, 1.75 M, 1.5 M, 1.25 M y 1 M, donde la solución más densa se encuentra en la parte inferior del tubo. B) Separación de la muestra de cloroplastos en fases de crecimiento tras la centrifugación. C) Tubos que contienen las muestras de cloroplastos separados por fases de crecimiento en orden: fase 1 (F1G; 2 M – 1.75 M), fase 2 (F2G; 1.75 M – 1.5 M), fase 3 (F3G; 1.5 M – 1.25 M) y fase 4 (F4G; 1.25 M – 1 M).

Las observaciones que se realizaron en el microscopio relevaron que, en la F1G, los plástidos presentaron la menor área, oscilando entre 0.5 y 2 μm , indicando un estado menos desarrollado. Las características morfológicas de los cloroplastos en las fases F1G y F2G eran muy similares (Fig. 3.4 B, C), diferenciándose principalmente en el área, donde la F1G presentó un rango de 0.5 a 2 μm , mientras que la F2G mostraba un rango de 2 a 4 μm . La F3G mostró un aumento en el área de los cloroplastos en comparación con las dos fases anteriores (4 a 6 μm), además de presentar un menor número de cloroplastos en las imágenes. Por otro lado, la F4G se encontraban los plástidos que presentaron el mayor rango de área, de 6 a 9 μm (Fig. 3.4 D), sugiriendo un estado de desarrollo más avanzado. Una vez recuperadas las fases de cloroplastos, se almacenaron a -80°C , procesándolas lo antes posible para evitar la degradación del ARN plastidial.

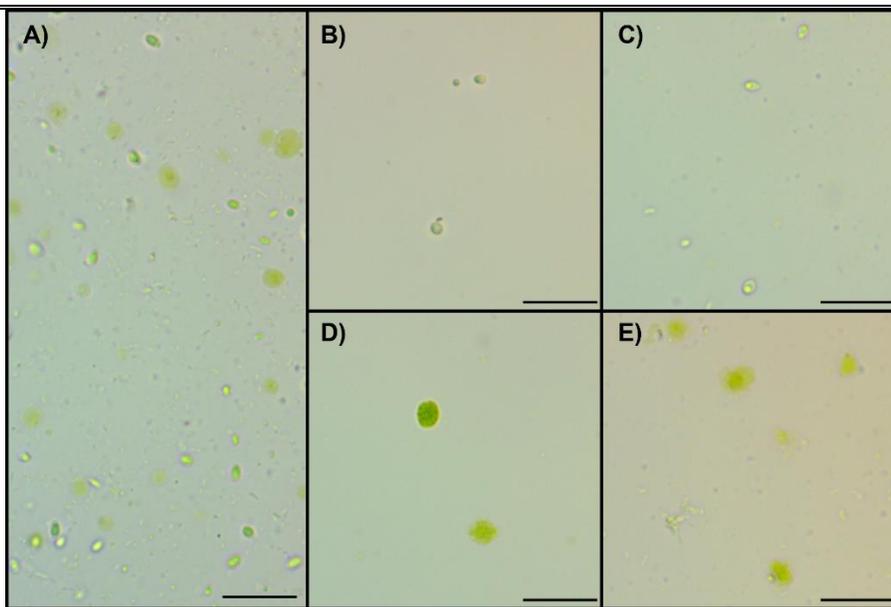


Figura 3.4. Visualización de cloroplastos en diferentes fases en la variedad somaclonal verde. A) Muestra de cloroplastos totales, mostrando un rango de área, desde $1 \mu\text{m}^2$ hasta $9.8 \mu\text{m}^2$, con un 9% presentando un área superior a $8 \mu\text{m}^2$ y el 16% inferior a $2 \mu\text{m}^2$. B) Muestra de cloroplastos de la fase F1G, con un rango de área de 0.4 a $2 \mu\text{m}^2$. C) Muestra de cloroplastos de la fase F2G, con un rango de área de 2 a $4 \mu\text{m}^2$. D) Muestra de cloroplastos de la fase F3G, con un rango de área de 5 a $7 \mu\text{m}^2$. E) Muestra de cloroplastos de la fase F4G, con un rango de área de 5 a $8 \mu\text{m}^2$. La barra de escala tiene una longitud de $10 \mu\text{m}$.

Para el proceso de separación de proplastidos en la variedad somaclonal albina, también se colocaron 5 ml por encima del gradiente de sacarosa, utilizando las mismas concentraciones mencionadas anteriormente para la variedad verde (2 M , 1.75 M , 1.5 M , 1.25 M , y 1 M) (Fig. 3.5B). Las interfases de $1.25 - 1 \text{ M}$ (fase 4) y $2 - 1.75 \text{ M}$ (fase 1) (Fig. 3.5A), no revelaron la presencia de proplástidos ni cloroplastos aislados en la variedad somaclonal albina. En cambio, las interfases de $1.5 - 1.25 \text{ M}$ (fase 3) y $1.75 - 1.5 \text{ M}$ (fase 2) mostraron dos fases, las cuales se denominaron F3A y F2A, respectivamente.

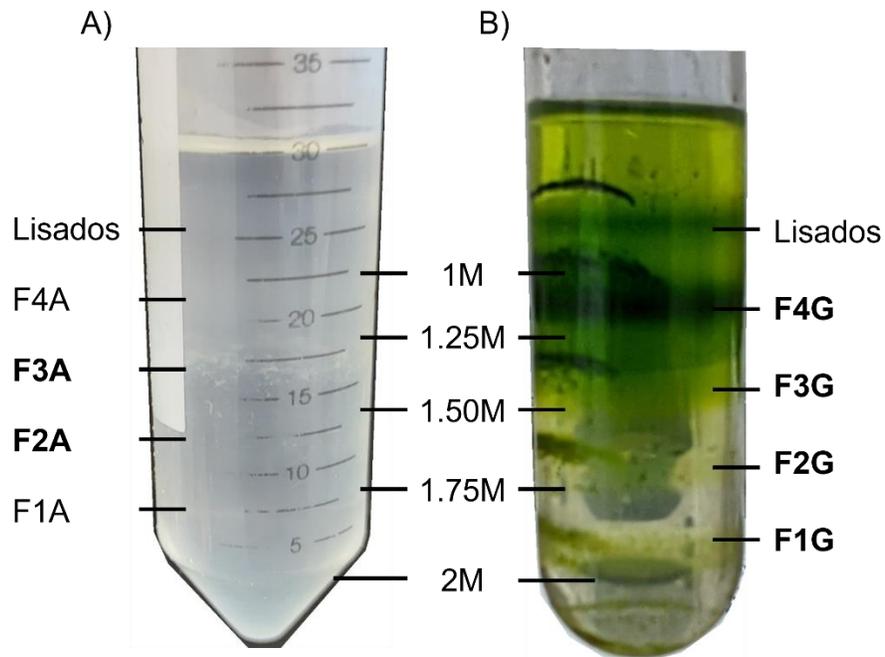


Figura 3.5. Separación de proplástidos y cloroplastos mediante un gradiente de sacarosa. A) Proplástidos de la variedad somaclonal albina separados a través del gradiente de sacarosa, destacando la presencia de los proplástidos en las fases F3A y F2A, ya que las fases F4A y F1A no presentaron proplástidos. B) Cloroplastos de la variedad somaclonal verde separados mediante el gradiente de sacarosa, mostrando las cuatro distintivas fases (F1G, F2G, F3G y F4G).

3.3 ANÁLISIS DE DOMINIOS CONSERVADOS

La identificación de dominios conservados en las secuencias de los genes *psaB*, *psaI*, *psbA*, *psbD*, *psbH* y *ycf3*, localizadas en el plastoma de referencia (NC_059876.1) y traducidas a aminoácidos, se llevó a cabo mediante InterProScan. Este análisis reveló la presencia de proteínas funcionales para todos los genes, las cuales mostraron una conservación a lo largo de toda la secuencia (Fig. 3.6).

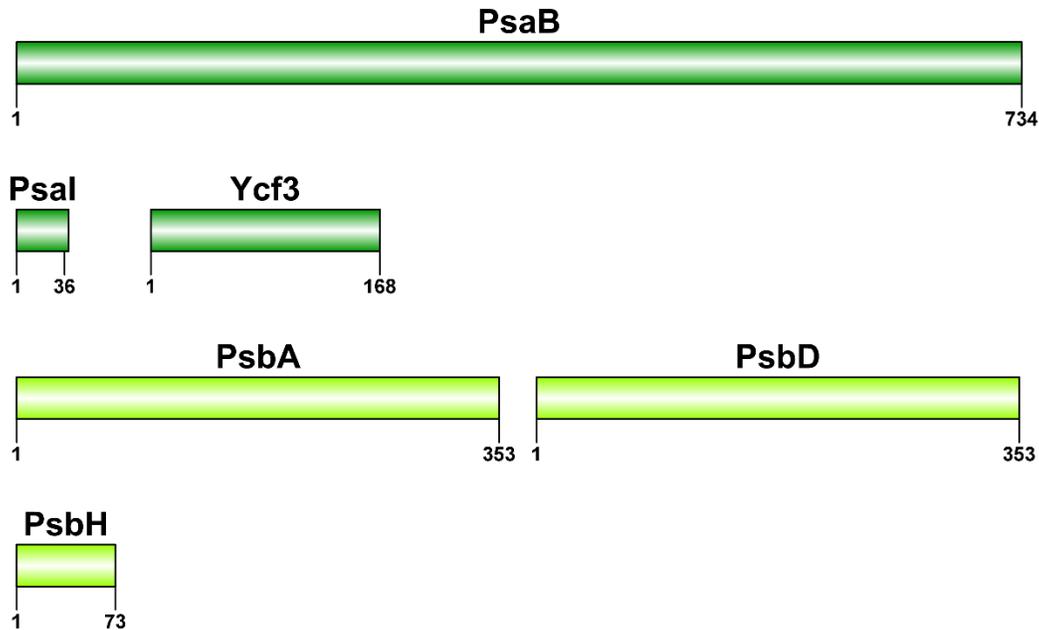


Figura 3.6. Análisis de los dominios conservados de las proteínas involucradas en el ensamblaje de los fotosistemas I y II. Dominios funcionales vinculados al ensamblaje del FSI (A) y del FSII (B). Las secuencias seleccionadas para el análisis fueron traducidas en aminoácidos y se identificaron utilizando la base de datos InterPro.

Posteriormente, se clasificaron las proteínas por su superfamilia proteica (Tabla 3.1). Se determinó las familias para diferentes proteínas: la proteína PsaB pertenece a la familia IPR001280 además de la subfamilia IPR006244; PsaI a la familia IPR001302; Ycf3 a la familia IPR02281; PsbA pertenece a la superfamilia IPR000484, con la subfamilia IPR005867; PsbD pertenece a la superfamilia IPR000484, con la familia IPR005868; y PsbH pertenece a la familia IPR001056.

Tabla 3.1. Dominios Conservados. Lista de las proteínas identificadas en la búsqueda con su respectiva entrada de InterPro.

Proteína	Fotosistema	Superfamilia	Entrada InterPro
PsaB	FSI	Fotosistema I PsaA/PsaB	IPR006244
Psal	FSI	Subunidad VIII del CR	IPR001302
Ycf3	FSI	Proteína de Ensamblaje Ycf3	IPR022818
PsbA	FSII	Proteína D1	IPR005867
PsbD	FSII	Proteína D2	IPR005868
PsbH	FSII	Proteína H del CR	IPR001056

3.4. ANÁLISIS DE MOTIVOS CONSERVADOS

Los motivos obtenidos a través de la búsqueda en MEME de las 13 especies utilizadas demostraron una conservación significativa (Fig. 3.7) respaldado por un valor P igual a cero para la mayoría de las especies, como las pertenecientes al género de *Agave*.

Las principales diferencias se encontraron para el gen *psal* en las especies *C. papaya* y *M. truncatula*, presentando un motivo inicial diferente a las demás especies.

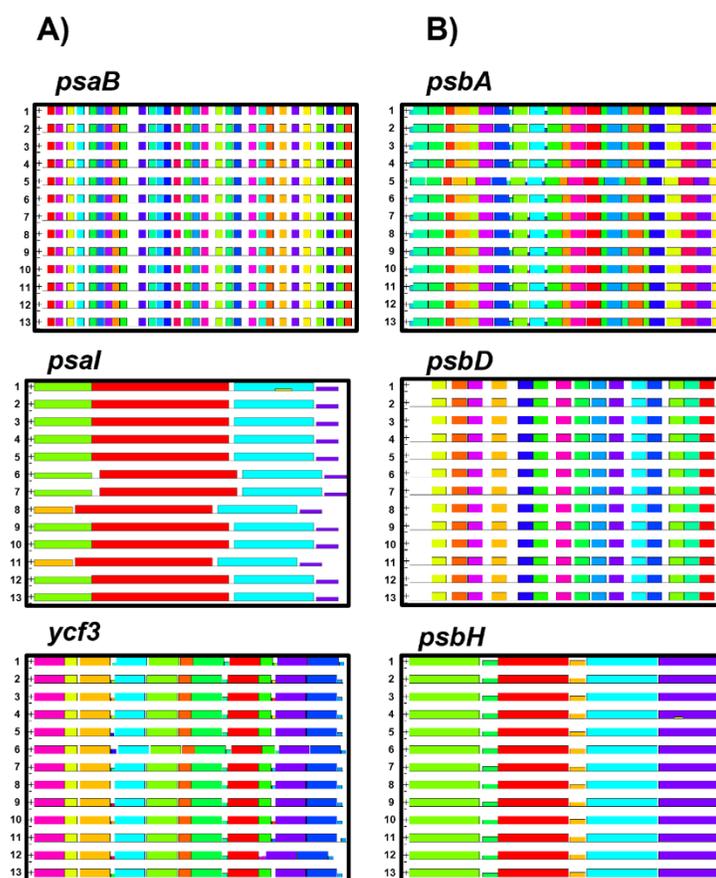


Figura 3.7. Motivos conservados en las secuencias de interés de los fotosistemas.

Utilizando el software MEME, se utilizaron secuencias de 15 especies diferentes, buscando un máximo de hasta 20 motivos. A) Genes vinculados al ensamblaje del FSI. B) Genes vinculados al ensamblaje del FSII. Para la mayoría de los genes se encontró una conservación significativa respaldado con un valor P igual a 0 en la mayoría de los casos. Las especies se encuentran enumeradas del 1 al 13 ordenados de la siguiente forma: 1) *A. angustifolia*, 2) *A. americana*, 3) *A. fourcroydes*, 4) *A. sisalana*, 5) *Amborella trichopoda*, 6) *Anana comosus*, 7) *Arabidopsis thaliana*, 8) *Brassica napus*, 9) *Carica papaya*, 10) *Dendrobium catenatum*, 11) *Elaeis guineensis*, 12) *Medicago truncatula* y 13) *Nicotiana tabacum*.

3.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR RT-PCR Y RT-QPCR

El análisis de expresión de las diferentes muestras se realizó por PCR punto final y por PCR cuantitativo (Figs. 3.7 y 3.8). El análisis en RT-PCR se llevó a cabo en las cuatro fases de crecimiento de los cloroplastos de la variedad somaclonal verde (F1G, F2G, F3G, F4G), utilizando una concentración de ARN de 500 ng/μl para cada fase. Las amplificaciones de RT-PCR (Fig. 3.7A) revelaron un patrón donde las dos primeras fases (F1G y F2G) existe nula o mínima expresión, aumentando en las dos últimas fases (F3G y F4G). En relación con los genes asociados al ensamblaje del FSI, se observó una expresión similar entre *psaI* y *ycf3*, mientras que *psaB* presentó una mayor expresión en la F4G. Por otro lado, para el centro de reacción del FSII (*psbA* y *psbD*), presentó una expresión muy similar, mientras que *psbH*, una proteína auxiliar, presentó expresión ascendente desde la F1G hasta la F4G, siendo en esta la banda más pronunciada. Por otro lado, en las dos fases de la variedad somaclonal albina (F2A y F3A), partiendo igualmente de 500 ng/μl de ARN, se encontró que, para todos los genes, excepto *ycf3*, la expresión para F3A fue mayor. En la F2A se encontró que los genes *psbD*, *psbH* y *ycf3* presentaban un nivel de expresión muy inferior.

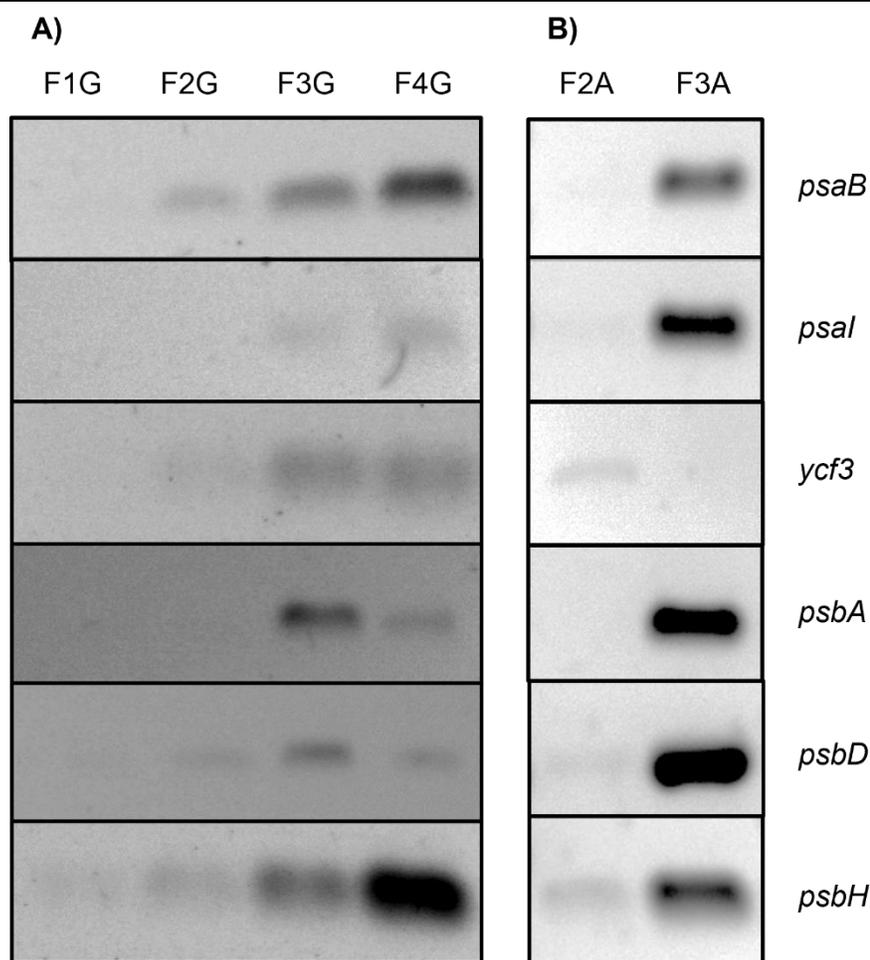


Figura 3.7. Análisis por RT-PCR en gel de agarosa. A) Amplificación de las fases F1G, F2G, F3G y F4G de la variedad somaclonal verde para los genes evaluados, mostrando la mayor expresión en las dos últimas fases. B) Amplificación de las fases F2A y F3A de la variedad somaclonal albina.

Para el análisis por RT-qPCR, se determinó la eficiencia de cada oligonucleótido (Tabla 3.2.) y se verificó la especificidad de las amplificaciones mediante pruebas Melt. Los datos crudos obtenidos de las amplificaciones por RT-qPCR fueron extraídos y analizados utilizando LinRegPCR, lo que permitió descartar réplicas con una eficiencia de amplificación inferior a 1.90, la mayoría oscilando entre 1.90 y 1.93.

Las amplificaciones de las diferentes fases y genes fueron establecidas con un umbral de 0.2 en todos los casos. La elección de un gen constitutivo adecuado resultó desafiante, dada la naturaleza de los genes provenientes del plastoma. La mayoría de los genes

constitutivos conocidos como el 18S, la tubulina y la actina, tienen origen nuclear, mientras que los genes constitutivos conocidos del plastoma, como los genes ribosomales y de la PEP, presentaron niveles de expresión variables en cada fase de crecimiento, dificultando la normalización.

Tabla 3.2. Eficiencia estimada de los oligonucleótidos por qRT-PCR.

Gen	Eficiencia	Desviación estándar
<i>psaB</i>	1.91	0.022
<i>psal</i>	1.92	0.02
<i>ycf3</i>	1.91	0.01
<i>psbA</i>	1.92	0.01
<i>psbD</i>	1.9	0.004
<i>psbH</i>	1.9	0.008

Las amplificaciones de los genes por RT-qPCR se obtuvieron en valores de umbral de ciclo (C_t) (Fig. 3.8), donde los valores mayores a 35 indicaron ausencia de expresión. En el caso de la variedad somaclonal verde (Fig. 3.8 A), con respecto a los genes asociados al FSI, se observó que para el gen *psaB* mostró una baja expresión en la primera fase de crecimiento (F1G), aumentando progresivamente hasta alcanzar su punto máximo en la fase de mayor crecimiento (F4G). Para *psal*, se encontró un incremento en la expresión en las tres primeras fases, seguido de una disminución en la última fase, aproximándose a niveles similares a la F2G. El gen *ycf3*, por otro lado, presentó una expresión significativamente baja en las dos primeras fases, alcanzó su punto máximo en la tercera fase, y mostró una expresión más elevada en la cuarta fase en comparación con las dos primeras, pero menor que la tercera. En cuanto a los genes asociados al FSII, *psbA* y *psbH* presentaron un patrón de expresión similar a *psaB*, con un aumento constante hasta la última fase. Por otro lado, *psbD* mostró su máxima expresión en F3G y la mínima en F2G, mientras que F1G y F4G presentaron niveles de expresión intermedio con respecto a la F3G y F2G.

En el caso de la variedad somaclonal albina (Fig. 3.8B), al comparar únicamente la F2G y F3G con F2A y F3A, se observó una tendencia similar de menor a mayor expresión (Fig. 3.8). En cuanto a los genes asociados al FSI, *psaB* fue el menos expresado en la etapa más temprana (F2A), mientras que *ycf3* fue el más expresado. El gen *psaI* demostró un nivel de expresión intermedia en comparación con los genes *psaB* y *ycf3*, vinculados al FSI. Para la etapa tardía (F3A), *psaB* y *psaI* mostraron niveles de expresión similares, mientras que *ycf3* mostró la menor expresión. En cuanto a la expresión de los genes asociados al FSII, *psbD* mostró la menor expresión en la F2A, mientras que, en la misma etapa, *psbA* y *psbH* mostraron una mayor expresión que *psbD*. En F3A, se encontró una expresión mayor que en F2A para los tres genes evaluados para el FSII, siendo *psbD* el que presentó la mayor expresión en comparación de los otros dos genes evaluados.

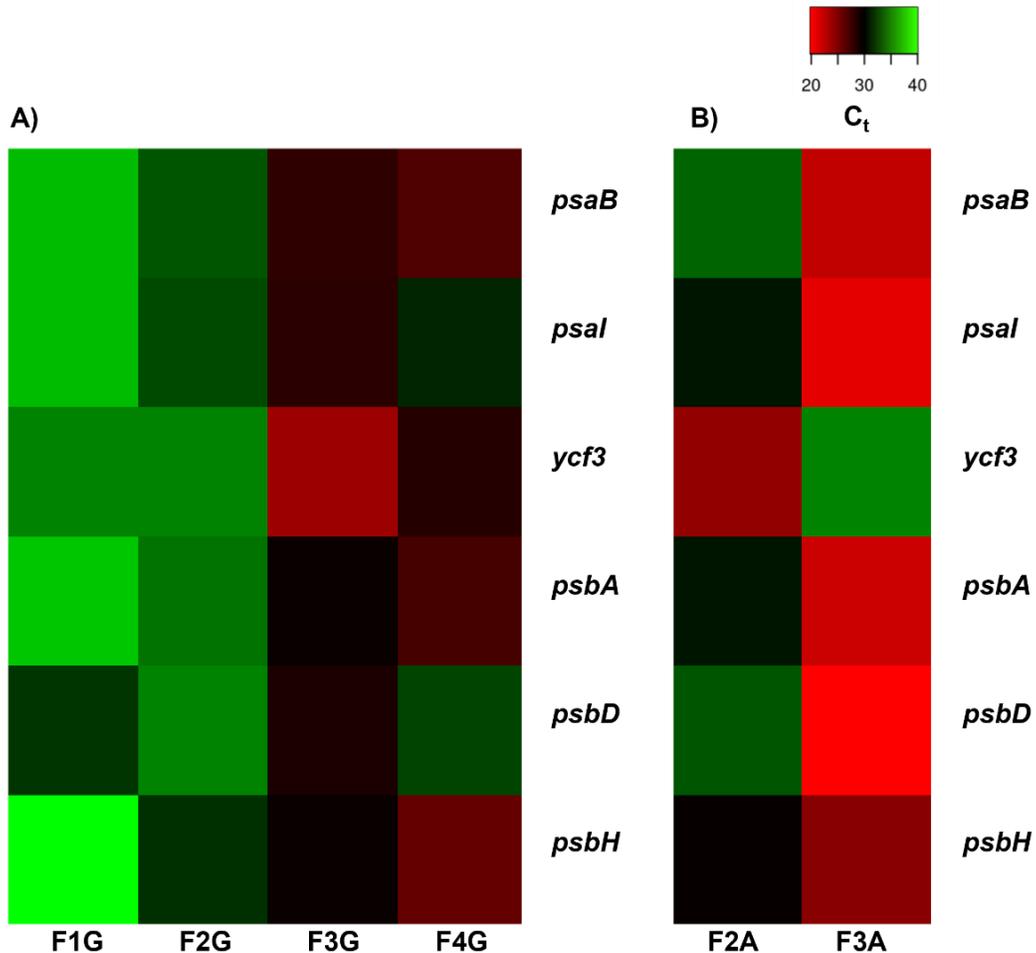


Figura 3.8. Mapa de calor de la expresión diferencial de los genes analizados en ambas variedades somaclonales. A) Análisis de expresión de los genes asociados al FSI y FSII en las cuatro fases de crecimiento de los cloroplastos (F1G, F2G, F3G y F4G) obtenidas de la variedad somaclonal verde de *A. angustifolia*. B) Análisis de expresión de los genes asociados al FSI y FSII en las dos fases de crecimiento de los cloroplastos (F2A y F3A) obtenidas de la variedad somaclonal albina de *A. angustifolia*. Los valores de C_t mayores a 35 representan la ausencia de expresión.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN

4.1.1. Estandarización del aislamiento de cloroplastos y proplástidos de plántulas *in vitro* de *Agave angustifolia* Haw.

Existen numerosos estudios que han estandarizado protocolos para el aislamiento de cloroplastos. Estos han permitido sentar las bases para este proceso en diferentes especies como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Spinacia oleracea*, *Nicotiana tabacum* y *Zea mays* (An *et al.*, 2021; Bhattacharya *et al.*, 2020; Block y Albrieux, 2018; Douce *et al.*, 1973; Jacobson, 1968; Kubis *et al.*, 2008; Morita, 1980; Takabe *et al.*, 1979). La morfología foliar facilita estas manipulaciones. Aunque se han establecido protocolos para organismos fotosintéticos como *Chlamydomonas reinhardtii* (Mason *et al.*, 2006), en plantas suculentas, como *A. angustifolia*, existen pocos procedimientos estandarizados (Gerwick *et al.* 1977), posiblemente debido a sus características morfológicas distintas, como la cutícula gruesa y el meristemo más ensanchado, lo que podría representar desafíos únicos para la obtención de cloroplastos intactos. No obstante, en este estudio, la morfología de las plántulas *in vitro* de *A. angustifolia* permitió la estandarización del protocolo de aislamiento de cloroplastos (Fig. 3.3), abriendo la posibilidad de adaptarlo a otras especies con características similares.

La separación de cloroplastos según las fases de crecimiento mediante un gradiente de sacarosa ofrece una perspectiva valiosa para el análisis de la expresión génica. Los cloroplastos de las fases F1G y F2G, visualmente, presentaron un área de aproximadamente 1 – 4 μm^2 , con características morfológicas similares entre ellas, una disminución en la pigmentación y un área menor a 2 μm^2 . En cambio, los cloroplastos de las fases F3G y F4G exhibieron pigmentación visible, con un área entre 6 – 8 μm^2 , siendo la F4G la de mayor área (Fig. 3.4), en concordancia con lo reportado por Hernández-Castellano (2020).

La visualización de proplástidos indiferenciados de la variedad somaclonal albina presentó desafíos técnicos debido a la ausencia de clorofila y estructuras morfológicas visibles (Fig.

3.2). A diferencia de los cloroplastos, no hay estudios sobre el aislamiento de proplástidos, y la microscopía electrónica a más de 20,000X es necesaria (Jacobson, 1968; Klein y Poljakoff-Mayber, 1961; Leese y Leech, 1976; Tischendorf *et al.*, 2007).

Durante el proceso de separación por gradiente de sacarosa, los plástidos indiferenciados de la variedad somaclonal albina formaron 2 fases, en contraste con las 4 fases observadas de los cloroplastos de la variedad somaclonal verde (Fig. 3.5). Estas dos fases (F2A y F3A) de la variedad somaclonal albina probablemente presenten un rango de tamaños similar a la F2G y F3G de la variedad somaclonal verde.

4.1.2. Análisis de RT-PCR y RT-qPCR en genes asociados al ensamblaje de los fotosistemas I y II

Durante la biogénesis del cloroplasto, los plástidos indiferenciados comienzan a dividirse y proliferan en número a lo largo de las células (Choi *et al.*, 2021). Al iniciar el desarrollo hacia cloroplasto, el ensamblaje de los fotosistemas se activa simultáneamente, con la expresión de genes clave, incluyendo aquellos que componen los fotosistemas (*psa* y *psb*) (Nickelsen y Rengstl, 2013; Schöttler *et al.*, 2011). En *A. angustifolia*, se observó una baja expresión de todos los genes evaluados en las fases F1G y F2G (Figs. 3.7 y 3.8), lo cual podría estar contrastando con la división de los plástidos para la proliferación celular, además de la falta de tilacoides desarrollados que sirven como plataforma de anclaje para las proteínas del FSI y FSII. En la F3G, donde los tilacoides están en desarrollo, se esperaba que ocurriera el ensamblaje del fotosistema, destacando la mayor expresión encontrada de los genes evaluados en esta fase. En F4G, al ser los más maduros, se anticipa la etapa más productiva que requiere continuamente la reparación y ensamblaje de fotosistemas. En contraste, se encontró que para el FSI, el gen *psaB* presentó una mayor expresión (Fig. 3.8), posiblemente relacionada con el proceso de regulación de luz asociado con este gen (Finster *et al.*, 2013). De igual forma, el gen *ycf3* presentó una expresión menor que en su fase anterior, aunque significativa. Este comportamiento contrasta con las funciones de este gen, el cual está asociado al anclaje de las proteínas PsaA y PsaB (Nellaepalli *et al.*, 2018).

En cuanto al FSII, los genes *psbA* y *psbH* mostraron una tendencia de expresión similar, con una baja expresión en las dos primeras fases de crecimiento que aumenta hasta la cuarta fase. El gen *psbA* codifica para la proteína del centro de reacción, vinculada también

con la regulación de luz (Finster *et al.*, 2013), mientras que el gen *psbH* codifica para la proteína auxiliar indispensable para estabilizar la unión del centro de reacción con las antenas LHCI (Cao *et al.*, 2020; Levey *et al.*, 2014). Para el gen *psbD*, una de las dos subunidades del centro de reacción, se observó un comportamiento similar en F1G, F2G y F3G en comparación con los demás genes evaluados del FSII; sin embargo, en F4G mostró una menor expresión, indicando posiblemente un proceso de regulación en la fase más tardía de crecimiento, asociado a procesos de regulación de luz, ya que con mayor presencia de luz, el transcrito tiende a estar más expresado (Finster *et al.*, 2013; Satoh *et al.*, 1999).

La variedad somaclonal albina presentó únicamente dos fases, correspondientes a F2G y F3G (Fig. 3.5). En la F2A, los genes vinculados al FSI mostraron disminución en su expresión, excepto el gen *ycf3* (Fig. 3.8). Este gen está relacionado con el ensamblaje de los fotosistemas, sin embargo, para su transcripción se requiere la presencia del factor nuclear denominado BF2 (Wang *et al.*, 2020), y además, necesita la presencia de la proteína Y3IP1 para que, una vez unidos, el complejo Ycf3-Y3IP1 pueda interactuar con la membrana de los tilacoides y permitir la unión de las proteínas PsaA y PsaB (Nellaepalli *et al.*, 2018, 2021). Se ha reportado que niveles reducidos de Y3IP1, posiblemente vinculados a cambios en la expresión de *ycf3*, pueden inhibir el desarrollo del FSI (Nellaepalli *et al.*, 2021). En el caso de los genes vinculados al FSII, en F2A, *psbA* mostró una expresión similar a *psbH*, mientras que *psbD* mostró una expresión menor. En comparación con F2G, F2A presentó niveles más altos de expresión para *psbA* y *psbH*, necesarios en los procesos intermediarios e iniciales del ensamblaje del FSII, mientras que *psbD* presentó niveles que coinciden con F2G. En F3A, se observaron los niveles más altos de expresión para los tres genes vinculados al ensamblaje del FSII similar a la expresión que presentó F3G. Pudiendo ser que, a pesar de la falta de pigmentación en la planta albina, los genes necesarios para el ensamblaje del FSII están activos y expresándose de manera similar que el fenotipo verde.

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR (Fig. 3.7) y RT-qPCR (Fig. 3.8) revelan un patrón de comportamiento consistente, fortaleciendo la confiabilidad de los datos obtenidos. Además, las fases identificadas en este estudio se alinean con los hallazgos de Loudya *et al.* (2021), quienes detallaron la biogénesis y el desarrollo del cloroplasto a nivel transcriptómico en una hoja de *Triticum aestivum*, una planta monocotiledónea.

Aprovechando el gradiente de crecimiento de los cloroplastos desde la base de la hoja, donde se ubican los proplástidos, hasta el ápice, donde se encuentran los cloroplastos maduros, Loudya *et al.* (2021) reportaron dos fases distintas: una fase inicial de proliferación de proplástidos y una segunda fase de diferenciación y desarrollo de los cloroplastos. Al contrastar estos resultados con nuestro estudio, se observa que, a excepción del gen *ycf3*, la expresión en las dos primeras fases de los cloroplastos aislados (F1G, F2G y F2A) sigue una tendencia similar a la etapa de proliferación de proplástidos descrita por Loudya *et al.* (2021). De igual forma, las fases posteriores de los cloroplastos aislados (F3G, F4G y F3A) exhiben un patrón de expresión que podría estar correlacionado con la fase de diferenciación y desarrollo de los cloroplastos según Loudya *et al.* (2021), sugiriendo que la ausencia de diferenciación y desarrollo de los cloroplastos en el fenotipo albino no está vinculado a los genes que conforman estructuralmente al FSI y FSII. Estos resultados también concuerdan con lo reportado en *A. angustifolia* por Hernández-Castellano *et al.*, (2020), donde se observa un aumento en la concentración de clorofila desde las etapas más tempranas hasta las fases de mayor crecimiento.

La elección del gen de referencia es muy importante para verificar posibles problemas en las concentraciones de ADN y reducir errores asociados con la concentración inicial de la muestra mediante la normalización (Andrade *et al.*, 2017). En el presente estudio, se utilizó ARN de cloroplasto o proplástido, descartando genes de origen nuclear como tubulina, actina o 18S (Wang *et al.*, 2015). Sin embargo, la limitación al seleccionar un gen constitutivo de cloroplasto radica en su expresión correlativa con la etapa de crecimiento del cloroplasto (Loudya *et al.*, 2021). Debido a esto en el presente estudio no se utilizó un gen constitutivo para el análisis de RT-qPCR, por lo que se respaldaron los resultados con el análisis de RT-PCR.

Durante la maduración de los cloroplastos en la variedad somaclonal verde, se observó un aumento en la expresión de genes esenciales para el ensamblaje de fotosistemas I y II (fig. 3.7 y 3.8). Sin embargo, en los proplástidos de la variedad somaclonal albina, la expresión de estos genes fue similar a los cloroplastos de la variedad somaclonal verde, con excepción del gen *ycf3* que mostró mayor expresión para F2A a diferencia de F1G y F2G que mostraban expresión baja, cumpliendo parcialmente nuestra hipótesis inicial.

Existen reportes de fenotipos albinos totales o parciales vinculados a alteraciones del gen *ycf3*, como mutaciones, polimorfismos de nucleótido único o eliminación de pares de bases (Nellaepalli *et al.*, 2018, 2021; Park *et al.*, 2023). Estos estudios demuestran que la proteína Ycf3 interactúa con la proteína de origen nuclear Y3IP1 uniéndose a la membrana de los tilacoides y permitiendo el inicio del ensamblaje de los fotosistemas mediante la unión de las proteínas PsaA y PsaB. En el caso de la variedad somaclonal verde de *A. angustifolia*, la expresión del gen aumentó progresivamente, siendo más prominente en las etapas finales (F3G y F4G), mientras que la variedad somaclonal albina presentó una mayor expresión en la etapa inicial (F2A), para disminuir en la etapa posterior (F3A). Esto podría provocar que la interacción Y3IP1 esté alterándose, lo que conduciría a un fenotipo albino tal como se reportó previamente.

4.2. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.2.1. Conclusiones

- La estandarización del protocolo de aislamiento y separación de cloroplastos mediante un gradiente de sacarosa facilitó la obtención de cloroplastos y proplástidos aislados en diferentes fases de crecimiento, permitiendo su análisis independiente mediante RT-qPCR.
- La variedad somaclonal verde presentó cuatro fases de crecimiento (F1G, F2G, F3G y F4G) mientras que la variedad somaclonal albina presentó dos fases (F2A y F3A), correspondientes a las fases intermedias de la variedad verde.
- Las características morfológicas de los proplástidos aislados de la variedad somaclonal albina representan un reto para la visualización mediante microscopio de campo claro o autofluorescencia.
- La expresión de los genes clave en el ensamblaje de los fotosistemas en la variedad somaclonal verde mostró una menor actividad en las etapas tempranas en comparación con las etapas tardías, corroborando hallazgos anteriores, pero desde una nueva perspectiva.
- La expresión de los genes en el ensamblaje de los fotosistemas en la variedad somaclonal albina en las dos fases de crecimiento observadas resultó similar a la variedad somaclonal verde. Aunque la fase temprana presenta menor expresión que incrementa en la fase tardía, excepto el gen *ycf3*. Dada la importancia de este gen en el ensamblaje del FSI, la baja expresión podría estar asociada al fenotipo albino.

4.2.2. Perspectivas

- Caracterizar la ultraestructura de los cloroplastos y proplástidos separados por tamaños mediante microscopía electrónica de transmisión.
- Analizar la presencia o ausencia de proteínas involucradas en el ensamblaje de fotosistemas mediante Western blot.
- Investigar factores nucleares relacionados con el gen *ycf3*, como BF2 y Y3IP1, así como aquellos vinculados al ensamblaje de fotosistemas.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- An, J., Miao, X., Wang, L., Li, X., Liu, X., Gao, H. (2021). Visualizing the Integrity of Chloroplast Envelope by Rhodamine and Nile Red Staining. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Andrade, L. M. de, Santos Brito, M. dos, Fávero Peixoto Junior, R., Marchiori, P. E. R., Nóbile, P. M., Martins, A. P. B., Ribeiro, R. V., Creste, S. (2017). Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. *Plant Methods*, 13(1), 28.
- Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., Noble, W. S. (2015). The MEME Suite. *Nucleic Acids Research*, 43(1), 39–49.
- Battle, M., Vegliani, F., Jones, M. (2020). Shades of Green: Untying the Knots of Green Photoperception. *Journal of Experimental Botany*, 71.
- Bhattacharya, O., Ortiz, I., Walling, L. L. (2020). Methodology: An optimized, high-yield tomato leaf chloroplast isolation and stroma extraction protocol for proteomics analyses and identification of chloroplast co-localizing proteins. *Plant Methods*, 16(1), 131.
- Biswal, B., Krupinska, K., Biswal, U. C. (2013). The Dynamic Role of Chloroplasts in Integrating Plant Growth and Development. En *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence*, 3–16.

-
- Block, M. A., Albrieux, C. (2018). Purification of Chloroplasts and Chloroplast Subfractions: Envelope, Thylakoids, and Stroma—From Spinach, Pea, and *Arabidopsis thaliana*. En E. Maréchal (Ed.), *Plastids: Methods and Protocols* , 123–135. Springer US.
- Börner, T., Aleynikova, A. Yu., Zubo, Y. O., Kusnetsov, V. V. (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(9), 761–769.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry & molecular biology of plants* (Second edition, p. 33). John Wiley & Sons Inc.
- Cackett, L., Luginbuehl, L. H., Schreier, T. B., Lopez-Juez, E., Hibberd, J. M. (2022). Chloroplast development in green plant tissues: The interplay between light, hormone, and transcriptional regulation. *New Phytologist*, 233(5), 2000–2016.
- Cahoon, A. B., Takacs, E. M., Sharpe, R. M., Stern, D. B. (2008). Nuclear, chloroplast, and mitochondrial transcript abundance along a maize leaf developmental gradient. *Plant Molecular Biology*, 66(1–2), 33–46.
- Cao, P., Pan, X., Su, X., Liu, Z., Li, M. (2020). Assembly of eukaryotic photosystem II with diverse light-harvesting antennas. *Current Opinion in Structural Biology*, 63, 49–57.
- Choi, H., Yi, T., Ha, S.-H. (2021). Diversity of Plastid Types and Their Interconversions. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–14.
- Daniell, H., Lin, C.-S., Yu, M., Chang, W.-J. (2016). Chloroplast genomes: Diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biology*, 17(1), 134.

-
- Dobrogojski, J., Adamiec, M., Luciński, R. (2020). The chloroplast genome: A review. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(6), 42–98.
- Douce, R., Holtz, R. B., Benson, A. A. (1973). Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(20), 7215–7222.
- Duarte-Aké, F., Castillo-Castro, E., Pool, F. B., Espadas, F., Santamaría, J. M., Robert, M. L., 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(12), 2489–2502.
- Finster, S., Eggert, E., Zoschke, R., Weihe, A., Schmitz-Linneweber, C. (2013). Light-dependent, plastome-wide association of the plastid-encoded RNA polymerase with chloroplast DNA. *The Plant Journal*, 76(5), 849–860.
- Fu, H.-Y., Ghandour, R., Ruf, S., Zoschke, R., Bock, R., Schöttler, M. A. (2021). The availability of neither D2 nor CP43 limits the biogenesis of photosystem II in tobacco. *Plant Physiology*, 185(3), 1111–1130.
- Galina, A. S. (2017). Formation of Proplastids in the Apical Meristem of Wheat. *Journal of Plant Cell Development*, 1(1), 23–30.
- Gerwick, B. C., Williams, G. J., Uribe, E. G. (1977). Effects of Temperature on the Hill Reaction and Photophosphorylation in Isolated Cactus Chloroplasts. 60, 430–432.
- Gray, M. W. (2017). Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Molecular Biology of the Cell*, 28(10), 1285–1287.

-
- Greiner, S., Lehwark, P., Bock, R. (2019). OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 59–64.
- Gutierrez Caro, B. (2015). Conservación de germoplasma *ex situ*: Protocolos y estrategias para la mantención de un banco *in vitro*. *Ciencia e investigación Forestal* 21(1): 69-82. *Ciencia e Investigación Forestal*, 21, 69–82.
- Han, H., Qiu, R., Liu, Y., Zhou, X., Gao, C., Pang, Y., Zhao, Y. (2022). Analysis of Chloroplast Genomes Provides Insights Into the Evolution of Agropyron. *Frontiers in Genetics*, 13(832809), 1–12.
- Han, M., Zhang, C., Suglo, P., Sun, S., Wang, M., Su, T. (2021). I-Aspartate: An Essential Metabolite for Plant Growth and Stress Acclimation. *Molecules*, 26(7), 1–17.
- Hansson, A., Amann, K., Zygadlo, A., Meurer, J., Scheller, H. V., Jensen, P. E. (2007). Knock-out of the chloroplast-encoded PSI-J subunit of photosystem I in *Nicotiana tabacum*. *The FEBS Journal*, 274(7), 1734–1746.
- Hernández-Castellano, S. (2020). Estudio molecular y microARNs del albinismo y la variegación en el cultivo *in vitro* de *Agave angustifolia* Haw. (p. 179). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.; 179.
- Hernández-Castellano, S., Garruña-Hernández, R., Us-Camas, R., Kú-Gonzalez, Á., De-la-Peña, C. (2020). *Agave angustifolia* albino plantlets lose stomatal physiology function by changing the development of the stomatal complex due to a molecular disruption. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(3), 787–805.

-
- Hernández-Verdeja, T., Vuorijoki, L., Strand, Å. (2020). Emerging from the darkness: Interplay between light and plastid signaling during chloroplast biogenesis. *Physiologia Plantarum*, 169(3), 397–406.
- Jacobson, A. B. (1968). A procedure for isolation of proplastids from etiolated maize leaves. *The Journal of Cell Biology*, 38(1), 238–244.
- Jarvis, P., López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), 787–802.
- Ji, Y., Lehotai, N., Zan, Y., Dubreuil, C., Díaz, M. G., Strand, Å. (2021). A fully assembled plastid-encoded RNA polymerase complex detected in etioplasts and proplastids in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 171(3), 435–446.
- Klein, S., Poljakoff-Mayber, A. (1961). Fine structure and pigment conversion in isolated etiolated proplastids. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 11, 433–440.
- Kubis, S. E., Lilley, K. S., Jarvis, P. (2008). Isolation and Preparation of Chloroplasts from *Arabidopsis thaliana* Plants. En A. Posch, *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation*, 171–186.
- Leese, B. M., Leech, R. M. (1976). Sequential Changes in the Lipids of Developing Proplastids Isolated from Green Maize Leaves 1. *Plant Physiology*, 57(5), 789–794.
- Levey, T., Westhoff, P., Meierhoff, K. (2014). Expression of a nuclear-encoded psbH gene complements the plastidic RNA processing defect in the PSII mutant hcf107 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 80(2), 292–304.

-
- Liebers, M., Grübler, B., Chevalier, F., Lerbs-Mache, S., Merendino, L., Blanvillain, R., Pfannschmidt, T. (2017). Regulatory Shifts in Plastid Transcription Play a Key Role in Morphological Conversions of Plastids during Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 8(23), 1–8.
- Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., Xue, Y., Ren, J. (2015). IBS: An illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*, 31(20), 3359–3361.
- Loudya, N., Mishra, P., Takahagi, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Inoue, K., Bogre, L., Mochida, K., López-Juez, E. (2021). Cellular and transcriptomic analyses reveal two-staged chloroplast biogenesis underpinning photosynthesis build-up in the wheat leaf. *Genome Biology*, 22(1), 151.
- Mason, C. B., Bricker, T. M., Moroney, J. V. (2006). A rapid method for chloroplast isolation from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Protocols*, 1(5), 2227–2230.
- McFadden, G. I. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(6), 513–519.
- Monja-Mio, K. M., Herrera-Alamillo, M. A., Sánchez-Teyer, L. F., Robert, M. L. (2019). Breeding Strategies to Improve Production of Agave (*Agave spp.*). En J. M. Al-Khayri, S. M. Jain, y D. V. Johnson (Eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops*, 319–362.
- Monja-Mio, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Alamillo, M. Á., Sánchez-Teyer, F. L., Robert, M. L. (2021). Comparison of conventional and temporary immersion systems

-
- on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora'. 3 Biotech, 11(2), 77.
- Morita, K. (1980). Release of Nitrogen From Chloroplasts During Leaf Senescence in Rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany*, 46(3), 297–302.
- Nellaepalli, S., Kim, R. G., Grossman, A. R., Takahashi, Y. (2021). Interplay of four auxiliary factors is required for the assembly of photosystem I reaction center subcomplex. *The Plant Journal*, 106(4), 1075–1086.
- Nellaepalli, S., Ozawa, S.-I., Kuroda, H., Takahashi, Y. (2018). The photosystem I assembly apparatus consisting of Ycf3–Y3IP1 and Ycf4 modules. *Nature Communications*, 9(1), 2439.
- Nickelsen, J., Rengstl, B. (2013). Photosystem II Assembly: From Cyanobacteria to Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 609–635.
- Nishimura, Y. (2023). Plastid Nucleoids: Insights into Their Shape and Dynamics. *Plant and Cell Physiology*, 1–9.
- Park, H.-S., Jeon, J.-H., Cho, W., Lee, Y., Park, J. Y., Kim, J., Park, Y. S., Koo, H. J., Kang, J. H., Lee, T. J., Kim, S. H., Kim, J.-B., Kwon, H.-Y., Kim, S.-H., Paek, N.-C., Jang, G., Suh, J.-Y., Yang, T.-J. (2023). High-throughput discovery of plastid genes causing albino phenotypes in ornamental chimeric plants. *Horticulture Research*, 10(1), 1–11.
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I.,

-
- Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, *51*(1), 418–427.
- Pogson, B. J., Albrecht, V. (2011). Genetic Dissection of Chloroplast Biogenesis and Development: An Overview. *Plant Physiology*, *155*(4), 1545–1551.
- Pogson, B. J., Ganguly, D., Albrecht-Borth, V. (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1847*(9), 1017–1024.
- Pyke, K. (2007). Plastid biogenesis and differentiation. En R. Bock (Ed.), *Cell and Molecular Biology of Plastids*, 1–28.
- Pyke, K. A. (2010). Plastid division. *AoB Plants*, *2010*(plq016), 1–10.
- Qin, X., Yang, X., Huang, X., Jin, G., Yang, X., Wu, M., Chen, T., Yi, K. (2021). The complete chloroplast genome of *Agave angustifolia*. *Mitochondrial DNA Part B*, *6*(11), 3236–3237.
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing.
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Castillo, E., Ojeda, G., Herrera-Alamillo, M. A. (2005). An Efficient Method for the Micropropagation of Agave Species. En V. M. Loyola-Vargas y F. Vázquez-Flota, *Plant Cell Culture Protocols*, 165–178. Humana Press.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, *37*(6), 1–12.

-
- Satoh, J., Baba, K., Nakahira, Y., Tsunoyama, Y., Shiina, T., Toyoshima, Y. (1999). Developmental stage-specific multi-subunit plastid RNA polymerases (PEP) in wheat. *The Plant Journal*, *18*(4), 407–415.
- Schimper, A. (1882). Ueber die Gestalten der Stärkebildner und Farbkörper. *Bot. Zentralbl. Ref. Organ. Gesamtgeb. Bot.*, *12*, 175–178.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675.
- Schöttler, M. A., Albus, C. A., Bock, R. (2011). Photosystem I: Its biogenesis and function in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, *168*(12), 1452–1461.
- Schöttler, M. A., Thiele, W., Belkuis, K., Bergner, S. V., Flügel, C., Wittenberg, G., Agrawal, S., Stegemann, S., Ruf, S., Bock, R. (2017). The plastid-encoded Psal subunit stabilizes photosystem I during leaf senescence in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, *68*(5), 1137–1155.
- Semenova, G. A. (2018). Formation of Proplastids in the Apical Meristem of Wheat. *Journal of Plant Cell Development*, *1*(1), 23–30.
- Semenova, G. A. (2022). Proplastids and Juvenile Chloroplasts in the Apical Meristem of Flax. *Journal of Plant Cell Development*, *1*, 31–37.
- Shi, C., Hu, N., Huang, H., Gao, J., Zhao, Y.-J., Gao, L.-Z. (2012). An Improved Chloroplast DNA Extraction Procedure for Whole Plastid Genome Sequencing. *PLoS One*, *7*(2), 1–7.

-
- Staehelin, L. A. (2003). Chloroplast structure: From chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis Research*, 76(1), 185–196.
- Stirbet, A., Lazar, D., Guo, Y., Govindjee, G. (2020). Photosynthesis: Basics, history and modelling. *Ann Bot*, 126(4), 511–537.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. S. (Eds.). (2015). *Plant physiology and development (Sixth edition)*. Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Takabe, T., Nishimura, M., Akazawa, T. (1979). Isolation of Intact Chloroplasts from Spinach Leaf by Centrifugation in Gradients of the Modified Silica “Percoll”. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(10), 2137–2142.
- Tischendorf, G., Oesterhelt, C., Hoffmann, S., Girus, J., Schnarrenberger, C., Gross*, W. (2007). Ultrastructure and enzyme complement of proplastids from heterotrophically grown cells of the red alga *Galdieria sulphuraria*. *European Journal of Phycology*, 42(3), 243–251.
- Tripathi, S., Hoang, Q. T. N., Han, Y.-J., Kim, J.-I. (2019). Regulation of Photomorphogenic Development by Plant Phytochromes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6165), 1–17.
- Wang, X., Fu, Y., Ban, L., Wang, Z., Feng, G., Li, J., Gao, H. (2015). Selection of reliable reference genes for quantitative real-time RT-PCR in alfalfa. *Genes & Genetic Systems*, 90(3), 175–180.
- Wang, X., Yang, Z., Zhang, Y., Zhou, W., Zhang, A., Lu, C. (2020). Pentatricopeptide repeat protein PHOTOSYSTEM I BIOGENESIS FACTOR2 is required for splicing of *ycf3*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(11), 1741–1761.

-
- Yagi, Y., Shiina, T. (2014). Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–7.
- Yang, H., Liu, J., Wen, X., Lu, C. (2015). Molecular mechanism of photosystem I assembly in oxygenic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(9), 838–848.
- Yoo, C. Y., Han, S., Chen, M. (2020). Nucleus-to-Plastid Phytochrome Signalling in Controlling Chloroplast Biogenesis. En J. A. Roberts (Ed.), *Annual Plant Reviews online* , 251–280.
- Zhen, S., van Iersel, M. W. (2017). Far-red light is needed for efficient photochemistry and photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 209, 115–122.