



***UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA***

***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS***

---

Trabajo de Tesis Doctoral

REGULACIÓN DE LOS PASOS INICIALES DE  
LA DEGRADACIÓN DE CLOROFILA  
DURANTE LA SENESCENCIA FOLIAR

---

Facundo Martin Gomez

Director: Juan José Guiamét  
Codirector: Carlos Guillermo Bártoli  
Asesor Académico: Silvana Petruccelli

2012

---

El presente trabajo fue realizado en su mayor parte en las instalaciones del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, y con estipendio proporcionado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

---

*A todos aquellos que han iluminado mi camino  
y aún lo siguen haciendo*

---

*Con todo doy gracias a  
Díos, que nos hace  
triunfar en Cristo, y  
por nosotros manifiesta  
en todo lugar el aroma  
de su conocimiento.*

*II Corintios 2:14*

---

## **Listado de Publicaciones Originales**

Al momento de finalizar el presente trabajo de tesis doctoral, se han prentado las siguientes publicaciones originales que surgieron total o parcialmente del mismo:

### **En revistas o libros**

- 01 - Martínez, D.; Costa, M.L.; **Gomez, F.M.**; Otegui, M.; Guiamet, J.J. (2008) “Senescence-associated vacuoles” are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves”. *Plant J.* 56(2): 196-206. Con referato. [SJR Indicator 2008: 1,284] [Ranking in the Plant Science subject category: 6/325 (2008)]
- 02 - Costa, M.L.; Martínez, D.E.; **Gomez, F.M.**; Carrión, C. and Guiamet, J.J. (*in Press*) “Chloroplast Protein Degradation: Involvement of Senescence-Associated Vacuoles” in “Chloroplast development during leaf growth and senescence” Biswal, B.; Krupinska, K.; Biswal, U.C. (Eds). Serie libros “Advances in Photosynthesis and Respiration” (Govindjee & Sharkey T.D., series eds.)
- 03 - **Gomez, F.M.**; Costa, M.L.; Desel, C.; Kieselbach, T.; Funk, C.; Krupinska, K. and Guiamet, J.J. “Extra-plastidial degradation of chlorophyll and photosystem I in tobacco leaves involving “Senescence-Associated Vacuoles””. *Enviado para su publicación.*

### **En actas de congresos**

- 04 - **Facundo M. Gomez**, Dana E. Martinez, M. Lorenza Costa, Juan J. Guiamet. ¿Vías alternativas de degradación de la clorofila en hojas senescentes de Arabidopsis? *XIII Reunión Latinoamericana XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*. Rosario, Santa Fé, Argentina, 21 al 24 de septiembre de 2008.
- 05 - **Facundo M. Gomez**, M. Lorenza Costa, Dana E. Martínez, Christiane Funk, Karin Krupinska, Juan José Guiamet. Degradación de la clorofila y apoproteínas del Fotosistema I en “Vacuolas Asociadas a la Senescencia” de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). *XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*. La Plata, Bs.As., Argentina, 26 al 29 de septiembre de 2010.

---

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

<i>CAPÍTULO 1</i> — INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
<i>CAPÍTULO 2</i> — DEGRADACIÓN DE CLOROFILA EN <i>VACUOLAS ASOCIADAS A LA SENESCENCIA</i> .....	96
<i>CAPÍTULO 3</i> — EFECTOS PLEIOTRÓPICOS DE LAS MUTACIONES EN LAS CLOROFILASAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	162
<i>CAPÍTULO 4</i> — ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS CLOROFILASAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	232
<i>CAPÍTULO 5</i> — CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS .....	321

---

---

# *CAPÍTULO 1*

—

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



---

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>CAPÍTULO 1 — INTRODUCCIÓN GENERAL</i> .....	1
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
LA CÉLULA VEGETAL .....	5
EL CLOROPLASTO .....	7
FOTOSÍNTESIS .....	9
Organización de los fotocomplejos en las membranas tilacoidales.....	11
LA MOLÉCULA DE CLOROFILA .....	14
DESARROLLO Y SENESCENCIA .....	16
Tipos de senescencia.....	18
Sistemas experimentales para el estudio de la senescencia .....	20
Factores que regulan la senescencia.....	22
Factores ambientales .....	22
Factores hormonales.....	26
La célula vegetal durante la senescencia.....	29
Regulación genética durante la senescencia .....	30
El cloroplasto durante la senescencia.....	33
Degradación de componentes cloroplásticos durante la senescencia .....	34
Degradación de proteínas cloroplásticas.....	34
Degradación de clorofila .....	37
Las Vacuolas Asociadas a la Senescencia .....	40
HIPÓTESIS DE LA TESIS .....	42
OBJETIVOS DE LA TESIS .....	43
Objetivo General .....	43
Objetivos específicos .....	43
FIGURAS.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	81

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – REPRESENTACIÓN GENERALIZADA DE UNA CÉLULA VEGETAL.....	44
FIGURA 1.2 – REPRESENTACIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE <i>PLASTOS</i> Y SUS DIFERENTES INTERRELACIONES.....	46
FIGURA 1.3 – EL CLOROPLASTO.....	48
FIGURA 1.4 – DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ORGANIZACIÓN DE LOS TILACOIDES DE LOS GRANA Y ESTROMÁTICOS.....	51
FIGURA 1.5 – MODELO ESQUEMÁTICO DE LOS MAYORES COMPLEJOS PROTEICOS DE LA MEMBRANA TILACOIDAL INVOLUCRADOS EN LA FOTOSÍNTESIS.....	53
FIGURA 1.6 – MODELO DEL SISTEMA DE MEMBRANAS TILACOIDALES CON LA DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPLEJOS MAYORES EN LAS DISTINTAS ZONAS DE LAS MISMAS.....	59
FIGURA 1.7 – REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE CLOROFILA A.....	61
FIGURA 1.8 – PROPIEDADES ÓPTICAS Y ELECTRÓNICAS DE LAS MOLÉCULAS DE CLOROFILA.....	63
FIGURA 1.9 – PROPIEDADES ÓPTICAS Y ELECTRÓNICAS DE LAS MOLÉCULAS DE LOS PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS.....	65
FIGURA 1.10 – PATRONES DE SENESCENCIA FOLIAR.....	67
FIGURA 1.11 – CARACTERÍSTICAS DE LA SENESCENCIA DE LA PLANTA ENTERA Y FOLIAR DE <i>ARABIDOPSIS</i> .....	69
FIGURA 1.12 – CARACTERÍSTICAS DE LA SENESCENCIA DE LA PLANTA ENTERA DE <i>NICOTIANA TABACUM</i> . .....	71
FIGURA 1.13 – CONCEPTO DE VENTANA DE LA SENESCENCIA.....	73
FIGURA 1.14 – EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA SENESCENCIA.....	75
FIGURA 1.15 – TRANSICIÓN CLOROPLASTO-GERONTOPLASTO.....	77
FIGURA 1.16 – ESQUEMA DE LA VÍA DE DEGRADACIÓN DE CLOROFILA.....	79

## **RESUMEN**

La clorofila es uno de los compuestos químicos más importantes de la biósfera. Todos los organismos fotosintéticos, entre los cuales destacamos naturalmente a las plantas, dependen casi exclusivamente de la clorofila como compuesto especializado en la captación y transformación de la energía lumínica en energía química. En las especies vegetales, las reacciones fotosintéticas ocurren principalmente en las células de las hojas, dentro de organelas especializadas denominadas cloroplastos, y por ende, es allí donde se localizan las moléculas de clorofila, las cuales se encuentran asociadas a proteínas, formando parte de los complejos fotosintéticos en las denominadas membranas tilacoidales de los cloroplastos.

Durante la etapa final del desarrollo de las plantas, la senescencia, los cloroplastos son desensamblados, y la mayoría de sus componentes son movilizados hacia otros sitios para ser reciclados. En el cloroplasto se encuentra localizado el mayor contenido de nitrógeno en la planta, formando parte de las proteínas cloroplásticas, las cuales requieren ser degradadas a unidades más pequeñas para poder trasladar el nitrógeno hacia otros órganos o tejidos. Para poder degradar las proteínas tilacoidales que contienen clorofila, es requisito previo separarlas de su cofactor, y así iniciar la degradación de la apoproteína y la clorofila en forma separada. Dada su naturaleza química, la degradación de clorofila requiere mecanismos especiales, a fin de maximizar el rendimiento en la movilización de nutrientes, y evitar el colapso prematuro de la célula vegetal. Por tanto, el estudio de estos mecanismos que ocurren durante la senescencia tienen alta importancia agro-económica, si por ejemplo se desean maximizar los rendimientos productivos.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

*Dijo luego: "Haga brotar la tierra hierba verde, hierba con semilla, y árboles frutales cada uno con su fruto, según su especie, y con su simiente, sobre la tierra". Y así fue.*

*Genesis 1:11*

Uno de los grupos de organismos de mayor complejidad biológica en este planeta, está representado por las plantas terrestres ([Fernandez & Lynch 2011](#); [Morse et al. 2009](#); [Yi 2006](#)). Desde tiempos primigenios, el ser humano aprendió a utilizarlas para beneficio propio, y en especial, como fuente de alimentos. Tal vez hoy en día, su extraordinaria importancia pase casi desapercibida, pero si algo no podemos evitar, es la eminente relación con el color *verde* que nos evoca el pensar en cualquier planta, y sin siquiera tener el más mínimo conocimiento en bioquímica o biología. Y más aún, no dejaremos nunca de maravillarnos ante los coloridos cambios de tonos verdes, amarillos y rojizos, que nos asombran con el paso de las estaciones.

Pero ¿qué es lo que le ocurre a las plantas para que cambien los colores de sus hojas? Para comprender esta respuesta debemos primero conocer por qué son *verdes*, para luego saber por qué dejan de serlo.

## **LA CÉLULA VEGETAL**

Curiosamente lo que define una planta como tal, no es su forma, ya que podemos encontrarnos frente a muy diversas variedades. Nos veríamos también tentados en definir a las plantas como aquellos organismos que tienen la capacidad de realizar *fotosíntesis* y sin embargo hay ejemplos de plantas *no-fotosintéticas*.

La mayoría de los científicos hoy en día concuerdan que la unidad básica de todos los organismos vivientes es la *célula*, y que ésta tiene todos los elementos necesarios para la vida. Las plantas forman parte del grupo de organismos complejos

compuestos por un gran número de células y los cuales comienzan su vida como una única célula.

Llamativamente el término *célula* fue acuñado por el naturalista inglés Robert Hooke, cuando en el año [1665](#) utilizando sus *magnifying glasses* describió su observación de finos cortes de *corcho*, es decir, restos de células vegetales muertas. Si bien su publicación *Micrographia*, el primer compendio registrado de observaciones microscópicas, fue la primera publicación mayor de la *Royal Society of London*, y el primer *best-seller* científico, dicha observación no fue tomada en cuenta por su real valor hasta mediados del Siglo XIX, quizá tal vez pasó desapercibida entre otros tantos dibujos microscópicos en la publicación, y fue recién valorada cuando los biólogos se dieron cuenta que las células eran las estructuras fundamentales de todas las plantas y animales.

Pero, ¿que características distintivas podemos encontrar en una célula vegetal? Entre todas las características que podemos encontrar en una célula vegetal, la *pared celular*, la *vacuola*, y los *plástidos*, son los que la hacen única ([Fig. 1.1](#))

Entre esas tres características, la que seguramente nos llame más la atención, y en dónde son llevadas a cabo los procesos más importantes del metabolismo vegetal y funcionamiento de la planta, son los *plástidos*. Estos son un grupo de organelas únicamente presentes en algas y plantas, con dos capas de membranas bilipídicas que conforman la *envoltura* y que poseen, al igual que el núcleo y las mitocondrias, su propio *genoma plástidico*. El término *plástido* involucra varios diferentes subtipos, cada uno con una función específica y característica, y su vez poseen la capacidad de inter-convertirse entre los diferentes subtipos ([Fig. 1.2](#)). Todos los plástidos poseen como característica en común las dobles membranas que conforman la envoltura, y la mayoría de ellos posee un tercer sistema de membranas internas bien definido (en leucoplastos y cromoplastos puede no ser visible) ([Wise 2006](#)).

En semillas, tejidos meristemáticos, y otros varios tejidos podemos encontrar *proplastos*, los cuales son ontogénicamente los precursores de todos los otros tipos de plástidos vegetales. Si el desarrollo de los tejidos meristemáticos o embrionarios acontece en la oscuridad, el desarrollo de los proplastos resulta en la formación del *etioplasto*, en el cual se puede observar un sistema de membranas internas en su

interior. Si posteriormente el tejido es expuesto a la luz, o si el desarrollo ocurre bajo exposición a la luz, rápidamente los etioplastos continúan su desarrollo, se tornan de *color verde*, formando los *cloroplastos* ([Hooper 2006](#)).

En diferentes momentos del desarrollo de los plástidos puede verse alterado su destino y función final. Pueden estos formar, *oleoplastos*, conteniendo múltiples vesículas de lípidos, *proteínoplastos*, que contiene múltiples vesículas con inclusiones proteicas, *amiloplastos*, que contienen gránulos de almidón. Algunos de estos amiloplastos están involucrados en la percepción de la gravedad, por lo que se los suele denominar *estatólitos*. Los plástidos mencionados son todos incoloros, es decir, sin pigmentación propia, por lo que se los suele englobar dentro de los denominados *leucoplastos* ([Wise 2006](#)). Otro de los subtipos de plástidos presentes en tejidos vegetales son los *cromoplastos*, lo cuales generalmente derivan de los *cloroplastos*, aunque muchas veces puede formarse directamente desde los *proplástidos*. Los *cromoplastos* contienen grandes concentraciones de pigmentos (carotenoides) rojos, amarillos y/o anaranjados, los cuales le otorgan diversos colores, y asimismo “colorean” el tejido de la planta en el cual se han formado ([Wise 2006](#)).

## EL CLOROPLASTO

Algunos historiadores asignan las primeras observaciones que indican la existencia de los *cloroplastos* al médico y botánico inglés [Nehemiah Grew](#), cuando hacia el año 1677 brinda su “discurso sobre el color de las plantas” a la *Royal Society of London* dando a entender que las plantas poseían una especie de “precipitado” *verde*. Sin embargo, esta disquisición de N. Grew debe ser interpretada en términos *alquimistas* del “color verde” en las plantas, y difícilmente haya observado lo que podría ser un cloroplasto.

Más acertado es el hecho de atribuirle al holandés Antonj van Leeuwenhoeck la primera descripción de microorganismos con cloroplastos. En una de sus cartas enviadas a la *Royal Society of London* en el año 1674 describió la presencia de pequeños “glóbulos verdes” en el interior de los “animálculos” que observó a través

del microscopio que él mismo había fabricado, y que habitaban las aguas del lago Berkelse Meer, cercano a su pueblo natal Delft ([Dobell 1932](#)). De acuerdo a sus descripciones y esquemas, lo que seguramente A. van Leeuwenhoek observó fueron algunas especies de algas verdes fotosintéticas, probablemente del género *Spirogyra*, con sus “glóbulos verdes” ordenados en forma espiral. Otro de los “animálculos” fotosintéticos que observó, según sus descripciones, probablemente fuera un protozoo con cloroplastos del género *Euglena* ([Dobell 1932](#)).

Posteriores observaciones de muchos científicos de la época, hacen a los pequeños corpúsculos verdes en el interior de células vegetales. Recién para el año 1807, el botánico alemán Ludolph Christian Treviranus fue uno de los primeros en observar “pequeñas partículas más oscuras en el interior de los corpúsculos verdes”, es decir, observó los *grana* en el interior de los *cloroplastos*, que por supuesto, aún no recibían ese nombre ([Treviranus 1811](#)).

En esa misma época, los químicos franceses Pierre Joseph Pelletier y Joseph Bienaimé Caventou, publican su trabajo *Sur la Matière verte des Feuilles* en *Annales de Chimie et de Physique* en [1818](#), donde proponen que la sustancia verde extraíble de las plantas con solventes orgánicos sea denominada *chlorophyle*.

Varios observadores en años posteriores notaron la heterogeneidad de esos cuerpos *clorofilaceos*, en lo que hoy podríamos referirnos a las *grana* y el *estroma*. Recién para el año [1883](#), el botánico alemán Andreas Franz Wilhelm Schimper propuso una nomenclatura sistemática para los diferentes “pequeños corpúsculos” que se observaban dentro de las células vegetales, acuñando así los términos *cloroplastos*, *leucoplastos* y *cromoplastos*, para los corpúsculos verdes, blancos y de otros colores, respectivamente. En el mismo año, el botánico alemán [Arthur Meyer](#), acuñó el término *grana* (sing. *granum*), para describir a los pequeños puntos que se observaban dentro de los cloroplastos.

La estructura final del cloroplasto con sus membranas internas, similar a los modelos actuales, fue observada a mediados del Siglo XX, con los avances de las técnicas de microscopía y el desarrollo de la microscopía electrónica, y en el año [1961](#), el botánico alemán Wilhelm Menke, finalmente acuñó el término *tilacoides* ([Koenig & Schmid 2009](#)), haciendo referencias a las membranas con forma de “sacos” que se observaban en el interior de los cloroplastos ([Fig. 1.3](#)).

Desde el primer modelo de la organización de los tilacoides propuesto por Menke hasta hoy en día, varios modelos han sido postulados ([Daum & Kühlbrandt 2011](#); [Mustárdy & Garab 2003](#)). La primera aproximación al modelo actual más aceptado fue propuesta por Dominick J. Paolillo en [1970](#). En este modelo “helicoidal”, las *lamellae* (sing., *lamella*), o tilacoides estromáticos, se encuentran en capas helicoidalmente arregladas conectándose con los tilacoides de cada *granum*.

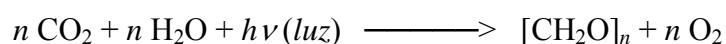
En los últimos años, en especial con el advenimiento de nuevas técnicas aplicadas a la microscopía electrónica, como por ejemplo, tomografía electrónica ([Bárcena & Koster 2009](#)) y crío-tomografía electrónica ([Tocheva et al. 2010](#)), el modelo helicoidal originalmente propuesto ha sido perfeccionado ([Austin & Staehelin 2011](#)), confeccionando una visualización tridimensional de la estructura de los tilacoides muy realista ([Fig. 1.4](#)).

## FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis es el proceso biofísico-químico más importante de la biosfera terrestre. Todas las formas de vida dependen en forma directa o indirecta de él.

Sin duda alguna, todos asociamos directamente este proceso como algo que ocurre en las plantas, y que el pigmento verde, la *clorofila*, por interacción con la luz, es el responsable de dicho proceso. Pero la realidad es que la fotosíntesis es mucho más compleja, y la *clorofila* no es el único compuesto involucrado en este proceso, pero es, sin embargo, la portadora de características fisicoquímicas que la hacen “única”.

La fotosíntesis podría ser resumida rápidamente en la siguiente reacción química:



En esta ecuación se resume el proceso de *síntesis* de carbohidratos, y típicamente veremos representada a la glucosa ( $n=6$ ), a partir de la interacción con la *luz*. Claro está que esta reacción no ocurre “exactamente” de este modo, y la ecuación tampoco nos muestra otra serie de *cofactores* que son utilizados en este proceso.



Aún en forma resumida, podríamos diferenciar dos etapas en este gran proceso *fotosintético*. Una primera etapa dónde la *energía lumínica* es captada por los pigmentos presentes en el cloroplasto, mayormente la clorofila, convirtiéndola en *energía química*. En una segunda etapa, esta *energía química* allí formada, es utilizada para formar los carbohidratos que luego la célula utilizará para otros fines. Estas etapas suelen recibir el nombre de “fase lumínica” (también, fase clara o fase fotoquímica) y “fase oscura”, respectivamente para la primera y segunda etapa, aunque para la segunda etapa suele preferirse actualmente la definición “fase de fijación del carbono de la fotosíntesis” (también, ciclo de Calvin-Benson) ya que estrictamente esta etapa también ocurre en presencia de luz y no en oscuridad.

Todo el proceso de captura de luz y de las funciones de traducción de energía lumínica en química (ATP y NADPH), es decir, la *fase fotoquímica* de la fotosíntesis, está localizada en los tilacoides del cloroplasto. Estas reacciones son llevadas a cabo por una serie de proteínas transmembrana y periféricas, así como también otros cofactores asociados ([Fig. 1.5](#)).

El primer evento de la fase fotoquímica comienza por la absorción de un fotón, generalmente por una molécula de clorofila, en alguna de las *antenas colectoras de luz* del Fotosistema II (*Light Harvesting Complex II, LHCII*). Esta absorción de energía por parte de una molécula de clorofila, conduce a los electrones de la misma a un estado energético superior en sus orbitales moleculares, comúnmente denominado, *estado excitado*, el cual no es estable, por lo que volverá a su estado basal. Existen varias formas posibles de *des-excitación* (de algunas de ellas hablaremos más adelante) pero la que es importante en la fase fotoquímica, es la denominada *transferencia resonante* de energía, formulada por Theodor Förster ([1946](#)) en la cual la energía absorbida por una molécula es transferida a otra molécula vecina en forma *no-radiativa*, hasta el “par especial” de moléculas de clorofila del centro de reacción, denominado *P680*, causando una separación neta de un electrón del mismo, el cual inicia una serie de reacciones de oxido-reducción a través de los distintos elementos presentes en las membranas tilacoidales. El P680 recupera el “electrón perdido” a través de la oxidación de una molécula de H<sub>2</sub>O, vía el *cluster* de átomos de Mn en el complejo “liberador de oxígeno” (*OEC, Oxygen-*

*Evolving Complex*) que producirá O<sub>2</sub>, en los organismos fotosintéticos “oxigénicos” ([Fig. 1.5](#)).

Finalmente, la transferencia de electrones en forma persistente a través de los complejos tilacoidales (Fotosistemas I, Citocromo *b<sub>6</sub>f* y Fotosistema II, [Fig. 1.5](#)), desde la molécula de H<sub>2</sub>O hasta el NADP<sup>+</sup> (produciendo NADPH), genera un gradiente del potencial electroquímico a través de la membrana tilacoidal que es utilizado por el *Coupling-Factor* (CF) o *ATP sintasa* para producir ATP, que es la forma final en la cual se “convierte” la energía lumínica, y junto con el NADPH producido, serán utilizados posteriormente en las reacciones de fijación de carbono, es decir, en la “fase oscura” de la fotosíntesis ([Fig. 1.5](#)).

Para que el rendimiento cuántico de la fotosíntesis, es decir, el cociente entre el O<sub>2</sub> producido y el número de fotones absorbidos, sea máximo, ambos centros de reacción de los Fotosistemas I y II deben recibir un *excitón* desde sus antenas colectoras. Esta observación fue inicialmente examinada por Emerson *et al.* ([1957](#)), y aunque sus experimentos fueron realizados originalmente en el alga verde *Chlorella pyrenoidosa*, posteriormente fueron confirmados en otras especies por distintos investigadores ([Hill 1954](#); [Hill & Bendall 1960](#); [Hill & Scarisbrick 1951](#)), y recibe el nombre de *Efecto Emerson*. Así mismo, estas investigaciones iniciales condujeron a muchos otros investigadores ([Duysens et al. 1961](#); [Govindjee et al. 1960](#); [Govindjee & Rabinowitch 1960](#); [Kok & Hoch 1961](#); [Witt et al. 1961a, b](#)) a proporcionar evidencia adicional sobre la existencia de dos fotosistemas funcionando acopladamente en los tilacoides ([Fig. 1.5](#)).

## **Organización de los fotocomplejos en las membranas tilacoidales**

*A priori*, se podría suponer que los cinco complejos mayores de las membranas tilacoidales (Fotosistemas I y II, Citocromo *b<sub>6</sub>f*, ATP sintasa, y NAD(P)H-Plastoquinona óxidoreductasa) se encontrarían distribuidos en forma más o menos homogénea, e incluso manteniendo una proporción unitaria entre ellos. Sin embargo, ocurre todo lo contrario.

Desde las primeras observaciones ([Miller & Staehelin 1976](#); [Staehelin 1976](#)) mediante microscopía electrónica de las membranas tilacoidales, utilizando técnicas de *freeze-etch* y *freeze-fracture*, las cuales permitieron observar los grandes complejos proteicos que sobresalen o los que están inmersos en las membranas, respectivamente, se reveló que la distribución de los complejos es heterogénea. En las membranas tilacoidales podemos reconocer cuatro regiones ([Fig. 1.6 A](#)). Por un lado observamos las *lamellae* estromáticas y las *grana*, y a su vez, dentro de cada *granum*, podemos diferenciar, las partes de membranas “comprimidas” y las “no-comprimidas”, es decir, los márgenes y las caras superior/inferior del *granum*. Desde las primeras observaciones mencionadas, ya se visualizó en primer lugar que el complejo de ATP sintasa se ubicaba sólo en las partes “no-comprimidas” del tilacoide.

En años posteriores, mediante experimentos de aislamiento de fragmentos de membranas tilacoidales por métodos mecánicos o mediante detergentes, se pudieron obtener vesículas formadas por los fragmentos de membranas de las partes “comprimidas” y las “no-comprimidas” del tilacoide. Esto permitió, sumar información bioquímica y biofísica sobre la composición de las distintas regiones de la membrana tilacoidal en cuanto a los complejos mayores allí presentes ([Åkerlund et al. 1976](#); [Andersson, B. & Åkerlund 1978](#); [Andersson, B. & Anderson 1980](#); [Gräber et al. 1978](#)). En modelos actuales ([Fig. 1.6 B](#)), podemos observar que los complejos de ATP sintasa se encuentran exclusivamente localizados en las regiones no-comprimidas, al igual que casi la totalidad de los complejos del Fotosistema I. Mientras que en la región “comprimida” del *granum* podemos encontrar la mayor parte de los complejos del Fotosistema II.

En la regiones de las *lamellae* estromáticas se encuentra presente otro complejo también importante, la NAD(P)H Deshidrogenasa, cuya principal función sería la de aportar electrones, provenientes de la oxidación del NAD(P)H al circuito cíclico del Fotosistema I. Este complejo forma generalmente supercomplejos asociándose a Fotosistema I a través del complejo LHCI, sin embargo la formación de este supercomplejo no pareciera ser determinante en la actividad de la NAD(P)H Deshidrogenasa ([Peng & Shikanai 2011](#)).

Técnicas más recientes, han permitido observar que en las regiones comprimidas del *granum*, se encuentran los denominados “supercomplejos” del Fotosistema II, es decir, dímeros de los centros de reacción del Fotosistema II junto a sus antenas colectoras internas, trímeros de los complejos LHCII, y el complejo OEC ([Danielsson et al. 2006](#); [Daum et al. 2010](#); [Nield & Barber 2006](#)). Así mismo, la presencia de estos supercomplejos estabilizaría la estructura “comprimida” de los *granum* ([Daum et al. 2010](#)).

El efecto más importante en el “apilamiento” de los tilacoides es la separación física de los Fotosistemas I y II, lo cual permitiría que ambos puedan funcionar en forma acoplada. Esta separación ofrece un mecanismo por el cual regular la distribución de energía entre ambos fotosistemas, previniendo que el Fotosistema II transfiera en forma directa su energía de excitación al Fotosistema I, el cual es mucho más eficiente en el uso de los “excitones” ([Staelin & van der Staay 2004](#)). Así mismo, la separación física de los fotosistemas, provee al tilacoide de dos micrositios aislados donde realizará preponderantemente los procesos de transporte lineal y transporte cíclico de electrones, en las *grana* y en los estroma *lamellae*, respectivamente, evitando la competencia entre ambos procesos ([Albertsson 2001](#)). En el mismo sentido, ante situaciones de alta incidencia lumínica, un desapilamiento parcial de los *grana*, como consecuencia de la fosforilación de algunas de las proteínas del fotosistema II y LHC II, y su migración acoplándose al fotosistema I ([Allen & Holmes 1986](#); [Dietzel et al. 2011](#); [Minagawa 2011](#)), disminuirá la proporción de fotones capturados por el fotosistema II, aumentando el transporte cíclico de electrones, y por tanto permitiendo un modo de regulación en la producción de ATP y NADPH en el cloroplasto según las demandas ([Forti & Vianelli 1988](#)).

Esta distribución particular de ambos fotosistemas en los distintos micrositios del tilacoide también puede explicar las observaciones experimentales acerca de que el rendimiento cuántico para la producción de una molécula de oxígeno es próximo a diez fotones ([Björkman & Demmig 1987](#); [Emerson & Arnold 1932](#)). Asumiendo que el transporte lineal de electrones requiere ocho fotones por molécula de oxígeno producida, los fotones adicionales absorbidos por la región del estroma *lamellae*, es decir, por el fotosistema I en esa zona, serán utilizados en el transporte cíclico de

electrones y no para la producción de oxígeno, lo cual aumentará el requerimiento fotónico ([Albertsson 2001](#)).

## LA MOLÉCULA DE CLOROFILA

Una de las singularidades más importantes de casi todos los organismos fotosintéticos, es su dependencia de moléculas de clorofila (o bacterioclorofila) ([Fig. 1.7](#)). Se especula que su utilización para aprovechar la energía lumínica surgió evolutivamente a modo de poder utilizar las porciones del espectro solar que no eran utilizadas por los primeros organismos (arqueobacterias) que utilizaban la luz como fuente de energía, y utilizaban moléculas de retinal (o compuestos similares), las cuales tienen su mayor absorción en la región espectral del color verde ([Stoeckenius 1985](#)). El estar asociadas a sistemas proteicos más eficientes en la conversión energética, le permitió prevalecer a estos nuevos organismos fotosintéticos clorofílicos ([Larkum 2006](#); [Olson & Blankenship 2005](#); [Scheer 2006](#)).

La clorofila es de los compuestos químicos más estudiados desde hace más de 200 años, y en el último siglo ha estado involucrada en los estudios de tres premios Nobel en el área de la química. Richard Willstätter fue consagrado en 1915 por “sus estudios en los pigmentos vegetales, en especial clorofila”. Hans Fischer, en 1930, por “sus estudios en la constitución de la hemina y la clorofila...”. Y posteriormente, Robert Woodward en 1965, por “sus logros en el arte de la síntesis orgánica”, siendo en parte quien culminó la total síntesis de clorofila, y de otros compuestos naturales. También cabe mencionar otros dos premios Nobel, en relación directa con la molécula de clorofila. En 1988, Johann Deisenhofer, Robert Huber y Hartmut Michel, fueron galardonados por “la determinación de la estructura tridimensional de los centros de reacción fotosintéticos”. Y en 1992, Rudolph A. Marcus, por “su contribución a la teoría de reacciones de transferencia electrónica en sistemas químicos”, habiendo trabajado en parte de su carrera en las reacciones de transferencia de electrones en los sistemas fotosintéticos.

La molécula de clorofila no sólo es única por sus propiedades espectrales, sino que permite con leves modificaciones en su estructura general, asociada al anillo

de clorina (o forbina, si consideramos el quinto anillo isocíclico ciclopentanona, *E*), generar una amplia variedad de compuestos con propiedades biofísicas únicas. Las moléculas de clorofila, y de modo similar aquellos compuestos que también poseen un anillo de clorina, presentan dos regiones de máxima absorbancia del espectro lumínico ([Fig. 1.8 A](#)), en la zona del color UV-azul y en la zona del color rojo-IR. Este espectro de absorción se corresponde con las transiciones electrónicas desde orbitales ocupados de mayor energía (HOMO, *Highest Occupied Molecular Orbital*) hacia los de menor energía desocupados (LUMO, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) ([Fig. 1.8 B](#)), y se corresponden con las transiciones de las denominadas *Bandas B* o *de Soret* y *Bandas Q*, respectivamente para las longitudes de onda del color UV-azul y rojo-IR. Claro está, que este modelo simplificado para las transiciones HOMO-LUMO, no muestra el resto de transiciones electrónicas posibles que se observan en un espectrograma “real” de absorción, en el cual aparecerán otras transiciones debidas a distintos estados vibracionales, y solapamiento parcial o total de otras transiciones; y si tenemos en cuenta que en una molécula de clorofila aparecen varios sustituyentes anexados al anillo de clorina/forbina central, las transiciones son cada vez más complejas desde el punto de vista teórico ([Kee et al. 2007a, b](#)). Aunque lo que resulta interesante de este modelo simplificado, es que nos permite predecir el “corrimiento” de las transiciones para las bandas de Soret y las bandas Q, entre los anillos de porfirina-clorina-bacterioclorina, hacia regiones de mayor energía para las bandas de Soret y de menor energía para las bandas Q ([Fig. 1.8](#)).

Así mismo, la modificación en uno de los sustituyentes del anillo central, por ejemplo, de clorofila *a* hacia *b*, reemplazando el grupo metilo por formilo en la posición 7, produce un corrimiento en las bandas de Soret y bandas Q. Este hecho resulta importante en los sistemas de las antenas colectoras de luz de los fotosistemas, ya que hace posible la transferencia energética desde las moléculas de clorofila *b* hacia las moléculas de clorofila *a*.

Las características espectrales de la molécula de clorofila le permiten ser receptores de energía que le cederán mediante transferencia resonante otros pigmentos, denominados en su conjunto como “accesorios” en los fotosistemas, como por ejemplo,  $\beta$ -carotenos, y permitiendo a los fotosistemas funcionar en un

rango espectral más amplio ([Fig. 1.9 A](#)). Otra característica importante desde el punto de vista biofísico, es que las moléculas de clorofila pueden emitir fluorescencia en la zona del color rojo, principalmente debido a transiciones electrónicas entre los niveles energéticos de las bandas de Soret y bandas Q, y finalmente perdiendo la energía de excitación en forma lumínica, denominada fluorescencia ([Fig. 1.9 B](#)). Esta propiedad es ampliamente utilizada en diversas determinaciones biofísicas que podemos relacionar con aspectos fisiológicos de las plantas, y en particular de los cloroplastos.

## DESARROLLO Y SENESCENCIA

Maravillarnos ante los coloridos cambios de tonos verdes, amarillos y rojizos, que ocurren en las plantas en algunas latitudes con el paso de las estaciones, implica entonces que acapara nuestra atención la última etapa del desarrollo, previo a la muerte, de muchas plantas, y en particular de las hojas. Esta fase final del desarrollo, que denominamos senescencia, no consiste simplemente en la degradación y destrucción, en forma aleatoria, de todos los componentes que constituyen al órgano en cuestión o al organismo en su totalidad, sino todo lo contrario, es un proceso bioquímico y fisiológico muy organizado en todos sus niveles, desde los compartimentos subcelulares hasta la planta entera ([Hörtensteiner & Feller 2002](#)).

Es desde hace varios años, cuestión de debate, la definición exacta del término *senescencia*, particularmente aplicado a la biología vegetal ([Thomas \*et al.\* 2003](#); [van Doorn & Woltering 2004](#)). Suele ser común el uso indistinto de términos como *senescencia*, *envejecimiento*, *muerte celular programada*, *apoptosis*... probablemente debido a que los mayores avances científicos en estos aspectos surgieron inicialmente de estudios en animales, y luego fueron trasladados a los sistemas vegetales. Sin embargo, hay leves diferencias entre la terminología empleada, y debe tenerse especial cuidado en su uso, especialmente al pretender comparar entre los diferentes niveles de organización biológica ([Noodén 2004](#)).

La *senescencia* es un proceso natural del desarrollo que puede ser considerado como una diferenciación terminal, ya que tiene lugar hacia el final del

ciclo de vida de un órgano u organismo. Todas las respuestas adaptativas desencadenadas durante este proceso, colectivamente denominadas *Síndrome de la Senescencia*, comprenden una serie de eventos bioquímicos y fisiológicos cuyo objetivo final es removilizar eficientemente los nutrientes desde los tejidos en cuestión, es decir, el reciclado de las macromoléculas y lípidos y el transporte de los mismos fuera de las estructuras senescentes hacia otras partes de la planta ([Peñarrubia & Moreno 2001](#)).

Si bien la *senescencia* es claramente parte del programa del desarrollo, la *muerte celular programada* (*PCD*, *Programmed Cell Death*), no siempre puede ser utilizada como sinónimo. De hecho, el término *senescencia*, es preferible cuando nos referimos a órganos u organismos, y el término *PCD* cuando se hace referencia a células o pequeños grupos de células; incluso puede ocurrir *PCD* en una situación que no estaría relacionada directamente con la *senescencia* en el sentido estricto (v.g. muerte de algunos tipos celulares durante la formación del aerenquima, la formación de esporas, el desarrollo del embrión, etc.) ([van Doorn & Woltering 2004](#)). Sin embargo, la *senescencia*, en muchos casos puede compartir muchas características comunes con *PCD*, teniendo en cuenta que el momento culminante es la muerte del conjunto de células que constituye el órgano u organismo ([Shahri 2011](#); [Thomas et al. 2003](#)). En un sentido más generalizado de *PCD*, la *senescencia*, podría ser considerada como una subcategoría de *PCD*, denominándola *PCD del desarrollo*, especialmente cuando se hace referencia a ciertas partes o grupos celulares de algunos órganos (v.g. pétalos) ([van Doorn 2005](#); [van Doorn & Woltering 2008](#)), sin embargo este uso del término puede generar confusión cuando se está haciendo referencia a los eventos específicos que ocurren durante la *senescencia* (del órgano u organismo) en ese tejido en particular. En este sentido, el término *senescencia foliar*, es utilizado normalmente para destacar los eventos que ocurren a nivel de la hoja u hojas durante la *senescencia* del organismo, los cuales variarán de acuerdo a la especie en particular.

Entre todos los eventos que ocurren durante el denominado *Síndrome de la Senescencia*, y dada la notoria importancia del órgano respecto de la planta, la *senescencia foliar* es el proceso a través del cual tradicionalmente se describe y se toma como referencia para los eventos que ocurren durante la *senescencia* ([Noodén](#)



[2004](#)). Generalmente el desarrollo de este proceso es “medido” en términos de parámetros cloroplásticos, debido a que la degradación del cloroplasto es probablemente la manifestación más importante durante la *senescencia* ([Noodén et al. 2004](#)), con la consecuente disminución de la capacidad fotosintética de las hojas.

El transcurso natural de la *senescencia*, y en particular su inicio, al igual que cualquier otro proceso genéticamente programado del desarrollo, puede ser alterado por cualquier combinación de factores bióticos y abióticos tales como luz (calidad, intensidad, fotoperíodo), temperatura, nutrientes, hormonas (citoquininas, etileno), patógenos, etc. ([Gan & Amasino 1997](#); [Shahri 2011](#)). Por tanto, no es extraño que, otros procesos tales como maduración de frutos, deterioro post-cosecha, respuesta hipersensible, lesiones, clorosis, necrosis, etc., compartan alguna característica en común con la *senescencia* ([Thomas et al. 2003](#); [van Doorn & Woltering 2005](#)), incluso los mecanismo de regulación genética estarían, al menos parcialmente, superpuestos ([Buchanan-Wollaston et al. 2005](#); [Guo et al. 2004](#); [Swidzinski et al. 2002](#)).

## **Tipos de senescencia**

La senescencia es un fenómeno muy generalizado que puede ser encontrado en todas las plantas, y cumple una función en el desarrollo así como una función adaptativa. La senescencia ocurre de acuerdo a diversos tipos o patrones, los cuales pueden ser representados por dos comportamientos extremos, especialmente cuando se hace referencia a todo el organismo ([Peñarrubia & Moreno 2001](#)). Según estos patrones de senescencia de la “planta entera”, los cuales enfatizan su relación con el ciclo reproductivo de la misma, las especies pueden ser *monocárpicas* o *policárpicas*. El término *monocárpica*, hace referencia a las plantas cuyo ciclo de vida posee un solo episodio reproductivo seguido de muerte. Generalmente las plantas monocárpicas son anuales o bianuales. El término *policárpicas*, hace referencia a plantas que poseen más de un episodio reproductivo a lo largo de su vida, siendo estas generalmente polianuales ([Hildebrand 1882](#); [Molisch 1930](#)). Las plantas policárpicas, como los árboles, usualmente muestran una senescencia

periódica de sus hojas, en combinación con el desarrollo de hojas nuevas. En las plantas monocárpicas, como la mayoría de los cultivos alimentarios, todos los individuos de la misma población de un modo casi sincrónico desarrollan la senescencia dirigiendo la movilización de los nutrientes a sus frutos en crecimiento ([Peñarrubia & Moreno 2001](#)).

Otra clasificación útil de los distintos tipos o patrones de senescencia, es la realizada por Leopold ([1961](#)), distinguiendo a modo general cuatro posibles patrones morfológicos, principalmente foliares. El primero ([Fig. 1.10 A](#)), típicamente observado en plantas anuales durante la fase vegetativa del desarrollo, donde acontece la senescencia foliar en forma progresiva desde la base de la planta hacia el ápice. Un segundo patrón de senescencia ([Fig. 1.10 B](#)), típicamente observado en árboles caducifolios, donde las hojas “senescen” sincrónicamente y son abscindidas anualmente. Una tercera posibilidad ([Fig. 1.10 C](#)), donde sólo la parte aérea de la planta “senesce” en forma periódica manteniendo vivas las estructuras subterráneas (v.g. plantas bulbosas). Y finalmente una cuarta posibilidad ([Fig. 1.10 D](#)), típica en especies monocárpicas, donde la senescencia se manifiesta en todo el organismo completo y finalmente muere en forma más o menos abrupta. Este último patrón está generalmente asociado con la reproducción de la planta, la cual deja vivas sólo sus semillas que continuarán con su linaje.

La planta modelo usualmente empleada en la mayoría de las investigaciones relacionadas con aspectos de biología molecular y celular, *Arabidopsis thaliana*, es una especie autógena, que muestra un patrón de senescencia monocárpica, y las hojas de su roseta presentan una senescencia (foliar) progresiva o secuencial, comenzando en las hojas basales más antiguas y continuando hasta el ápice. Como planta monocárpica tiene un ciclo de vida relativamente corto, y sus hojas muestran distinguiblemente las etapas del desarrollo y un bien definido y reproducible programa de senescencia ([Fig. 1.11](#)) ([Lim et al. 2007](#)).

Otra especie generalmente empleada en investigaciones relacionadas con aspectos bioquímicos es *Nicotiana tabacum*. Esta planta es una especie autógena, y es óptima en estudios donde se requiere una cantidad importante de tejido foliar. El patrón de senescencia de esta especie podría encuadrarse en el mismo tipo que *Arabidopsis*, aunque la senescencia progresiva en sus hojas puede ser visualizada y

seguida con mayor facilidad debido a la separación escalonada entre sus hojas ([Fig. 1.12](#)), y además la senescencia foliar ocurre en forma independiente del desarrollo floral ([Thomas & Stoddart 1980](#)).

### ***Sistemas experimentales para el estudio de la senescencia***

Al momento de la planificación experimental para el estudio de cualquier parámetro de la senescencia, es de suma importancia la elección del sistema apropiado. Muchas son las variables a tener en cuenta al momento de evaluar algún parámetro relacionado con la senescencia, sobre todo a nivel de la planta entera, puesto que tampoco son menos los factores que alteran el normal desarrollo de la senescencia, tanto acelerándola como demorándola. Si bien la mayoría de los experimentos son desarrollados en invernáculos o en cámaras de crecimiento bajo condiciones óptimas de desarrollo, muchas veces las condiciones en “el campo” podrían diferir sustancialmente, y no reflejar finalmente las mismas observaciones realizadas en condiciones de invernáculo o cámara de crecimiento (v.g. [Luquez & Guiamét 2001](#)).

Uno de los sistemas experimentales más utilizados es el empleo de porciones u órganos (v.g. hojas) cortados de la planta. Si bien este sistema es de suma utilidad, especialmente cuando se desea trabajar con especies de gran porte en condiciones de laboratorio, se debe tener especial consideración con las relaciones inter-órganos en la planta, cuya ausencia debida a la interrupción del sistema vascular, podrían alterar el normal desarrollo de la senescencia, por ejemplo, debido a la acumulación de azúcares en las hojas cortadas ([Lazan et al. 1983](#); [Noodén et al. 2004](#); [Pourtau et al. 2006](#)).

Otro de los sistemas experimentales más difundidos es el uso de plantas mutantes y transgénicas. En épocas previas al gran desarrollo actual de las técnicas de ingeniería genética, o en especies donde las técnicas de manipulación genética no son relativamente sencillas, la identificación de mutaciones naturales afectando la senescencia ha permitido avanzar en diversos aspectos genéticos de esta etapa del desarrollo. El desarrollo de nuevas técnicas de transgénesis, especialmente la

transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, y la sencilla metodología utilizada en *Arabidopsis thaliana*, ha tornado esta técnica muy usual en los estudios genéticos ([Peñarrubia & Moreno 2001](#)). Asimismo se encuentran fácilmente disponibles diversas colecciones con gran variedad de mutantes por inserción de T-DNA de *Arabidopsis thaliana* ([Alonso et al. 2003](#); [Sessions et al. 2002](#)), cuyas mutaciones *Knock Out* se encuentran mapeadas al gen de interés. Sin embargo, debe tenerse especial cuidado al emplear plantas transgénicas, así como mutantes, en especial los artificiales ([Clark & Krysan 2010](#); [Curtis et al. 2009](#); [Ülker et al. 2008](#)). El hecho que *Agrobacterium* introduzca en forma cuasi aleatoria un fragmento de T-DNA ([Forsbach et al. 2003](#); [Kim, S.-I. & Gelvin 2007](#)), y frecuentemente ocurra más de un evento de transformación por célula ([De Buck et al. 2009](#); [Oltmanns et al. 2010](#)), requiere tomar los recaudos necesarios cuando se evalúan aspectos fisiológicos y bioquímicos. Por ejemplo, evaluar el rol de cierto gen posiblemente involucrado en el desarrollo normal de la senescencia, podría conducirnos a interpretaciones erróneas si existen otros genes cuya función se encuentra también alterada por la inserción de un segundo T-DNA. Del mismo modo, se debe tener especial cuidado en la interpretación de las observaciones realizadas, puesto que en muchos casos la alteración de un gen, ya sea por mutación artificial o natural (v.g. [Luquez & Guiamét 2001](#)), puede generar diversos efectos pleiotrópicos o *a priori* no directamente relacionados con la senescencia ([Feng & Mundy 2006](#); [Lim et al. 2007](#)), y otros muchos posibles efectos indeseados debidos a la misma alteración genética ([Daxinger et al. 2008](#)). Así mismo una inserción de T-DNA en el interior de la secuencia de un gen, no es condición suficiente para el silenciamiento de ese gen ([Lechtenberg et al. 2003](#); [Meza et al. 2002](#)).

Otra metodología experimental sumamente difundida, es el uso de tratamientos externos, generalmente con el fin de promover o inhibir la senescencia. Estos tratamientos pueden ser tanto físicos (v.g. bloqueo de la luz, alteración de la temperatura) o químicos (v.g. aplicación de hormonas, inhibidores enzimáticos) o combinaciones de ambos (v.g. cambios abruptos generando situación de estrés). Al igual que con cualquiera de los sistemas experimentales anteriormente descritos, se debe tener especial cautela con las observaciones realizadas con estas metodologías, principalmente si se desean extrapolar conclusiones a sistemas “naturales” y/o de

plantas enteras, puesto que los mecanismos de respuesta de la planta a cualquier alteración externa pueden diferir en distinta medida de los mecanismos de senescencia “naturales” ([Becker & Apel 1993](#); [Buchanan-Wollaston et al. 2005](#); [Guo & Gan 2011](#)).

## **Factores que regulan la senescencia**

Existe una gran diversidad de factores que pueden regular o alterar la senescencia “natural” de una planta. Podemos agrupar la gran mayoría de todos ellos en dos conjuntos, externos o ambientales e internos u hormonales. Sin embargo, este agrupamiento no implica necesariamente una clara división fisiológica y bioquímica, ya que muchos de ellos se encuentran interrelacionados en sus funciones o mecanismos de acción, y regulándose mutuamente en forma concertada.

### ***Factores ambientales***

Generalmente, cuando se hace referencia a la senescencia normal o natural, tanto de la planta entera como de alguno de sus órganos, se está considerando al proceso que ocurre en condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo de la planta. Por lo tanto, la senescencia puede ser inducida prematuramente, mediante la exposición de cualquier estímulo ambiental que aparte temporal o permanentemente a la planta de las condiciones óptimas de crecimiento. Muchos de estos estímulos ambientales ocurren a modo de situación de estrés para la planta ([Lers 2007](#)).

Sin embargo, en algunas ocasiones, puede ocurrir que la intensidad y la duración del estímulo o estrés que recibe la planta sean leves o moderados, desencadenando una serie de respuestas tendientes a mitigar futuras situaciones de estrés más intensas que ocurrirán por ejemplo durante los procesos de desmantelamiento celular que ocurren durante la senescencia (v.g. estrés oxidativo), y consecuentemente estos episodios de estrés moderado desaceleran la senescencia ([Gómez et al. 2008](#)).

En sus ambientes naturales, las plantas están frecuentemente expuestas a situaciones ambientales de estrés, las cuales podrían afectar su crecimiento, metabolismo, desarrollo y productividad. Las situaciones de estrés ambientales pueden ser bióticas, como resultado de la interacción con otros organismos (generalmente patógenos), o abióticas, como resultado de un cambio físico o químico en algún componente de su entorno comparado con las condiciones óptimas de crecimiento ([Lers 2007](#)).

Las situaciones de estrés ambientales son muy diversas y de variada naturaleza (v.g. alta y baja irradiancia, alta y baja temperatura, sequía, deficiencia de nutrientes, patógenos, sustancias tóxicas ambientales, etc.), y frecuentemente existe una muy estrecha relación con el desarrollo de la planta. Por tanto es muy difícil discernir en diversas situaciones entre los efectos de distintos estímulos ambientales y factores propios de desarrollo de la planta, puesto que según progresa la senescencia, más vulnerable se torna la planta a diversos estímulos externos ([Leopold 1961](#)).

El inicio y desarrollo de una respuesta acelerada de la senescencia como resultado de una situación de estrés podría ser interpretado como un mecanismo de defensa por parte de la planta, de característica adaptativa, permitiendo que complete su ciclo de vida, maximizando el uso de sus propios recursos y la producción de prole ([Guo & Gan 2005](#); [Munné-Bosch & Alegre 2004](#)).

Las interrelaciones entre diferentes situaciones de estrés y la senescencia de la planta son mediadas generalmente por la participación de varias hormonas vegetales, principalmente etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico. Así mismo, plantas mutantes para distintas enzimas en las vías de síntesis de dichas hormonas, demostraron que las mismas actúan como moduladores de la senescencia, y no controlando en forma absoluta el progreso de la senescencia ([Grbić & Bleeker 1995](#); [He, Y. et al. 2002](#); [Morris et al. 2000](#)). Diversos análisis genómicos han permitido agrupar los diferentes genes relacionados con las vías de señalización de dichas hormonas, así como también, genes independientes de las mismas ([Buchanan-Wollaston et al. 2005](#)). Del mismo modo, se ha encontrado un gran solapamiento en la expresión de distintos genes que aumentan sus niveles durante la senescencia y

durante situaciones de estrés biótico y abiótico ([Chen, W. et al. 2002](#); [Guo & Gan 2011](#)).

Uno de los factores ambientales más importantes para el desarrollo de las plantas, y probablemente uno de los más estudiados, es la irradiancia y la composición espectral de la luz.

La privación total de la luz, en hojas individuales, desencadena el proceso de senescencia. A pesar de que las hojas de las plantas naturalmente nunca se someterán a oscuridad absoluta, este suele ser un procedimiento habitual usualmente empleado para acelerar el proceso de senescencia, tanto en hojas unidas como separadas de la planta, y debe tenerse en cuenta que las hojas de distintas edades pueden responder en forma diferencial al tratamiento de oscuridad u otros tratamientos ([Becker & Apel 1993](#); [Weaver et al. 1998](#)). Sin embargo, si la planta entera es sometida a oscuridad, el mecanismo de respuesta no es el mismo, y variará según la especie. Se observó que en *Arabidopsis* este tratamiento causa un retraso general de la senescencia ([Weaver & Amasino 2001](#)), mientras que en cebada ocurre lo contrario ([Kleber-Janke & Krupinska 1997](#)). Si bien aún no hay una clara explicación sobre el retraso de la senescencia generalizada al someter la planta completa a oscuridad, se especula que una reducción del metabolismo global de la planta puede causar este efecto ([Weaver et al. 1998](#)). Incluso varios de los mutantes *oresara* (del lenguaje coreano 오래 살아, /olae sal-a/, “de larga vida”) de *Arabidopsis*, con diversas deficiencias generales en su metabolismo, muestran senescencia demorada ([Woo et al. 2001](#); [Woo et al. 2002](#); [Woo et al. 2004](#)).

La irradiancia también actúa modulando la longevidad foliar. En *Arabidopsis*, la senescencia foliar estaría modulada por la luz de un modo dependiente de la dosis recibida, disminuyendo la longevidad foliar con el aumento de la misma ([Nooden et al. 1996](#)), aunque plantas de algodón no parecen responder del mismo modo ([Sassenrath-Cole et al. 1996](#)). La exposición a una alta irradiancia sometería a la planta a una situación de estrés, en la cual son generadas elevadas cantidades de especies reactivas del oxígeno (v.g. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por el cloroplasto, con el consecuente daño y/o muerte ([Foyer & Noctor 2005](#)). Análisis genómicos mostraron que varios genes expresados en situación de alta irradiancia son también expresados durante la senescencia ([Vanderauwera et al. 2005](#)). Los cambios que ocurren durante la

senescencia incrementan la susceptibilidad de la hoja a la alta irradiancia, con lo que se torna de suma importancia la existencia de mecanismos tendientes a disminuir la absorción lumínica, como por ejemplo mediante la producción de antocianinas ([Hoch et al. 2003](#)), activando e incrementando diferentes mecanismos de disipación de la energía absorbida ([Demmig-Adams & Adams 1992](#); [Ledford & Niyogi 2005](#); [Ort 2001](#)), así como también, de mecanismos de reparación y protección contra el daño *foto-oxidativo* ([Procházková & Wilhelmová 2007](#)).

En condiciones naturales, el estrés por alta irradiancia suele acontecer en combinación con otras situaciones de estrés ambiental, tales como bajas temperaturas ([Suzuki & Mittler 2006](#)), patógenos ([Bechtold et al. 2005](#)), sequía ([Behera et al. 2002](#)), los cuales actuarán en forma sinérgica, acelerando el proceso de senescencia.

En muchas especies vegetales, la transición hacia la fase reproductiva está, al menos en parte, controlada por el fotoperíodo. En especies monocárpicas, como *Arabidopsis*, el desarrollo reproductivo está ligado a la senescencia de la planta entera, por lo que someténdola a un fotoperíodo inductivo, es decir, a *día largo*, la mayoría de sus ecotipos florecerán rápidamente, generarán menor número de hojas en la roseta, y la planta “senescerá” antes ([Levey & Wingler 2005](#)). Sin embargo, mientras que el control de la senescencia foliar por las estructuras reproductivas es algo común en las plantas monocárpicas, este tipo de regulación podría no ser algo generalizado, y *Arabidopsis* es una de las excepciones, donde la senescencia o longevidad foliar no estaría controlada por este *control correlativo*, aunque la senescencia de la roseta “completa” sí lo estaría ([Lim et al. 2007](#); [Noodén & Penney 2001](#)).

La calidad lumínica también está involucrada en el desarrollo de las plantas, y por ende, en el progreso de la senescencia. Usualmente, en la mayoría de las plantas, el desarrollo de nuevas hojas en posiciones apicales, va generando sombreado en las hojas más antiguas de posiciones basales. Este sombreado no sólo ocasiona una disminución en la irradiancia sobre dichas hojas, sino que también modifica el espectro lumínico que arriba a ellas, fundamentalmente disminuyendo la proporción de luz roja (~ 650-680nm), absorbida por las moléculas de clorofila, en relación a la luz roja “lejana” (~ 710-740nm). Experimentos en los cuales se modificó la relación rojo/rojo lejano, mediante suplementación lumínica o filtros, muestran una demora



en la senescencia foliar a altas relaciones de rojo/rojo lejano, y una aceleración de la misma a bajas relaciones, así como también al disminuir la irradiancia ([Rousseaux et al. 1996, 2000](#)). Sin embargo, en condiciones naturales, la disminución de la irradiancia en las hojas basales va acompañada de una alteración de la calidad lumínica de forma muy compleja, es decir, acontece una disminución en la relación rojo/rojo lejano, disminución de la radiación del espectro UV y azul, aumento de la radiación verde, lo cual dificulta discernir qué cambio específico de la composición espectral y/o la irradiancia tiene un mayor efecto sobre la longevidad foliar, sobretodo considerando que cualquiera sea la modificación tanto espectral como de intensidad, también ocurrirá una alteración de la actividad fotosintética ([Folta & Maruhnich 2007](#)), y una modificación del metabolismo nitrogenado y del carbono ([Niinemets 2007](#)). Incluso, al menos en *Arabidopsis*, la actividad del Fitocromo A (PhyA), uno de los fotorreceptores de luz roja/rojo lejano, depende de la densidad de flujo fotónico en las longitudes de onda del rojo, evitándose la degradación de PhyA a alta irradiancia ([Franklin et al. 2007](#)).

En conclusión, y a modo general para cualquier otra situación de estrés ambiental, cualquiera sea el estímulo que afecte en forma negativa las condiciones de crecimiento de la planta, resultará en una inducción o aceleración de la senescencia, y muchos de los mecanismos a través de los cuales transcurre el proceso, estarán superpuestos en mayor o menor medida ([Lers 2007](#)).

### ***Factores hormonales***

Si bien el ciclo de vida de la plantas está claramente regulado por diversos factores externos, muchos de ellos se traducen en señales internas de la planta, y la mayoría de las veces, son las diferentes hormonas las que actúan mediando los efectos de estos estímulos externos. Incluso en condiciones de óptimo crecimiento, y “ausencia” (hasta cierto punto es difícil definir este término de modo absoluto para cualquier etapa del desarrollo) de cualquier tipo de estrés ambiental, las plantas entrarán a su última etapa del desarrollo siguiendo un proceso programado de acuerdo a su ciclo vital, y las hormonas de la planta juegan un rol preponderante en

la regulación y control del proceso entre los diferentes tejidos, órganos de la planta, e incluso la comunidad de plantas.

El grupo de las “cinco clásicas” hormonas [etileno, ácido giberélico (GA), citoquininas, ácido abscísico (ABA), auxinas], con el agregado del ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), son las siete hormonas más estudiadas en relación al desarrollo y senescencia de las plantas.

Las células vegetales deben integrar un complejo balance entre las diferentes señales hormonales, las cuales frecuentemente actúan en conjunto con otras señales hormonales, generando una serie de vías de señalización que se intercomunican, y por tanto muchas veces el efecto de una misma hormona puede ocasionar respuestas similares a otra, e incluso generar respuestas antagónicas ([Bennett et al. 2005](#)).

A modo general, las hormonas que demoran la senescencia, citoquininas, auxinas y giberelinas, actúan promoviendo reacciones anabólicas, estimulando la fotosíntesis y el desarrollo general de la planta. Entre estas tres hormonas, los efectos de las citoquininas como antagonistas de la senescencia son los más estudiados ([Gan & Amasino 1997](#); [Wingler & Roitsch 2008](#)). El inicio de la senescencia foliar ocurre aproximadamente en sincronía con la disminución de los niveles endógenos de citoquininas ([Gan & Amasino 1997](#); [Noh et al. 2004](#)). Muchos experimentos en los cuales se aplicó esta hormona en forma exógena ([Gan & Amasino 1996](#); [Weaver et al. 1998](#)), y en plantas transgénicas en las cuales se han incrementado los niveles endógenos de citoquininas durante la senescencia ([Gan & Amasino 1995, 1996](#)), han mostrado una significativa demora en la senescencia foliar, aunque finalmente la planta entrará de todos modos en la etapa de senescencia.

A pesar de que aplicaciones exógenas de auxinas parecieran tener un efecto variable sobre la demora en la senescencia ([Noh & Amasino 1999](#)), las plantas mutantes *ore14* de *Arabidopsis*, que poseen una sensibilidad aumentada a las auxinas ([Lim et al. 2010](#)), y plantas mutantes y transgénicas con niveles aumentados de auxinas ([Kim, J.I. et al. 2011](#)) muestran una marcada demora en la senescencia foliar.

Entre las hormonas que aceleran la senescencia, el etileno es probablemente la más estudiada, y frecuentemente es utilizada para promover la senescencia en estudios sobre este proceso. El efecto del etileno es conocido desde la antigüedad

(obviamente no como tal) para acelerar la maduración de frutos, aunque actualmente se conoce que está involucrado en muchas funciones del desarrollo de la planta, como expansión foliar, germinación, abscisión y senescencia foliar, desarrollo radicular, rizogénesis, mediando respuestas al estrés abiótico, etc. ([Khan 2006](#)).

Sin embargo, aplicaciones de esta hormona sobre distintos órganos de la planta, y en particular sobre las hojas, no tienen el mismo efecto en cualquier etapa del desarrollo. El “concepto de ventana de la senescencia” ([Fig. 1.13](#)), el cual fue desarrollado a partir de diversos estudios de la interacción del etileno con la edad de la hoja, muestra claramente que la senescencia foliar tiene tres fases en relación al efecto de esta hormona ([Grbić & Bleeker 1995](#); [Jing et al. 2003](#); [Jing et al. 2002](#)). En la primera fase, de “nunca senescer” o “Etileno-Insensible”, el etileno no podrá inducir o promover la senescencia. En la segunda fase, de “senescencia dependiente de etileno”, la hoja se encuentra en una etapa del desarrollo en la cual esta hormona podrá inducir la senescencia, y al inicio de esta etapa su efecto dependerá de la *dosis* y *tiempo de exposición* a esta hormona. Y finalmente la tercera fase, de “senescencia independiente de etileno”, la senescencia foliar procederá igualmente a pesar de la presencia o ausencia de esta hormona ([Grbić & Bleeker 1995](#); [Jing et al. 2003](#); [Jing et al. 2002](#)).

El “concepto de ventana de la senescencia” ([Fig. 1.13](#)), podría también permitirnos integrar todas las hormonas involucradas en la senescencia foliar. En *Arabidopsis* las diferentes hormonas parecieran controlar el inicio y progresión de la senescencia de un modo dependiente de la edad foliar. En este concepto ampliado a las distintas hormonas, a medida que transcurre el desarrollo de la hoja, esta va disminuyendo la concentración, sensibilidad y/o efectividad de las hormonas que actúan “demorando” la senescencia (Auxinas, GA, Citoquininas); y a su vez comienza a aumentar la concentración, sensibilidad y/o efectividad de las hormonas que actúan “acelerando” la senescencia (Etileno, JA, ABA, SA) ([Schippers et al. 2007](#)).

El ataque por diversos tipos de patógenos puede inducir senescencia prematura de la hoja infectada, lo cual resultará en la abscisión del órgano. Muchos genes han sido identificados por aumentar su expresión durante la senescencia foliar y el ataque por patógenos ([Jung et al. 2007](#); [Quirino et al. 2000](#)), lo que podría

explicar las similitudes entre los eventos involucrados en la senescencia y los mecanismos de defensa a patógenos ([Lers 2007](#)). En este mismo sentido, varios factores de transcripción involucrados en las respuestas a patógenos mediados por vías de señalización en las que intervienen el etileno, JA y SA, también son inducidos durante la senescencia foliar ([Chen, W. et al. 2002](#)).

El empleo de distintos mutantes de *Arabidopsis* con funciones alteradas en la biosíntesis y señalización por etileno, JA y SA, ha permitido comprobar la participación e interacción entre estas hormonas, en las respuestas a las diferentes situaciones de estrés biótico y abiótico, así como también su participación en el transcurso de la senescencia foliar ([Berger 2002](#); [He, Y. et al. 2002](#); [Morris et al. 2000](#); [Penninckx et al. 1996](#)). Sin embargo, aún no se ha encontrado ninguna conexión crucial entre las vías de señalización por JA o SA y el desarrollo de la senescencia, y puesto que los distintos mutantes desarrollan la senescencia normalmente, el rol de estas hormonas en la senescencia es aún debatible. JA y SA parecen estar relacionadas con la inducción de la senescencia debido al solapamiento entre los programas de senescencia y respuesta a patógenos ([Jing et al. 2003](#); [Quirino et al. 2000](#)).

## **La célula vegetal durante la senescencia**

Numerosos cambios ocurren a nivel celular durante la senescencia, y una característica importante de este proceso es el de movilizar en forma ordenada y controlada los nutrientes liberados en el mismo, fundamentalmente desde las células del órgano senescente hacia los nuevos órganos en desarrollo o hacia sitios de reserva. Uno de los nutrientes de mayor importancia, y por tanto de mayor interés en “reciclar” durante la senescencia es el nitrógeno, el cual se encuentra mayoritariamente localizado en los cloroplastos. Por ello, es de suma importancia que los procesos catabólicos que acontecen durante la senescencia, ocurran de modo ordenado y controlado, no solo a nivel celular, sino también a nivel subcelular ([Hörtensteiner & Feller 2002](#); [Masclaux et al. 2000](#)).

Uno de los primeros cambios estructurales que se observan en una célula senescente acontece en el cloroplasto, en contraste con los cambios estructurales en el núcleo y en las mitocondrias, que son generalmente observados en etapas avanzadas de la senescencia celular. La desintegración visible de las membranas plasmáticas y vacuolares pareciera ser la fase terminal del proceso, marcando el fin de la homeostasis y la muerte de la célula ([Noodén 2004](#)).

El proceso de desensamblado y movilización de los componentes celulares debe estar considerablemente controlado y regulado, a fin de minimizar los daños colaterales durante el proceso y maximizar la eficiencia del mismo. Por tanto, se torna imperiosa la capacidad de desintoxicación de ciertos compuestos, como *especies reactivas del oxígeno*, que se incrementarán inevitablemente durante el proceso, a fin de evitar el colapso prematuro de la integridad celular ([Matile 2001](#)).

### ***Regulación genética durante la senescencia***

Mientras que durante la senescencia muchas de las actividades metabólicas disminuyen, este proceso no es simplemente el resultado de la simple represión o inhibición de la expresión génica, sino de una compleja alteración de la misma, donde efectivamente la expresión de muchos genes se ve disminuida, pero la de muchos otros se ve incrementada ([Noodén 2004](#)).

Un punto importante a tener en cuenta en el análisis de la expresión génica durante la senescencia, es la “base de referencia”, puesto que muchas moléculas cuyos niveles son estables durante casi todo el desarrollo celular, durante la senescencia van decayendo, como es el caso del ARN ribosomal, probablemente debido al aumento de actividad de ARNasas ([Taylor et al. 1993](#)), y usualmente empleado como referencia de la expresión génica. Por tanto, en estudios de senescencia foliar, es generalmente conveniente normalizar los resultados en base al área foliar o peso fresco del tejido ([Guiamét et al. 2002](#)).

La importancia del conocimiento sobre cuáles genes ven afectada su expresión, ya sea aumentando o disminuyendo, así como cuáles podrían estar “regulando” el progreso de la senescencia, surge de la filosofía generalizada que

controlando estos genes se podría “manipular” el programa de senescencia. Si bien el control genético de la senescencia pareciera estar bajo control nuclear ([Smart 1994](#)), las evidencias sobre la regulación genética por parte del cloroplasto son controvertidas. En algunas especies, la degradación del ADN cloroplástico pareciera ser al menos un pre-requisito para la degradación del cloroplasto, marcando un punto de “no retorno” en la senescencia, mientras que en otras especies el ADN plastídico es preservado durante la senescencia ([Krupinska 2006](#); [Oldenburg & Bendich 2004](#)). Otras evidencias, a favor de la regulación por genes cloroplásticos, indicarían la participación de la subunidad F del complejo proteico NADH-Deshidrogenasa del cloroplasto, cuya expresión aumenta durante la senescencia, en desencadenarla o acelerarla al aumentar la producción de *especies reactivas del oxígeno* ([Zapata et al. 2005](#)).

Podemos agrupar los genes cuyas funciones están relacionadas con la senescencia en seis categorías ([Fig. 1.14](#)) ([Smart 1994](#); [Thomas & Smart 1993](#)): (1) Genes *Housekeeping*, aquellos que son siempre expresados pues son necesarios para las distintas funciones celulares durante todo el desarrollo celular. (2) Genes que son expresados tempranamente durante el desarrollo, pero cuyas funciones o productos serán activados más tardíamente, por ejemplo, enzimas vacuolares, zimógenos. (3) Genes cuyas funciones se corresponden con el crecimiento y anabolismo celular, y contribuyen a la senescencia cuando dejan de expresarse, por ejemplo, proteínas tilacoidales. (4) Genes reguladores que son expresados al iniciar la senescencia, controlando su inicio y velocidad de progresión; estos genes son generalmente un punto de convergencia de varias vías de traducción de los distintos factores externos e internos que desencadenan la senescencia. (5) Genes codificando actividades relacionadas a la senescencia, y cuya expresión es incrementada durante la senescencia, por ejemplo, enzimas del catabolismo. (6) Genes codificando productos cuya función es la de movilizar productos de almacenamiento, como por ejemplo enzimas relacionadas con la movilización de nitrógeno.

La clasificación detallada de los genes que intervienen en el proceso de la senescencia, claramente nos permite observar ([Fig. 1.14](#)) que este programa involucra no sólo la activación de genes al iniciar y progresar esta etapa, sino que también es importante la regulación negativa de otros genes involucrados en el

anabolismo celular. La mayoría de los denominados genes *SAG* (*Senescence-Associated Genes*) se corresponden con las categorías (4) y (5) mencionadas anteriormente. Sin embargo no todos los genes denominados *SAG* están directamente involucrados en la regulación o en procesos catabólicos de la senescencia, ya que muchos de estos genes actúan primariamente en la protección de la célula senescente del estrés ocasionado durante la movilización de sus componentes ([Gepstein et al. 2003](#); [Kim, H.J. et al. 2007](#); [Weaver et al. 1998](#)). En *Arabidopsis* podrían existir unos 2500 genes *SAG* representando aproximadamente el 10% del genoma completo, demostrando la complejidad del proceso ([Guo et al. 2004](#)).

Diversos estudios sobre la expresión génica de *Arabidopsis* (v.g. [Guo et al. 2004](#); [Lin & Wu 2004](#); [Zentgraf et al. 2004](#)) y otras especies (v.g. [Andersson, A. et al. 2004](#); [Bhalerao et al. 2003](#); [Gregersen & Holm 2007](#)) han mostrado la compleja interacción entre miles de genes que modifican su expresión durante la senescencia, incluso mostrando diferentes “programas” de senescencia según los diferentes factores que puedan haber desencadenado el inicio de la misma, y las condiciones bajo las cuales esta transcurra ([Buchanan-Wollaston et al. 2005](#); [Guo & Gan 2011](#)), y probablemente esta complejidad del sistema nos esté indicando tal vez el motivo por el cual nunca se ha encontrado “el gen de la senescencia”.

Otra posible herramienta experimental para el análisis y búsqueda de genes que cumplan algún rol de notoria importancia en el inicio y desarrollo de la senescencia, es el empleo de plantas mutantes, las cuales permitirán luego a través de análisis genéticos el estudio del gen o genes involucrados en la mutación. Los mutantes *oresara* de *Arabidopsis*, cuya característica importante es una mayor longevidad de la planta (tal como lo indica su nombre en el lenguaje coreano), han permitido la caracterización e identificación de algunos genes asociados a la senescencia ([Oh et al. 1997](#)). Otras plantas mutantes muy empleadas son las que presentan la característica de *stay-green* (“que permanece verde”), en las cuales lo más notorio es su demora o bloqueo en la degradación de clorofila ([Thomas & Howarth 2000](#)).

Las nuevas tecnologías “ómicas” (v.g. transcriptómica, proteómica) y de secuenciación, han permitido en los últimos años identificar los genes que subyacen en los *QTLs* anteriormente estudiados en relación a rasgos relacionados a la

senescencia en diversas especies, en especial en aquellas en las cuales aún no se ha realizado la secuenciación de su genoma completo ([Ougham et al. 2007](#)).

## **El cloroplasto durante la senescencia**

Uno de los eventos más notorios que ocurre durante la senescencia foliar, y en especial en las células del mesófilo, es la transformación de los cloroplastos en gerontoplastos ([Fig. 1.15](#)).

Esta transformación está caracterizada por varios cambios a nivel estructural del cloroplasto, como por ejemplo, desorganización de las membranas tilacoidales, formación de vesículas, incremento del número y tamaño de glóbulos osmiofílicos, aumento del número y tamaño de plastoglóbulos, y pérdida progresiva de la clorofila presente. Esta última característica es probablemente el hecho más notorio en la senescencia foliar, lo cual pondrá en evidencia los carotenoides amarillos remanentes, y producirá el consecuente cambio de color en la hoja ([Krupinska 2006](#); [Matile 2001](#); [Parthier 1988](#)).

Si bien ocurre una reducción del tamaño del cloroplasto debido a los cambios estructurales mencionados, la información concerniente al número de cloroplastos por célula durante la senescencia es algo contradictoria. Diversos estudios muestran que el número de cloroplastos en distintas especies disminuye, aunque en otras pareciera permanecer constante ([Krupinska 2006](#)).

En la maduración de frutos, los cloroplastos estarán sujetos a otros cambios estructurales diferentes a los que ocurren en las hojas, siendo estos transformados en cromoplastos. No todos los cromoplastos tienen como predecesores a los cloroplastos, pudiendo provenir de otros plástidos, como por ejemplo de leucoplastos en los pétalos o de amiloplastos en tubérculos ([Parthier 1988](#)).

La principal discordancia entre gerontoplastos y cromoplastos, no reside en diferencias ultraestructurales, sino en sus actividades metabólicas. Mientras que los cromoplastos aún poseen actividades anabólicas (v.g. síntesis de carotenoides y galactolípidos) y mantienen gran parte del ADN plastídico, en los gerontoplastos ocurre todo lo contrario, caracterizándose básicamente por sus actividades



catabólicas ([Bouvier & Camara 2006](#); [Egea et al. 2010](#)). Por lo cual, si bien en ambos ocurre un desensamblaje del aparato fotosintético y degradación de sus componentes, el mecanismo a través del cual acontecen ambos procesos, y su regulación genética, puede ser diferente ([Barsan et al. 2010](#); [Kahlau & Bock 2008](#); [Zeng et al. 2011](#)).

## **Degradación de componentes cloroplásticos durante la senescencia**

El destino final del cloroplasto y sus componentes durante la senescencia es suma importancia, debida a que el mismo posee más del 70% del nitrógeno foliar, el cual debe ser movilizado durante la senescencia a órganos de reserva, como por ejemplo, frutos o tubérculos ([Mae 2004](#)). Para trasladar este nitrógeno, es necesario degradar las proteínas a subunidades que puedan ser movilizadas o de las cuales se pueda remover el nitrógeno trasladándolo a otra parte. En otras palabras, las proteínas, que poseen casi la totalidad del nitrógeno presente en las células y sus organelas, deben ser degradadas a sus aminoácidos constituyentes, algunos de los cuales podrán ser movilizados como tales, y otros serán des-aminados previo a su consumo final y trasladando el nitrógeno a otro aminoácido transportable ([Mae 2004](#)).

Por lo tanto, a fin de maximizar el rendimiento en el “reciclado” del nitrógeno, es importante que la degradación de los componentes cloroplásticos ocurra de un modo estrictamente regulado y controlado. Asimismo, dada la diversidad y complejidad de los componentes cloroplásticos, es esperable encontrar diversos mecanismos de degradación para estos componentes.

### ***Degradación de proteínas cloroplásticas***

*A priori*, parecieran existir dos mecanismos principales para la degradación de las proteínas y otros componentes cloroplásticos ([Hörtensteiner & Feller 2002](#); [Krupinska 2006](#)): a través de la digestión intracelular de la organela completa o a través de una transformación gradual a gerontoplasto, en el cual se han degradado la

mayor parte de sus componentes, tanto intra- como extra-plastídicamente, es decir, por actividades proteolíticas en el interior del plástido o por exportación de los componentes plastídicos a compartimentos líticos externos. Si bien la autofagia del cloroplasto completo por la vacuola central pareciera ser un mecanismo posible para degradar cloroplastos de estructura aberrante o muy dañados ([Niwa et al. 2004](#)), sigue siendo un punto conflictivo en cuanto a su participación en la senescencia y el destino final de los gerontoplastos, para lo cual hay observaciones a favor ([Minamikawa et al. 2001](#)) y en contra ([Evans et al. 2010](#)).

La degradación de proteínas cloroplásticas durante la transición a gerontoplasto, puede ocurrir a través de diversas proteasas que actúan en la senescencia por activación o nueva síntesis de las mismas, y puede tener lugar dentro del cloroplasto mismo, por cambios en la compartimentación de proteasas vacuolares, o relocalización a vacuolas líticas de las proteínas cloroplásticas a degradar. Debido a la diferente naturaleza de las proteínas cloroplásticas, la degradación de las proteínas localizadas en el estroma y los tilacoides ocurre probablemente a través de diferentes mecanismos.

Una vez iniciada la senescencia, las proteínas estromáticas, tanto fotosintéticas (v.g. RubisCO) como no-fotosintéticas (v.g. Glutamina Sintetasa), son degradadas tempranamente, mientras que las proteínas tilacoidales permanecen intactas hasta después que las proteínas estromáticas han comenzado a degradarse ([Krupinska 2006](#)).

La degradación de la proteína estromática RubisCO ha sido muy estudiada ya que es sin duda es la proteína más abundante del planeta. Diversos indicios muestran que su degradación sería iniciada por proteasas cloroplásticas, proceso en el cual podrían participar las diversas proteasas presentes en el cloroplasto ([Adam & Clarke 2002](#)), algunas de las cuales aumentan su expresión durante la senescencia ([Andersson, A. et al. 2004](#); [Nakabayashi et al. 1999](#); [Želisko et al. 2005](#)). Ensayos *in vitro* empleando cloroplastos lisados ([Kokubun et al. 2002](#); [Miyadai et al. 1990](#)), así como también cloroplastos intactos aislados ([Roulin & Feller 1998](#); [Zhang et al. 2007](#)), han mostrado la participación de proteasas cloroplásticas en la degradación de RubisCO. Todos estos ensayos mostraron una degradación parcial de RubisCO por parte del cloroplasto, lo cual hace suponer que la degradación de las proteínas

cloroplásticas, o al menos la mayoría de ellas, se iniciaría dentro del cloroplasto, y la tarea sería finalizada extra-plastídicamente.

Las proteínas tilacoidales, las cuales constituyen alrededor del 30% del total de proteínas cloroplásticas, parecieran tener diferentes velocidades de degradación durante la senescencia, así como variados mecanismos. La mayoría de las proteínas tilacoidales poseen diferentes cofactores, y en especial clorofila, por lo cual la remoción de los cofactores es un requisito para iniciar la degradación de la apoproteína y el cofactor en forma separada ([Matile 1997](#); [Matile et al. 1999](#); [Thomas et al. 2002](#)). Así mismo, las diferentes plantas mutantes *stay-green* muestran retención de algunos complejos proteicos conteniendo clorofila, pero no de todos ellos, y pueden degradar normalmente otros componentes cloroplásticos ([Bachmann et al. 1994](#); [Thomas & Smart 1993](#)).

Presumiblemente, la existencia de mecanismos de reparación de proteínas tilacoidales frecuentemente sujetas al daño foto-oxidativo, como por ejemplo D1 y proteínas del complejo LHCII ([Guiamét et al. 2002](#)), indicarían que el alto ritmo de degradación de las mismas involucraría proteasas cloroplásticas. La participación de proteasas cloroplásticas en la degradación de proteínas tilacoidales estaría respaldada por ensayos con plantas mutantes para dichas proteasas ([Kapri-Pardes et al. 2007](#); [Sun et al. 2010](#); [Želisko et al. 2005](#)).

La degradación diferencial de los distintos componentes fotosintéticos estaría controlada también por factores externos, en especial la irradiancia, probablemente con el fin de minimizar daños colaterales durante el desensamblaje del aparato fotosintético ([Hidema et al. 1992](#); [Humbeck & Krupinska 2003](#)). Entre las proteínas tilacoidales de los complejos fotosintéticos, el citocromo *b<sub>6</sub>f* es degradado rápidamente durante el inicio de la senescencia, volviéndose un paso limitante para el transporte electrónico ([Guiamét et al. 2002](#); [Humbeck et al. 1996](#)). En cuanto a los complejos Fotosistema I y II, las comparaciones entre las velocidades relativas de degradación entre ambos complejos resulta dificultosa experimentalmente, varios análisis muestran un aparente mayor ritmo de degradación para el Fotosistema I ([Jenkins & Woolhouse 1981](#); [Miersch et al. 2000](#); [Tang et al. 2005](#)). Sin embargo, durante la degradación de los complejos de los Fotosistemas I y II, la desaparición de las proteínas de los centros de reacción pareciera ocurrir más rápidamente que las

proteínas de los complejos de las antenas colectoras LHCI y LHCII, respectivamente ([Hidema et al. 1992](#); [Hidema et al. 1991](#); [Humbeck et al. 1996](#); [Kura-Hotta et al. 1987](#); [Miersch et al. 2000](#)).

La degradación de componentes cloroplásticos por parte de la vacuola central, donde se encuentran gran parte de las proteasas de expresión asociada a la senescencia, requiere la existencia de algún mecanismo de transporte desde el cloroplasto ([Martínez et al. 2008](#)). Diferentes autores ([Bourett et al. 1999](#); [Guiamét et al. 1999](#); [Park et al. 1999](#)) han reportado observaciones donde el cloroplasto durante la senescencia pareciera expulsar parte de sus componentes a través de protuberancias o corpúsculos que emanan de él, sugiriendo este mecanismo de degradación de los componentes cloroplásticos. Más recientemente, se han observado pequeñas vesículas conteniendo proteínas cloroplásticas, y careciendo de clorofila, denominadas *RCB* (*RubisCO-Containing Bodies*), dispersas tanto en el citoplasma como en la vacuola central ([Chiba et al. 2003](#); [Ishida et al. 2008](#)). Sin embargo, plantas mutantes *apg* de *Arabidopsis*, las cuales carecen de *RCB*, y que además muestran una senescencia acelerada ([Hanaoka et al. 2002](#); [Yoshimoto et al. 2004](#)), degradan RubisCO a un ritmo similar a las plantas controles ([Wada et al. 2009](#)), lo cual sugeriría la existencia de mecanismos alternativos que no involucran los *RCB*.

En resumen, a pesar del avance registrado en los últimos años con la utilización de las nuevas metodologías llamadas “ómicas”, es poco lo que se conoce sobre el mecanismo de degradación de las proteínas cloroplásticas durante la senescencia.

### ***Degradación de clorofila***

La clorofila es uno de los compuestos orgánicos más abundantes de la naturaleza ([Matile et al. 1996](#)) y también unos de los más importantes. De ella dependen, directa o indirectamente, la mayoría de los organismos vivientes en la biósfera puesto que la clorofila es esencial para la fotosíntesis ([Takamiya et al. 2000](#)). Más de 10<sup>9</sup> toneladas de clorofila se degradan al año mundialmente ([Hendry](#)

[et al. 1987](#)). La degradación de clorofila, y de las proteínas del aparato fotosintético, ocurre con especial intensidad durante la senescencia foliar ([Thomas 2002](#)). La degradación de clorofila tiene lugar durante la senescencia de las hojas en el otoño, en la maduración de frutos, el deterioro post-cosecha de vegetales verdes, en respuesta al ataque por patógenos y en etapas iniciales del desarrollo de flores ([Matile et al. 1999](#)). En especies de cultivo, la senescencia prematura del follaje puede ser una importante limitante del rendimiento. Asimismo el mantenimiento de la actividad fotosintética por un período más prolongado puede aumentar el rendimiento de diversos cultivos de interés ([Borrell & Hammer 2000](#); [He, P. et al. 2004](#)).

La degradación de clorofila es un proceso que requiere un alto grado de control y regulación puesto que los compuestos que se forman inicialmente son altamente fototóxicos ([Mach et al. 2001](#)). En este sentido, la degradación de la clorofila involucra varias etapas ([Fig. 1.16](#)) en las cuales se destruyen las propiedades foto-dinámicas de los compuestos intermediarios por la disrupción del sistema conjugado de electrones  $\pi$  ([Hörtensteiner 2004](#)). Por otro lado, la formación de estos compuestos podría ser beneficiosa para la planta bajo ciertas circunstancias como por ejemplo el ataque de organismos patógenos ya que aumentarían indirectamente la formación de compuestos aún más tóxicos para el organismo invasor (v.g. especies reactivas del oxígeno, [Kariola et al. 2005](#); [Reinbothe et al. 2009](#)). Asimismo, se postula actualmente un rol anti-oxidativo de los catabolitos finales de la clorofila ([Müller et al. 2007](#)).

A pesar de que la primera enzima involucrada en el catabolismo de clorofila, la clorofilasa, fue descubierta hace un siglo por A. Stoll durante su trabajo doctoral bajo la dirección del posteriormente premio Nobel R. Willstätter ([Willstätter & Stoll 1911](#)), y es además la primera enzima aislada y purificada, sólo recientemente se ha conseguido avanzar sobre su conocimiento y el de enzimas involucradas en etapas posteriores del proceso. Con el avance de la biología molecular y la ingeniería genética en las últimas décadas, se han conseguido identificar varios de los genes correspondientes a las enzimas involucradas en el catabolismo de la clorofila ([Takamiya et al. 2000](#)). Sin embargo, gran parte del proceso permanece desconocido, y existen incertidumbres sobre el posible funcionamiento de vías alternativas de

degradación de clorofila ([Takamiya et al. 2000](#)). Durante la senescencia se desencadenan una serie de eventos que varían notablemente según cuales sean las causas que la iniciaron ([Buchanan-Wollaston et al. 2005](#)). Varios estudios transcriptómicos muestran que distintos sets de genes se expresan en hojas que “senescen” normalmente adheridas, o separadas de la planta, o en respuesta a hormonas que aceleran la senescencia ([Buchanan-Wollaston et al. 2003](#); [He, Y. et al. 2001](#)) Por tanto no es extraño que exista más de una vía de degradación de la clorofila y sus complejos proteicos, y más aún que la verdadera función de las diversas isoformas de las clorofilasas en muchas especies aún sea desconocida ([Chen, L.-F.O. et al. 2008](#); [Schenk et al. 2007](#))

El primer paso en el proceso catabólico de la clorofila corresponde a la defitilación de la misma ([Fig. 1.16](#)), catalizada por la clorofilasa [clorofila-clorofilido hidrolasa, E.C. 3.1.1.14]. En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado dos genes (*ATCLH1* y *ATCLH2*) cuyos productos dan enzimas con esta actividad catalítica. Estas isoenzimas difieren en varias características, como ser su secuencia de aminoácidos, señales de tránsito y localización, e incluso señales de activación hormonales y externas ([Benedetti et al. 1998](#); [Liao et al. 2007](#)). En especial, es interesante que, mientras *ATCLH2* posee una secuencia típica de un péptido de tránsito para localización cloroplástica, *ATCLH1* estaría dirigida a la vía secretoria. Algo similar ocurre con los correspondientes genes ortólogos en *Citrus sinensis* ([Jacob-Wilk et al. 1999](#)) y *Chenopodium album* ([Tsuchiya et al. 1999](#)). Se desconoce actualmente el significado de la existencia de estas isoformas de la clorofilasa y sus roles ponderados en el proceso de degradación.

Aún menos conocido es el proceso por el cual la clorofila, que se encuentra formando parte de complejos proteicos en los fotosistemas, se pone en contacto con la clorofilasa. En estudios de fraccionamiento subcelular, la clorofilasa cloroplástica aparece localizada en la membrana externa del cloroplasto, separada de las clorofilas de las membranas tilacoidales ([Matile & Schellenberg 1996](#)), y en experimentos de expresión transiente las clorofilasas aparecen en estructuras esféricas, no caracterizadas hasta el momento, pero claramente fuera de los cloroplastos ([Schenk et al. 2007](#)). Es decir que la etapa previa al primer paso catabólico que es la defitilación mencionada precedentemente, requiere el desmantelamiento de los

fotosistemas y desensamblaje de la clorofila de sus complejos, y el transporte de las clorofilas al menos hasta la membrana externa del cloroplasto ([Matile 2001](#)) o alguna estructura extra-plastídica ([Guiamét et al. 1999](#)).

Los conocimientos de los procesos de degradación de clorofila son potencialmente útiles en la industria, agricultura, farmacéutica y horticultura, donde puede ser necesario retrasar o acelerar la degradación de clorofila, ya sea por ingeniería genética o por otros métodos. Por ejemplo, el retraso podría mantener el color verde de las hojas y por tanto la apariencia fresca de los vegetales, o podría incrementar el rendimiento de cereales y oleaginosas. Su aceleración podría aumentar la facilidad con que se elimina la clorofila o sus derivados contaminantes en productos elaborados a partir de vegetales, resultando en un incremento de su valor comercial ([Takamiya et al. 2000](#)).

### ***Las Vacuolas Asociadas a la Senescencia***

Hasta hace poco tiempo atrás, se pensaba que el único compartimento lítico de las células vegetales era la vacuola central, la cual además cumplía otras funciones importantes para la célula, como detoxificación, homeostasis celular general, depósito de iones y pigmentos, etc. ([Marty 1999](#)). Sin embargo, recientemente se ha encontrado que las células senescentes poseen, además de la vacuola central, pequeños compartimentos ácidos con alta actividad proteolítica ([Otegui et al. 2005](#)).

Estos pequeños compartimentos ácidos, denominados *Vacuolas Asociadas a la Senescencia* (VAS), se observan sólo en células conteniendo cloroplastos senescentes. Estas VAS poseen un tamaño aproximado de 0,5 – 0,8µm de diámetro, y están limitadas por una membrana simple. En la membrana de las VAS podemos encontrar la transportadora de protones vacuolar mediada por pirofosfato [V-(H<sup>+</sup>)PPasa], la cual a su vez se encuentra en el tonoplasto (membrana de la vacuola central), pero las VAS carecen de la acuaporina γ-TIP presente en el tonoplasto, y además son más ácidas que la vacuola central ([Otegui et al. 2005](#)).

Las VAS representan un compartimento de alta actividad proteolítica durante la senescencia. Se ha caracterizado la presencia de proteasas cisteínicas en su interior utilizando un sustrato fluorogénico específico para proteasas cisteínicas (R-6502), y plantas transgénicas expresando la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) fusionada SAG12, la cual es una proteasa cisteínica con alta actividad durante la senescencia ([Otegui et al. 2005](#)). Así mismo, la existencia en las VAS de fluorescencia roja característica de la clorofila, marcaría una semejanza con los compartimentos observados previamente “emergiendo” de cloroplastos senescentes ([Guiamét et al. 1999](#)).

Estos datos sugerirían que las VAS, estarían actuando a modo de transportador de componentes cloroplásticos, y recibiendo a su vez componentes extra-plastídicos, finalizando su degradación posiblemente en la vacuola central.



## **HIPÓTESIS DE LA TESIS**

Las hipótesis principales de este trabajo son:

- *Las “Vacuolas Asociadas a la Senescencia” participan de una vía extra-plastídica para la degradación de clorofila.*
- *La existencia de isoformas de clorofilasa, codificadas por genes distintos en varias especies y con diferentes localizaciones subcelulares, indica que existen vías diferentes de degradación de clorofila, operando en distintos momentos del desarrollo o bajo distintas situaciones ambientales.*

## **OBJETIVOS DE LA TESIS**

### **Objetivo General**

Dilucidar el mecanismo y regulación de las primeras etapas de la degradación de la clorofila durante la senescencia foliar utilizando *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. y *Nicotiana tabacum* L. como plantas modelo.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar los complejos clorofila-proteína presentes en las VAS de *N. tabacum* y el mecanismo de degradación de la clorofila en dichas organelas.
2. Realizar un análisis funcional de las clorofilasas de *A. thaliana* mediante el uso de mutantes *Knock Out* (simples y doble) de *ATCHL1* y *ATCHL2* evaluando inicialmente las características fenotípicas de las plantas y efectos pleiotrópicos debidos a las mutaciones.
3. Evaluar el rol de las clorofilasas de *Arabidopsis* durante la senescencia foliar, su localización subcelular, y su participación en el proceso de degradación de las clorofilas en las VAS.

## **FIGURAS**

Figura 1.1 – Representación generalizada de una célula vegetal.

En este esquema se puede observar una célula vegetal de tejidos fotosintéticos. Imagen realizada por Russell Kightley.

<http://www.sciencephoto.com/media/10538/view>

Figura 1.1

# La célula vegetal

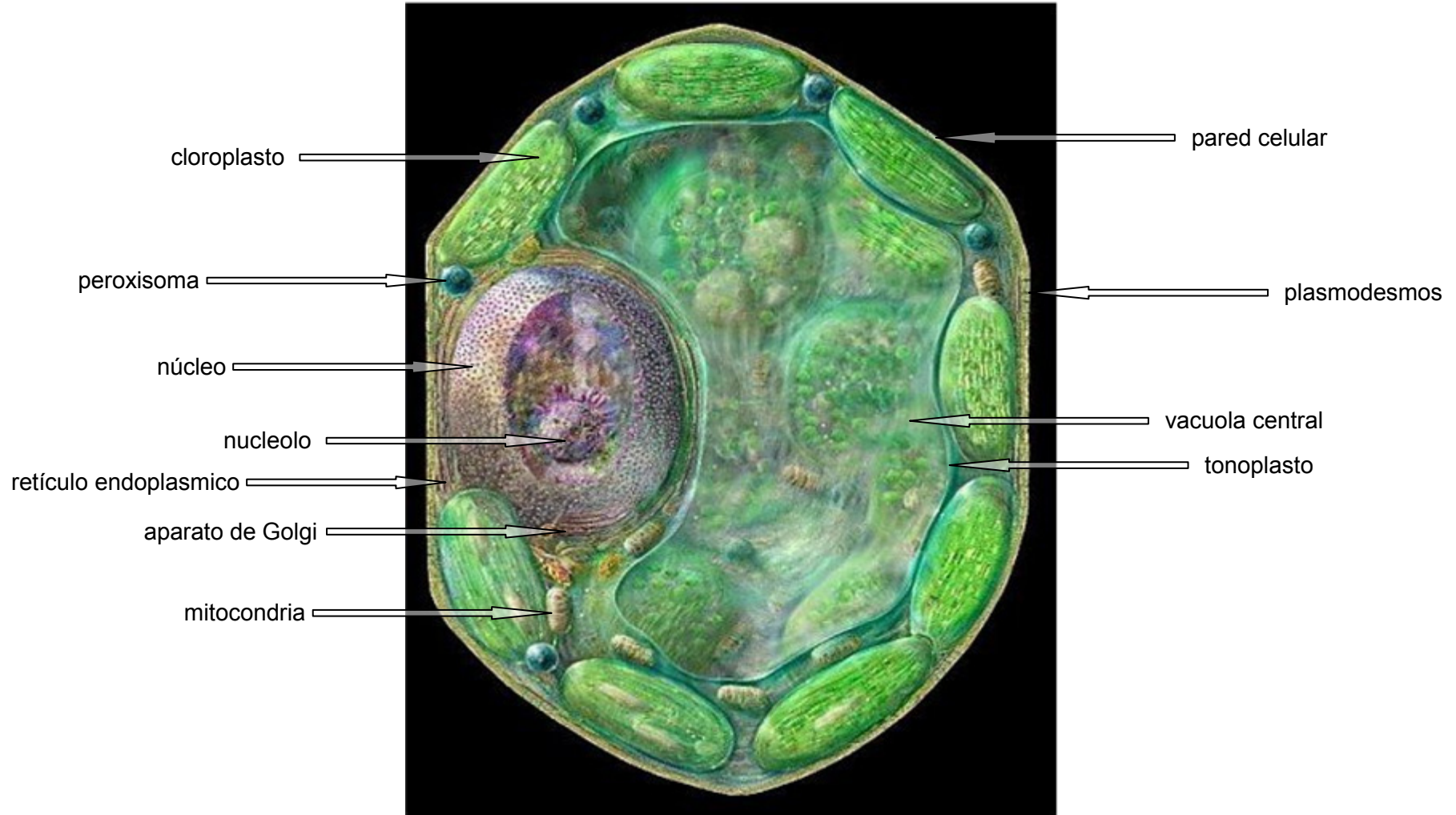


Figura 1.2 – Representación de los distintos tipos de *Plastos* y sus diferentes interrelaciones.

Imagen realizada por Mariana Ruiz Villarreal.

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plastids\\_types\\_es.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plastids_types_es.svg)

Figura 1.2

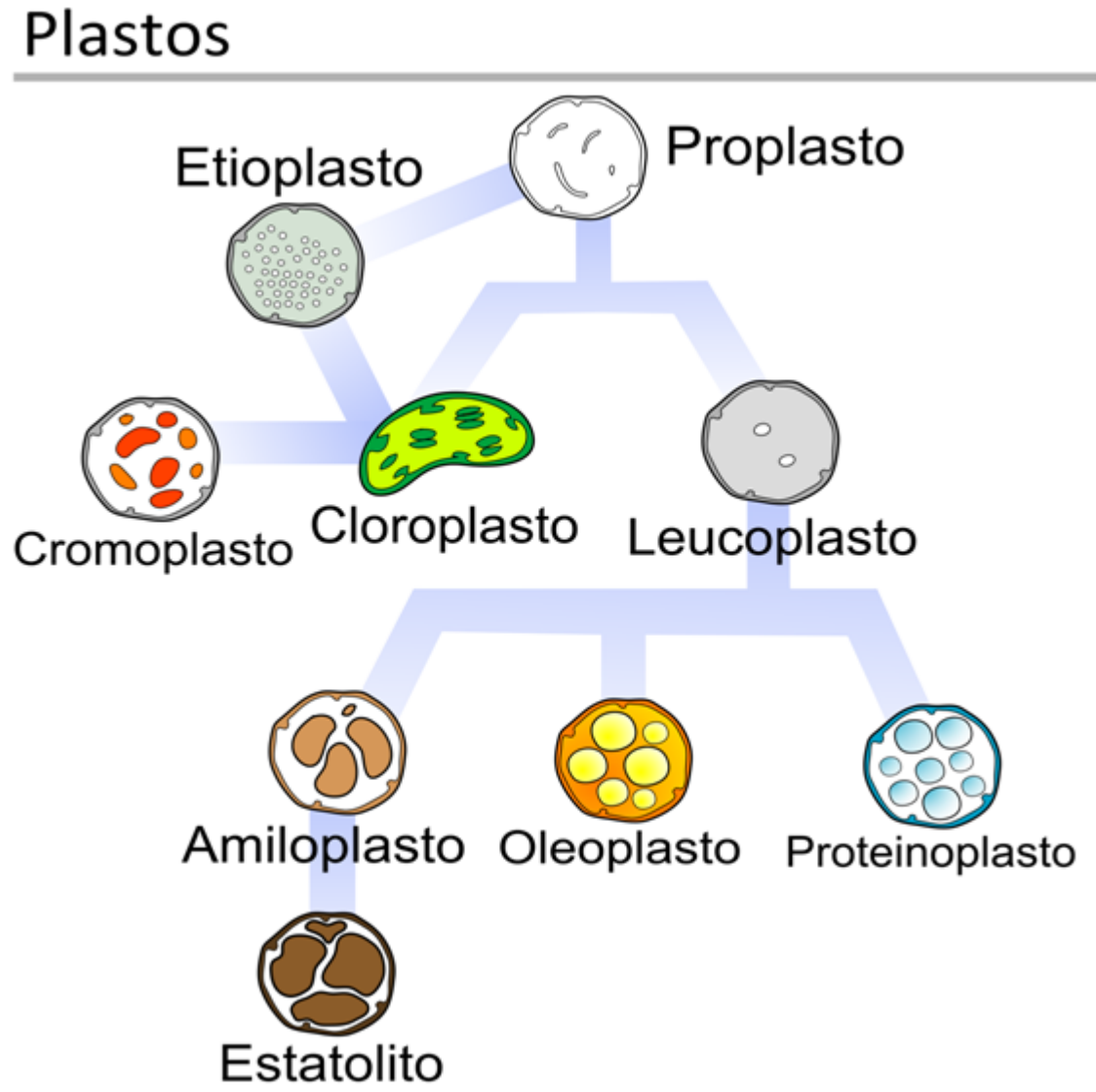


Figura 1.3 – El cloroplasto.

(A) Representación gráfica del cloroplasto. Imagen realizada por Russell Kightley.

<http://www.sciencephoto.com/media/10703/view>

(B) Microfotografía electrónica (con colores artificiales) de un cloroplasto de una hoja de tabaco. Imagen tomada por Jeremy Burgess.

<http://www.sciencephoto.com/media/10671/view>

Figura 1.3

A

# El cloroplasto

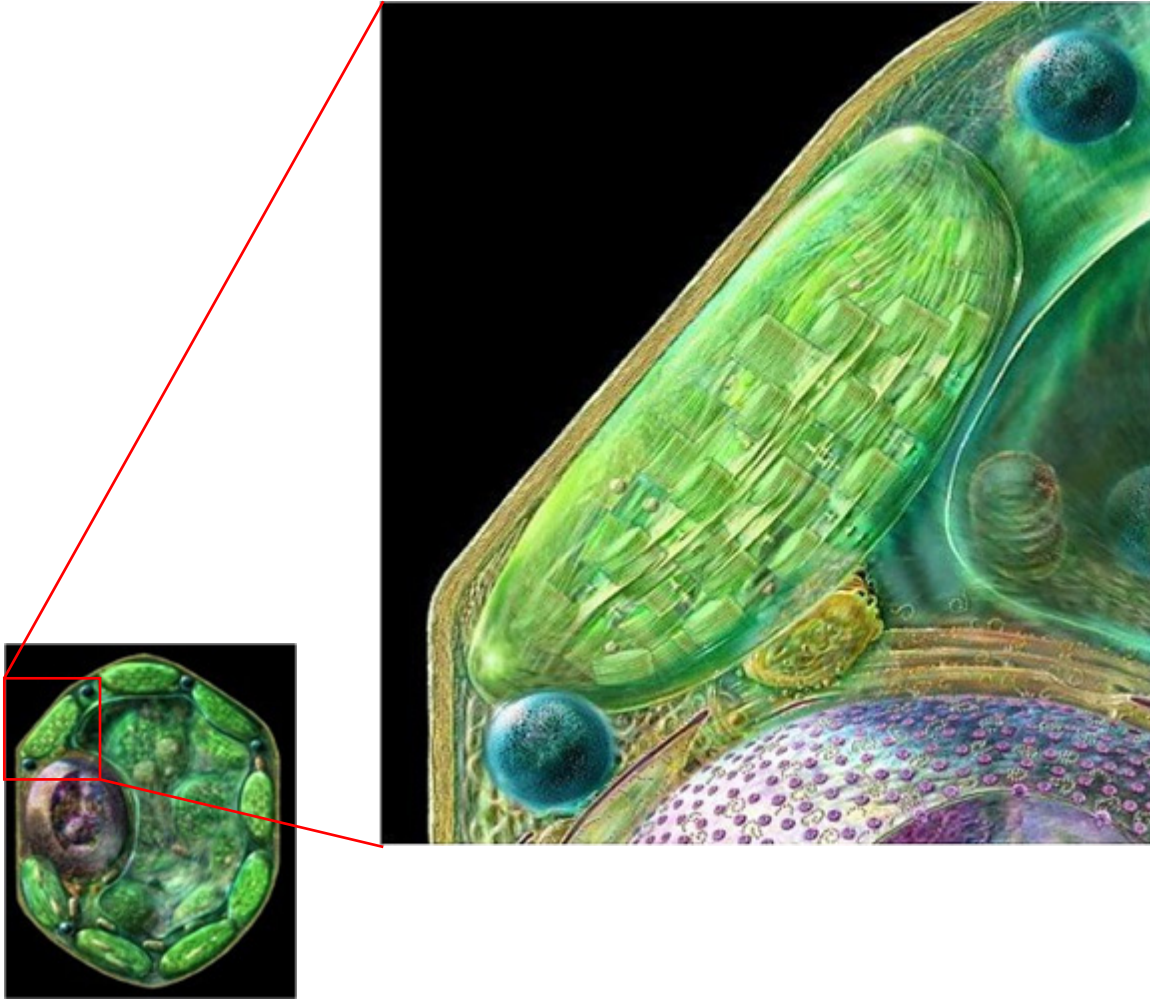




Figura 1.3

B



Figura 1.4 – Descripción general de la organización de los tilacoides de los grana y estromáticos.

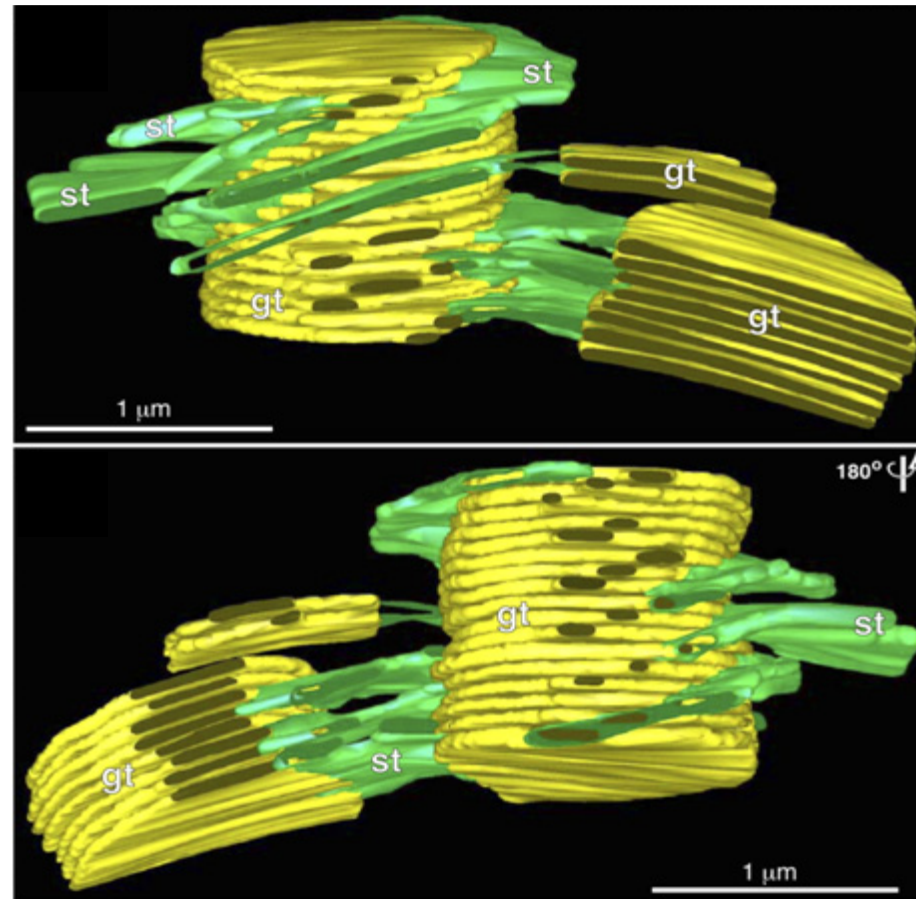
Imágenes tomadas de [Austin & Staehelin 2011](#).

gt: tilacoides de los grana

st: tilacoides estromáticos

Figura 1.4

Descripción general de la organización de los tilacoides del grana y estromáticos



Austin J. & Staehelin L. (2011) *Plant Physiol*;155,1601-1611

Figura 1.5 – Modelo esquemático de los mayores complejos proteicos de la membrana tilacoidal involucrados en la fotosíntesis.

Imágenes tomadas del *website* del Dr. Jon Nield (<http://queenmaryphotosynthesis.org/nield/psIIimages/oxygenicphotosynthmodel.html>).

- (A) Representación completa de los complejos.
- (B) Ampliación del complejo del Fotosistema II.
- (C) Ampliación del complejo del Citocromo *b<sub>6</sub>f*.
- (D) Ampliación del complejo del Fotosistema I.
- (E) Ampliación del complejo de ATP Sintasa.

Figura 1.5 A

### Modelo esquemático de los mayores complejos proteicos de la membrana tilacoidal involucrados en la fotosíntesis

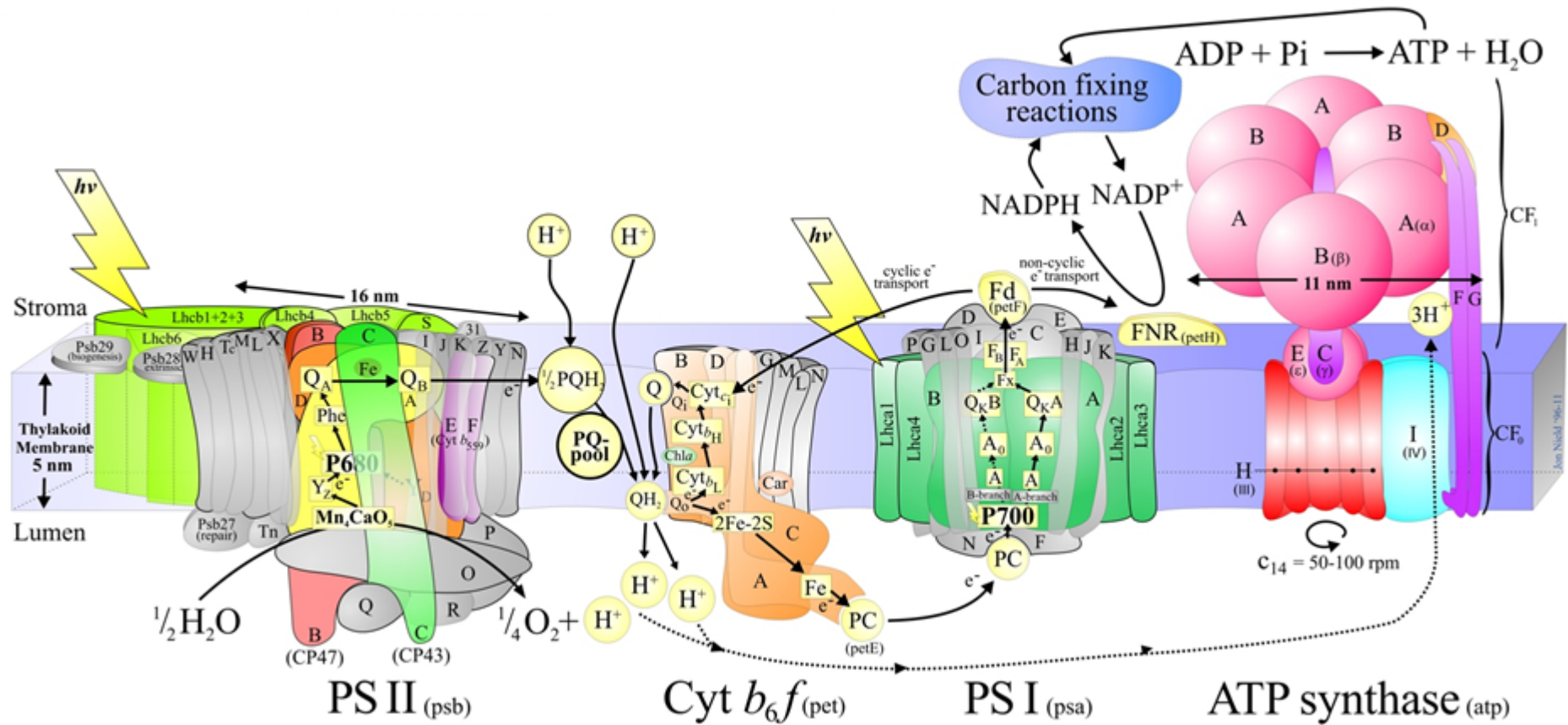


Figura 1.5

B

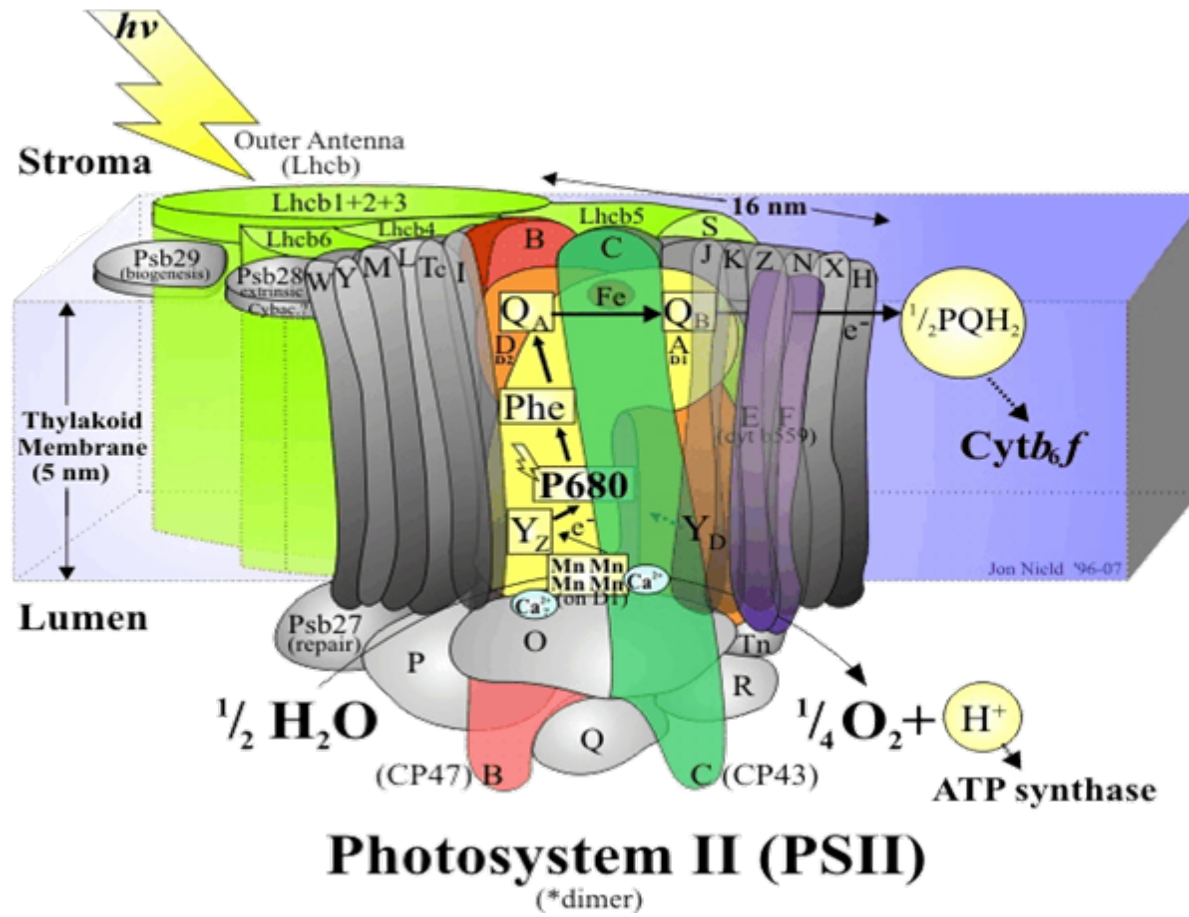


Figura 1.5 C

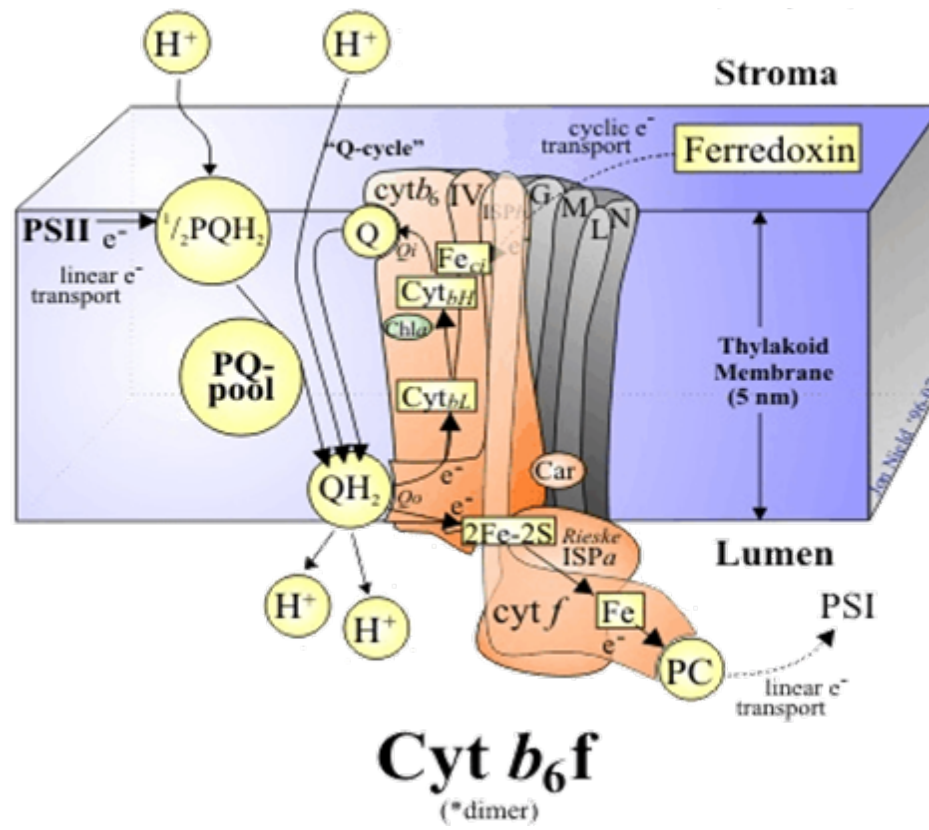
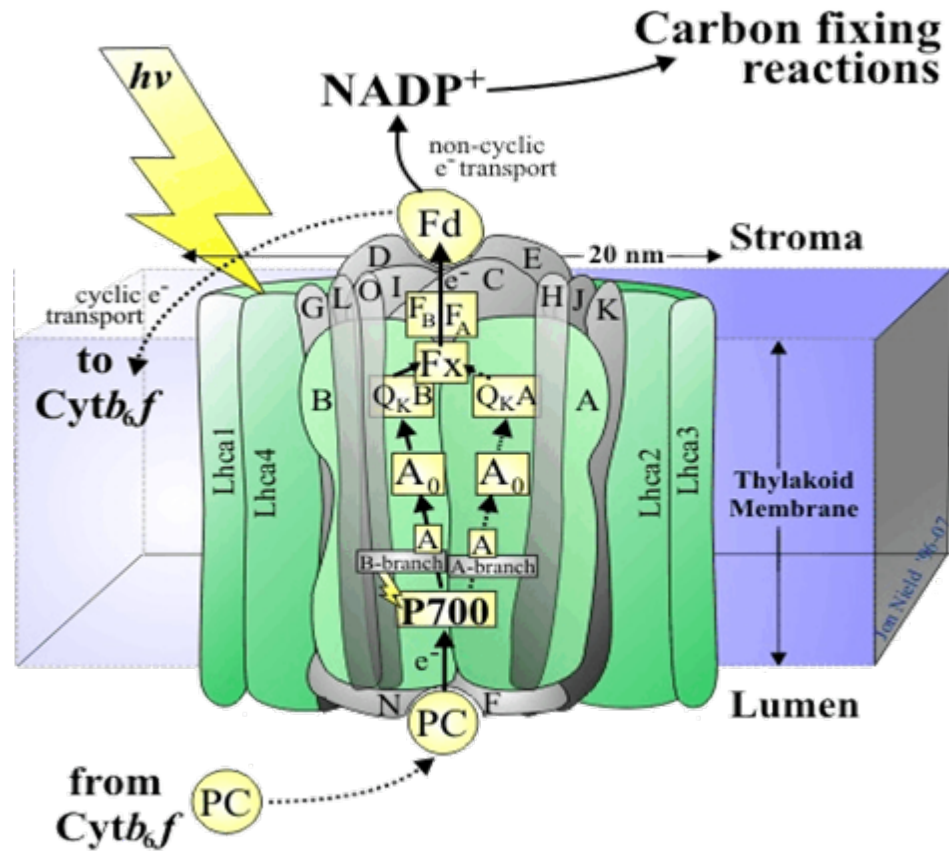


Figura 1.5

D



## Photosystem I (PSI)

(\*monomer - higher plants; trimer - cyanobacteria)



Figura 1.5

E

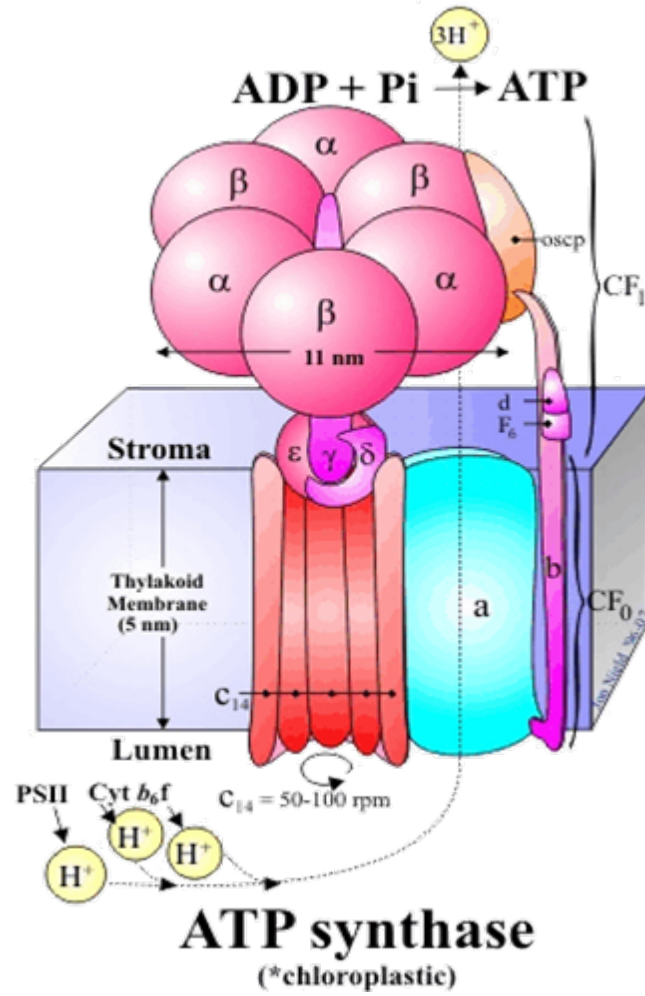


Figura 1.6 – Modelo del sistema de membranas tilacoidales con la distribución de los complejos mayores en las distintas zonas de las mismas.

Imágenes tomadas de [Albertsson 2001](#).

(A) Regiones internas de la membrana tilacoidal.

(B) Modelo de la membrana tilacoidal.

Figura 1.6

Modelo del sistema de membranas tilacoidales con la distribución de los complejos mayores en las distintas zonas de las mismas

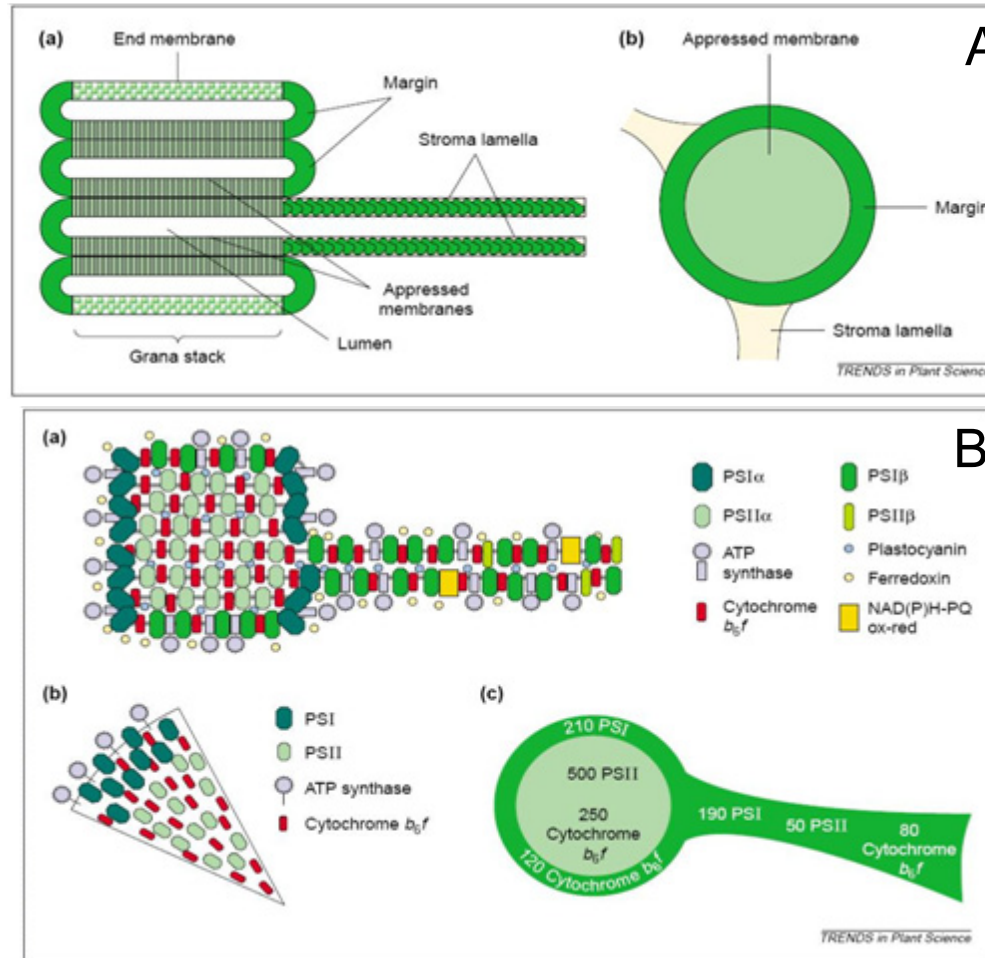


Figura 1.7 – Representación de la estructura de la molécula de clorofila *a*.

Se muestra con color el sistema de dobles enlaces conjugados en el anillo de clorina. También se señalan las diferencias en la estructura de la molécula en comparación con las moléculas de clorofila *b* y bacterioclorofilas. En color azul se indica, utilizando la nomenclatura de IUPAC, los anillos porfirínicos (A-D), el isocíclico ciclopentanona (E), y la numeración para la mayoría de los átomos de carbono del anillo y los sustituyentes (1-20).

Figura 1.7

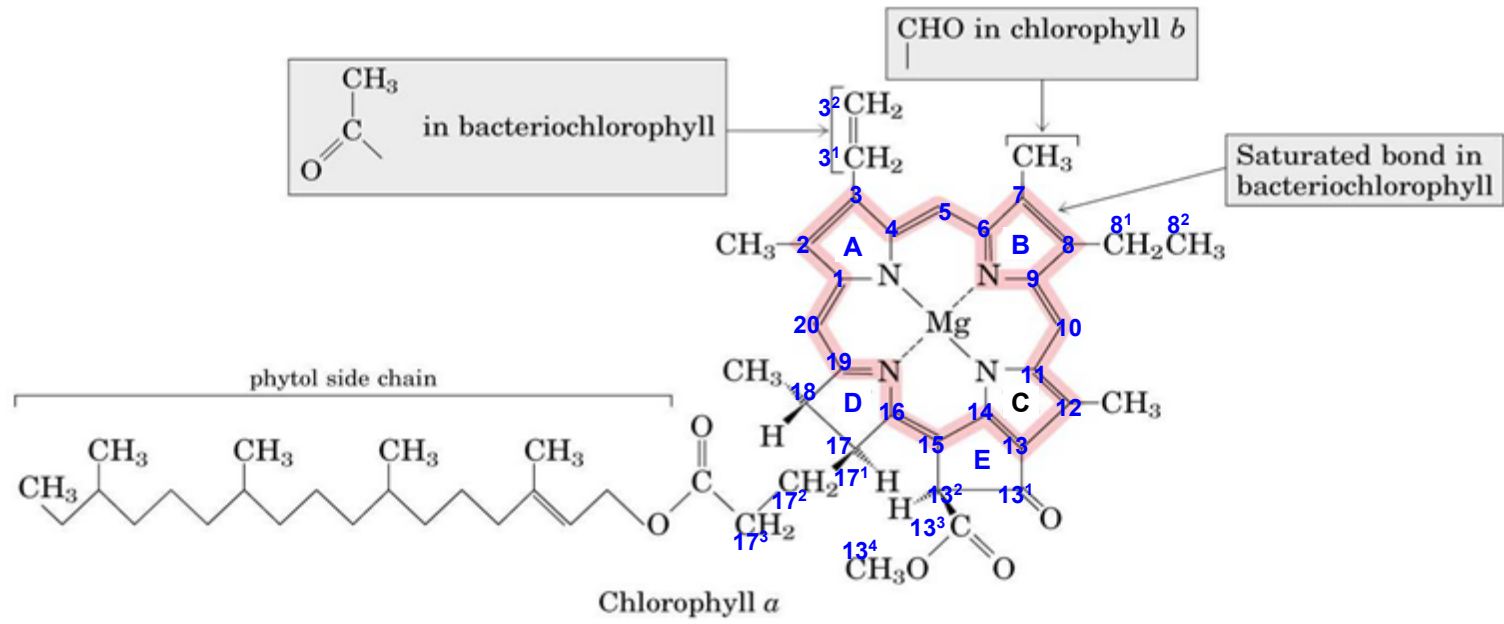


Figura 1.8 – Propiedades ópticas y electrónicas de las moléculas de clorofila.

(A) Espectrograma de absorción de clorofila *a* y *b*, y bacterioclorofila *a* y *b*.

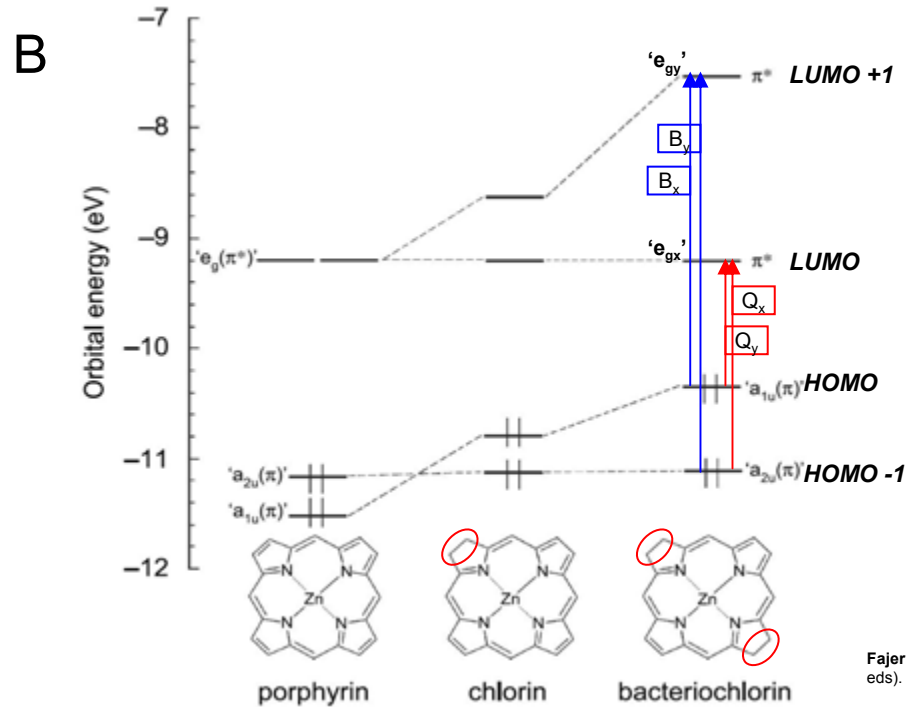
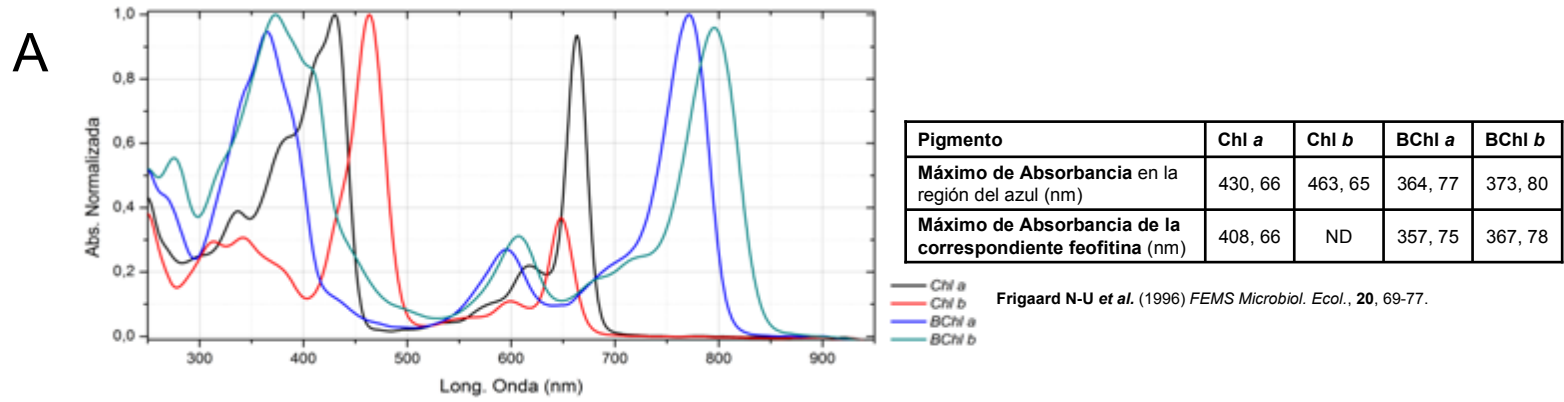
En la tabla se indica la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia de la banda de Soret, y su equivalente (bacterio)feofitina correspondiente.

Los datos para el espectrograma fueron tomados de <http://www.bio.ku.dk/nuf/resources/scitab/chlabs/index.htm>, y se corresponden con [Frigaard \*et al.\* 1996](#).

(B) Diagrama de los niveles energéticos HOMO-LUMO correspondientes para los anillos heterocíclicos de porfirina, clorina y bacterioclorina, complejando un catión de zinc. Se demarcan en los círculos rojos los simples enlaces C-C, que están ausentes en las porfirinas.

El diagrama fue tomado de [Fajer 2005](#).

Figura 1.8



Fajer J. (2005) In *Discoveries in Photosynthesis* (Govindjee, Beatty, J.T., Gest, H. and Allen, J.F. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 205-212.

Figura 1.9 – Propiedades ópticas y electrónicas de las moléculas de los pigmentos fotosintéticos.

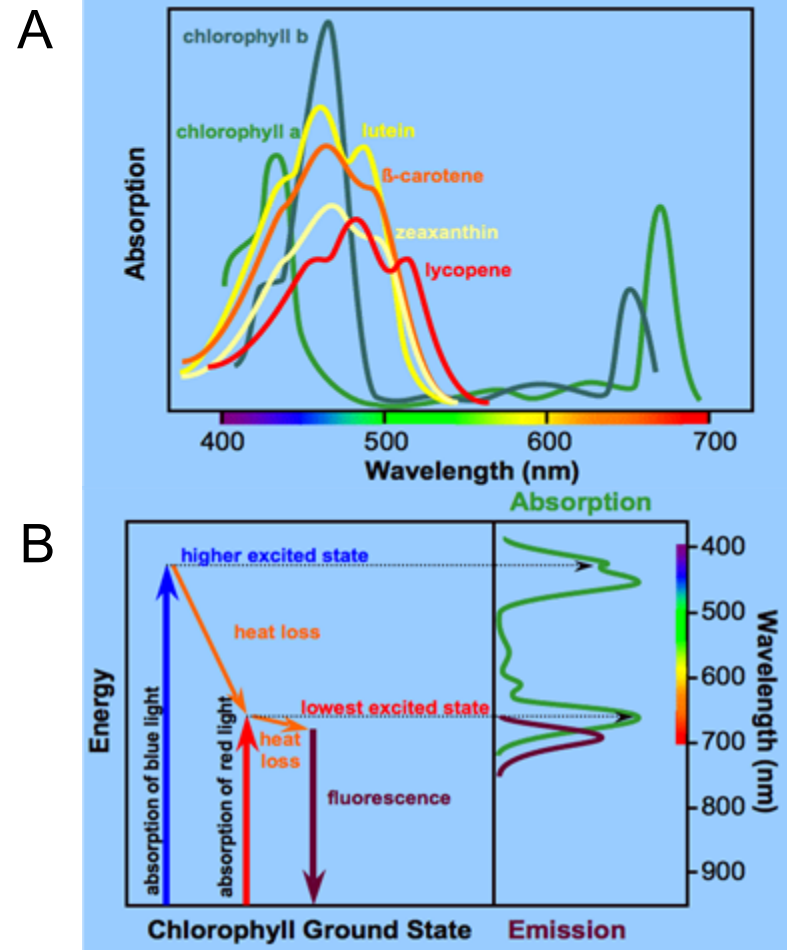
(A) Espectrograma de absorción de clorofila *a* y *b*, y otros carotenoides presentes en los complejos fotosintéticos.

(B) Esquema de transiciones electrónicas de absorción y emisión fluorescente de (bacterio)clorofila, mostrando en forma conjunta ambos espectrogramas.

Imágenes tomadas de Koning, R.E. (1994) Light. *Plant Physiology Information Website*. [http://plantphys.info/plant\\_physiology/light.shtml](http://plantphys.info/plant_physiology/light.shtml). (27-9-2011).



Figura 1.9



Koning RE (1994) *Plant Physiology Information Website*.  
[http://plantphys.info/plant\\_physiology/light.shtml](http://plantphys.info/plant_physiology/light.shtml) (9-27-2011).

Figura 1.10 – Patrones de senescencia foliar.

(A) Senescencia progresiva o secuencial.

(B) Senescencia sincrónica o decidua.

(C) Senescencia de la parte superior.

(D) Senescencia completa.

Imagen tomada de *SenWiki*. [http://www.sidthomas.net/SenWiki/tiki-index.php?page\\_ref\\_id=294](http://www.sidthomas.net/SenWiki/tiki-index.php?page_ref_id=294)

Figura 1.10

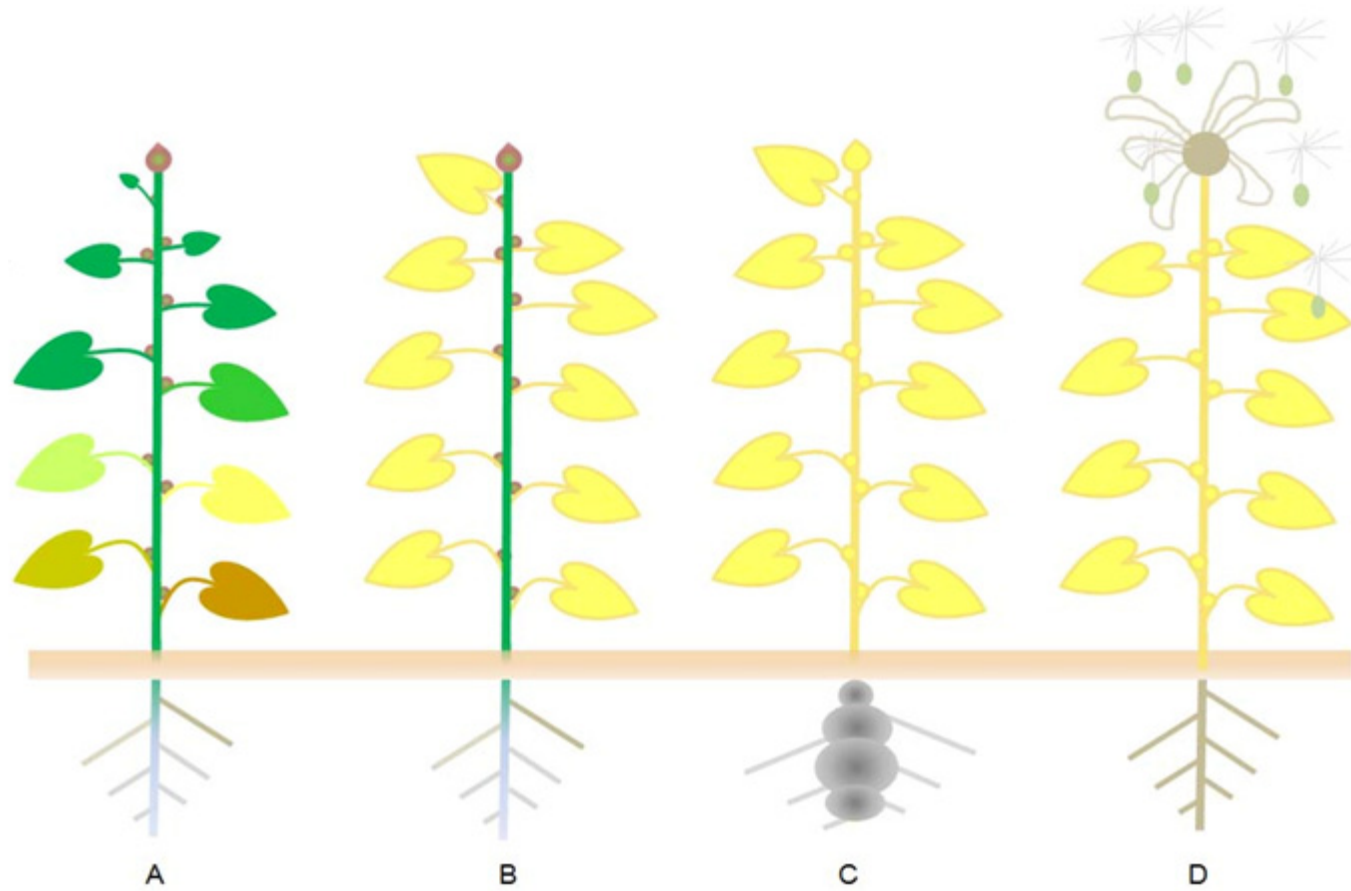


Figura 1.11 – Características de la senescencia de la planta entera y foliar de *Arabidopsis*.

Se muestra en las imágenes las características típicas de (a) una planta entera y (b) de la tercera hoja de *Arabidopsis* creciendo a “día largo” (fotoperíodo 16h de luz) indicando tiempo de su ciclo de vida.

Imágenes tomadas de [Lim et al. 2007](#).

Figura 1.11

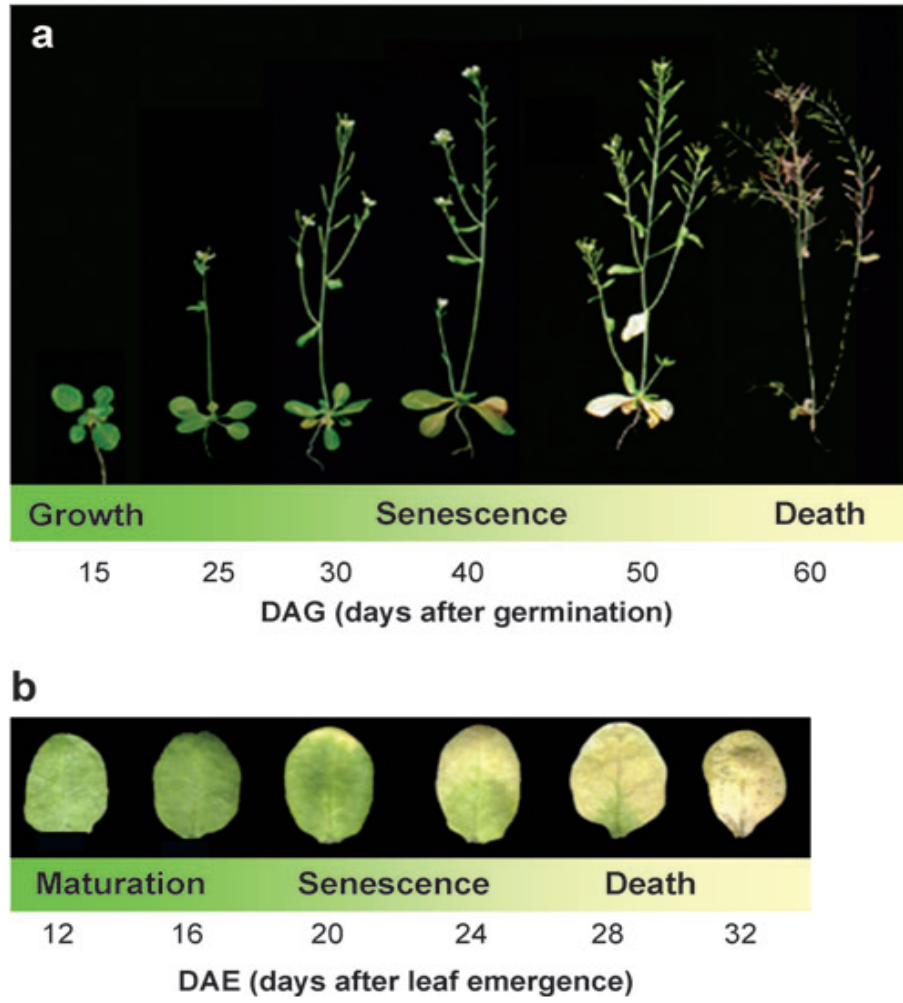


Figura 1.12 – Características de la senescencia de la planta entera de *Nicotiana tabacum*.

Imagen modificada de

<http://www.turbosquid.com/FullPreview/Index.cfm/ID/545381>

Figura 1.12

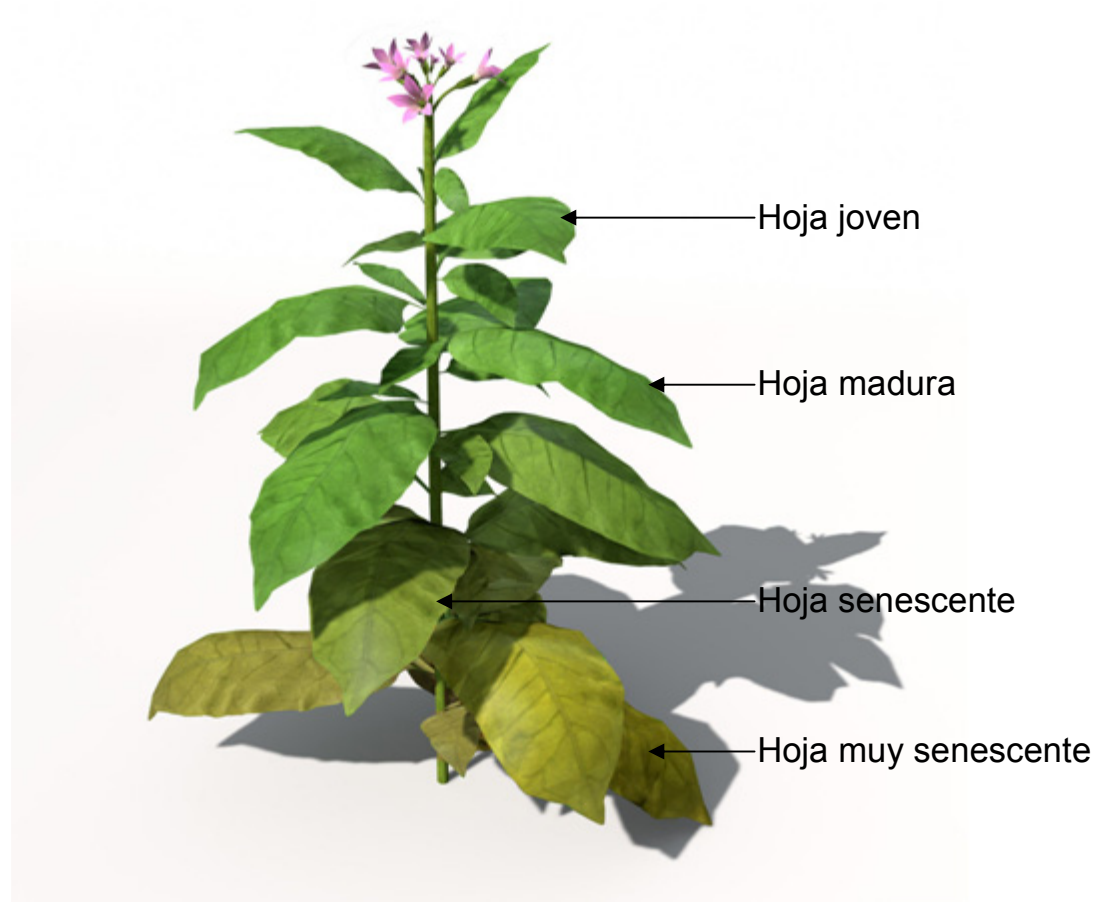


Imagen modificada de

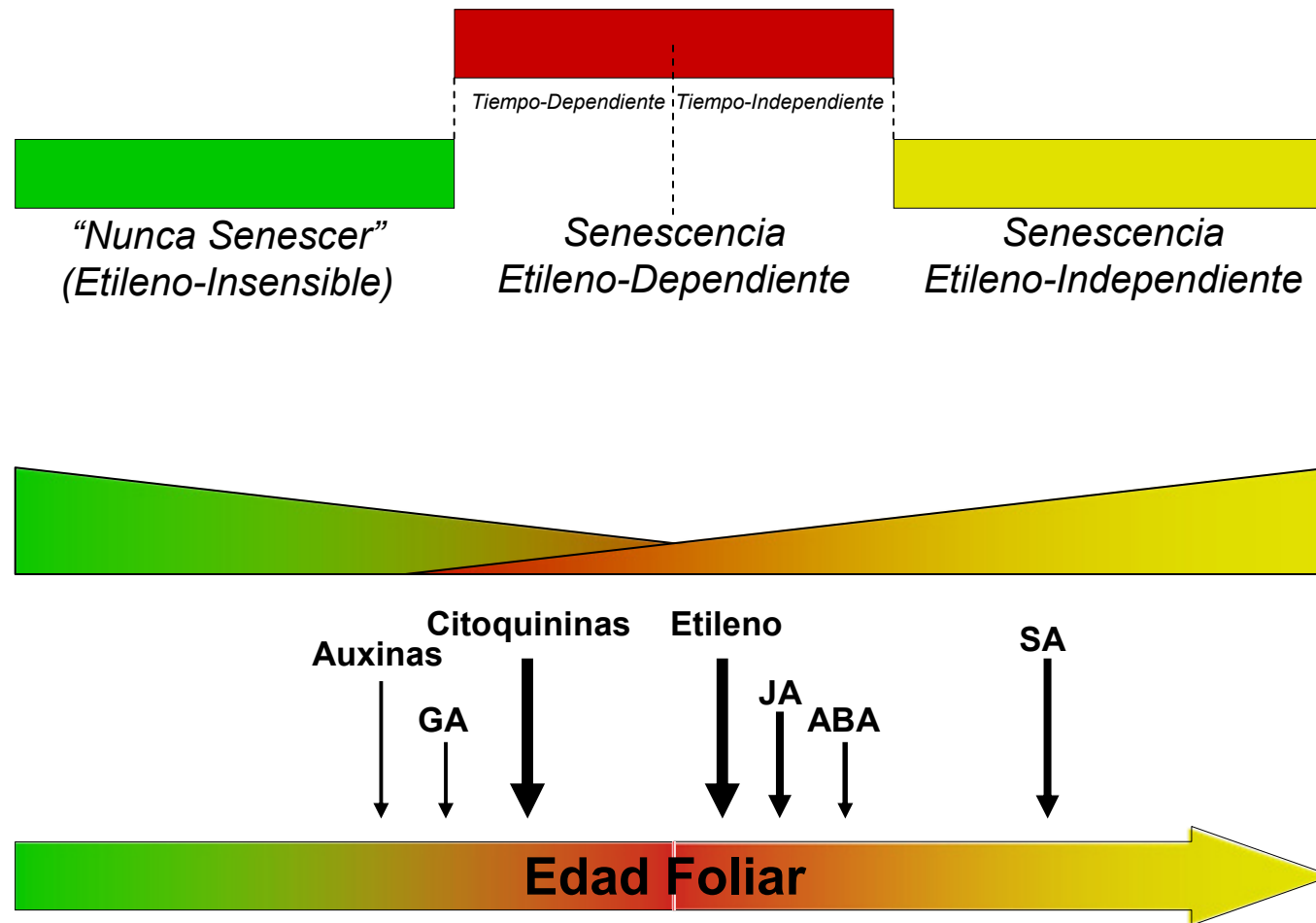
<http://www.turbosquid.com/FullPreview/Index.cfm/ID/545381>

Figura 1.13 – Concepto de ventana de la senescencia.

Imagen adaptada y modificada de [Schippers \*et al.\* 2007](#).



Figura 1.13

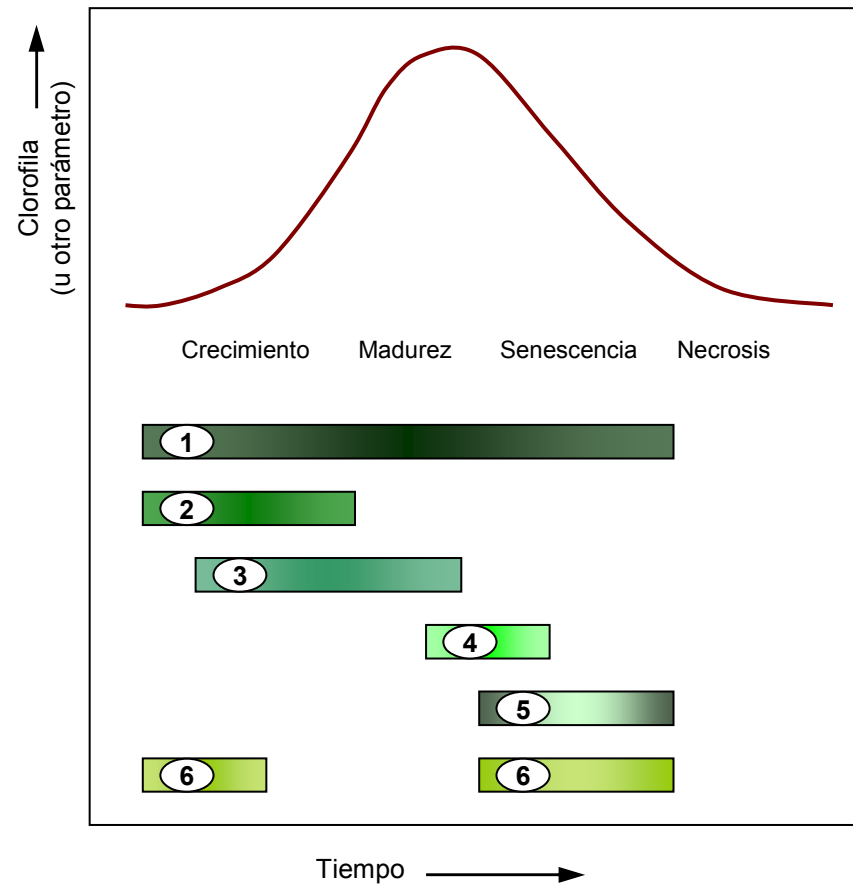


Schippers JHM et al. (2007) In *Annual Plant Reviews*, Vol. 26: *Senescence Processes in Plants* (Gan, S. ed.), pp. 145-170.

Figura 1.14 – Expresión de genes relacionados con la senescencia.

Imagen adaptada y modificada de [Smart 1994](#).

Figura 1.14



Smart, C.M. (1994) *New Phytol.*, 126, 419-448.

Figura 1.15 – Transición cloroplasto-gerontoplasto.

Se observan los cambios estructurales que ocurren en el cloroplasto (paneles inferiores) a medida que progresa la senescencia foliar, comparativamente con los cambios externos que se observan en la hoja (paneles superiores).

Imagen tomada y adaptada de [Keskitalo \*et al.\* 2005](#)

Figura 1.15

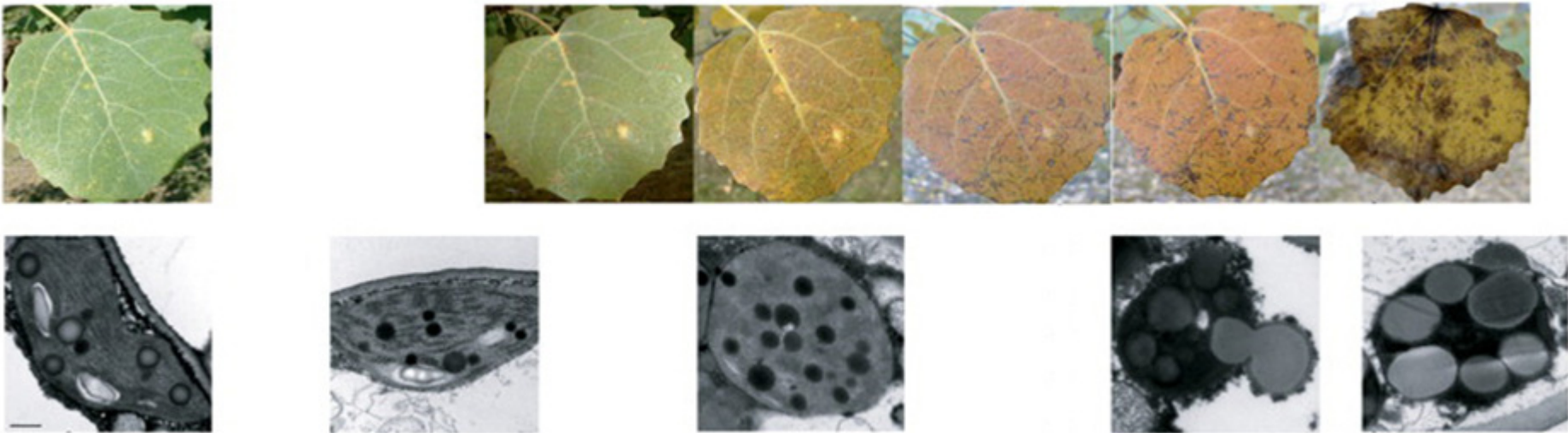


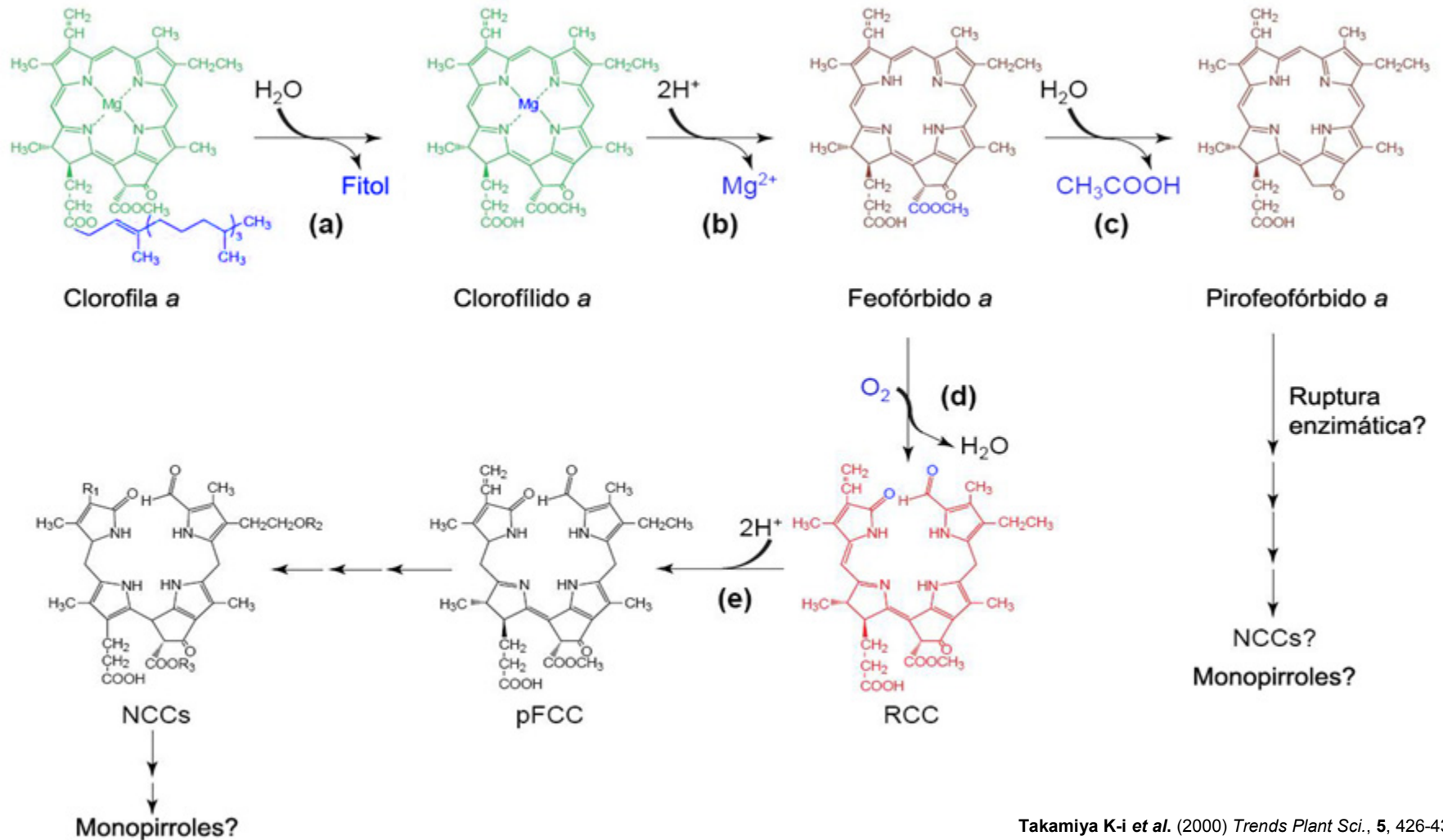
Figura 1.16 – Esquema de la vía de degradación de clorofila.

Se indican con color azul las modificaciones enzimáticas en cada etapa para el compuesto correspondiente. Entre paréntesis se indican las enzimas involucradas en cada etapa: **(a)** Clorofilasa; **(b)** Magnesio de-quelatasa; **(c)** Feoforbidasas; **(d)** Feofórbido *a* oxigenasa; **(e)** RCC Reductasa.

Abreviaciones: RCC, *Red Chlorophyll Catabolite*; pFCC, *primary Fluorescent Chlorophyll Catabolite*; NCCs, *Nonfluorescent Chlorophyll Catabolites*

Imagen tomada y adaptada de [Takamiya et al. 2000](#).

Figura 1.16



Takamiya K-i et al. (2000) *Trends Plant Sci.*, 5, 426-431.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Adam, Z. and Clarke, A.K.** (2002) Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends Plant Sci.*, **7**, 451-456.
- Åkerlund, H.-E., Andersson, B. and Albertsson, P.-Å.** (1976) Isolation of Photosystem II enriched membrane vesicles from spinach chloroplasts by phase partition. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **449**, 525-535.
- Albertsson, P.-Å.** (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends Plant Sci.*, **6**, 349-354.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. and Ecker, J.R.** (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- Allen, J.F. and Holmes, N.G.** (1986) A general model for regulation of photosynthetic unit function by protein phosphorylation. *FEBS Lett.*, **202**, 175-181.
- Andersson, A., Keskitalo, J., Sjodin, A., Bhalerao, R., Sterky, F., Wissel, K., Tandre, K., Aspeborg, H., Moyle, R., Ohmiya, Y., Bhalerao, R., Brunner, A., Gustafsson, P., Karlsson, J., Lundeberg, J., Nilsson, O., Sandberg, G., Strauss, S., Sundberg, B., Uhlen, M., Jansson, S. and Nilsson, P.** (2004) A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biol.*, **5**, R24.
- Andersson, B. and Åkerlund, H.-E.** (1978) Inside-out membrane vesicles isolated from spinach thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **503**, 462-472.
- Andersson, B. and Anderson, J.M.** (1980) Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **593**, 427-440.
- Austin, J.R., II and Staehelin, L.A.** (2011) Three-Dimensional Architecture of Grana and Stroma Thylakoids of Higher Plants as Determined by Electron Tomography. *Plant Physiol.*, **155**, 1601-1611.
- Bachmann, A., Fernández-López, J., Ginsburg, S., Thomas, H., Bouwkamp, J.C., Solomos, T. and Matile, P.** (1994) Stay-green genotypes of *Phaseolus vulgaris* L.: chloroplast proteins and chlorophyll catabolites during foliar senescence. *New Phytol.*, **126**, 593-600.
- Bárcena, M. and Koster, A.J.** (2009) Electron tomography in life science. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **20**, 920-930.
- Barsan, C., Sanchez-Bel, P., Rombaldi, C., Egea, I., Rossignol, M., Kuntz, M., Zouine, M., Latché, A., Bouzayen, M. and Pech, J.-C.** (2010) Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J. Exp. Bot.*, **61**, 2413-2431.



- Becker, W. and Apel, K.** (1993) Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta*, **189**, 74-79.
- Bechtold, U., Karpinski, S. and Mullineaux, P.M.** (2005) The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signalling responses in plant-biotrophic pathogen interactions. *Plant, Cell Environ.*, **28**, 1046-1055.
- Behera, R.K., Mishra, P.C. and Choudhury, N.K.** (2002) High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *J. Plant Physiol.*, **159**, 967-973.
- Benedetti, C.E., Costa, C.L., Turcinelli, S.R. and Arruda, P.** (1998) Differential Expression of a Novel Gene in Response to Coronatine, Methyl Jasmonate, and Wounding in the *Coil* Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **116**, 1037-1042.
- Bennett, M., Bellini, C. and Van Der Straeten, D.** (2005) Integrative biology: dissecting cross-talk between plant signalling pathways. *Physiol. Plant.*, **123**, 109-109.
- Berger, S.** (2002) Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta*, **214**, 497-504.
- Bhalerao, R., Keskitalo, J., Sterky, F., Erlandsson, R., Bjorkbacka, H., Birve, S.J., Karlsson, J., Gardstrom, P., Gustafsson, P., Lundeberg, J. and Jansson, S.** (2003) Gene Expression in Autumn Leaves. *Plant Physiol.*, **131**, 430-442.
- Björkman, O. and Demmig, B.** (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, **170**, 489-504.
- Borrell, A.K. and Hammer, G.L.** (2000) Nitrogen dynamics and the physiological basis of stay-green in Sorghum. *Crop Sci.*, **40**, 1295-1307.
- Bourett, T.M., Czymmek, K.J. and Howard, R.J.** (1999) Ultrastructure of chloroplast protuberances in rice leaves preserved by high-pressure freezing. *Planta*, **208**, 472-479.
- Bouvier, F. and Camara, B.** (2006) The Role of Plastids in Ripening Fruits. In *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R.R. and Hooper, J.K. eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, pp. 419-432.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. and Pink, D.** (2003) The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnol. J.*, **1**, 3-22.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.-F., Wu, S.-H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. and Leaver, C.J.** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **42**, 567-585.
- Clark, K.A. and Krysan, P.J.** (2010) Chromosomal translocations are a common phenomenon in *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion lines. *Plant J.*, **64**, 990-1001.
- Curtis, M., Belcram, K., Bollmann, S., Tominey, C., Hoffman, P., Mercier, R. and Hays, J.** (2009) Reciprocal chromosome translocation associated with TDNA-insertion mutation in *Arabidopsis*: genetic and cytological analyses of consequences for gametophyte development and for construction of doubly mutant lines. *Planta*, **229**, 731-745.

- Chen, L.-F.O., Lin, C.-H., Kelkar, S.M., Chang, Y.-M. and Shaw, J.-F.** (2008) Transgenic broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with antisense chlorophyllase (*BoCLH1*) delays postharvest yellowing. *Plant Sci.*, **174**, 25-31.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.-S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X. and Zhu, T.** (2002) Expression Profile Matrix of Arabidopsis Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses. *Plant Cell*, **14**, 559-574.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N.K., Makino, A. and Mae, T.** (2003) Exclusion of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/oxygenase from Chloroplasts by Specific Bodies in Naturally Senescing Leaves of Wheat. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 914-921.
- Danielsson, R., Suorsa, M., Paakkarinen, V., Albertsson, P.-Å., Styring, S., Aro, E.-M. and Mamedov, F.** (2006) Dimeric and Monomeric Organization of Photosystem II: DISTRIBUTION OF FIVE DISTINCT COMPLEXES IN THE DIFFERENT DOMAINS OF THE THYLAKOID MEMBRANE *J. Biol. Chem.*, **281**, 14241-14249.
- Daum, B. and Kühlbrandt, W.** (2011) Electron tomography of plant thylakoid membranes. *J. Exp. Bot.*, **62**, 2393-2402.
- Daum, B., Nicastro, D., Austin, J., II, McIntosh, J.R. and Kuhlbrandt, W.** (2010) Arrangement of Photosystem II and ATP Synthase in Chloroplast Membranes of Spinach and Pea. *Plant Cell*, **22**, 1299-1312.
- Daxinger, L., Hunter, B., Sheikh, M., Jauvion, V., Gascioli, V., Vaucheret, H., Matzke, M. and Furner, I.** (2008) Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, **13**, 4-6.
- De Buck, S., Podevin, N., Nolf, J., Jacobs, A. and Depicker, A.** (2009) The T-DNA integration pattern in *Arabidopsis* transformants is highly determined by the transformed target cell. *Plant J.*, **60**, 134-145.
- Demmig-Adams, B. and Adams, W.W., III.** (1992) Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **43**, 599-626.
- Dietzel, L., Bräutigam, K., Steiner, S., Schöffler, K., Lepetit, B., Grimm, B., Schöttler, M.A. and Pfannschmidt, T.** (2011) Photosystem II Supercomplex Remodeling Serves as an Entry Mechanism for State Transitions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **23**, 2964-2977.
- Dobell, C.** (1932) The First Observations on "Little Animals" (Protozoa and Bacteria) in Waters (Letters 6, 13, 13a, 18, 18b). In *Antony van Leeuwenhoek and his "Little Animals"*. New York: Harcourt, Brace and Company, pp. 109-166.
- Duysens, L.N.M., Amesz, J. and Kamp, B.M.** (1961) Two Photochemical Systems in Photosynthesis. *Nature*, **190**, 510-511.
- Egea, I., Barsan, C., Bian, W., Purgatto, E., Latché, A., Chervin, C., Bouzayen, M. and Pech, J.-C.** (2010) Chromoplast Differentiation: Current Status and Perspectives. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 1601-1611.
- Emerson, R. and Arnold, W.** (1932) The Photochemical Reaction In Photosynthesis. *J. Gen. Physiol.*, **16**, 191-205.

- Emerson, R., Chalmers, R. and Cederstrand, C.** (1957) Some Factors Influencing The Long-Wave Limit Of Photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **43**, 133-143.
- Evans, I.M., Rus, A.M., Belanger, E.M., Kimoto, M. and Brusslan, J.A.** (2010) Dismantling of *Arabidopsis thaliana* mesophyll cell chloroplasts during natural leaf senescence. *Plant Biol.*, **12**, 1-12.
- Fajer, J.** (2005) Chlorophyll chemistry before and after crystals of photosynthetic reaction centers. In *Discoveries in Photosynthesis* (Govindjee, Beatty, J.T., Gest, H. and Allen, J.F. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 205-212.
- Feng, C.-P. and Mundy, J.** (2006) Gene Discovery and Functional Analyses in the Model Plant *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.*, **48**, 5-14.
- Fernandez, A. and Lynch, M.** (2011) Non-adaptive origins of interactome complexity. *Nature*, **474**, 502-505.
- Folta, K.M. and Maruhnich, S.A.** (2007) Green light: a signal to slow down or stop. *J. Exp. Bot.*, **58**, 3099-3111.
- Forsbach, A., Schubert, D., Lechtenberg, B., Gils, M. and Schmidt, R.** (2003) A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Mol. Biol.*, **52**, 161-176.
- Förster, T.** (1946) Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften*, **33**, 166-175.
- Forti, G. and Vianelli, A.** (1988) Influence of thylakoid protein phosphorylation on photosystem I photochemistry. *FEBS Lett.*, **231**, 95-98.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.** (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell Environ.*, **28**, 1056-1071.
- Franklin, K.A., Allen, T. and Whitelam, G.C.** (2007) Phytochrome A is an irradiance-dependent red light sensor. *Plant J.*, **50**, 108-117.
- Frigaard, N.-U., Larsen, K.L. and Cox, R.P.** (1996) Spectrochromatography of photosynthetic pigments as a fingerprinting technique for microbial phototrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **20**, 69-77.
- Gan, S. and Amasino, R.M.** (1995) Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Gan, S. and Amasino, R.M.** (1996) Cytokinins in plant senescence: From spray and pray to clone and play. *Bioessays*, **18**, 557-565.
- Gan, S. and Amasino, R.M.** (1997) Making Sense of Senescence (Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence). *Plant Physiol.*, **113**, 313-319.
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M.-J., Hajouj, T., Neshar, M.F.O., Yariv, I., Dor, C. and Bassani, M.** (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J.*, **36**, 629-642.
- Gómez, F., Fernández, L., Gergoff, G., Guamet, J.J., Chaves, A. and Bartoli, C.G.** (2008) Heat shock increases mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and extends postharvest life of spinach leaves. *Postharvest Biol. Technol.*, **49**, 229-234.
- Govindjee, Ichimura, S., Cederstrand, C. and Rabinowitch, E.** (1960) Effect of combining far-red light with shorter wave light on the excitation of fluorescence in *Chlorella*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**, 322-323.

- Govindjee and Rabinowitch, E.** (1960) Two Forms of Chlorophyll *a* in vivo with Distinct Photochemical Functions. *Science*, **132**, 355-356.
- Gräber, P., Zickler, A. and Åkerlund, H.-E.** (1978) Electric evidence for the isolation of inside-out vesicles from spinach chloroplasts. *FEBS Lett.*, **96**, 233-237.
- Grbić, V. and Bleecker, A.B.** (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **8**, 595-602.
- Gregersen, P.L. and Holm, P.B.** (2007) Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol. J.*, **5**, 192-206.
- Grew, N.** (1682) A Discourse of the Colors of Plants (1677). In *The Anatomy of Plants. With an Idea of a Philosophical History of Plants, and several other Lectures, read before the Royal Society.*: Royal Society of London, pp. 269-278.
- Guamét, J.J., Pichersky, E. and Noodén, L.D.** (1999) Mass Exodus from Senescing Soybean Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **40**, 986-992.
- Guamét, J.J., Tyystjärvi, E., Tyystjärvi, T., John, I., Kairavuo, M., Pichersky, E. and Noodén, L.D.** (2002) Photoinhibition and loss of photosystem II reaction centre proteins during senescence of soybean leaves. Enhancement of photoinhibition by the 'stay-green' mutation *cytG*. *Physiol. Plant.*, **115**, 468-478.
- Guo, Y., Cai, Z. and Gan, S.** (2004) Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell Environ.*, **27**, 521-549.
- Guo, Y. and Gan, S.** (2005) Leaf Senescence: Signals, Execution, and Regulation. In *Current Topics in Developmental Biology* (Schatten, G.P. ed: Academic Press, pp. 83-112.
- Guo, Y. and Gan, S.** (2011) Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant, Cell Environ.*, **35**, 644-655.
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S. and Ohsumi, Y.** (2002) Leaf Senescence and Starvation-Induced Chlorosis Are Accelerated by the Disruption of an *Arabidopsis* Autophagy Gene. *Plant Physiol.*, **129**, 1181-1193.
- He, P., Zhou, W. and Jin, J.** (2004) Carbon and Nitrogen Metabolism Related to Grain Formation in Two Different Senescent Types of Maize. *J. Plant Nutr.*, **27**, 295-311.
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D.F. and Gan, S.** (2002) Evidence Supporting a Role of Jasmonic Acid in *Arabidopsis* Leaf Senescence. *Plant Physiol.*, **128**, 876-884.
- He, Y., Tang, W., Swain, J.D., Green, A.L., Jack, T.P. and Gan, S.** (2001) Networking Senescence-Regulating Pathways by Using *Arabidopsis* Enhancer Trap Lines. *Plant Physiol.*, **126**, 707-716.
- Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. and Brown, S.B.** (1987) The Degradation Of Chlorophyll — A Biological Enigma. *New Phytol.*, **107**, 255-302.
- Hidema, J., Makino, A., Kurita, Y., Mae, T. and Ojima, K.** (1992) Changes in the Levels of Chlorophyll and Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein of PS II in Rice Leaves Aged under Different Irradiances from Full Expansion through Senescence. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 1209-1214.

- Hidema, J., Makino, A., Mae, T. and Ojima, K.** (1991) Photosynthetic Characteristics of Rice Leaves Aged under Different Irradiances from Full Expansion through Senescence. *Plant Physiol.*, **97**, 1287-1293.
- Hildebrand, F.** (1882) Die Lebensdauer und Vegetationsweise der Pflanzen, ihre Ursache und ihre Entwicklung. In *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* (Engler, A. ed. Leipzig: W. Engelmann, pp. 51-135.
- Hill, R.** (1954) The Cytochrome *b* Component Of Chloroplasts. *Nature*, **174**, 501-503.
- Hill, R. and Bendall, F.** (1960) Function of the Two Cytochrome Components in Chloroplasts: A Working Hypothesis. *Nature*, **186**, 136-137.
- Hill, R. and Scarisbrick, R.** (1951) The Haematin Compounds Of Leaves. *New Phytol.*, **50**, 98-111.
- Hoch, W.A., Singaas, E.L. and McCown, B.H.** (2003) Resorption Protection. Anthocyanins Facilitate Nutrient Recovery in Autumn by Shielding Leaves from Potentially Damaging Light Levels. *Plant Physiol.*, **133**, 1296-1305.
- Hooper, J.K.** (2006) Chloroplast Development: Whence and Whither. In *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R.R. and Hooper, J.K. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 27-51.
- Hooke, R.** (1665) *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies made by Magnifying Glasses*: Royal Society of London.
- Hörtensteiner, S.** (2004) The loss of green color during chlorophyll degradation—a prerequisite to prevent cell death? *Planta*, **219**, 191-194.
- Hörtensteiner, S. and Feller, U.** (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.*, **53**, 927-937.
- Humbeck, K. and Krupinska, K.** (2003) The abundance of minor chlorophyll *a/b*-binding proteins CP29 and LHCl of barley (*Hordeum vulgare* L.) during leaf senescence is controlled by light. *J. Exp. Bot.*, **54**, 375-383.
- Humbeck, K., Quast, S. and Krupinska, K.** (1996) Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant, Cell Environ.*, **19**, 337-344.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R. and Mae, T.** (2008) Mobilization of Rubisco and Stroma-Localized Fluorescent Proteins of Chloroplasts to the Vacuole by an *ATG* Gene-Dependent Autophagic Process. *Plant Physiol.*, **148**, 142-155.
- Jacob-Wilk, D., Holland, D., Goldschmidt, E.E., Riov, J. and Eyal, Y.** (1999) Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the *Chlase1* gene from ethylene-treated *Citrus* fruit and its regulation during development. *Plant J.*, **20**, 653-661.
- Jenkins, G.I. and Woolhouse, H.W.** (1981) Photosynthetic Electron Transport During Senescence of the Primary Leaves of *Phaseolus vulgaris* L. II. THE ACTIVITY OF PHOTOSYSTEMS ONE AND TWO, AND A NOTE ON THE SITE OF REDUCTION OF FERRICYANIDE. *J. Exp. Bot.*, **32**, 989-997.
- Jing, H.-C., Hille, J. and Dijkwel, P.P.** (2003) Ageing in Plants: Conserved Strategies and Novel Pathways. *Plant Biol.*, **5**, 455-464.
- Jing, H.-C., Sturre, M.J.G., Hille, J. and Dijkwel, P.P.** (2002) *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *Plant J.*, **32**, 51-63.

- Jung, C., Lyou, S., Yeu, S., Kim, M., Rhee, S., Kim, M., Lee, J., Choi, Y. and Cheong, J.-J.** (2007) Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.*, **26**, 1053-1063.
- Kahlau, S. and Bock, R.** (2008) Plastid Transcriptomics and Translatomics of Tomato Fruit Development and Chloroplast-to-Chromoplast Differentiation: Chromoplast Gene Expression Largely Serves the Production of a Single Protein. *Plant Cell*, **20**, 856-874.
- Kapri-Pardes, E., Naveh, L. and Adam, Z.** (2007) The Thylakoid Lumen Protease Deg1 Is Involved in the Repair of Photosystem II from Photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 1039-1047.
- Kariola, T., Brader, G., Li, J. and Palva, E.T.** (2005) Chlorophyllase 1, a Damage Control Enzyme, Affects the Balance between Defense Pathways in Plants. *Plant Cell*, **17**, 282-294.
- Kee, H.L., Kirmaier, C., Tang, Q., Diers, J.R., Muthiah, C., Taniguchi, M., Laha, J.K., Ptaszek, M., Lindsey, J.S., Bocian, D.F. and Holten, D.** (2007a) Effects of Substituents on Synthetic Analogs of Chlorophylls. Part 1: Synthesis, Vibrational Properties and Excited-state Decay Characteristics. *Photochem. Photobiol.*, **83**, 1110-1124.
- Kee, H.L., Kirmaier, C., Tang, Q., Diers, J.R., Muthiah, C., Taniguchi, M., Laha, J.K., Ptaszek, M., Lindsey, J.S., Bocian, D.F. and Holten, D.** (2007b) Effects of Substituents on Synthetic Analogs of Chlorophylls. Part 2: Redox Properties, Optical Spectra and Electronic Structure. *Photochem. Photobiol.*, **83**, 1125-1143.
- Keskitalo, J., Bergquist, G., Gardeström, P. and Jansson, S.** (2005) A Cellular Timetable of Autumn Senescence. *Plant Physiol.*, **139**, 1635-1648.
- Khan, N.A.** (2006) *Ethylene Action in Plants*: Springer Berlin Heidelberg.
- Kim, H.J., Lim, P.O. and Nam, H.G.** (2007) Molecular Regulation of Leaf Senescence. In *Annual Plant Reviews Volume 26: Senescence Processes in Plants* (Gan, S. ed: Blackwell Publishing Ltd, pp. 231-255.
- Kim, J.I., Murphy, A.S., Baek, D., Lee, S.-W., Yun, D.-J., Bressan, R.A. and Narasimhan, M.L.** (2011) YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **62**, 3981-3992.
- Kim, S.-I. and Gelvin, S.B.** (2007) Genome-wide analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions. *Plant J.*, **51**, 779-791.
- Kleber-Janke, T. and Krupinska, K.** (1997) Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions. *Planta*, **203**, 332-340.
- Koenig, F. and Schmid, G.** (2009) Wilhelm Menke (1910–2007): a pioneer in chloroplast structure. *Photosynth. Res.*, **99**, 81-84.
- Kok, B. and Hoch, G.** (1961) Spectral Changes In Photosynthesis. In *A symposium on Light And Life* (McElroy, W.D. and Glass, B. eds). Baltimore: The Johns Hopkins Press, pp. 397-423.
- Kokubun, N., Ishida, H., Makino, A. and Mae, T.** (2002) The Degradation of the Large Subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/oxygenase into the

- 44-kDa Fragment in the Lysates of Chloroplasts Incubated in Darkness. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1390-1395.
- Krupinska, K.** (2006) Fate and Activities of Plastids During Leaf Senescence. In *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R.R. and Hooper, J.K. eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, pp. 433-449.
- Kura-Hotta, M., Satoh, K. and Katoh, S.** (1987) Relationship between Photosynthesis and Chlorophyll Content during Leaf Senescence of Rice Seedlings. *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1321-1329.
- Larkum, A.W.D.** (2006) The Evolution of Chlorophylls and Photosynthesis. In *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls* (Grimm, B., Porra, R.J., Rüdiger, W. and Scheer, H. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 261-282.
- Lazan, H.B., Barlow, E.W.R. and Brady, C.J.** (1983) The Significance of Vascular Connection in Regulating Senescence of the Detached Flag Leaf of Wheat. *J. Exp. Bot.*, **34**, 726-736.
- Lechtenberg, B., Schubert, D., Forsbach, A., Gils, M. and Schmidt, R.** (2003) Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing. *Plant J.*, **34**, 507-517.
- Ledford, H.K. and Niyogi, K.K.** (2005) Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell Environ.*, **28**, 1037-1045.
- Leopold, A.C.** (1961) Senescence in Plant Development. *Science*, **134**, 1727-1732.
- Lers, A.** (2007) Environmental Regulation of Leaf Senescence. In *Annual Plant Reviews, Volume 26: Senescence Processes in Plants* (Gan, S. ed: Blackwell Publishing Ltd, pp. 108-144.
- Levey, S. and Wingler, A.** (2005) Natural variation in the regulation of leaf senescence and relation to other traits in Arabidopsis. *Plant, Cell Environ.*, **28**, 223-231.
- Liao, Y., An, K., Zhou, X., Chen, W.-J. and Kuai, B.-K.** (2007) *AtCLH2*, a Typical but Possibly Distinctive Chlorophyllase Gene in Arabidopsis. *J. Integr. Plant Biol.*, **49**, 531-539.
- Lim, P.O., Kim, H.J. and Gil Nam, H.** (2007) Leaf Senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **58**, 115-136.
- Lim, P.O., Lee, I.C., Kim, J., Kim, H.J., Ryu, J.S., Woo, H.R. and Nam, H.G.** (2010) Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J. Exp. Bot.*, **61**, 1419-1430.
- Lin, J.-F. and Wu, S.-H.** (2004) Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. *Plant J.*, **39**, 612-628.
- Luquez, V.M. and Guamét, J.J.** (2001) Effects of the 'Stay Green' Genotype *GGd1d1d2d2* on Leaf Gas Exchange, Dry Matter Accumulation and Seed Yield in Soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Ann. Bot.*, **87**, 313-318.
- Mach, J.M., Castillo, A.R., Hoogstraten, R. and Greenberg, J.T.** (2001) The Arabidopsis-accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 771-776.
- Mae, T.** (2004) Leaf Senescence and Nitrogen Metabolism. In *Plant Cell Death Processes* (Noodén, L.D. ed. San Diego: Academic Press, pp. 157-168.

- Martínez, D.E., Costa, M.L. and Guamet, J.J.** (2008) Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biol.*, **10**, 15-22.
- Marty, F.** (1999) Plant Vacuoles. *Plant Cell*, **11**, 587-600.
- Masclaux, C., Valadier, M.H., Brugière, N., Morot-Gaudry, J.F. and Hirel, B.** (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*, **211**, 510-518.
- Matile, P.** (1997) The Vacuole and Cell Senescence. In *The Plant Vacuole* (Leigh, R.A. and Sanders, D. eds): Academic Press, pp. 87-112.
- Matile, P.** (2001) Senescence and Cell Death in Plant Development: Chloroplast Senescence and its Regulation. In *Regulation of Photosynthesis* (Aro, E.-M. and Andersson, B. eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer / Kluwer Academic Press, pp. 277-297.
- Matile, P., Hortensteiner, S. and Thomas, H.** (1999) Chlorophyll Degradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 67-95.
- Matile, P., Hortensteiner, S., Thomas, H. and Krautler, B.** (1996) Chlorophyll Breakdown in Senescent Leaves. *Plant Physiol.*, **112**, 1403-1409.
- Matile, P. and Schellenberg, M.** (1996) The cleavage of phaeophorbide *a* is located in the envelope of barley gerontoplasts. *Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 55-59.
- Menke, W.** (1961) Über die Chloroplasten von *Anthoceros punctatus*. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.*, **16**, 334-336.
- Meyer, A.** (1883) *Das chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer beziehung. Ein beitrag zur kenntniss des chlorophyllkornes der angiospermen und seiner metamorphosen* Leipzig: A. Felix.
- Meza, T.J., Stangeland, B., Mercy, I.S., Skårn, M., Nymoén, D.A., Berg, A., Butenko, M.A., Håkelién, A.-M., Haslekås, C., Meza-Zepeda, L.A. and Aalen, R.B.** (2002) Analyses of single-copy *Arabidopsis* T-DNA-transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4556-4566.
- Miersch, I., Heise, J., Zelmer, I. and Humbeck, K.** (2000) Differential Degradation of the Photosynthetic Apparatus During Leaf Senescence in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Biol.*, **2**, 618-623.
- Miller, K.R. and Staehelin, L.A.** (1976) Analysis of the thylakoid outer surface. Coupling factor is limited to unstacked membrane regions. *J. Cell Biol.*, **68**, 30-47.
- Minagawa, J.** (2011) State transitions — The molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **1807**, 897-905.
- Minamikawa, T., Toyooka, K., Okamoto, T., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M.** (2001) Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: Immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma*, **218**, 144-153.
- Miyadai, K., Mae, T., Makino, A. and Ojima, K.** (1990) Characteristics of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Degradation by Lysates of Mechanically Isolated Chloroplasts from Wheat Leaves. *Plant Physiol.*, **92**, 1215-1219.



- Molisch, H.** (1930) Die Lebensdauer der Pflanze. Jena: G. Fischer.
- Morris, K., Mackerness, S.A.H., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M., Carr, J.P. and Buchanan-Wollaston, V.** (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.*, **23**, 677-685.
- Morse, A.M., Peterson, D.G., Islam-Faridi, M.N., Smith, K.E., Magbanua, Z., Garcia, S.A., Kubisiak, T.L., Amerson, H.V., Carlson, J.E., Nelson, C.D. and Davis, J.M.** (2009) Evolution of Genome Size and Complexity in *Pinus*. *PLoS ONE*, **4**, e4332.
- Müller, T., Ulrich, M., Ongania, K.-H. and Kräutler, B.** (2007) Colorless Tetrapyrrolic Chlorophyll Catabolites Found in Ripening Fruit Are Effective Antioxidants. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 8699-8702.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L.** (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct. Plant Biol.*, **31**, 203-216.
- Mustárdy, L. and Garab, G.** (2003) Granum revisited. A three-dimensional model - where things fall into place. *Trends Plant Sci.*, **8**, 117-122.
- Nakabayashi, K., Ito, M., Kiyosue, T., Shinozaki, K. and Watanabe, A.** (1999) Identification of *clp* Genes Expressed in Senescing *Arabidopsis* Leaves. *Plant Cell Physiol.*, **40**, 504-514.
- Nield, J. and Barber, J.** (2006) Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **1757**, 353-361.
- Niinemets, Ü.** (2007) Photosynthesis and resource distribution through plant canopies. *Plant, Cell Environ.*, **30**, 1052-1071.
- Niwa, Y., Kato, T., Tabata, S., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K. and Moriyasu, Y.** (2004) Disposal of chloroplasts with abnormal function into the vacuole in *Arabidopsis thaliana* cotyledon cells. *Protoplasma*, **223**, 229-232.
- Noh, Y.-S. and Amasino, R.M.** (1999) Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Mol. Biol.*, **41**, 181-194.
- Noh, Y.-S., Quirino, B.F. and Amasino, R.M.** (2004) Senescence and Genetic Engineering. In *Plant Cell Death Processes* (Noodén, L.D. ed. San Diego: Academic Press, pp. 91-105.
- Noodén, L.D.** (2004) Introduction. In *Plant Cell Death Processes* (Noodén, L.D. ed. San Diego: Academic Press, pp. 1-18.
- Noodén, L.D., Guiamét, J.J. and John, I.** (2004) Whole Plant Senescence. In *Plant Cell Death Processes* (Noodén, L.D. ed. San Diego: Academic Press, pp. 227-244.
- Nooden, L.D., Hillsberg, J.W. and Schneider, M.J.** (1996) Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiol. Plant.*, **96**, 491-495.
- Noodén, L.D. and Penney, J.P.** (2001) Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *J. Exp. Bot.*, **52**, 2151-2159.
- Oh, S.A., Park, J.-H., Lee, G.I., Paek, K.H., Park, S.K. and Gil Nam, H.** (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **12**, 527-535.

- Oldenburg, D.J. and Bendich, A.J.** (2004) Changes in the Structure of DNA Molecules and the Amount of DNA Per Plastid During Chloroplast Development in Maize. *J. Mol. Biol.*, **344**, 1311-1330.
- Olson, J.M. and Blankenship, R.E.** (2005) Thinking about the evolution of photosynthesis. In *Discoveries in Photosynthesis* (Govindjee, G., Beatty, J.T., Gest, H. and Allen, J.F. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 1073-1086.
- Oltmanns, H., Frame, B., Lee, L.-Y., Johnson, S., Li, B., Wang, K. and Gelvin, S.B.** (2010) Generation of Backbone-Free, Low Transgene Copy Plants by Launching T-DNA from the Agrobacterium Chromosome. *Plant Physiol.*, **152**, 1158-1166.
- Ort, D.R.** (2001) When There Is Too Much Light. *Plant Physiol.*, **125**, 29-32.
- Otegui, M.S., Noh, Y.-S., Martínez, D.E., Petroff, M.G.V., Staehelin, L.A., Amasino, R.M. and Guamet, J.J.** (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. *Plant J.*, **41**, 831-844.
- Ougham, H., Armstead, I., Howarth, C., Galyuon, I., Donnison, I. and Thomas, H.** (2007) The Genetic Control of Senescence Revealed By Mapping Quantitative Trait Loci. In *Annual Plant Reviews Volume 26: Senescence Processes in Plants* (Gan, S. ed: Blackwell Publishing Ltd, pp. 171-201.
- Paolillo, D.J.** (1970) The Three-Dimensional Arrangement of Intergranal Lamellae in Chloroplasts. *J. Cell Sci.*, **6**, 243-253.
- Park, H., Eggink, L.L., Roberson, R.W. and Hooper, J.K.** (1999) Transfer of proteins from the chloroplast to vacuoles in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta): A pathway for degradation. *J. Phycol.*, **35**, 528-538.
- Parthier, B.** (1988) Gerontoplasts - the yellow end in the ontogenesis of chloroplasts. *Endocyt. Cell Res.*, **5**, 163-190.
- Pelletier, P.J. and Caventou, J.B.** (1818) Sur la Matière verte des Feuilles. *Annales de Chimie et de Physique*, **9**, 194-196.
- Peng, L. and Shikanai, T.** (2011) Supercomplex Formation with Photosystem I Is Required for the Stabilization of the Chloroplast NADH Dehydrogenase-Like Complex in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **155**, 1629-1639.
- Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., Samblanx, G.W.D., Buchala, A., Metraux, J.-P., Manners, J.M. and Broekaert, W.F.** (1996) Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. *Plant Cell*, **8**, 2309-2323.
- Peñarrubia, L. and Moreno, J.** (2001) Senescence in Plants and Crops. In *Handbook of Plant and Crop Physiology* (Pessarakli, M. ed. NY: Marcel Dekker, pp. 181-203.
- Pourtau, N., Jennings, R., Pelzer, E., Pallas, J. and Wingler, A.** (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta*, **224**, 556-568.
- Procházková, D. and Wilhelmová, N.** (2007) Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biol. Plant.*, **51**, 401-406.
- Quirino, B.F., Noh, Y.-S., Himelblau, E. and Amasino, R.M.** (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.*, **5**, 278-282.

- Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I. and Reinbothe, S.** (2009) Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J.*, **276**, 4666-4681.
- Roulin, S. and Feller, U.** (1998) Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Planta*, **205**, 297-304.
- Rousseaux, M.C., Hall, A.J. and Sánchez, R.A.** (1996) Far-red enrichment and photosynthetically active radiation level influence leaf senescence in field-grown sunflower. *Physiol. Plant.*, **96**, 217-224.
- Rousseaux, M.C., Hall, A.J. and Sánchez, R.A.** (2000) Basal leaf senescence in a sunflower (*Helianthus annuus*) canopy: responses to increased R/FR ratio. *Physiol. Plant.*, **110**, 477-482.
- Sassenrath-Cole, G.F., Lu, G., Hodges, H.F. and McKinion, J.M.** (1996) Photon flux density versus leaf senescence in determining photosynthetic efficiency and capacity of *Gossypium Hirsutum* L. Leaves. *Environ. Exp. Bot.*, **36**, 439-446.
- Scheer, H.** (2006) An Overview of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. In *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Grimm, B., Porra, R.J., Rüdiger, W. and Scheer, H. eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, pp. 1-26.
- Schenk, N., Schelbert, S., Kanwischer, M., Goldschmidt, E.E., Dörmann, P. and Hörtensteiner, S.** (2007) The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **581**, 5517-5525.
- Schimper, A.F.W.** (1883) Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Botanische Zeitung*, **41**, 105-120.
- Schippers, J.H.M., Jing, H.-C., Hille, J. and Dijkwel, P.P.** (2007) Developmental and Hormonal Control of Leaf Senescence. In *Annual Plant Reviews, Volume 26: Senescence Processes in Plants* (Gan, S. ed: Blackwell Publishing Ltd, pp. 145-170.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M. and Goff, S.A.** (2002) A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell*, **14**, 2985-2994.
- Shahri, W.** (2011) Senescence: Concepts and Synonyms. *Asian J. Plant Sci.*, **10**, 24-28.
- Smart, C.M.** (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.*, **126**, 419-448.
- Staehelein, L.A.** (1976) Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membranes *in vitro*. *J. Cell Biol.*, **71**, 136-158.
- Staehelein, L.A. and van der Staay, G.W.M.** (2004) Structure, Composition, Functional Organization and Dynamic Properties of Thylakoid Membranes. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D.R., Yocum, C.F. and Heichel, I.F. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 11-30.

- Stoeckenius, W.** (1985) The rhodopsin-like pigments of halobacteria: light-energy and signal transducers in an archaeobacterium. *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 483-486.
- Sun, X., Fu, T., Chen, N., Guo, J., Ma, J., Zou, M., Lu, C. and Zhang, L.** (2010) The Stromal Chloroplast Deg7 Protease Participates in the Repair of Photosystem II after Photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **152**, 1263-1273.
- Suzuki, N. and Mittler, R.** (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.*, **126**, 45-51.
- Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J. and Leaver, C.J.** (2002) A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **30**, 431-446.
- Takamiya, K.-i., Tsuchiya, T. and Ohta, H.** (2000) Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends Plant Sci.*, **5**, 426-431.
- Tang, Y., Wen, X. and Lu, C.** (2005) Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice. *Plant Physiol. Biochem.*, **43**, 193-201.
- Taylor, C.B., Bariola, P.A., delCardayré, S.B., Raines, R.T. and Green, P.J.** (1993) RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5118-5122.
- Thomas, H.** (2002) Ageing in plants. *Mech. Ageing. Dev.*, **123**, 747-753.
- Thomas, H. and Howarth, C.J.** (2000) Five ways to stay green. *J. Exp. Bot.*, **51**, 329-337.
- Thomas, H., Ougham, H., Canter, P. and Donnison, I.** (2002) What stay-green mutants tell us about nitrogen remobilization in leaf senescence. *J. Exp. Bot.*, **53**, 801-808.
- Thomas, H., Ougham, H.J., Wagstaff, C. and Stead, A.D.** (2003) Defining senescence and death. *J. Exp. Bot.*, **54**, 1127-1132.
- Thomas, H. and Smart, C.M.** (1993) Crops that stay green. *Ann. Appl. Biol.*, **123**, 193-219.
- Thomas, H. and Stoddart, J.L.** (1980) Leaf Senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 83-111.
- Tocheva, E.I., Li, Z. and Jensen, G.J.** (2010) Electron Cryotomography. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**.
- Trevisanus, L.C.** (1811) *Beyträge zur Pflanzenphysiologie*: H. Dieterich.
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T. and Takamiya, K.-i.** (1999) Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 15362-15367.
- Ülker, B., Peiter, E., Dixon, D.P., Moffat, C., Capper, R., Bouché, N., Edwards, R., Sanders, D., Knight, H. and Knight, M.R.** (2008) Getting the most out of publicly available T-DNA insertion lines. *Plant J.*, **56**, 665-677.
- van Doorn, W.G.** (2005) Plant programmed cell death and the point of no return. *Trends Plant Sci.*, **10**, 478-483.
- van Doorn, W.G. and Woltering, E.J.** (2004) Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *J. Exp. Bot.*, **55**, 2147-2153.

- van Doorn, W.G. and Woltering, E.J.** (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci.*, **10**, 117-122.
- van Doorn, W.G. and Woltering, E.J.** (2008) Physiology and molecular biology of petal senescence. *J. Exp. Bot.*, **59**, 453-480.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inzé, D. and Van Breusegem, F.** (2005) Genome-Wide Analysis of Hydrogen Peroxide-Regulated Gene Expression in Arabidopsis Reveals a High Light-Induced Transcriptional Cluster Involved in Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Physiol.*, **139**, 806-821.
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T. and Makino, A.** (2009) Autophagy Plays a Role in Chloroplast Degradation during Senescence in Individually Darkened Leaves. *Plant Physiol.*, **149**, 885-893.
- Weaver, L.M. and Amasino, R.M.** (2001) Senescence Is Induced in Individually Darkened Arabidopsis Leaves, but Inhibited in Whole Darkened Plants. *Plant Physiol.*, **127**, 876-886.
- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B. and Amasino, R.M.** (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.*, **37**, 455-469.
- Willstätter, R. and Stoll, A.** (1911) Untersuchungen über Chlorophyll. XI. Über Chlorophyllase. *Liebigs Ann. Chem.*, **378**, 18-72.
- Wingler, A. and Roitsch, T.** (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biol.*, **10**, 50-62.
- Wise, R.R.** (2006) The Diversity of Plastid Form and Function. In *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R.R. and Hooper, J.K. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 3-26.
- Witt, H.T., Muller, A. and Rumberg, B.** (1961a) Experimental Evidence for the Mechanism of Photosynthesis. *Nature*, **191**, 194-195.
- Witt, H.T., Muller, A. and Rumberg, B.** (1961b) Oxidized Cytochrome and Chlorophyll  $C_2$  in Photosynthesis. *Nature*, **192**, 967-969.
- Woo, H.R., Chung, K.M., Park, J.-H., Oh, S.A., Ahn, T., Hong, S.H., Jang, S.K. and Nam, H.G.** (2001) ORE9, an F-Box Protein That Regulates Leaf Senescence in Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 1779-1790.
- Woo, H.R., Goh, C.-H., Park, J.-H., De La Serve, B.T., Kim, J.-H., Park, Y.-I. and Nam, H.G.** (2002) Extended leaf longevity in the *ore4-1* mutant of Arabidopsis with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. *Plant J.*, **31**, 331-340.
- Woo, H.R., Kim, J.H., Nam, H.G. and Lim, P.O.** (2004) The Delayed Leaf Senescence Mutants of Arabidopsis, *ore1*, *ore3*, and *ore9* are Tolerant to Oxidative Stress. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 923-932.
- Yi, S.V.** (2006) Non-adaptive evolution of genome complexity. *Bioessays*, **28**, 979-982.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T. and Ohsumi, Y.** (2004) Processing of ATG8s, Ubiquitin-Like Proteins, and Their Deconjugation by ATG4s Are Essential for Plant Autophagy. *Plant Cell*, **16**, 2967-2983.

- Zapata, J.M., Guéra, A., Esteban-Carrasco, A., Martín, M. and Sabater, B.** (2005) Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death Differ.*, **12**, 1277-1284.
- Želisko, A., García-Lorenzo, M., Jackowski, G., Jansson, S. and Funk, C.** (2005) AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13699-13704.
- Zeng, Y., Pan, Z., Ding, Y., Zhu, A., Cao, H., Xu, Q. and Deng, X.** (2011) A proteomic analysis of the chromoplasts isolated from sweet orange fruits [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *J. Exp. Bot.*, **62**, 5297-5309.
- Zentgraf, U., Jobst, J., Kolb, D. and Rentsch, D.** (2004) Senescence-Related Gene Expression Profiles of Rosette Leaves of *Arabidopsis thaliana*: Leaf Age Versus Plant Age. *Plant Biol.*, **6**, 178-183.
- Zhang, L.-F., Rui, Q., Zhang, P., Wang, X.-y. and Xu, L.-L.** (2007) A novel 51-kDa fragment of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase formed in the stroma of chloroplasts in dark-induced senescing wheat leaves. *Physiol. Plant.*, **131**, 64-71.

## *CAPÍTULO 2*

—

### **DEGRADACIÓN DE CLOROFILA EN VACUOLAS ASOCIADAS A LA SENESCENCIA**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>CAPÍTULO 2 — DEGRADACIÓN DE CLOROFILA EN VACUOLAS ASOCIADAS A LA SENESCENCIA</i> .....	96
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	97
ÍNDICE DE FIGURAS.....	99
ÍNDICE DE TABLAS.....	99
RESUMEN.....	100
INTRODUCCIÓN.....	101
MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	104
Aislamiento de las VAS.....	104
Análisis por citometría de flujo de las VAS aisladas.....	106
Determinación de clorofila y los pigmentos derivados de su catabolismo en las VAS aisladas.....	106
Extracción de Clorofila <i>a</i> de <i>Arthrospira platensis</i> .....	107
Extracción de Clorofila <i>b</i> de hojas de espinaca.....	108
Preparación de Clorofilido.....	109
Preparación de Feofórbido y Feofitina.....	110
Determinación de la actividad redox del P700.....	110
Espectrogramas de fluorescencia de las VAS.....	111
Electroforesis en gel no-desnaturalizante.....	112
Análisis de las proteínas por espectrometría de masas.....	114
Análisis de <i>Western-blot</i> y ensayos de autodigestión.....	116
RESULTADOS.....	119
Clorofila en las VAS aisladas.....	119
Degradación de clorofila en las VAS aisladas.....	120
Identificación de proteínas de unión a clorofila en las VAS.....	121
Otras proteínas cloroplásticas.....	122
Fluorescencia del Fotosistema I en las VAS.....	122



Degradación de la proteína de unión a clorofila PsaA del Fotosistema I en las VAS aisladas .....	124
FIGURAS.....	125
TABLAS .....	146
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	151
Vacuolas Asociadas a la Senescencia .....	151
Degradación de clorofila en las VAS.....	151
Fotosistema I en las VAS aisladas .....	153
¿Vías independientes para la degradación del Fotosistema I y II durante la senescencia? .....	155
BIBLIOGRAFÍA .....	157

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – AISLAMIENTO DE LAS VAS. ....	125
FIGURA 2.2 – ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LAS VAS AISLADAS. ....	127
FIGURA 2.3 – CROMATOGRAMAS HPLC. ....	130
FIGURA 2.4 – DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DEL FOTOSISTEMA I EN LAS VAS.....	134
FIGURA 2.5 – ANÁLISIS DE <i>WESTERN-BLOT</i> ADICIONALES. ....	136
FIGURA 2.6 – ESPECTROGRAMAS 3-D DE FLUORESCENCIA. ....	138
FIGURA 2.7 – ESPECTROGRAMAS DE FLUORESCENCIA (EXCITACIÓN A 440NM).....	140
FIGURA 2.8 – DUAL PAM-100. ....	142
FIGURA 2.9 – DEGRADACIÓN DE PSAA EN LAS VAS AISLADAS. ....	144

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1 – ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	146
--	-----

## **RESUMEN**

La pérdida de clorofila es el principal síntoma visible de la senescencia en las hojas. Los pasos iniciales de la vía de degradación de la clorofila operan dentro de los cloroplastos, pero la reciente observación de que "Vacuolas Asociadas Senescencia" (VAS) contienen clorofila plantea la cuestión de si las mismas también pueden contribuir a la degradación de clorofila.

Las VAS aisladas contienen clorofila *a* y *b* (con una relación clorofila *a/b* cercana a 5) y pequeñas cantidades de clorofilido *a*. Las cantidades de clorofilido *a* y feoforbido *a* aumentan después de la incubación de las VAS a 30°C en oscuridad, lo que sugiere la presencia de actividades clorofilasa y Mg<sup>2+</sup>-dequelatasa en las VAS. A través de electroforesis en gel no-desnaturalizante, la clorofila en las VAS se asoció a un número de "bandas verdes". Los análisis de espectrometría de masas y de *Western-blot* mostraron que los complejos de clorofila-proteína aislados de las VAS son en su mayoría proteínas de unión a clorofila del Fotosistema I (FSI), incluyendo proteínas del centro de reacción del FSI y proteínas de los complejos captadores de luz del FSI (*Light Harvesting Complex*, LHC). Esto fue confirmado por mediciones de los espectros de fluorescencia a 77K, que mostraron un pico de emisión único en torno a 730nm en las VAS. La incubación de las VAS a 30°C en oscuridad produjo una disminución en los niveles de PsaA, que fue reducida por la adición de inhibidores de proteasas cisteínicas.

Por lo tanto, es probable que las VAS participen en la degradación de las proteínas del FSI y sus clorofilas asociadas durante la senescencia de las hojas.

## **INTRODUCCIÓN**

*El que no permanece en mí es echado fuera, como el sarmiento, y se seca, y los amontonan y los arrojan al fuego para que ardan.*

*San Juan 15:6*

La importancia de la clorofila para los organismos fotosintéticos, reside en que este pigmento les permite utilizar la energía lumínica en la síntesis de compuestos químicos de gran utilidad, pero también es importante saber qué hacer con ella cuando “ya no son requeridos sus servicios”. Durante la senescencia foliar, la pérdida de clorofila es un rasgo distintivo de la misma, así como un conveniente indicador de la degradación de los cloroplastos ([Krupinska 2006](#); [Ougham et al. 2008](#)). Cada año, miles de millones de toneladas de la clorofila se degradan durante la senescencia de las hojas en la Tierra ([Hendry et al. 1987](#)). A diferencia de la degradación de las proteínas, que proporcionan el nitrógeno para movilizar a otras partes de la planta, la clorofila se degrada en catabolitos nitrogenados (pirroles) que son eventualmente almacenados en la vacuola central, en una forma inmóvil ([Hörtensteiner 2006](#)). Por lo tanto, a menudo se asume que la degradación de la clorofila se ha desarrollado como un proceso de desintoxicación para evitar el riesgo potencial de fototoxicidad que podría surgir como consecuencia del desmantelamiento de los complejos de clorofila-proteína y la liberación de la clorofila libre o la formación de catabolitos fotodinámicos de la clorofila ([Mach et al. 2001](#); [Pruzinska et al. 2003](#)).

Hay una fuerte evidencia de la operación de una vía de degradación de la clorofila, que implica una serie de reacciones que tienen lugar en el cloroplasto y la vacuola central. Los pasos iniciales de la degradación de clorofila ocurren en el cloroplasto, y son catalizados por enzimas del cloroplasto ([Hörtensteiner 2006](#)). En primer lugar, los complejos clorofila-proteína de las membranas tilacoides son desmantelados, posiblemente con la participación de la proteína SGR ([Armstead et al. 2006, 2007](#); [Hörtensteiner 2009](#); [Park et al. 2007](#)). Entonces, la clorofila *a* es descompuesta a través de una serie de reacciones que incluyen defitilación por la

enzima clorofilasa, la eliminación de  $Mg^{2+}$  por una actividad dequelatasa y ruptura oxigenolítica del anillo de clorina por la enzima feoforbido *a* oxigenasa ([Hörtensteiner 2006](#); [Pruzinska et al. 2003](#)). Los catabolitos fluorescentes y no fluorescentes de la clorofila son formados después de la escisión oxigenolítica del anillo de clorina, y estos catabolitos son eventualmente desechados en la vacuola central ([Hinder et al. 1996](#)). Hasta el presente, no hay postulada ninguna vía independiente para la degradación de la clorofila *b*, que es degradada a través de esta misma vía después de la conversión en clorofila *a* por la enzima clorofila *b* reductasa ([Sato et al. 2009](#); [Scheumann et al. 1999](#)). Por otro lado, es factible encontrar variaciones a este esquema en diferentes especies, por ejemplo, en *Arabidopsis* donde la eliminación de  $Mg^{2+}$  por una actividad dequelatasa precede a la defitilación por la enzima feofitinasasa ([Schelbert et al. 2009](#)).

Observaciones circunstanciales sugieren también la operación de vías no-plastídicas para la degradación de la clorofila. Clorofilasas presuntas dirigidas a la vía secretoria fueron clonadas a partir de *Chenopodium album* y *Arabidopsis* ([Takamiya et al. 2000](#)). La sobre-expresión de ATCHL1, una clorofilasa aparentemente dirigida a la vía secretoria, provocó un aumento de la proporción clorofilo/clorofila de hojas ([Benedetti & Arruda 2002](#); [Kariola et al. 2005](#)), lo cual implica que ATCHL1 puede acceder a la clorofila *in vivo*. Sin embargo, las líneas mutantes *Knock Out* (KO) de ATCHL1 parecen degradar la clorofila normalmente durante la senescencia inducida por oscuridad ([Schenk et al. 2007](#)), lo que plantea dudas sobre su participación en la degradación de la clorofila.

Una nueva clase de vacuolas líticas en las hojas senescentes de soja y *Arabidopsis* fueron descritas por [Otegui et al. \(2005\)](#). Estas “Vacuolas Asociadas a la Senescencia” (VAS) son pequeñas (0,5 – 0,8 $\mu$ m de diámetro) y claramente distinguibles de la vacuola central, ya que son más ácidas y tienen diferentes proteínas marcadoras en su membrana limitante ([Otegui et al. 2005](#)). Observaciones por microscopía confocal y análisis bioquímico de las VAS aisladas mostraron que contienen proteínas del estroma cloroplástico, y que puede degradar RuBisCO *in vitro* ([Martínez et al. 2008](#)). Esto sugiere que las VAS desempeñan un papel en la degradación de las proteínas del estroma de los cloroplastos. Consistentemente, una fracción de las VAS también muestran una señal fluorescente con un espectro de

emisión idéntico a la clorofila, y un análisis bioquímico de las VAS nos permitió demostrar que esta señal de fluorescencia corresponde al menos a clorofila *a* ([Martínez \*et al.\* 2008](#)). Por lo tanto, es tentador sugerir que al menos una fracción de la clorofila de las hojas podría ser degradada dentro de las VAS. Por consiguiente, los principales objetivos aquí fueron determinar: 1) la composición de los pigmentos de las VAS, 2) si la clorofila en las VAS está unida a proteínas específicas de unión a clorofila, y 3) si la clorofila y las proteínas de unión a clorofila pueden ser degradadas en las VAS.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana), cultivadas en macetas de 1 litro con “tierra negra” en invernaderos con luz natural, con una temperatura de 20/15°C día/noche, en la ciudad La Plata (Argentina, 34° 55’ S, 57° 55’ W) durante los meses de marzo a noviembre, o en la ciudad de Kiel (Alemania, 54° 20’ N, 10° 7’ E) durante los meses de agosto y octubre. Como tratamiento para acelerar la senescencia, se utilizaron hojas maduras, las cuales fueron colocadas en cajas de plástico con un papel de filtro humedecido, y se indujo la senescencia de las hojas en oscuridad continua durante 1-2 días a 20°C. Para estandarizar la variación del contenido de clorofila en los tratamientos de inducción de senescencia de las hojas de tabaco en oscuridad, se utilizó el colorímetro SPAD-502 (*Konica Minolta*), determinando así el contenido de clorofila foliar de manera no destructiva.

### **Aislamiento de las VAS**

Para el aislamiento de las VAS, se utilizaron aproximadamente 12g de hojas de tabaco (sin la nervadura principal), y se realizó la homogeneización del tejido en un recipiente apropiado, rodeado con hielo, con la mezcladora *Braun Minipimer® MR5500BC*, durante 30 segundos a máxima potencia, con el agregado de 50ml de solución buffer (25mM HEPES pH 7,5; 0,6M manitol; 6,2mM cisteína; 2 mM EDTA; 1% p/v PVPP; 1mM PMSF). Para teñir las VAS con el marcador acidotrópico Rojo Neutro, el homogeneizado fue agitado suavemente durante 15 minutos en un agitador orbital en presencia de aproximadamente 0,1mg/ml de Rojo Neutro. Luego se filtró a través de una malla de nylon de 20µm de poro y se centrifugó a 3500g durante 15min a 4°C en un tubo tipo Falcon® de 50ml, en una centrífuga con rotor basculante. En esta centrifugación se eliminan del

homogeneizado la mayoría de los cloroplastos y membranas de los mismos. El sobrenadante fue colocado en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa: 5, 25, 35, 45 y 60% p/v sacarosa (preparados en 25mM HEPES pH 7,5; 0,6M manitol) y se centrifugó a 100000g en un rotor de tipo basculante (modelo MLS-50) durante 1 hora a 4°C en una ultracentrífuga *Optimax*<sup>TM</sup> (*Beckman-Coulter*) o en una ultracentrífuga Centrikon T-124 con un rotor TST41.14 (*Kontron Instruments*). Para aumentar el rendimiento de VAS en el aislamiento, puede utilizarse un gradiente discontinuo de sacarosa eliminando las concentraciones superiores a 25% p/v (*i.e.* 60, 45 y/o 35% p/v). Finalizada esta centrifugación se tomó la fracción “entrante” a la fase de 25% de sacarosa ([Fig. 2.1](#)), la cual es la que está mayormente enriquecida en VAS. Para eliminar las proteínas contaminantes solubles y las adheridas a la superficie externa de las VAS, la fracción enriquecida fue tratada con la proteasa Termolisina (*Sigma-Aldrich*) en una concentración final de aproximadamente 25µg/ml a 4°C durante 20 min. El tratamiento con Termolisina fue detenido por la adición de EGTA (concentración final 160µM). Dado que la termolisina no puede atravesar la membrana limitante de las VAS, este tratamiento permite eliminar proteínas contaminantes en el exterior de estas estructuras. Las VAS fueron luego re-aisladas en un nuevo gradiente de densidad igual al realizado previamente. Finalmente de aquí se tomó nuestra fracción de las VAS ([Fig. 2.1](#)), para la realización de los diferentes experimentos con las VAS aisladas.

Para los ensayos de actividad proteolítica, las VAS fueron aisladas sin el agregado de inhibidores de proteasas (PMSF). Para las muestras utilizadas en experimentos donde la presencia del colorante Rojo Neutro no es requerido (*v.g.* Citometría de flujo) o podría interferir posteriormente (*v.g.* Geles “Verdes”), el mismo no fue agregado en el homogeneizado ([Fig. 2.1](#)).

Para el ensayo de degradación *in vitro* de la clorofila en las VAS aisladas, se diluyeron las mismas con igual volumen de solución buffer (Hepes 25mM pH 7,5; 0,6M manitol) y luego fueron centrifugadas a 16000g durante 25min a 4°C. El sedimento enriquecido en las VAS fue incubado a 30°C durante 6h en oscuridad, y luego congelado rápidamente para su posterior análisis por HPLC como se describirá posteriormente.



## Análisis por citometría de flujo de las VAS aisladas

Para el análisis de citometría de flujo, se utilizaron las VAS aisladas, diluidas con solución de Fosfato de Sodio 50mM pH 7. Se analizaron las distintas muestras en el citómetro de flujo FACSCalibur™ (*Becton Dickinson*) (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) con excitación a 488nm y detección de emisión de fluorescencia en 515-545nm, 564-606nm y > 670nm. Para cada muestra fueron evaluados 20000-30000 eventos. Los datos obtenidos por el citómetro fueron analizados con el programa gratuito *Flowing Software v1.6* (diseñado por Perttu Terho, *Cell Imaging Core*, Centro de Biotecnología de Turku, Finlandia. [www.flowingsoftware.com](http://www.flowingsoftware.com)). Para teñir las VAS con el sustrato de proteasas cisteínicas R6502 [*bis*-(benciloxycarbonil-L-fenilalanil-L-arginina amida)-Rhodamina-110; *Molecular Probes*, Inc.], la primera fracción enriquecida en las VAS, después del tratamiento con Termolisina, fue incubada durante 15min a 30°C con 200µM del sustrato, y luego aisladas nuevamente en un gradiente de densidad de sacarosa tal como se realizó previamente.

## Determinación de clorofila y los pigmentos derivados de su catabolismo en las VAS aisladas

Para la determinación del contenido de clorofila en los diferentes aislamientos de las VAS y homogeneizados de hojas, así como también en otras muestras líquidas, se tomaron pequeñas alícuotas de las muestras a determinar, las cuales fueron diluidas en acetona bufereada (80:20 v/v; Acetona : Buffer Tris•HCl 100mM pH 7,8), y luego centrifugadas a 16000g durante 2min a 4°C para eliminar el material insoluble. Para la cuantificación espectrofotométrica de las clorofilas se utilizaron las ecuaciones descriptas en [Sims & Gamon \(2002\)](#), con una leve modificación:

➤ Clorofila *a* ( $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) =  $0,01373\cdot(A_{663} - A_{750}) - 0,000897\cdot(A_{537} - A_{750}) - 0,003046\cdot(A_{647} - A_{750})$

➤ Clorofila *b* ( $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) =  $0,02405\cdot(A_{647} - A_{750}) - 0,004305\cdot(A_{537} - A_{750}) - 0,005507\cdot(A_{663} - A_{750})$

Dónde  $A_{537}$ ,  $A_{647}$ ,  $A_{663}$ ,  $A_{750}$  representan la absorbancia de la muestra a 537nm, 647nm, 663nm y 750nm, respectivamente. Para convertir las unidades de concentración de químicas a físicas, se tuvieron en cuenta los pesos moleculares de la clorofila *a* (893,5 g.mol<sup>-1</sup>) y de la clorofila *b* (907,5 g.mol<sup>-1</sup>).

Para determinar la composición de pigmentos, se llevó a cabo un análisis por HPLC. Para ello, la fracción aislada de las VAS fue diluida con un volumen igual de solución buffer (Hepes 25mM pH 7,5; 0,6M manitol) y luego centrifugada a 16000g durante 25min a 4°C. El sedimento enriquecido en VAS fue resuspendido en un pequeño volumen (~20µl) del mismo buffer en el cual fueron sedimentadas, y luego se adicionó 100-200µl acetona bufereada al 80% (con Tris•HCl 100mM pH 7,8), se centrifugó a 16000g por 5min y se recuperó el sobrenadante, y antes de la inyección en un sistema HPLC, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,22µm de poro. El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando un equipo HPLC *Shimadzu* con una bomba LC-10ATvp y una segunda bomba LC-20AT, equipada con una columna *Varian ChromSep MicroSpher™ C18* (100mm × 4,6mm, 3µm tamaño de partícula, 120Å tamaño de poro), una columna guarda *Varian ChromSep SS C18* (10mm × 2mm) y un *loop* para inyección de la muestra de 20µl. Se utilizó un gradiente lineal de 15 minutos a partir de 100% de solvente A (80:20 v/v, Metanol : Acetato de Amonio 1M) hasta 100% de solvente B (80:20 v/v; Metanol : Acetona), y luego el solvente B se mantuvo 20min hasta que los pigmentos se eluyeron completamente. El caudal de flujo fue mantenido a 1ml.min<sup>-1</sup>, y la detección fue realizada a 667nm con un espectrofotómetro *Shimadzu SPD10-AVvp*. Los patrones de clorofila *a* y *b*, clorofilido *a* y *b*, feofitina *a* y *b*, feofórbido *a* y *b*, fueron preparados según se describe a continuación a partir de una extracción de *Arthrospira platensis* deshidratada, siguiendo los procedimientos que se describen a continuación.

### **Extracción de Clorofila *a* de *Arthrospira platensis***

El aislamiento de clorofila *a* se realizó a partir de *Arthrospira platensis* deshidratada, siguiendo el procedimiento descrito en [Iriyama et al. \(1974\)](#) con leves modificaciones. Se pesaron 600mg de *Arthrospira platensis*, se la hidrató en el

mortero (en hielo) con 1,2ml de Tris•HCl 100mM pH 7,8. Luego se agregaron 3 espátulas pequeñas de cuarzo molido. Se adicionaron 12ml de acetona bufereada 80:20 v/v (buffer Tris•HCl 100mM pH 7,8) y se mortereó la *Arthrospira platensis*. Luego se transfirió toda la mezcla a un tubo tipo Falcon® de 50ml, y se centrifugó 10min a 16000g. El sobrenadante acetónico se transfirió a otro tubo, y al precipitado se lo resuspendió en 12ml de DMF (DiMetil-Formamida), y se lo dejó hasta el día siguiente en oscuridad a 4°C.

Al sobrenadante acetónico se le agregó dioxano (0,14ml/ml de extracto) y luego fosfato de sodio 1mM pH 7,5 (0,32ml/ml de extracto) de a gotas y agitando. Se lo dejó reposar 1h a 4°C. Luego se lo centrifugó 10min a 16000g. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado fue resuspendido en 2ml de acetona bufereada 80:20 v/v. Inmediatamente se repitió el proceso de precipitación de igual modo. El precipitado se resuspendió en 1ml de *n*-hexano, y se lo centrifugó 10min a 16000g. El precipitado de clorofila se forma en la interfase de los solventes. Finalmente se disolvió el precipitado en 600µl de acetona bufereada 80:20 v/v, y se almacenó en crioviales en N<sub>2</sub> líquido.

Al día siguiente se utilizó el extracto de clorofila disuelta en DMF. Se centrifugó 10min a 16000g para eliminar restos de *Arthrospira platensis* y cuarzo. Al sobrenadante de DMF se le agregó dioxano (0,4ml/ml de extracto) y luego Fosfato de Sodio 1mM pH 7,5 (1ml/ml de extracto) de a gotas y agitando. Se lo dejó reposar 1h a 4°C, y se lo centrifugó 10min a 16000g. Se descartó el sobrenadante, y al precipitado se lo resuspendió en acetona bufereada 80:20 v/v. Luego se continuó la precipitación de la clorofila de igual modo que en el métodos descripto anteriormente, y finalmente la clorofila se almacenó en N<sub>2</sub> líquido.

### **Extracción de Clorofila *b* de hojas de espinaca**

Para la preparación de clorofila *b* patrón a partir de hojas de espinaca, se homogeneizaron las hojas en acetona bufereada 80:20 v/v (5ml/g de tejido). Luego se continuó con el procedimiento descripto en [Iriyama et al. \(1974\)](#) para la purificación de clorofila mediante precipitación por dioxano, para lo cual se agregó dioxano (0,14ml/ml de extracto) y luego fosfato de sodio 1mM pH 7,5 (0,16ml/ml de extracto) de a gotas y agitando. Se lo dejó reposar 1h a 4°C y se centrifugó durante

10min a 16000g. El precipitado fue resuspendido en acetona bufereada 80:20 v/v. Inmediatamente se repitió el proceso de precipitación de igual modo. Al segundo precipitado se lo resuspendió en 1ml de *n*-hexano, y se lo centrifugó 10min a 16000g. Finalmente el precipitado de clorofila formado en la interfase de los solventes se disolvió en acetona bufereada 80:20 v/v. La clorofila fue almacenada en crioviales en N<sub>2</sub> líquido, hasta su purificación en una columna de sacarosa.

Para purificar la clorofila *b* en una columna de sacarosa, se rellenó un tubo de vidrio de 3cm de diámetro y 40cm de largo con sacarosa molida finamente y secada en estufa 24hs. Se colocó el extremo inferior en un kitasato para poder realizar succión por vacío durante la elución con el solvente. En el extremo superior se sembró la muestra con clorofilas purificadas, y luego se comenzó a agregar lentamente el solvente de elución (1% v/v isopropanol en éter de petróleo o 5% v/v acetona en *n*-hexano). Cuando la fracción de clorofila *b* estaba por finalizar su elución de la columna, se colocó un tubo de ensayo dentro del kitasato para recoger dicha fracción. A esta fracción enriquecida en clorofila *b*, se la colocó en un rotavapor para eliminar el solvente de elución, y luego fue disuelta en acetona bufereada 80:20 v/v.

## **Preparación de Clorofilido**

Para la preparación de clorofilido *a* o clorofilido *b* se realizó una reacción enzimática con clorofilasa recombinante ([ver Capítulo 4, Expresión y purificación de Clorofilasa recombinante](#)), cuya construcción en el vector de expresión fue cedida gentilmente por el Dr. C. E. Benedetti ([Benedetti & Arruda 2002](#)). Dicho plásmido fue introducido en *Escherichia coli* BL21(DE3) conteniendo el plásmido pG-KJE8 (*Takara Bio*, Inc.) para la expresión de las chaperonas GroEL, GroES, DnaK, DnaJ y DrpE.

La reacción enzimática para la preparación de clorofilido se siguió de acuerdo al procedimiento descrito en [Benedetti & Arruda \(2002\)](#) con leves modificaciones. Se colocó un alícuota de 0,1ml (aproximadamente 50µg) de la clorofilasa recombinante purificada en 1ml de MOPS 0,1M pH 7, y luego se le agregó 0,2ml de clorofila *a* o clorofila *b* purificadas, según se deseara preparar clorofilido *a* o clorofilido *b*, respectivamente. La mezcla de reacción fue incubada a 25°C en

oscuridad con agitación por 30min. Se detuvo luego la reacción enzimática por la adición de igual volumen de acetona : hexano, 50:50 v/v. Se agitó fuertemente la mezcla, y se centrifugó 2min a 13000g para separar bien las fases. Se tomó finalmente la fase acuosa inferior enriquecida en clorofilido.

### **Preparación de Feofórbido y Feofitina**

La preparación de los patrones de feofórbido y feofitina fue realizada a partir clorofilido y clorofila, respectivamente, por acidificación con Metanol : HCl, 20:1 v/v, aproximadamente 15µl/ml de patrón.

### **Determinación de la actividad redox del P700**

Para la evaluación simultánea de la actividad redox del P700 y la fluorescencia modulada de clorofila se utilizó el DUAL-PAM-100 (*Heinz Walz GmbH*, Alemania) ([Schreiber et al. 2002](#)). Las suspensiones del aislamiento de las VAS y del homogeneizado de hojas de tabaco (a partir del cual se prepararon las VAS) fueron diluidas con solución buffer (Hepes 25mM pH 7,5; 0,6M manitol), a una concentración apropiada para las determinaciones en este equipo y para que la concentración de clorofila total en ambas muestras fuera similar. Luego se colocaron las muestras en la unidad óptica para suspensiones líquidas para realizar las determinaciones simultáneas de la cinética redox del P700 ([Harbinson & Hedley 1989](#); [Harbinson & Woodward 1987](#); [Klughammer & Schreiber 1994](#)) y de la fluorescencia modulada de clorofila ([Schreiber 1983](#); [Schreiber et al. 1996](#); [Schreiber et al. 1993](#); [Schreiber et al. 1986](#)). En nuestra determinación se iluminó la muestra con luz actínica roja (655nm,  $126\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y roja lejana (730nm, en la máxima intensidad del equipo), y a los 9seg de iniciada la iluminación con luz actínica se aplicaron pulsos saturantes de luz de  $10000\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de una duración de 44ms, bajo el programa de rutina del equipo DUAL-PAM-100 para la determinación de Pm' (para mayores detalles ver [Klughammer & Schreiber 2008](#)). La muestra se mantuvo 9seg más bajo luz actínica luego del pulso saturante de luz. Previo a comenzar la determinación, se balanceó la señal del detector de 830/875nm, lo cual determina el potencial basal (I) del detector, y así luego el equipo registrará los cambios (modo

cinético) en la absorbancia a (830 – 875)nm en relación al potencial basal del detector (es decir,  $\Delta I/I$ ). En la estimación de la fluorescencia basal ( $F_0$ ) de clorofila se consideró que el Fotosistema I aportaba el 30% del total de  $F_0$ . Esta estimación (estándar) es posible, ya que el rendimiento cuántico de fluorescencia del Fotosistema I, a diferencia del rendimiento cuántico de fluorescencia del Fotosistema II, es constante; es decir, no depende del estado redox del lado aceptor de electrones del Fotosistema I, ni del rendimiento cuántico no-fotoquímico de disipación de la energía de excitación en energía térmica. En nuestro caso realizamos determinaciones meramente cualitativas de la actividad cinética redox del P700 y de la fluorescencia modulada de clorofila, aunque el programa del equipo permitió obtener todos los parámetros cuantitativos.

### **Espectrogramas de fluorescencia de las VAS**

Los espectrogramas de emisión y excitación de fluorescencia fueron realizados con un espectrofluorómetro Hitachi F-4500 FL. Las determinaciones de los espectrogramas de fluorescencia fueron realizadas en el modo *Scan 3-D* del *software (FL Solutions)* del equipo, con los siguientes parámetros (EX: Excitación; EM: Emisión):

<i>EX Start WL:</i>	400,0nm
<i>EX End WL:</i>	800,0nm
<i>EX Sampling Interval:</i>	10,0nm
<i>EM Start WL:</i>	400,0nm
<i>EM End WL:</i>	800,0nm
<i>EM Sampling Interval:</i>	2,0nm
<i>Scan speed:</i>	1200nm/min
<i>EX Slit:</i>	2,5nm
<i>EM Slit:</i>	5,0nm

Los datos obtenidos en el modo *Scan 3-D* nos permitieron seleccionar las longitudes de onda de excitación (por ejemplo, 440nm) ([Mullet et al. 1980](#)) para las

cuales se observa la fluorescencia característica de los distintos complejos clorofila-proteína.

Para las determinaciones se realizaron diluciones de las VAS aisladas y del homogeneizado de hojas de tabaco, de modo tal de evitar la “auto-absorción” de la fluorescencia en las muestras. El análisis fue realizado en primer lugar a temperatura ambiente, y a continuación, se congeló la muestra en N<sub>2</sub> líquido para las determinaciones a 77K.

### Electroforesis en gel no-desnaturalizante

La electroforesis en gel no-desnaturalizante se realizó de acuerdo a [Sárvári & Nyitrai \(1994\)](#) con leves modificaciones. Se armaron geles de 3mm de espesor (~8cm ancho × ~9cm alto) con un gradiente de concentración de acrilamida de 6-12% para el gel de resolución, y una concentración de acrilamida de 4% para el gel de *stacking*. Para realizar el gel con un gradiente de concentración de acrilamida, se colocaron las soluciones de máxima (alta densidad) y mínima (baja densidad) concentración de acrilamida en el dispositivo para realizar gradientes del tipo de vasos comunicantes con un agitador magnético del lado donde se realizará la mezcla previo a ser vertida (por gravedad) entre las placas de vidrio para que polimerice la solución, para lo cual una vez que se vertieron las soluciones, se cubrió la misma con una fina capa isopropanol o *n*-butanol. Una vez que polimerizó la solución, se lavó con agua destilada el alcohol agregado, para preparar encima el gel de *stacking*, de modo tal que quede una distancia de ~4mm desde la base de la foseta hasta el gel de resolución. La composición de las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Solución de Alta Densidad:

Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilénbis-acrilamida (100:1)	12% p/v Acril.
Tris•HCl pH 9,8	1,31M
Deriphat® 160 (N-lauril-β-iminodipropionato sódico)	0,1% p/v
Glicerol	10% v/v
APS (Peroxidisulfato amónico)	0,0125% p/v
TEMED ( <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etano-1,2-diamina)	0,07% v/v

Solución de Baja Densidad:

Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilen- <i>bis</i> -acrilamida (100:1)	6% p/v Acril.
Tris•HCl pH 9,8	1,31M
Deriphat® 160 (N-lauril- $\beta$ -iminodipropionato sódico)	0,1% p/v
Glicerol	10% v/v
APS (Peroxidisulfato amónico)	0,0125% p/v
TEMED ( <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etano-1,2-diamina)	0,07% v/v

Solución *Stacking*:

Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilen- <i>bis</i> -acrilamida (100:1)	4% p/v Acril.
Tris•HCl pH 6,1	0,1M
Deriphat® 160 (N-lauril- $\beta$ -iminodipropionato sódico)	0,1% p/v
Glicerol	10% v/v
APS (Peroxidisulfato amónico)	0,025% p/v
TEMED ( <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etano-1,2-diamina)	0,07% v/v

La electroforesis fue realizada aplicando una corriente de 100V (constante), durante aproximadamente 2h a 4-8°C En la misma se usó un buffer de electroforesis de la siguiente composición:

Tris•HCl pH 8,3	0,025M
Glicina	0,19M
Deriphat® 160 (N-lauril- $\beta$ -iminodipropionato sódico)	0,2% p/v

Para la electroforesis se sembró un volumen de muestra correspondiente a un total de 14 $\mu$ g de clorofila total en las mismas. Como la altura del volumen cargado de muestra no debe ser superior a la altura del gel de *stacking*, se diseñaron “peines” de ~8mm de ancho. Las muestras de las VAS aisladas se prepararon previamente a la electroforesis solubilizándolas con una mezcla de detergentes (*n*-Decil- $\beta$ -D-maltopiranosido : *n*-Heptil- $\beta$ -D-tioglucopiranosido : SDS; 4,5:4,5:1 p/p) en una relación de Detergente : Clorofila, 40:1 p/p.

El aislamiento de tilacoides de hojas de tabaco fue realizado siguiendo el procedimiento descrito en [Tambussi et al. \(2000\)](#). Las muestras de tilacoides fueron solubilizadas con una mezcla de detergentes (*n*-Decil- $\beta$ -D-maltopiranosido :



*n*-Heptil- $\beta$ -D-tioglucopiránosido : SDS; 4,5:4,5:1 p/p) en una relación de Detergente : Clorofila, 40:1 p/p.

### **Análisis de las proteínas por espectrometría de masas<sup>1</sup>**

Las bandas verdes observadas en la electroforesis en geles no-desnaturalizantes correspondientes a la muestra de las VAS aisladas fueron cortadas del mismo, y preparadas para ser analizadas por espectrometría de masas (LC-MS/MS) siguiendo el procedimiento descrito en [Kufryk et al. \(2008\)](#) para el análisis de los péptidos obtenidos de la digestión *in-gel* utilizando tripsina.

Las bandas del gel verde fueron removidas, cortadas en pequeños cubos y desteñidas mediante extracción de los pedazos de gel cuatro veces durante 30 minutos usando 0,2ml de Bicarbonato de Amonio 20mM en 35% v/v de Acetonitrilo. Lo pedazos de gel fueron secados mediante 2 lavados usando 0,1ml de Acetonitrilo puro, y los pedazos blancos secos de gel fueron reconstituidos en hielo con una solución de Bicarbonato de Amonio 20mM, Acetonitrilo 10% v/v, y tripsina modificada (grado secuenciación, *Promega*) 2ng/ $\mu$ l. La cantidad de la solución de tripsina depende del volumen de los pedazos de gel y se coloca lo necesario para cubrir los pedazos de gel. Después de aproximadamente 1h de la digestión *in-gel* las muestras fueron transferidas del hielo a un cuarto de incubación a 37°C; la cantidad de solución de tripsina fue verificada luego de 10 minutos y, en caso de ser necesario, ajustada de modo de asegurar que los pedazos de gel no se sequen durante la incubación. El tratamiento con tripsina fue continuado *overnight* a 37°C.

Para preparar las muestras para el análisis mediante Fase Reversa LC-MS/MS, la fase líquida de las muestras de la digestión *in-gel* fue diluida con agua Milli-Q a una concentración final de 5% v/v de Acetonitrilo; las soluciones fueron acidificadas mediante adición de Ácido Fórmico 10% v/v hasta una concentración final de 1% v/v, y centrifugadas por 15 minutos a 20000g a 4°C. El análisis por LC-MS/MS fue realizado utilizando un *Acquity UPLC (Waters)* acoplado a un *Q-TOF Ultima Mass Spectrometer (Waters)*. Los péptidos fueron

---

<sup>1</sup> Este análisis fue realizado en los laboratorios del Departamento de Química de la Universidad de Umeå (Suecia) mediante una colaboración con la Dra. Christiane Funk.

separados mediante la cromatografía de nanoflujo en fase reversa utilizando una columna BEH C18 (100 $\mu$ m  $\times$  100mm, 1,7 $\mu$ m tamaño de partícula, 130 $\text{Å}$  tamaño de poro), la cual fue equilibrada a un flujo de 350nl.min<sup>-1</sup> con 95% del solvente A (5% v/v Acetonitrilo en 0,1% v/v Ácido Fórmico) y 5% del solvente B (95% v/v Acetonitrilo en 0,1% v/v Ácido Fórmico). La separación de los péptidos fue realizada aplicando un gradiente lineal desde 15% del solvente B hasta el primer minuto, y luego a 45% del solvente B hasta los 20 minutos, y manteniendo constante esa proporción del solvente B hasta los 35 minutos. La adquisición de los espectros fue realizada utilizando los parámetros típicos para el análisis directo de datos del software *MassLynx v4.1*. Los péptidos eluidos *on-line* dentro de la fuente de iones fueron monitoreados utilizando un MS-TOF *survey scan* ( $m/z$  400 a  $m/z$  1300, tiempo de escaneo 0,8s, y *inter delay* 0,2s), y las 3 señales más abundantes fueron seleccionadas por su estado de carga para análisis MS/MS (rango  $m/z$  50–2000, tiempo de escaneo 1,0s, *inter delay* 0,1s). Para obtener una mejor cobertura de los péptidos presentes en las muestras, se realizaron corridas adicionales bajo idénticas condiciones pero empleando ventanas más pequeñas de masa para el MS-TOF *survey scan* ( $m/z$  400–900 y  $m/z$  900–1300).

Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el *ProteinLynx Global Server v2.2.5* (Waters) y con los parámetros para deisotopización rápida combinada con una sustracción de 50% de la línea de base. El archivo .PKL resultante fue usado para las búsquedas en las bases de datos de TAIR9 y NCBIInr (actualizada al 20 de septiembre de 2009) utilizando el filtro taxonómico para plantas verdes. Los parámetros de búsqueda permiten errores de masa de hasta 100ppm para los datos del MS, y de hasta 0,06 Da para los datos del MS/MS. Se utilizaron otros parámetros adicionales permitiendo 2 sitios de corte “perdidos” para la tripsina y las modificaciones variables: deamidación (Asn, Gln), oxidación (Met), fosforilación (Ser, Thr, Tyr) y derivación en propionamida (Cys). El umbral para la identificación de péptidos individuales fue establecido en 99,5% de confianza y las identificaciones redundantes fueron excluidas utilizando la función de “rojo intenso” (*bold red*).

## Análisis de *Western-blot* y ensayos de autodigestión

Para los experimentos de “autodigestión”, se incubaron los aislamientos enriquecidos en las VAS en oscuridad a 30°C con o sin la adición de inhibidores de proteasas [E64 (90µM), AEBSF (900µM)]. Se fueron tomando alícuotas de las muestras, a distintos tiempos, y se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente se utilizaron estas muestras para analizar por *Western-Blot* los niveles de la proteína de interés antes y después de la incubación.

Para el ensayo de *Western-blot*, se realizó en una primera etapa una electroforesis en gel desnaturizante siguiendo el procedimiento descrito en [Fling & Gregerson \(1986\)](#). Se utilizó un *mid*i-gel (gel de tamaño mediano) de 10% p/v de acrilamida (o 16%, para el análisis de Lhca1-4). La composición de los geles de resolución y *stacking* fueron las siguientes:

Gel de Resolución	
Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilen- <i>bis</i> -acrilamida (37:1)	10 o 16% p/v Acril.
Tris•HCl pH 8,85	0,75M
SDS (Dodecil sulfato sódico)	0,10% p/v
APS (Peroxidisulfato amónico)	0,02% p/v
TEMED ( <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etano-1,2-diamina)	0,04% v/v

Gel de <i>Stacking</i>	
Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilen- <i>bis</i> -acrilamida (37:1)	5% p/v Acril.
Tris•HCl pH 6,8	0,125M
SDS (Dodecil sulfato sódico)	0,10% p/v
APS (Peroxidisulfato amónico)	0,10% p/v
TEMED ( <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etano-1,2-diamina)	0,10% v/v

La composición del buffer utilizado para la electroforesis fue el siguiente:

Tris•HCl pH 8,5	0,025M
Glicina	0,19M
SDS (Dodecil sulfato sódico)	0,1% p/v

Las diferentes muestras a analizar fueron mezcladas con Buffer de muestra (Tris•HCl 0,055M pH 6,8; SDS 2% p/v; Glicerol 7% v/v; 2-Mercaptoetanol 4,3% v/v; Azul de Bromofenol 0,001% p/v). Se cargaron las muestras en el gel igualando

un total de  $\sim 1\mu\text{g}$  de clorofila (para los ensayos de autodigestión descriptos a continuación, es clorofila total inicial previo a la incubación) en cada una de las fosetas.

La electroforesis se realizó aplicando una corriente (constante) de  $\sim 15\text{mA}$  por gel a  $4^\circ\text{C}$  hasta que el colorante (Azul de bromofenol) llegara al fondo del gel ( $\sim 5\text{h}$ ).

Una vez finalizada la electroforesis en el gel, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa ( $0,1\mu\text{m}$  de poro) siguiendo el procedimiento descrito en [Towbin \*et al.\* \(1979\)](#) con algunas modificaciones. Se aplicó una corriente (constante) de  $200\text{mA}$  durante  $2\text{hs}$  a  $4^\circ\text{C}$ . Para la transferencia se utilizó un buffer de la siguiente composición:

Tris	48mM
Glicina	39mM
SDS (Dodecil sulfato sódico)	0,037% p/v
Metanol	20% v/v

Previo a la electrotransferencia, tanto la membrana de nitrocelulosa como el gel conteniendo las proteínas, fueron colocados en el buffer de transferencia durante  $5\text{min}$  para equilibrar el pH de ambos con el nuevo pH del buffer.

Finalizada la electrotransferencia, se realizó una tinción de las proteínas de la membrana con Rojo Ponceau (Ponceau S 0,2% p/v; Ácido Tricloroacético 3% p/v; Ácido Sulfosalicílico 3% p/v) para marcar la ubicación de los marcadores de peso molecular. Luego se realizó el “bloqueo” de la membrana con buffer TBS-T (Tris•HCl 20mM pH 7,4; NaCl 150mM, Tween-20® 0,05% v/v) o PBS-T (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,49mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,09mM; NaCl 145,30mM; Tween-20® 0,05% v/v) con 5% p/v de leche en polvo descremada. El bloqueo se realizó *overnight*, con agitación a  $4^\circ\text{C}$ . Luego se lavó la membrana 3 veces con buffer TBS-T o PBS-T durante  $5\text{min}$ , y se incubó la membrana con buffer TBS-T o PBS-T con 1% p/v de leche en polvo descremada conteniendo el anticuerpo primario contra la proteína de interés, durante  $2\text{h}$  a temperatura ambiente o *overnight* a  $4^\circ\text{C}$  con agitación. Luego se lavó la membrana 5 veces con buffer TBS-T o PBS-T durante  $5\text{min}$ , y se incubó la membrana con buffer TBS-T o PBS-T con 1% p/v de leche en polvo descremada conteniendo el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con la enzima HRP (Peroxidasa de Rábano picante, *Armoracia rusticana*) durante  $1\text{h}$  a temperatura

ambiente. Luego se lavó la membrana 3 veces con buffer TBS-T o PBS-T durante 5min, y se procedió a la visualización de las proteínas de interés siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del reactivo quimioluminiscente (*NEN<sup>TM</sup> Life Science Products, USA*) y detectada mediante autoradiogramas usando las películas Amersham Hyperfilm ECL (*GE Healthcare, USA*).

Para reutilizar la membrana de nitrocelulosa con otros anticuerpos para otra proteína de interés se siguió el procedimiento descrito por [Suck & Krupinska \(1996\)](#) con leves modificaciones. La membrana de nitrocelulosa fue colocada 8min con agitación en buffer de *stripping* (NaOH 0,4M; SDS 0,1% p/v) a temperatura ambiente. Luego se lavó dos veces con agua destilada durante 2min. A continuación se lavó nuevamente dos veces con buffer TBS-T o PBS-T durante 5min. Finalizada esta etapa, se bloqueó la membrana nuevamente con TBS-T o PBS-T con 5% p/v de leche en polvo descremada.

Los anticuerpos utilizados contra PsaA, Elip1, Elip2, Lhca1, Lhca3 y Lhca4 fueron comprados a Agrisera (*Agrisera AB, Vännas, Suecia*). El anticuerpo contra Lhca2, fue donado gentilmente por *Carlsberg Labs* (Dinamarca). El anticuerpo contra FtsH11 fue donado gentilmente por la Dra. Carina Knorpp (University of Umeå, Suecia).

## RESULTADOS

### Clorofila en las VAS aisladas

A través de observaciones mediante microscopía confocal ([Martínez et al. 2008](#)), se ha notado en las VAS una fluorescencia similar a la fluorescencia de la clorofila “cloroplástica” (es decir, con un pico de emisión alrededor de 685nm). A fin de examinar la composición de pigmentos de las VAS, las mismas fueron aisladas y purificadas como se describió anteriormente. El protocolo empleado para el aislamiento de las VAS, brinda un rendimiento de las VAS purificadas sin contaminación por cloroplastos o la vacuola central ([Martínez et al. 2008](#)). Para confirmar que la clorofila en esta fracción está realmente confinada dentro de las VAS, hemos realizado un análisis por citometría de flujo de las VAS aisladas marcadas con el marcador acidotrópico rojo neutro, o el sustrato de proteasas cisteínicas R6502, los cuales marcan las VAS *in vivo* ([Otegui et al. 2005](#)). Es importante destacar que ninguno de estos fluoróforos produce una marcación significativa de los cloroplastos ([Otegui et al. 2005](#)). La [figura 2.2](#) muestra que las vesículas (“eventos” del citómetro) conteniendo clorofila en nuestra fracción de las VAS han sido marcadas con rojo neutro ([Fig. 2.2A](#)) o R6502 ([Fig. 2.2B](#)), es decir, la clorofila está contenida dentro de las VAS. A su vez, los datos obtenidos mostraron distintas poblaciones de VAS, una de las cuales no muestra fluorescencia de clorofila y a su vez es marcada por rojo neutro o R6502 ([Fig. 2.2A-F](#)), lo cual es concordante con resultados previamente observados ([Martínez et al. 2008](#)). Otra fracción de eventos muestra fluorescencia de clorofila y no son teñidas por rojo neutro o R6502, y esto puede ser atribuido a una baja eficiencia del marcador acidotrópico o de la actividad de las proteasas cisteínicas, respectivamente ([Fig. 2.2A-F](#)). Cabe aclarar que debido al pequeño tamaño de las VAS, se debió utilizar una alta ganancia de los detectores del equipo, con lo cual hay una fracción de los eventos registrados que carecen de marcas de fluorescentes (clorofila y rojo neutro o R6502) que podría ser material particulado y es adicionado al conteo de eventos correspondientes a las VAS

aisladas, subestimando de esta manera la proporción de eventos con señal de rojo neutro/R6502 y clorofila.

### Degradación de clorofila en las VAS aisladas

El análisis por HPLC de la composición de los pigmentos de VAS aisladas mostró dos picos principales correspondientes a clorofila *a* y *b* ([Fig. 2.3A](#)). Las medidas espectrofotométricas de las VAS disueltas en acetona bufereada al 80% indican que la relación clorofila *a/b* es  $5,12 \pm 1,01$  (media  $\pm$  DE) ([Fig. 2.3B-C](#)), es decir, considerablemente más alta que la relación clorofila *a/b* típica de hojas o tilacoides. Los niveles de clorofilido *a* y feofitina *a* fueron muy inferiores a los de clorofila, mientras que inicialmente los niveles de feofórbido *a* no fueron detectables, así como tampoco de clorofilido *b*, feofórbido *b* o feofitina *b*. Por lo tanto, las VAS contienen clorofila y clorofilido *a*, el cual es el primer catabolito de la vía de degradación de clorofila en muchas especies ([Hörtensteiner 2006](#)), y a su vez están altamente enriquecidas en clorofilido *a*, en comparación con el homogeneizado total de las hojas ([Fig. 2.3A](#)). Para determinar si los catabolitos de la clorofila se forman en las VAS o si se exportan desde los cloroplastos senescentes, se incubaron *in vitro* las VAS para seguir los cambios en su composición de pigmentos. La incubación *in vitro* en oscuridad de las VAS aisladas causó un aumento inicial abrupto en los niveles de clorofilido *a* ([Fig. 2.3D](#)). Por ejemplo, los niveles de clorofilido *a* aumentaron aproximadamente 5 veces durante las 6 horas de incubación. Por lo tanto, las VAS contienen clorofila, y también son competentes en la degradación de clorofila para obtener los catabolitos conocidos en los primeros lugares de la vía de degradación de clorofila, clorofilido *a* y feofórbido *a*, este último aumentando su concentración a medida que transcurre el tiempo de incubación de las VAS. A su vez se observó que los niveles de feofitina *a* van incrementándose lentamente a medida que transcurre el tiempo de incubación, al igual que los niveles de  $13^2\text{OH}$ -clorofila *a* y piroclorofilido *a* ([Fig. 2.3D](#)). Si bien carecemos de los patrones de los dos últimos catabolitos de clorofila mencionados ( $13^2\text{OH}$ -clorofila *a* y piroclorofilido *a*), es

posible determinar su presencia por estimación de sus tiempos de retención cromatográficos ([Roca & Minguez-Mosquera 2003](#)).

## Identificación de proteínas de unión a clorofila en las VAS

En las membranas tilacoides de los cloroplastos, la clorofila se une a proteínas específicas para formar complejos clorofila-proteína ([Scheer 2006](#)), y probablemente no hay ninguna cantidad significativa de clorofila libre en las células vivas. Por lo tanto tratamos de determinar si la clorofila está ligada a proteínas específicas de unión a clorofila en las VAS. Las proteínas de las VAS aisladas fueron solubilizadas con una mezcla de detergentes suaves y separadas por electroforesis en gel no-desnaturalizante para preservar las interacciones proteína-clorofila. Con muestras de membranas tilacoidales, este sistema de electroforesis separa una serie de bandas de color verde (es decir, complejos de clorofila-proteína), con casi ninguna liberación de clorofila libre ([Fig. 2.4A](#)). En las muestras de VAS aisladas se observaron cuatro bandas verdes. La banda 1, la más abundante y la que contiene la mayor proporción de clorofila en las VAS, mostró una movilidad electroforética más lenta que cualquier otra “banda verde” de las VAS o tilacoides. El análisis LC-MS/MS de esta primera banda mostró mayormente una concordancia de los péptidos hallados con secuencias de proteínas del Fotosistema I, incluyendo proteínas del centro de reacción del Fotosistema I, así como también subunidades de la ATP sintasa cloroplástica y V-(H<sup>+</sup>)ATPasas, que probablemente tengan una movilidad electroforética similar en nuestro sistema a los complejos del Fotosistema I ([Tabla 2.1](#)). La banda 2 también contiene proteínas del Fotosistema I, así como también la subunidad β de la ATP-sintasa cloroplástica y V-(H<sup>+</sup>)ATPasas ([Tabla 2.1](#)). Las bandas 3 y 4 estuvieron principalmente compuestas por proteínas (con mayor *score*) de unión a clorofila *a/b* de los complejos captadores de luz de los fotosistemas (proteínas Lhc) ([Tabla 2.1](#)). Cuando se examinan bajo luz UV, las bandas 2, 3 y 4 fluorescen fuertemente ([Fig. 2.4B](#)), mientras que la banda 1 no fluoresce, lo cual es consistente con la mitigación (*quenching*) fotoquímica de la fluorescencia en el centro de reacción del Fotosistema I (v.g. [Allen & Staehelin](#)



[1991](#)). Para confirmar la presencia de proteínas del Fotosistema I, las VAS aisladas fueron sometidas a SDS-PAGE y *Western-blot* con anticuerpos específicos. Fueron detectadas en las VAS aisladas de hojas senescentes inducidas por oscuridad durante 1 o 2 días, la proteína PsaA del centro de reacción del Fotosistema I y las proteínas Lhca1, Lhca2, Lhca3 y Lhca4 del complejo captador de luz LHCI ([Fig. 2.4C](#)).

### Otras proteínas cloroplásticas

En el trabajo previo de [Martínez et al. \(2008\)](#) no se pudieron detectar mediante análisis de *Western-blot*, las proteínas D1 y LHCII del Fotosistema II en las VAS aisladas ([Fig. 2.5A](#)), por lo que se amplió el análisis a otras proteínas del mismo Fotosistema II: Las proteínas CP43 y CP47, proteínas de unión a clorofilas del centro de reacción del Fotosistema II no fueron detectables en las VAS ([Fig. 2.5B](#)). Así mismo se intentó detectar la presencia de otras proteínas de localización cloroplástica; la metaloproteasa FtsH11 ([Heazlewood et al. 2004](#); [Urantowka et al. 2005](#)), y las proteínas de unión a clorofila ELIPs (v.g. [Andersson et al. 2003](#); [Bruno & Wetzel 2004](#)) (utilizando anticuerpos generados contra péptidos de las proteínas ELIP1 y ELIP2 de *Arabidopsis thaliana*), las cuales también resultaron no-detectables en las VAS ([Fig. 2.5C](#))

### Fluorescencia del Fotosistema I en las VAS

A fin de estudiar más en profundidad la presencia de los fotocomplejos en las VAS, se analizaron los espectrogramas de emisión de fluorescencia a temperatura ambiente y a 77K. A esta última temperatura, la emisión de fluorescencia del Fotosistema I tiene un pico característico en alrededor de 730nm, mientras que el Fotosistema II emite en varios picos entre 680 y 695nm ([Govindjee 2004](#)). En primer lugar, se realizaron los espectrogramas con el modo *Scan 3-D* ([Fig. 2.6](#)), a partir de los cuales se localizaron las longitudes de onda de excitación para observar los picos máximos de emisión de fluorescencia; las longitudes de onda de excitación encontradas correspondieron a 440 y 480nm. A su vez los espectrogramas de emisión

a 440 o 480nm prácticamente no mostraron diferencias cualitativas entre si. Así mismo, estos espectrogramas 3D nos muestran *a priori* que la única señal de fluorescencia en las VAS provendría de complejos clorofila-proteína con propiedades espectrales similares o características de los fotocomplejos tilacoidales, y no son detectables otros posibles complejos conteniendo clorofila.

A temperatura ambiente, los espectrogramas de emisión (excitación a 440nm) de las VAS y del homogeneizado de hoja del cual las VAS fueron aisladas (y que representa mayormente la fluorescencia de tilacoides) fueron prácticamente idénticos ([Fig. 2.7A](#)), lo que confirma la observación previa de los espectrogramas de emisión de fluorescencia de los cloroplastos y las VAS determinados por microscopía confocal *in vivo* ([Martínez et al. 2008](#)). Sin embargo, los espectrogramas fueron muy diferentes a 77K. Mientras que dos picos de emisión principales alrededor de 680 y 730nm que representan la emisión del Fotosistema II y del Fotosistema I, respectivamente ([Govindjee 2004](#)), dominaron el espectrograma del homogeneizado de hoja (en su mayoría tilacoides), sólo el pico a 730nm emanado del Fotosistema I fue observado en las VAS aisladas ([Fig. 2.7B](#)). En ambos casos, tanto a temperatura ambiente como a 77K, las muestras del homogeneizado mostraron una mayor eficiencia de fluorescencia respecto de las muestras de las VAS aisladas, sobre todo teniendo en cuenta que la concentración de clorofila total en la muestra de las VAS fue mayor a la del homogeneizado de tejido.

Por otra parte, las VAS mostraron los cambios en la absorbancia a 830nm típicos de la reducción/oxidación del P700 ([Schreiber 2004](#)), donde el incremento de la absorbancia a 830nm representa la oxidación del P700 luego de iluminar con luz roja lejana. Claramente podemos observar ([Fig. 2.8](#)) la presencia de Fotosistema I “funcional” tanto en el homogeneizado de tejido como en las VAS. Por otro lado, mientras en el homogeneizado se observó la típica fluorescencia variable asociada con el Fotosistema II, la misma no pudo ser detectada en las VAS ([Fig. 2.8](#)). Todas estas evidencias indican que las VAS contienen unidades del Fotosistema I, en cual el centro de reacción P700 es capaz de ser oxidado y reducido continuamente, y a lo sumo no más que posibles trazas de Fotosistema II.

## **Degradación de la proteína de unión a clorofila PsaA del Fotosistema I en las VAS aisladas**

Las VAS son un compartimento lítico en células de las hojas senescentes, con actividad proteolítica muy intensa ([Otegui \*et al.\* 2005](#)). Las VAS aisladas pueden degradar RuBisCO ([Martínez \*et al.\* 2008](#)) y, presumiblemente, otras proteínas del estroma. Esto plantea la cuestión de si las VAS pueden degradar las proteínas del Fotosistema I también. La incubación de VAS aisladas a 30°C en oscuridad dio lugar a una rápida disminución en los niveles de la proteína de unión a clorofila PsaA del centro de reacción del Fotosistema I ([Fig. 2.9A](#)). La degradación de PsaA fue reducida por la adición del inhibidor de proteasas cisteínicas E-64 ([Fig. 2.9B](#)). AEBSF, un inhibidor de las proteasas serínicas, fue mucho menos efectivo que el E-64. Estos datos muestran que las proteasas de tipo cisteínicas presentes en las VAS pueden degradar las proteínas del Fotosistema I en este compartimento.

**FIGURAS**

Figura 2.1 – Aislamiento de las VAS.

Fraccionamiento del homogeneizado de hojas de tabaco mediante ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa. Primer (A) y segundo (C) fraccionamiento en un gradiente discontinuo de 5-60% p/v sacarosa, con (derecha) y sin (izquierda) Rojo Neutro. Primer (B) y segundo (D) fraccionamiento en un gradiente discontinuo de 5-35% p/v sacarosa, con (derecha) y sin (izquierda) Rojo Neutro. Se indica en las figuras la fracción enriquecida en VAS.

Figura 2.1

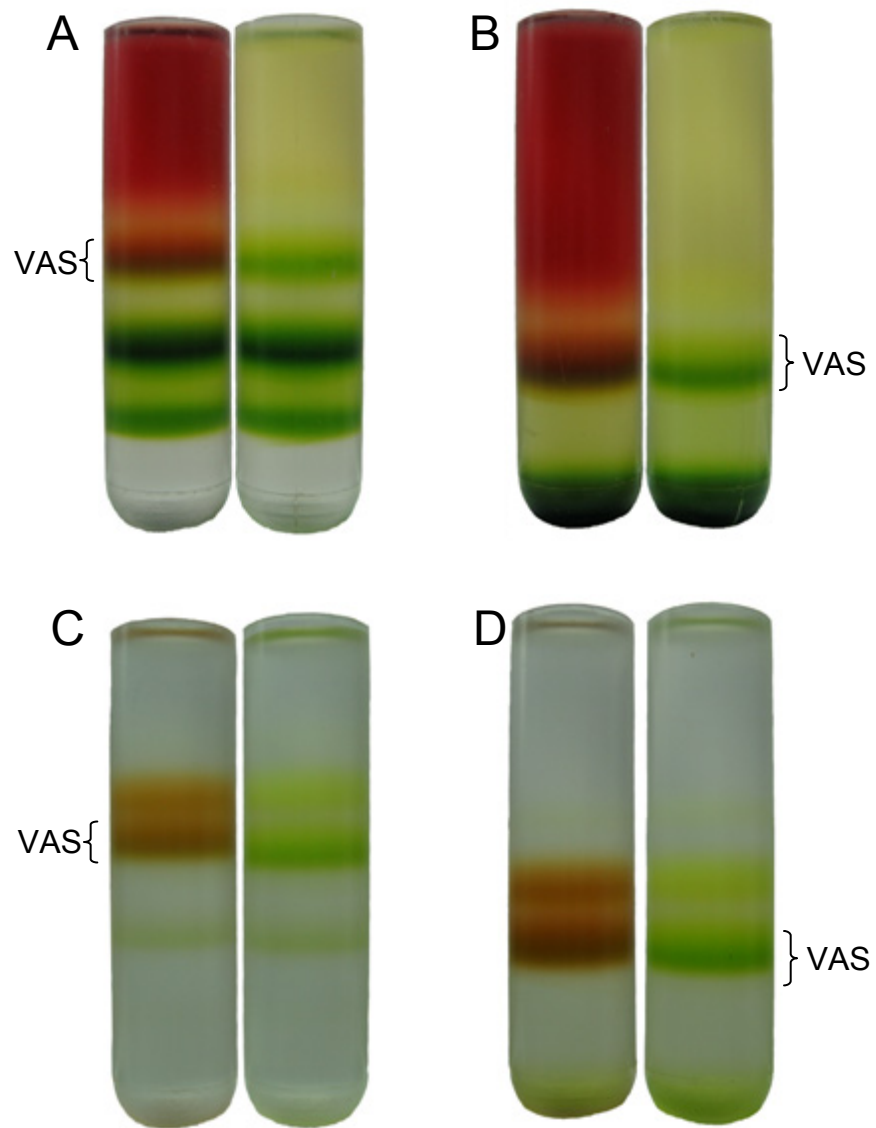


Figura 2.2 – Análisis por citometría de flujo de las VAS aisladas.

*Density-plots* de VAS analizadas por fluorescencia de Clorofila y Rojo Neutro (RN) (A y C) o Clorofila y R6502 (B y D). Figuras C y D, corresponden a muestras de VAS sin el agregado de RN o R6502. Figuras E y F muestran los histogramas superpuestos correspondientes a los eventos contabilizados para la señal de fluorescencia de RN y R6502, en las muestras con (línea gruesa) y sin (línea fina) el agregado de los mismos. Las tablas G y H muestran los datos estadísticos de cada uno de los histogramas en el segmento indicado en el gráfico.

Figura 2.2

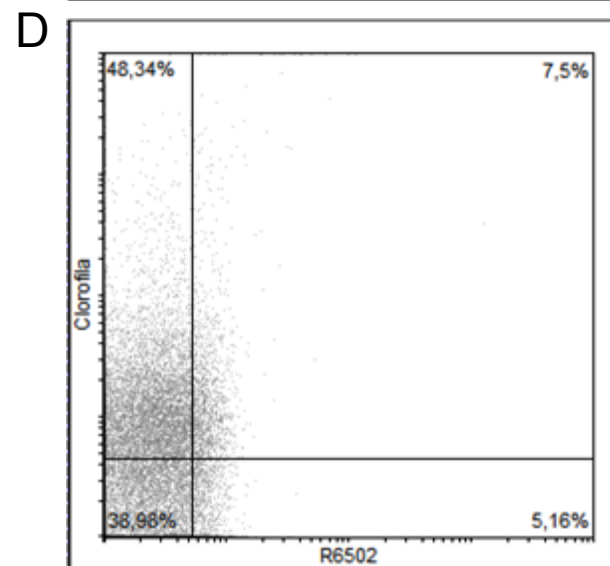
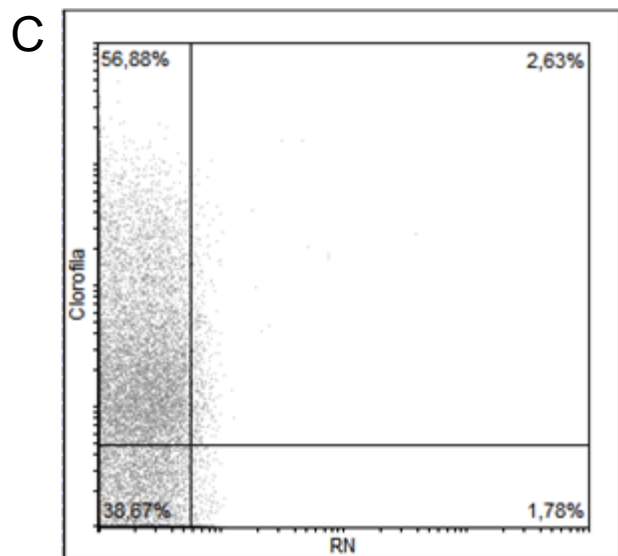
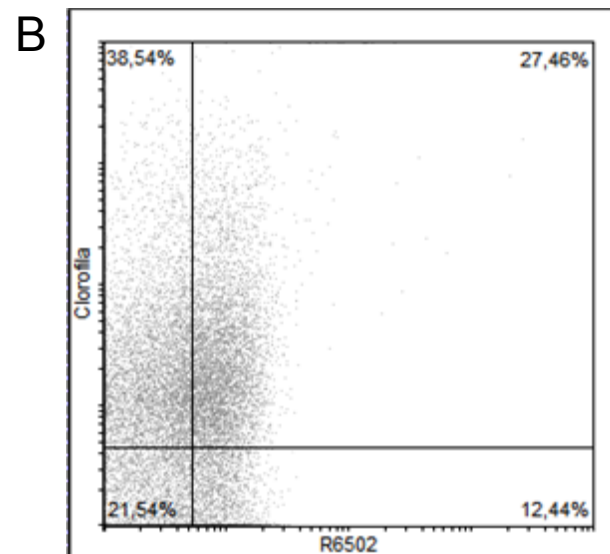
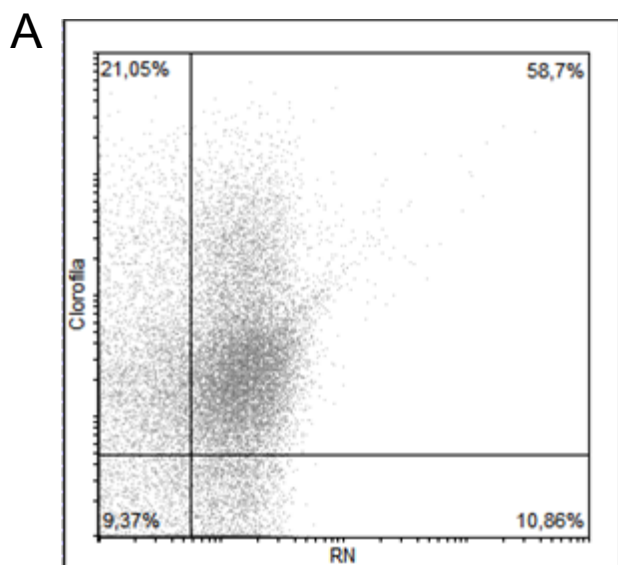
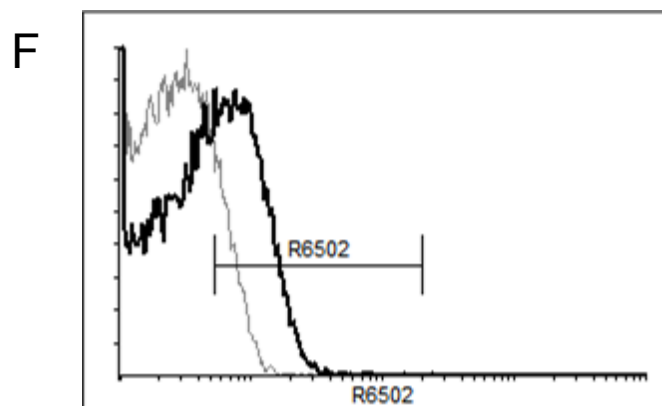
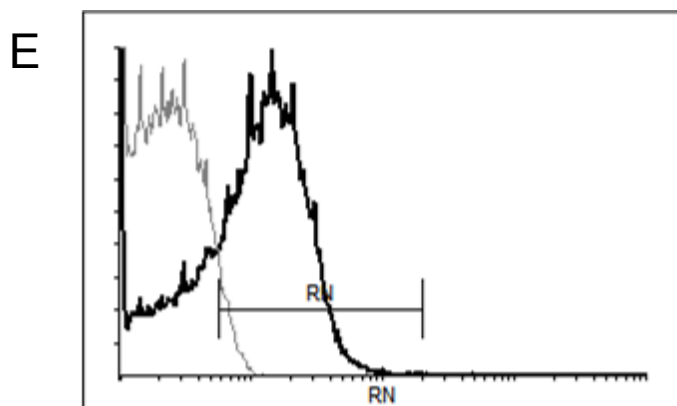


Figura 2.2



G

- RN	Number	% of vis	X Mean	X GeoMean	CV
All events	20000	100	2,37	1,93	141,35
RN	926	4,63	7,23	6,93	56,96

+ RN	Number	% of vis	X Mean	X GeoMean	CV
All events	20000	100	15,05	8,59	472,02
RN	13925	69,62	18,31	15,52	71

H

- R6502	Number	% of vis	X Mean	X GeoMean	CV
All events	20000	100	2,53	2,08	390,88
R6502	2530	12,65	7,67	7,27	58,17

+ R6502	Number	% of vis	X Mean	X GeoMean	CV
All events	20000	100	5,54	3,44	474,64
R6502	7974	39,86	10,75	9,74	61,88



Figura 2.3 – Cromatogramas HPLC.

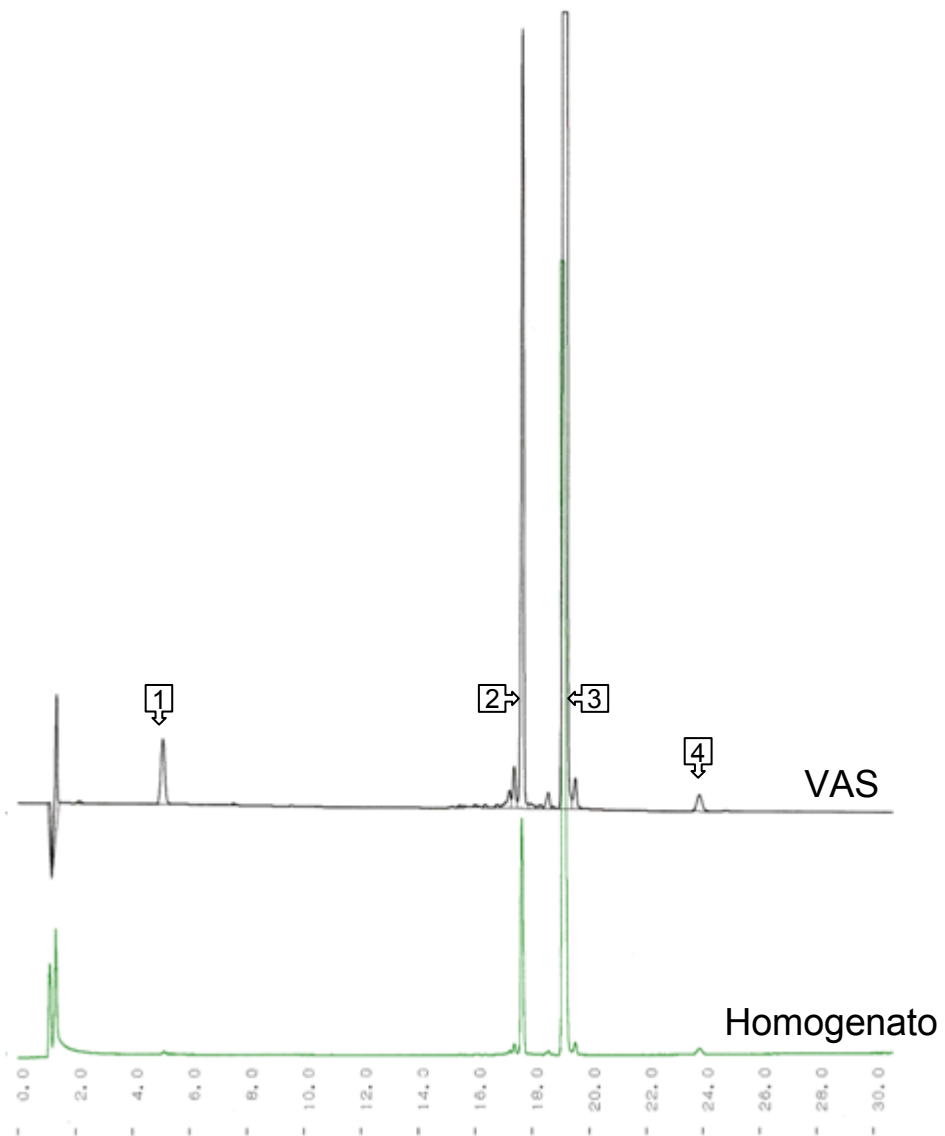
Cromatogramas HPLC de los pigmentos extraídos de las VAS y detectados por su absorbancia a 667nm. (A) Cromatogramas típicos de las VAS aisladas y del homogeneizado de tejido de hoja del cual se aislaron las VAS. Los picos señalados corresponden a 1- clorofilido *a* (Chlide *a*), 2- clorofila *b* (Chl *b*), 3- clorofila *a* (Chl *a*) y 4- feofitina *a* (Phein *a*).

(B) Espectros de absorción de las VAS, y (C) clorofila *a* purificada, disueltos en acetona bufereada 80%.

(D) Cromatograma de las VAS aisladas (0h) y luego incubadas en oscuridad a 30°C durante 6, 10 y 14h. Los picos señalados corresponden a 1- clorofilido *b* (Chlide *b*), 2- 13<sup>2</sup>OH-clorofilido *a* (13<sup>2</sup>OH-Chlide *a*), 3- clorofilido *a* (Chlide *a*), 4- piroclorofilido *a* (Pyrochlidge *a*), 5- feofórbido *a* (Pheide *a*), 6- clorofila *b* (Chl *b*), 7- 13<sup>2</sup>OH-clorofila *a* (13<sup>2</sup>OH-Chl *a*), 8- clorofila *a* (Chl *a*) y 9- feofitina *a* (Phein *a*).

Figura 2.3

A



1. Chlide *a*
2. Chl *b*
3. Chl *a*
4. Phein *a*

Figura 2.3

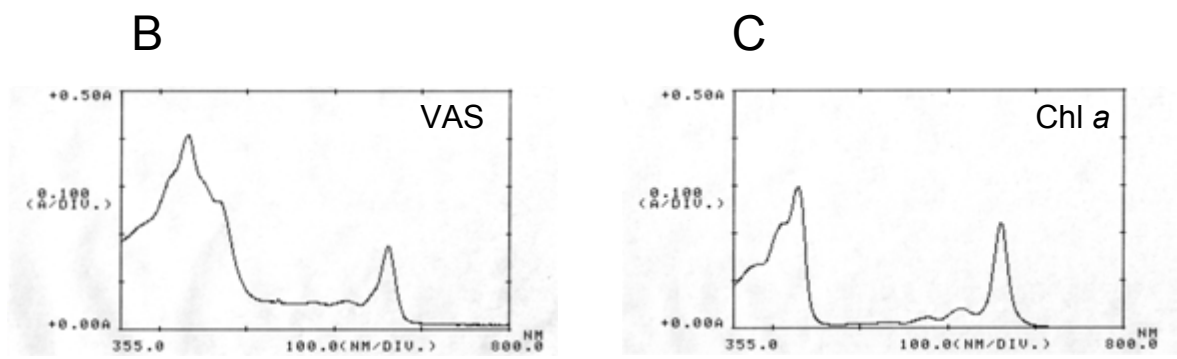
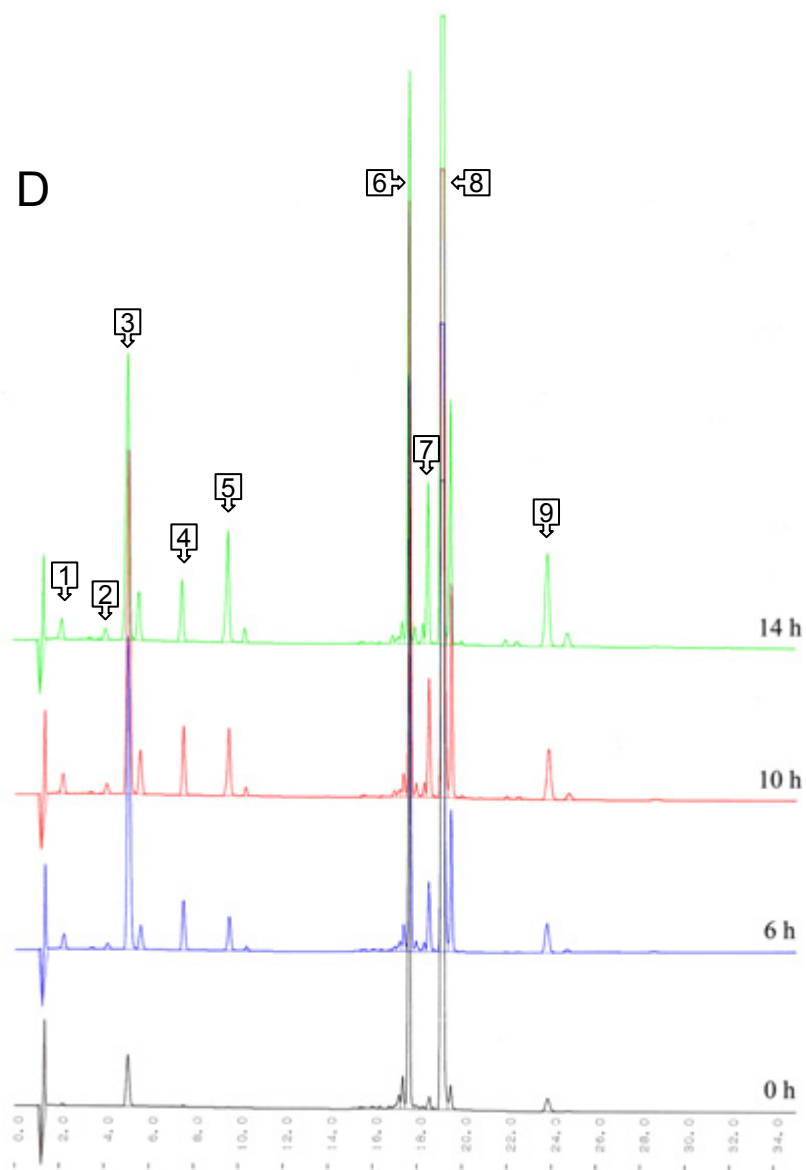


Figura 2.3



1. Chlide *b*
2.  $^{13}\text{C}$ OH-Chlide *a*
3. Chlide *a*
4. Pyrochlide *a*
5. Pheide *a*
6. Chl *b*
7.  $^{13}\text{C}$ OH-Chl *a*
8. Chl *a*
9. Phein *a*

Figura 2.4 – Detección de proteínas del Fotosistema I en las VAS.

(A) y (B) Electroforesis en gel no-desnaturalizante de VAS aisladas o tilacoides, iluminados con luz visible (A) o luz UV (B). Se sembró en cada calle 14 $\mu$ g de clorofila. Se indican con llaves las cuatro bandas verdes sometidas a identificación por LC-MS/MS. (C) Analisis de *Western-blot* de VAS aisladas y del homogeneizado de hojas de tabaco (Hom) inducidas a “senescer” en oscuridad durante 1 o 2 días, y reveladas con anticuerpos contra proteínas del Fotosistema I. Se cargaron 1,1 $\mu$ g de clorofila en cada calle.

Figura 2.4

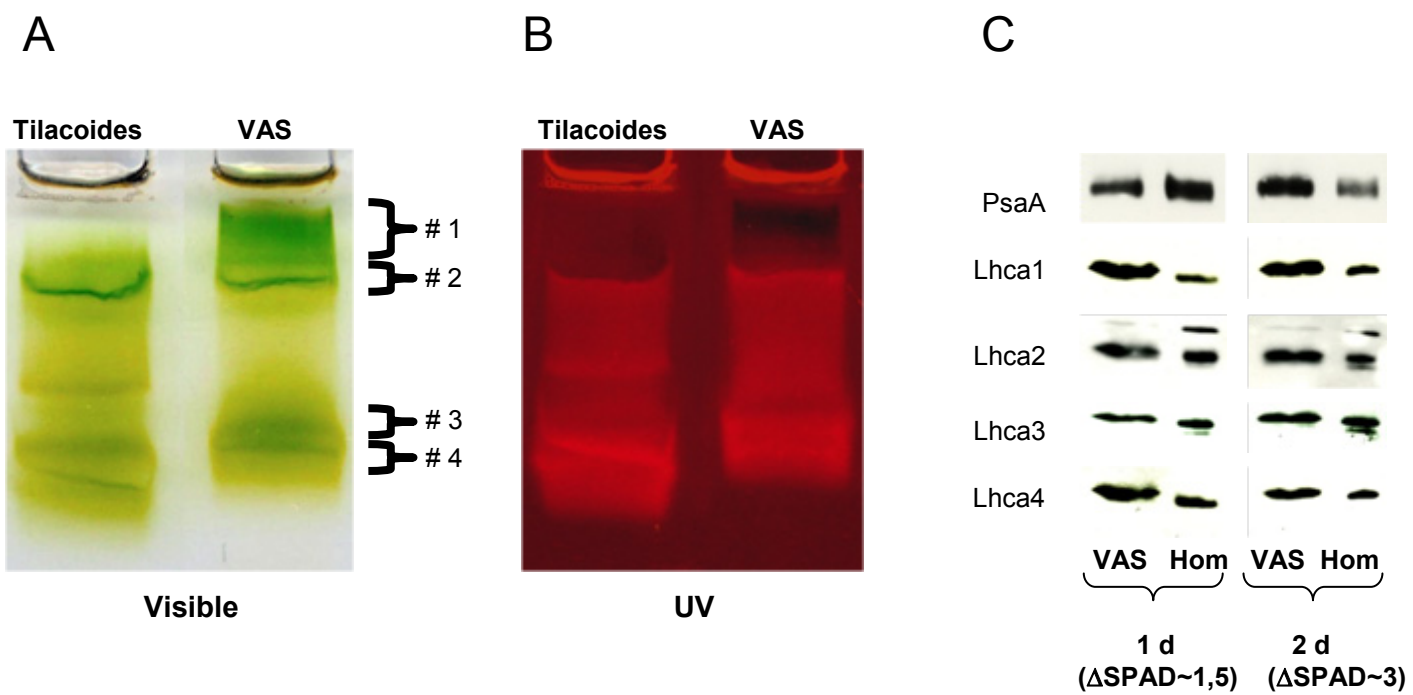


Figura 2.5 – Análisis de *Western-Blot* adicionales.

Análisis de *Western-blot* de proteínas cloroplásticas en VAS aisladas y homogeneizado de hoja de tabaco (Homog.) o cloroplastos senescentes aislados (Cloropl. Senesc.), examinado con anticuerpos contra D1, CP43, CP47 y LHC II (proteínas del Fotosistema II), GS (GS2, isoenzima cloroplástica), RbCO (LS), ELIP1, ELIP2 y FtsH11. Se cargaron 7,5µg de proteína por línea.

Figura 2.5

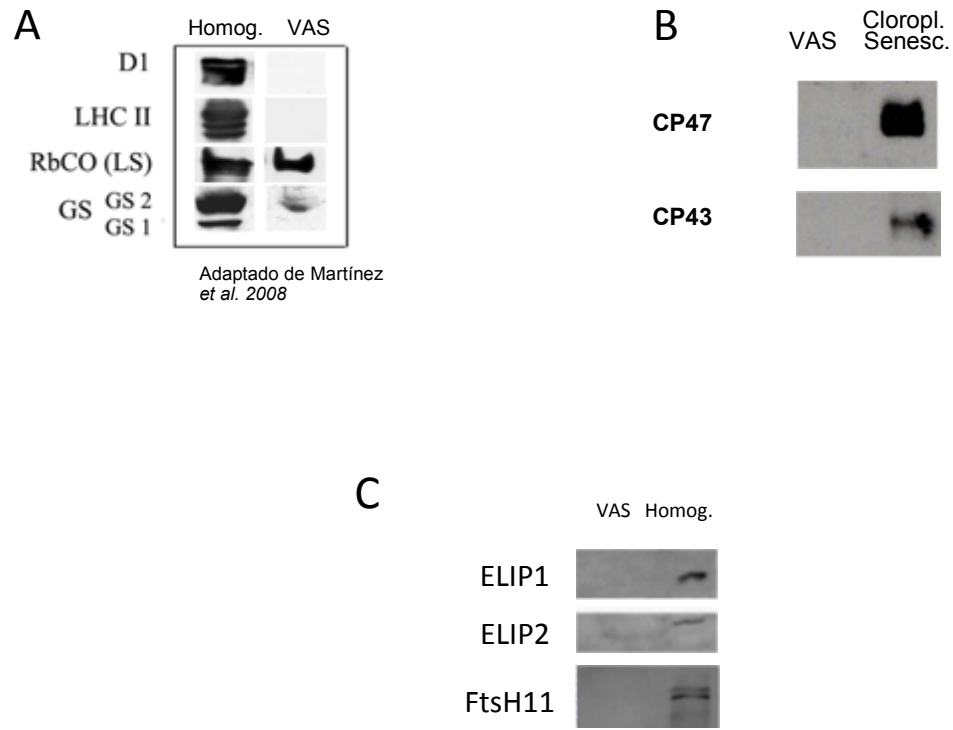




Figura 2.6 – Espectrogramas 3-D de fluorescencia.

Espectrogramas de emisión de fluorescencia a diferentes longitudes de excitación (*Scan 3-D*) a temperatura ambiente (RT, paneles superiores) y a 77K (paneles inferiores) de las VAS aisladas y del homogeneizado de hojas de tabaco (Hom.).

Se indujo la senescencia de hojas de tabaco por oscuridad durante 48h en oscuridad ( $\Delta SPAD \sim 3$ ), y se determinaron los espectrogramas de fluorescencia de las VAS aisladas (C-D, paneles derecha) y homogeneizado de hojas (A-B, paneles izquierda).

El contenido de clorofila total para las VAS fue de 15,98 $\mu$ g/ml, y para el homogeneizado fue de 6,69 $\mu$ g/ml.

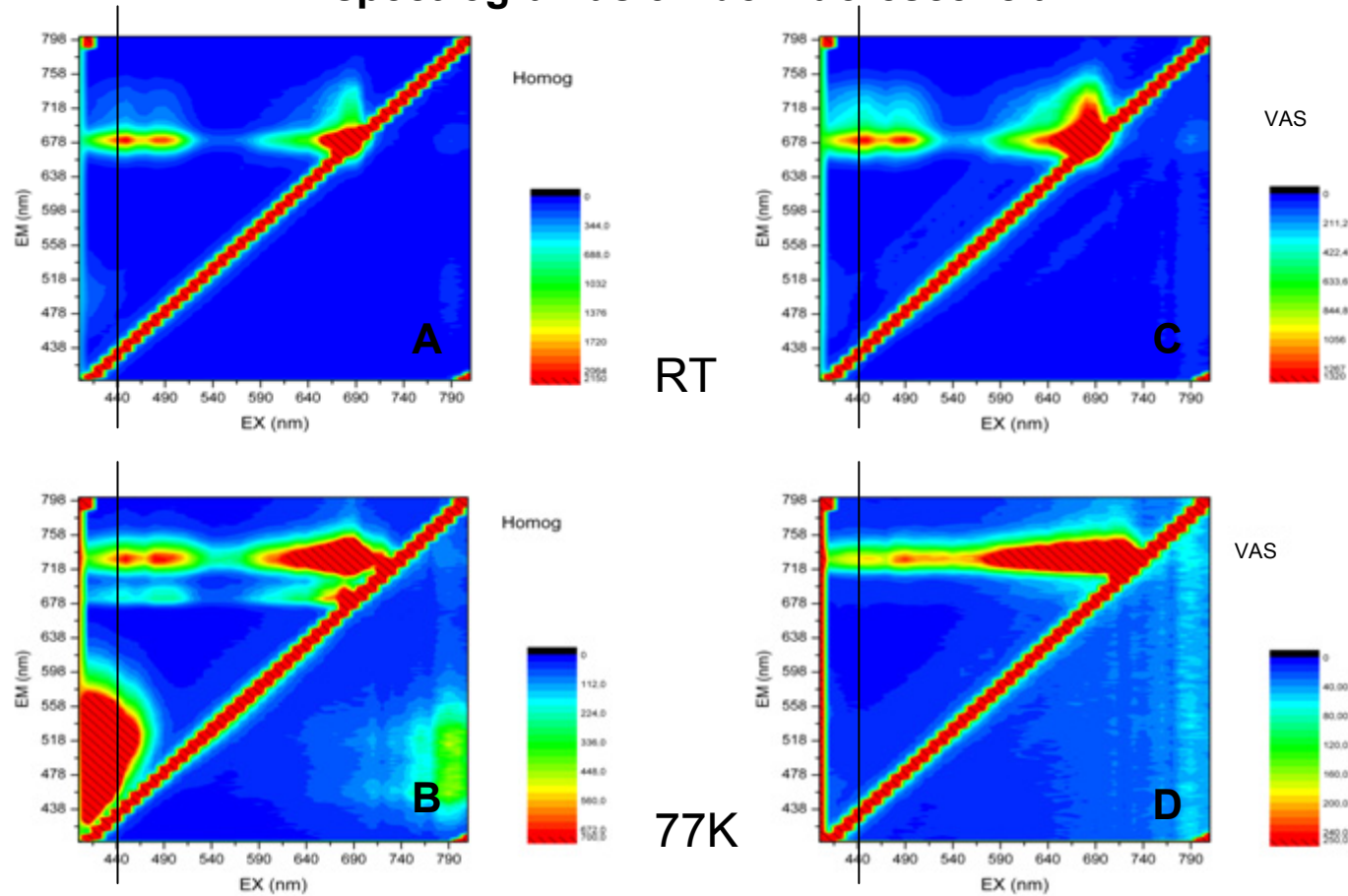
Las líneas verticales en los gráficos señalan la longitud de excitación a la cual se observan los picos de máxima emisión de fluorescencia entre 600 y 800nm.

La intensidad de fluorescencia emitida es representada por la escala de colores del azul al rojo, de menor a mayor intensidad de emisión respectivamente, y tabuladas al máximo de los picos en la región de 600-800nm (emisión) y 400-550nm (excitación).

EX: Excitación; EM: Emisión

Figura 2.6

### Espectrogramas 3D de Fluorescencia



48hs oscuridad ( $\Delta$ SPAD ~ 3)

Muestra	Clorof. Total (ug/ml)
Homog (48hs oscuridad)	6,69
VAS (48hs oscuridad)	15,98

Figura 2.7 – Espectrogramas de fluorescencia (excitación a 440nm).

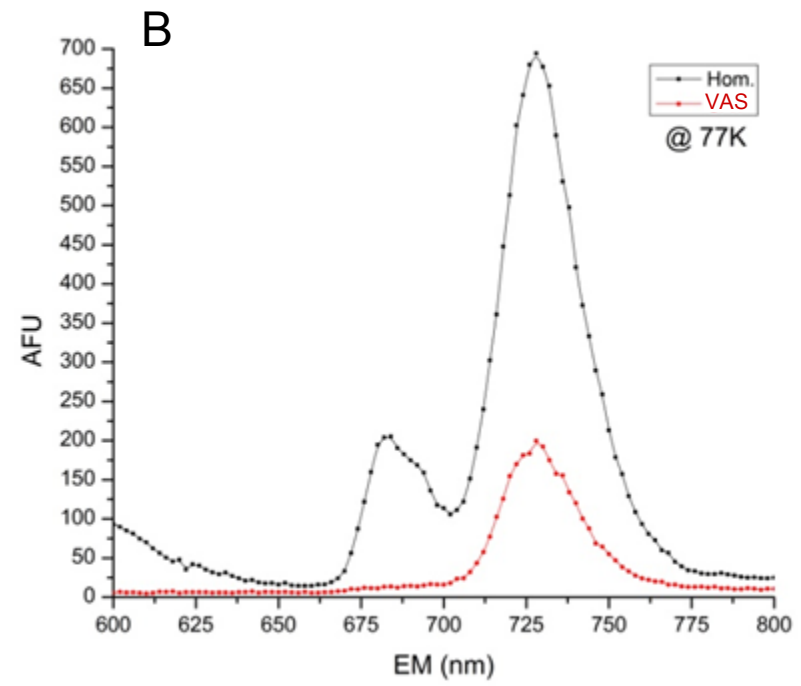
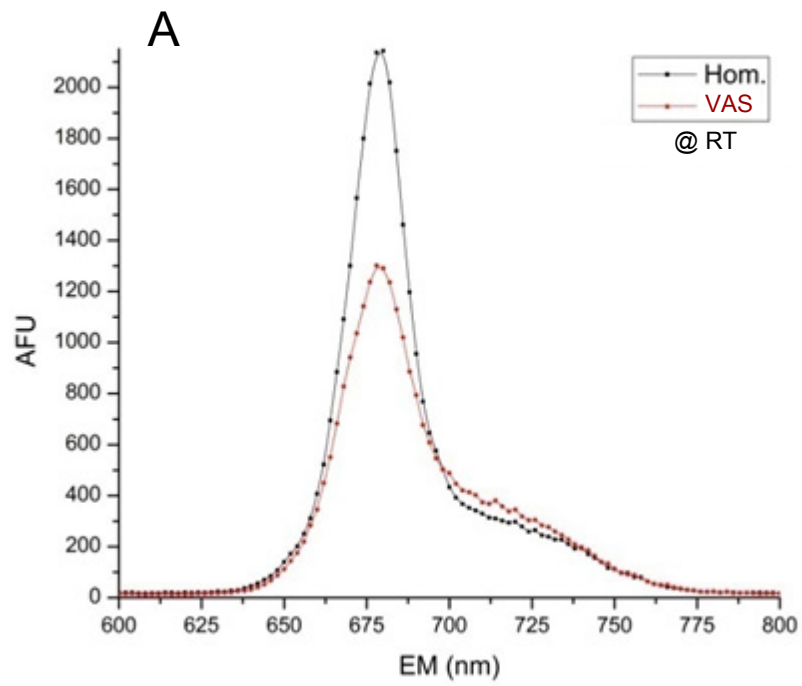
Espectrogramas de emisión de fluorescencia a temperatura ambiente (RT) y a 77K de las VAS aisladas y del homogeneizado de hojas de tabaco (Hom.).

Se indujo la senescencia de hojas de tabaco por oscuridad durante 48hs ( $\Delta$ SPAD ~ 3), y se determinaron los espectrogramas de emisión de fluorescencia de las VAS aisladas y homogeneizado de hojas, con excitación a 440nm.

El contenido de clorofila total en el ensayo para el aislamiento de las VAS fue de 15,98 $\mu$ g/ml, y para el homogeneizado fue de 6,69 $\mu$ g/ml.

AFU: Unidades Arbitrarias de Fluorescencia; EM: Emisión

Figura 2.7



48hs oscuridad ( $\Delta$ SPAD ~ 3)

Muestra	Clorof. Total (ug/ml)
Hom. (48hs oscuridad)	6,69
VAS (48hs oscuridad)	15,98

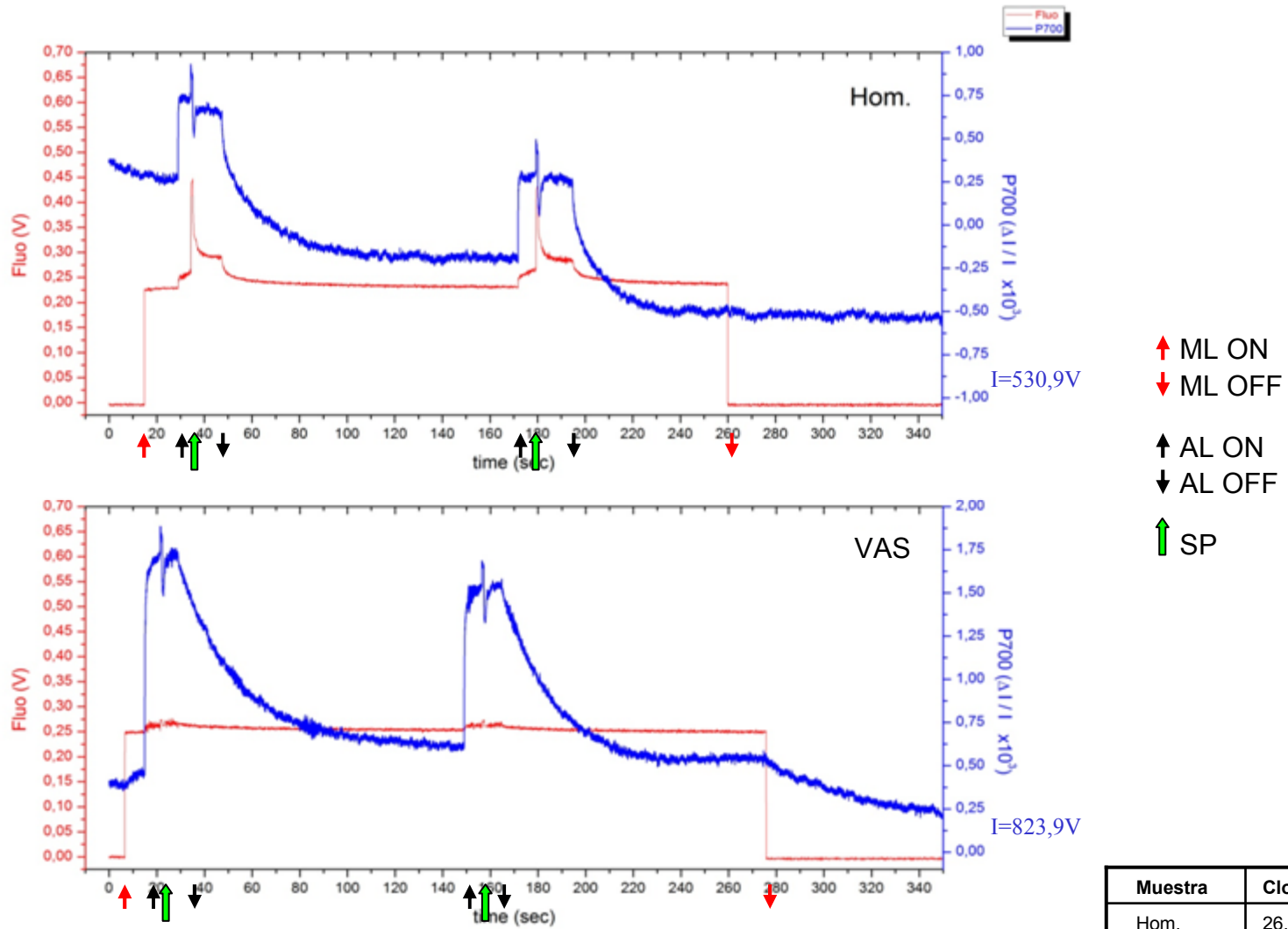
Figura 2.8 – Dual PAM-100.

Fluorescencia modulada de la clorofila (Fluo, línea roja) y cambios en la absorbancia a 830nm inducidos por luz (P700, línea azul) en el homogeneizado de hojas (Hom., panel superior) y las VAS aisladas (panel inferior). El contenido de clorofila total fue de 26,3 (homogeneizado) y 39,4 (VAS)  $\mu\text{g}$  clorofila/ml.

En el lado izquierdo de los gráficos se indica el potencial de calibración (I) del detector de 830/875 nm.

ML ON: luz de medición encendida; ML OFF: luz de medición apagada; AL ON: luz actínica encendida; AL OFF: luz actínica apagada; SP: pulso de luz saturante

Figura 2.8



Muestra	Clorof. Total (ug/ml)
Hom.	26,3
VAS	39,4

Figura 2.9 – Degradación de PsaA en las VAS aisladas.

(A) VAS aisladas incubadas a 30°C durante 8h. Iguales alícuotas de la fracción de VAS fueron muestreadas a 0, 4, y 8h de incubación y analizadas por *Western-blot* utilizando anticuerpos contra PsaA. Se cargó en cada línea el equivalente a 1,1µg de clorofila total inicial. (B) Inhibición de la degradación de PsaA por el inhibidor de proteasas cisteínicas E64 o el inhibidor de proteasas serínicas AEBSF, mostrados a las 4h de incubación. Se cargó en cada línea el equivalente a 26ng de clorofila total inicial.

Figura 2.9





**TABLAS**

Tabla 2.1 – Análisis de espectrometría de masas

En las tablas a continuación se indican los resultados obtenidos del análisis de espectrometría MS/MS, para los péptidos de digestión enzimática de las proteínas halladas en las bandas verdes 1-2-3-4, ordenados según el índice *Mascot score*.

Tabla 2.1

Muestra	Accession	Descripción	Mascot score	Precursor mass [Da]	Peptides matched	Sequence coverage [%]
<b>Banda Verde 1</b>						
gij 2499964		PsaB subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Antirrhinum majus</i> L.]	623	82368	21	8
gij 131167		PsaD subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes]	553	22410	15	36,8
gij 397555		PsaH subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes]	287	15328	9	30,3
gij 3914442		PsaH subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> ]	261	15400	7	30,3
gij 407769		PsaDb subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes]	258	23441	9	32,2
gij 1217601		PsaEb subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes]	253	15599	5	44,2
gij 29468504		PsaL subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Nicotiana attenuata</i> Torr. ex S. Watson]	230	23256	8	32,7
gij 2499966		PsaEa subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes]	224	15090	6	31,9
gij 401322		A subunidad catalítica de V-(H <sup>+</sup> ) ATPasa [ <i>Gossypium hirsutum</i> L.]	201	68479	5	10,4
gij 255560497		β subunidad de ATP sintasa vacuolar, presunta [ <i>Ricinus communis</i> L.]	194	45499	5	14,5
gij 168812218		Proteína de unión a Clorofila <i>a/b</i> tipo I, presunta [ <i>Cupressus sempervirens</i> L.]	162	14298	2	17,2
gij 3687676		RuBisCO activasa precursor, fragmento [ <i>Datisca glomerata</i> (Presl) Baill]	159	26933	3	14,8
gij 115792		Proteína 21 de unión a Clorofila <i>a/b</i> , LHCII tipo I CAB21 [ <i>Nicotiana tabacum</i> L.]	150	28108	2	13,2
gij 68139361		β subunidad de ATP sintasa cloroplástica [ <i>Alisma plantago-aquatica</i> L.]	143	48593	3	12,2
gij 12004115		β subunidad de ATP sintasa cloroplástica [ <i>Douglasia nivalis</i> Lindl.]	139	52382	3	6,8
gij 5725141		RbcL subunidad [ <i>Dracaena draco</i> (L.) L.]	97	50195	3	12,6
gij 255546735		PsaA-PsaB subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Ricinus communis</i> L.]	85	39414	2	3,4
gij 168061898		PsaF subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp. ssp. <i>patens</i> ]	80	22851	1	8,5
gij 110377772		Lhcb6, LHCII subunidad proteína CP24 [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun NN]	73	27317	1	7
gij 575349		Lhca2, LHCI subunidad proteína CAB4 [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. ssp. <i>virginiana</i> cv. Shockin]	67	22219	1	6
gij 38045712		P-loop dominio NTPasa, candidata a proteína de resistencia [ <i>Vitis amurensis</i> Rupr.]	64	19523	1	5,8
gij 12585492		E <i>stator</i> subunidad de V-(H <sup>+</sup> ) ATPasa [ <i>Citrus limon</i> (L.) Burm.f.]	62	26327	1	5,2

Tabla 2.1

Muestra	Accession	Descripción	Mascot score	Precursor mass [Da]	Peptides matched	Sequence coverage [%]
<b>Banda Verde 2</b>						
gij159232254		$\beta$ subunidad de ATP sintasa cloroplástica [ <i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes]	615	35962	17	35,7
gij212896602		$\beta$ subunidad de ATP sintasa cloroplástica [ <i>Amphicarpaea bracteata</i> (L.) Fernald]	607	50622	17	23
gij11769		$\alpha$ subunidad de ATP sintasa cloroplástica [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. var. BY4]	383	55404	9	15
gij131167		PsaD subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes]	312	22410	5	19,1
gij6601482		Subunidad catalítica de V-(H <sup>+</sup> ) ATPasa, fragmento [ <i>Allium cepa</i> L.]	204	19754	4	24
gij3914442		PsaH subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>rapa</i> ]	141	15400	3	30,3
gij57013987		F1 subunidad de ATP sintasa mitocondrial [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. var. BY4]	133	55191	5	7,5
gij397555		PsaH subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes]	127	15328	4	30,3
gij11497524		PsaB subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Spinacia oleracea</i> L. cv. Geant d'Hiver]	117	82377	4	6,4
gij115792		Proteína 21 de unión a Clorofila <i>a/b</i> , LHCII tipo I CAB21 [ <i>Nicotiana tabacum</i> L.]	116	28108	2	13,2
gij51968480		B3 subunidad catalítica de V-(H <sup>+</sup> ) ATPasa [ <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.]	102	31188	2	11
gij114336		Membrana plasmática (H <sup>+</sup> ) ATPasa 2 [ <i>Solanum lycopersicum</i> L.]	102	77991	2	4
gij224128696		FtsH proteína predicha [ <i>Populus balsamifera</i> ssp. <i>trichocarpa</i> (Torr. & A. Gray ex Hook.) Brayshaw]	93	73278	1	4,1
gij11465970		Citocromo <i>f</i> [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. var. BY4]	86	35224	2	5
gij168812218		Proteína de unión a Clorofila <i>a/b</i> tipo I, presunta [ <i>Cupressus sempervirens</i> L.]	77	14298	1	17,2
gij4539327		A3 subunidad catalítica de V-(H <sup>+</sup> ) ATPasa [ <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.]	77	95099	1	1,2
gij13877547		Lhcb4, LHCII subunidad proteína CP29 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.]	75	31150	1	5,2
gij2687475		RbcL subunidad [ <i>Dendromecon rigida</i> Benth.]	74	51502	2	8,2
gij2316022		MRP-like ABC transportador [ <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.]	73	26999	1	6,5
gij14149007		V-(H <sup>+</sup> ) PPasa [ <i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Moneymaker]	70	36736	1	4,5
gij22003634		RbcL subunidad [ <i>Clusia leprantha</i> Mart.]	69	49495	2	11,4
gij29468504		PsaL subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Nicotiana attenuata</i> Torr. ex S.Watson]	66	23256	2	20
gij544741		PsaEa subunidad centro de reacción fotosistema I, fragmento [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. var. BY4]	66	2831	1	70
gij11762		D1 subunidad centro de reacción fotosistema II, presunta [ <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> Viv.]	64	38952	1	3,1

Tabla 2.1

Muestra	Accession	Descripción	Mascot score	Precursor mass [Da]	Peptides matched	Sequence coverage [%]
<b>Banda Verde 3</b>						
gij149242542	Lhca3,	LHCI subunidad proteína CAB8 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.]	446	17903	12	32,7
gij115806	Lhcb2,	LHCII Tipo I subunidad proteína CAB5 [ <i>Solanum lycopersicum</i> L.]	305	25694	6	19,8
gij7271947	Lhca3,	LHCI subunidad proteína CAB8 [ <i>Alonsoa meridionalis</i> (L. f.) Kuntze]	240	20815	7	28
gij62898519	PsbQ,	Oxygen evolving enhancer protein 3 [ <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun NN]	189	24142	3	15,4
gij131237	D1	subunidad centro de reacción fotosistema II [ <i>Amaranthus hybridus</i> L.]	177	38939	4	6,5
gij110377772	Lhcb6,	LHCII subunidad proteína CP24 [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun NN]	176	27317	3	14,8
gij110377793	Lhcb5,	LHCII subunidad proteína CP26 [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun NN]	165	30428	4	16,1
gij1709846	PsbS	subunidad centro de reacción fotosistema II, CP22 [ <i>Solanum lycopersicum</i> L.]	163	29250	3	11,6
gij115804	Proteína 25	de unión a Clorofila a/b, LHCII tipo I CAB25 [ <i>Petunia</i> sp.]	151	28149	5	5,6
gij416681	δ	subunidad de ATP sintasa cloroplástica [ <i>Nicotiana tabacum</i> L.]	148	26768	2	6,9
gij110377766	Lhcb4,	LHCII subunidad proteína CP29 [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun NN]	142	31132	3	12,3
gij115764	Lhca1,	LHCI subunidad proteína CAB6A [ <i>Solanum lycopersicum</i> L.]	130	26557	2	5,3
gij224168566	D2	subunidad centro de reacción fotosistema II, proteína predicha [ <i>Populus balsamifera</i> ssp. <i>trichocarpa</i> (Torr. & A. Gray ex Hook.) Brayshaw]	122	14361	3	14,4
gij45386465	PsbC	subunidad centro de reacción fotosistema II, CP43 [ <i>Trillium grandiflorum</i> (Michx.) Salisb.]	121	44873	3	7,3
gij19913107	Transportador	dicarboxilato/tricarboxilato mitocondrial, gen <i>dtc2</i> [ <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi]	116	31546	4	12,5
gij115779	Proteína 21	de unión a Clorofila a/b, LHCII tipo I CAB21 [ <i>Glycine max</i> (L.) Merr.]	102	26192	3	5,3
gij224100707	Dominio	proteína <i>Rieske</i> [2Fe-2S], proteína predicha [ <i>Populus balsamifera</i> ssp. <i>trichocarpa</i> (Torr. & A. Gray ex Hook.) Brayshaw]	97	31668	1	5,5
gij224075976	Transportador	dicarboxilato/tricarboxilato mitocondrial, proteína predicha [ <i>Populus balsamifera</i> ssp. <i>trichocarpa</i> (Torr. & A. Gray ex Hook.)]	87	31872	2	8
gij19913111	Transportador	dicarboxilato/tricarboxilato mitocondrial, gen <i>dtc4</i> [ <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi]	87	24459	2	10,6
gij168061898	PsaF	subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp. ssp. <i>patens</i> ]	86	22851	1	8,5
gij7524675	PsbB	subunidad centro de reacción fotosistema II, CP47 [ <i>Pinus thunbergii</i> Parl.]	82	56295	1	2,6
gij30013659	PsaF	subunidad centro de reacción fotosistema I, putative [ <i>Nicotiana tabacum</i> L.]	75	24452	2	13,1

Tabla 2.1

Muestra	Accession	Descripción	Mascot score	Precursor mass [Da]	Peptides matched	Sequence coverage [%]
<b>Banda Verde 4</b>						
gij149242542		Lhca3, LHCI subunidad proteína CAB8 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.]	316	17903	8	
gij131305		PsbE subunidad centro de reacción fotosistema II, Citocromo <i>b</i> <sub>559</sub> subunidad $\alpha$ [ <i>Oenothera berteriana</i> Spach]	202	9309	4	
gij115803		Proteína 4 de unión a Clorofila a/b, LHCII tipo I CAB4 [ <i>Solanum lycopersicum</i> L.]	178	28756	3	
gij68004437		D1 subunidad centro de reacción fotosistema II [ <i>Dunaliella salina</i> (Dunal) Teodoresco]	166	36937	4	
gij225271		$\beta$ subunidad de ATP sintasa cloroplástica [ <i>Nicotiana tabacum</i> L. var. BY4]	149	20930	3	
gij416681		$\delta$ subunidad de ATP sintasa cloroplástica [ <i>Nicotiana tabacum</i> L.]	147	26768	2	
gij7271947		Lhca3, LHCI subunidad proteína CAB8 [ <i>Alonsoa meridionalis</i> (L. f.) Kuntze]	129	20815	3	
gij62898519		PsbQ, <i>Oxygen evolving enhancer protein 3</i> [ <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun NN]	119	24142	3	
gij13877547		Lhcb4, LHCII subunidad proteína CP29 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.]	112	31150	2	
gij224168566		D2 subunidad centro de reacción fotosistema II, proteína predicha [ <i>Populus balsamifera</i> ssp. <i>trichocarpa</i> (Torr. & A. Gray ex Hook.) Brayshaw]	107	14361	3	
gij168061898		PsaF subunidad centro de reacción fotosistema I [ <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp. ssp. <i>patens</i> ]	90	22851	1	
gij255550741		PsaF subunidad centro de reacción fotosistema I, presunta [ <i>Ricinus communis</i> L.]	79	24402	2	
gij115792		Proteína 21 de unión a Clorofila a/b, LHCII tipo I CAB21 [ <i>Nicotiana tabacum</i> L.]	79	28108	1	
gij1709846		PsbS subunidad centro de reacción fotosistema II, CP22 [ <i>Solanum lycopersicum</i> L.]	79	29250	1	
gij15235029		Lhcb5, LHCII subunidad proteína CP26 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.]	75	30138	1	
gij217069960		Proteína de función desconocida [ <i>Medicago truncatula</i> Gaertn.]	72	20506	1	
gij82754633		$\epsilon$ subunidad de ATP sintasa cloroplástica [ <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Desiree]	66	14631	1	
gij154101549		Lhcb6, LHCII subunidad proteína CP24, fragmento [ <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgii]	62	13609	1	

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

### **Vacuolas Asociadas a la Senescencia**

Las VAS son pequeñas vacuolas ácidas, que se desarrollan en células fotosintéticas durante la senescencia de las hojas ([Otegui et al. 2005](#)). Las observaciones que proteínas del estroma del cloroplasto son reubicadas a las VAS en hojas senescentes ([Martínez et al. 2008](#)) y que las VAS parecen contener los niveles más altos de actividades de proteasas cisteínicas de las células de hojas senescentes ([Otegui et al. 2005](#)) indican que las VAS pueden desempeñar un papel importante en la degradación de las proteínas del cloroplasto durante la senescencia. Los datos aquí presentados sugieren un papel para las VAS en la degradación del Fotosistema I y de las clorofilas asociadas al mismo.

### **Degradación de clorofila en las VAS**

La vía de degradación de la clorofila consiste en una serie de reacciones que conducen a la producción de catabolitos incoloros que se almacenan en la vacuola central ([Hörtensteiner 2006](#); [Matile 1997](#)). Esta vía se inicia con el desensamblaje de los complejos de clorofila-proteína de las membranas tilacoides, que podría implicar la actividad de la proteína SGR ([Armstead et al. 2006, 2007](#); [Hörtensteiner 2009](#); [Park et al. 2007](#)). La clorofila “liberada” es entonces defitilada por la clorofilasa, el átomo de  $Mg^{2+}$  es retirado por una actividad de  $Mg^{2+}$ -dequelatasa, y el anillo de clorina es escindido oxigenolíticamente por la feofórbido *a* oxigenasa para producir, luego de varias sucesivas etapas, catabolitos incoloros ([Hörtensteiner 2006](#)). Existen variaciones de esta vía, como en *Arabidopsis* donde la eliminación de  $Mg^{2+}$  para formar feofitina precedería a la defitilación ([Schelbert et al. 2009](#)). A pesar de que los cloroplastos contienen todas las actividades necesarias para estas reacciones ([Hörtensteiner 2006](#)), el hallazgo de clorofila y de los primeros catabolitos clorofila (clorofilido *a* y feofórbido *a*) en las VAS sugiere que, al menos, una fracción de la

clorofila presente en las hojas es degradada en estos compartimentos líticos. Así mismo, la abrupta acumulación de clorofilido *a* en las VAS y el lento incremento posterior en los niveles de feoforbido *a*, muestran que en las VAS de *N. tabacum* la vía principal de degradación de clorofila, y a su vez el paso limitante, parece transcurrir a través de la actividad clorofilasa presente en dichas organelas. Este mecanismo sería concordante con lo observado en un sistema heterólogo de expresión transiente en hojas de zapallo y protoplastos de tabaco ([Harpaz-Saad et al. 2007](#)), y diferiría del mecanismo principal propuesto para *Arabidopsis* ([Schelbert et al. 2009](#)).

Por otro lado, debido a que la clorofila en las VAS está unida a proteínas de unión a clorofila ([Fig. 2.4](#)), la operación de una vía de degradación de la clorofila exigiría el desmantelamiento de estos complejos clorofila-proteína dentro de las VAS, así como también de la actividad de las enzimas de degradación de clorofila. Hasta ahora, la mayoría de estas enzimas han sido localizadas en plástidos, aunque han sido descritas clorofilasas extra-plastídicas presuntas, que podrían actuar fuera de los cloroplastos ([Schenk et al. 2007](#); [Takamiya et al. 2000](#); [Tsuchiya et al. 1999](#)). Por ejemplo, la ATCHL1 es una clorofilasa posiblemente no-cloroplástica ([Schenk et al. 2007](#); [Tsuchiya et al. 1999](#)). La participación de ATCHL1 en la degradación de la clorofila durante la senescencia ha sido descartada debido a que las líneas de mutantes *KO* de ATCHL1 no son *stay-green*, es decir, la clorofila (o los complejos clorofila-proteína) no son conservados durante la senescencia de las hojas en estas líneas ([Schenk et al. 2007](#)). Sin embargo, es interesante destacar que las líneas de mutantes *KO* de ATCHL1 muestran consistentemente niveles más bajos de clorofilido que las correspondientes líneas de tipo silvestre ([ver Capítulo 4](#)) ([Benedetti & Arruda 2002](#); [Kariola et al. 2005](#); [Schenk et al. 2007](#)) lo que sugiere que ATCHL1 es una clorofilasa activa con acceso a la clorofila *in vivo*. Por otra parte, ATCHL2, supuestamente una clorofilasa plastídica con un claro péptido de tránsito, parece localizarse sobre todo en pequeñas estructuras vesiculares fuera de los plástidos de hojas senescentes de *Arabidopsis* ([Schenk et al. 2007](#)). La asignación de su localización subcelular sobre la base de análisis de su secuencia puede no ser simple cuando se trata de células senescentes. La determinación de la localización de enzimas hidrolíticas en hojas senescentes puede ser complicada por el tráfico de

proteínas entre los distintos compartimentos subcelulares. Por ejemplo, la proteína GFP dirigida a cloroplastos (*i.e.*, GFP fusionada a una secuencia de direccionamiento a cloroplasto) se traslada a las VAS en la senescencia de las hojas de tabaco ([Martínez \*et al.\* 2008](#)) planteando la posibilidad de un tráfico masivo de proteínas del estroma (que podría incluir a las enzimas de degradación de clorofila) de los cloroplastos hacia las VAS.

Por lo tanto, las enzimas de degradación de clorofila incluso dirigidas al cloroplasto podrían proporcionar parte de la maquinaria necesaria para la degradación de clorofila en las VAS. Así mismo, la presencia de otros compuestos derivados de la clorofila (*v.g.*  $13^{2}\text{OH}$ -clorofilido *a*, piroclorofilido *a*,  $13^{2}\text{OH}$ -clorofila *a*) son indicativos de la coexistencia de otros mecanismos de degradación de la clorofila en las VAS. Estos catabolitos podrían producirse por la presencia de un sistema de enzimas oxidativas, análogo a sistemas ya descritos en otras especies (*v.g.* [Roca \*et al.\* \(2007\)](#); [Roca \*et al.\* \(2004\)](#); [Roca & Minguez-Mosquera \(2003\)](#)), que conducen rápidamente a la apertura del anillo de clorina con el consecuente cambio de sus propiedades químicas y espectrales, concluyendo en compuestos no detectables en nuestro sistema cromatográfico.

## **Fotosistema I en las VAS aisladas**

Varias líneas de evidencia (*i.e.*, la espectrometría de masas, análisis inmunológicos y los espectros de emisión de fluorescencia) muestran que la clorofila en las VAS está unida a apoproteínas del Fotosistema I. Ninguno de estos enfoques nos permitió detectar otros complejos clorofila-proteína, por ejemplo, los componentes del Fotosistema II. A pesar que parte de los datos obtenidos por espectrometría de masas sugerirían la presencia de algunas proteínas del Fotosistema II en las “bandas verdes” de mayor movilidad electroforética encontradas en las VAS, esto es un punto contradictorio con todos los otros análisis realizados a las VAS. Esta discrepancia podría explicarse por una posible conservación de las secuencias aminoacídicas entre las distintas proteínas de unión a clorofila presentes en los fotosistemas ([Green \*et al.\* 1991](#); [Hoffman \*et al.\* 1987](#)), y a su vez por el uso de



bases de datos conteniendo información de otras especies para la identificación por espectrometría de masas para proteínas de *Nicotiana tabacum* L., siendo la misma una especie de la cual aún no se dispone de su secuencia genómica completa o de la totalidad de sus proteínas. En este mismo sentido, varias de las proteínas del Fotosistema I de *Nicotiana tabacum* son polimórficas ([Obokata et al. 1993](#)), lo cual aporta una mayor complejidad en el análisis y detección de las mismas por espectrometría de masas. Más aún, ninguna de las cinco proteínas del Fotosistema I (de *Nicotiana tabacum*) identificadas en los *immunoblots*, lo fue también por espectrometría de masas. Finalmente, si bien parecería muy poco probable, no podemos descartar la presencia de fragmentos de degradación de proteínas del Fotosistema II reconocidos por la espectrometría de masas, y que no sean detectados por ninguno de los otros métodos aquí empleados (*i.e. immunoblots*, fluorescencia).

Las VAS aisladas pueden autodigerir proteínas del Fotosistema I contenidas en las mismas, y los ensayos farmacológicos muestran que la mayor parte de esta actividad es reducida por el inhibidor E-64, es decir, que corresponde a las proteasas de tipo cisteínicas, lo cual es consistente con la detección de alta actividad peptidasa *in vivo* en las VAS usando un sustrato fluorogénico de proteasas de tipo cisteínicas ([Otegui et al. 2005](#)). Aunque los datos muestran que las proteínas del Fotosistema I se pueden degradar en las VAS, no podemos estimar cuantitativamente la proporción de los complejos del Fotosistema I que se degradan a lo largo de esta vía para evaluar la importancia de esta ruta de degradación del Fotosistema I durante la senescencia.

Por lo tanto, las VAS estarían implicadas en la degradación del Fotosistema I, y esto plantea un interrogante sobre el mecanismo de selección que puede específicamente dirigir al Fotosistema I, pero no a otras proteínas tilacoides, hacia las VAS. Dos puntos importantes, sin resolver aún, se refieren al mecanismo de re-localización del Fotosistema I hacia las VAS, y si el Fotosistema I en las VAS está agregado o soluble en el medio acuoso de las VAS, o está unido a estructuras de membrana tipo laminares.

## ¿Vías independientes para la degradación del FOTOSISTEMA I y II durante la senescencia?

Durante la senescencia, algunas de las proteínas solubles del estroma del cloroplasto (por ejemplo, RuBisCO, la Glutamina Sintetasa II) son trasladadas a las VAS, donde pueden ser degradadas ([Martínez et al. 2008](#)). En este trabajo, esta observación es extendida a las proteínas del FOTOSISTEMA I. Si existiese la posibilidad que las VAS contengan alguna proteína del FOTOSISTEMA II, estas sólo tendrían un rol marginal en la degradación de las mismas. Existe una creciente evidencia de la degradación de las proteínas del FOTOSISTEMA II en el cloroplasto por proteasas específicas del cloroplasto. Las proteasas cloroplásticas DegP y FtsH parecen cooperar en la degradación de D1 durante la fotoinhibición ([Kapri-Pardes et al. 2007](#); [Sun et al. 2010](#); [Sun et al. 2007](#)), y parece ser probable que ellas también pueden ser responsables de la degradación de D1 durante la senescencia. La metalo-proteasa cloroplástica FtsH6 ha sido involucrada en la degradación *in vitro* de las proteínas Lhcb de la antena del FOTOSISTEMA II ([Želisko et al. 2005](#)), sin embargo, *in vivo* solamente parece tener una función minoritaria ([Wagner et al. 2011](#)). La operación hipotética de vías separadas para la degradación del FOTOSISTEMA I y II, el primero dentro de las VAS, y el segundo dentro de los mismos plástidos, es consistente con algunas observaciones fisiológicas previas. Hay casos en los que la degradación del FOTOSISTEMA I comienza antes que la del FOTOSISTEMA II (por ejemplo, [Miersch et al. \(2000\)](#); [Tang et al. \(2005\)](#)), o a la inversa, que la actividad de transporte de electrones del FOTOSISTEMA II cae más rápido que la actividad del FOTOSISTEMA I, aunque probablemente esto se deba a cambios en la eficiencia del transporte electrónico desde o hacia el FOTOSISTEMA I ([Hilditch et al. 1986](#)). Estos antecedentes son consistentes con el funcionamiento de dos vías diferentes, posiblemente localizadas en diferentes compartimentos subcelulares, para la degradación de cada fotosistema. Una valoración de la proporción de las VAS con una clara señal de fluorescencia de clorofila en hojas senescentes de mutantes de *Arabidopsis* con deficiencias en el FOTOSISTEMA I o FOTOSISTEMA II ([Meurer et al. 1996](#)), o en mutantes *stay-green* que específicamente fallan en la degradación de ciertos componentes de las membranas de los tilacoides (por ejemplo, *cytG* de soja, [Guamét et al. 1991](#);

[Guiamét et al. 2002](#)) podría ayudar a apreciar si las VAS están específicamente involucradas en la degradación de los complejos clorofila-proteína del Fotosistema I y las moléculas de pigmentos unidos al mismo durante la senescencia de las hojas.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Allen, K.D. and Staehelin, L.A.** (1991) Resolution of 16 to 20 chlorophyll-protein complexes using a low ionic strength native green gel system. *Anal. Biochem.*, **194**, 214-222.
- Andersson, U., Heddad, M. and Adamska, I.** (2003) Light Stress-Induced One-Helix Protein of the Chlorophyll *a/b*-Binding Family Associated with Photosystem I. *Plant Physiol.*, **132**, 811-820.
- Armstead, I., Donnison, I., Aubry, S., Harper, J., Hortensteiner, S., James, C., Mani, J., Moffet, M., Ougham, H., Roberts, L., Thomas, A., Weeden, N., Thomas, H. and King, I.** (2006) From crop to model to crop: identifying the genetic basis of the staygreen mutation in the *Lolium/Festuca* forage and amenity grasses. *New Phytol.*, **172**, 592-597.
- Armstead, I., Donnison, I., Aubry, S., Harper, J., Hortensteiner, S., James, C., Mani, J., Moffet, M., Ougham, H., Roberts, L., Thomas, A., Weeden, N., Thomas, H. and King, I.** (2007) Cross-Species Identification of Mendel's *I* Locus. *Science*, **315**, 73-.
- Benedetti, C.E. and Arruda, P.** (2002) Altering the Expression of the Chlorophyllase Gene *ATHCOR1* in Transgenic Arabidopsis Caused Changes in the Chlorophyll-to-Chlorophyllide Ratio. *Plant Physiol.*, **128**, 1255-1263.
- Bruno, A.K. and Wetzel, C.M.** (2004) The early light-inducible protein (*ELIP*) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. *J. Exp. Bot.*, **55**, 2541-2548.
- Fling, S.P. and Gregerson, D.S.** (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.*, **155**, 83-88.
- Govindjee** (2004) Chlorophyll *a* Fluorescence: A Bit of Basics and History. In *Chlorophyll a Fluorescence* (Papageorgiou, G.C. and Govindjee eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, pp. 1-41.
- Green, B.R., Pichersky, E. and Kloppstech, K.** (1991) Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 181-186.
- Guamét, J.J., Schwartz, E., Pichersky, E. and Nooden, L.D.** (1991) Characterization of Cytoplasmic and Nuclear Mutations Affecting Chlorophyll and Chlorophyll-Binding Proteins during Senescence in Soybean. *Plant Physiol.*, **96**, 227-231.
- Guamét, J.J., Tyystjärvi, E., Tyystjärvi, T., John, I., Kairavuo, M., Pichersky, E. and Noodén, L.D.** (2002) Photoinhibition and loss of photosystem II reaction centre proteins during senescence of soybean leaves. Enhancement of photoinhibition by the 'stay-green' mutation *cytG*. *Physiol. Plant.*, **115**, 468-478.
- Harbinson, J. and Hedley, C.L.** (1989) The kinetics of P-700<sup>+</sup> reduction in leaves: a novel *in situ* probe of thylakoid functioning. *Plant, Cell Environ.*, **12**, 357-369.
- Harbinson, J. and Woodward, F.I.** (1987) The use of light-induced absorbance changes at 820 nm to monitor the oxidation state of P-700 in leaves. *Plant, Cell Environ.*, **10**, 131-140.

- Harpaz-Saad, S., Azoulay, T., Arazi, T., Ben-Yaakov, E., Mett, A., Shibolet, Y.M., Hörtensteiner, S., Gidoni, D., Gal-On, A., Goldschmidt, E.E. and Eyal, Y.** (2007) Chlorophyllase Is a Rate-Limiting Enzyme in Chlorophyll Catabolism and Is Posttranslationally Regulated. *Plant Cell*, **19**, 1007-1022.
- Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J.S., Gout, A.M., Day, D.A., Whelan, J. and Millar, A.H.** (2004) Experimental Analysis of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome Highlights Signaling and Regulatory Components, Provides Assessment of Targeting Prediction Programs, and Indicates Plant-Specific Mitochondrial Proteins. *Plant Cell*, **16**, 241-256.
- Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. and Brown, S.B.** (1987) The Degradation Of Chlorophyll — A Biological Enigma. *New Phytol.*, **107**, 255-302.
- Hilditch, P., Thomas, H. and Rogers, L.** (1986) Leaf senescence in a non-yellowing mutant of *Festuca pratensis*: Photosynthesis and photosynthetic electron transport. *Planta*, **167**, 146-151.
- Hinder, B., Schellenberg, M., Rodoni, S., Ginsburg, S., Vogt, E., Martinoia, E., Matile, P. and Hortensteiner, S.** (1996) How Plants Dispose of Chlorophyll Catabolites. DIRECTLY ENERGIZED UPTAKE OF TETRAPYRROLIC BREAKDOWN PRODUCTS INTO ISOLATED VACUOLES. *J. Biol. Chem.*, **271**, 27233-27236.
- Hoffman, N.E., Pichersky, E., Malik, V.S., Castresana, C., Ko, K., Darr, S.C. and Cashmore, A.R.** (1987) A cDNA clone encoding a photosystem I protein with homology to photosystem II chlorophyll *a/b*-binding polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8844-8848.
- Hörtensteiner, S.** (2006) Chlorophyll Degradation During Senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 55-77.
- Hörtensteiner, S.** (2009) Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends Plant Sci.*, **14**, 155-162.
- Iriyama, K., Ogura, N. and Takamiya, A.** (1974) A Simple Method for Extraction and Partial Purification of Chlorophyll from Plant Material, Using Dioxane. *J. Biochem.*, **76**, 901-904.
- Kapri-Pardes, E., Naveh, L. and Adam, Z.** (2007) The Thylakoid Lumen Protease Deg1 Is Involved in the Repair of Photosystem II from Photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 1039-1047.
- Kariola, T., Brader, G., Li, J. and Palva, E.T.** (2005) Chlorophyllase 1, a Damage Control Enzyme, Affects the Balance between Defense Pathways in Plants. *Plant Cell*, **17**, 282-294.
- Klughammer, C. and Schreiber, U.** (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700<sup>+</sup>-absorbance changes at 830 nm. *Planta*, **192**, 261-268.
- Klughammer, C. and Schreiber, U.** (2008) Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I. *PAM Application Notes*, **1**, 11-14.
- Krupinska, K.** (2006) Fate and Activities of Plastids During Leaf Senescence. In *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R.R. and Hooper, J.K. eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, pp. 433-449.
- Kufryk, G., Hernandez-Prieto, M., Kieselbach, T., Miranda, H., Vermaas, W. and Funk, C.** (2008) Association of small CAB-like proteins (SCPs) of *Synechocystis* sp. PCC 6803 with Photosystem II. *Photosynth. Res.*, **95**, 135-145.

- Mach, J.M., Castillo, A.R., Hoogstraten, R. and Greenberg, J.T.** (2001) The *Arabidopsis*-accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 771-776.
- Martínez, D.E., Costa, M.L., Gomez, F.M., Otegui, M.S. and Guiamet, J.J.** (2008) 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J.*, **56**, 196-206.
- Matile, P.** (1997) The Vacuole and Cell Senescence. In *The Plant Vacuole* (Leigh, R.A. and Sanders, D. eds): Academic Press, pp. 87-112.
- Meurer, J., Meierhoff, K. and Westhoff, P.** (1996) Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and Northern hybridisation. *Planta*, **198**, 385-396.
- Miersch, I., Heise, J., Zelmer, I. and Humbeck, K.** (2000) Differential Degradation of the Photosynthetic Apparatus During Leaf Senescence in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Biol.*, **2**, 618-623.
- Mullet, J.E., Burke, J.J. and Arntzen, C.J.** (1980) Chlorophyll Proteins of Photosystem I. *Plant Physiol.*, **65**, 814-822.
- Obokata, J., Mikami, K., Hayashida, N., Nakamura, M. and Sugiura, M.** (1993) Molecular Heterogeneity of Photosystem I (*psaD*, *psaE*, *psaF*, *psaH*, and *psaL* Are All Present in Isoforms in *Nicotiana* spp.). *Plant Physiol.*, **102**, 1259-1267.
- Otegui, M.S., Noh, Y.-S., Martínez, D.E., Petroff, M.G.V., Staehelin, L.A., Amasino, R.M. and Guiamet, J.J.** (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J.*, **41**, 831-844.
- Ougham, H., Hörtensteiner, S., Armstead, I., Donnison, I., King, I., Thomas, H. and Mur, L.** (2008) The control of chlorophyll catabolism and the status of yellowing as a biomarker of leaf senescence. *Plant Biol.*, **10**, 4-14.
- Park, S.-Y., Yu, J.-W., Park, J.-S., Li, J., Yoo, S.-C., Lee, N.-Y., Lee, S.-K., Jeong, S.-W., Seo, H.S., Koh, H.-J., Jeon, J.-S., Park, Y.-I. and Paek, N.-C.** (2007) The Senescence-Induced Staygreen Protein Regulates Chlorophyll Degradation. *Plant Cell*, **19**, 1649-1664.
- Pruzinska, A., Tanner, G., Anders, I., Roca, M. and Hortensteiner, S.** (2003) Chlorophyll breakdown: Pheophorbide *a* oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the *accelerated cell death 1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15259-15264.
- Roca, M., Gandul-Rojas, B. and Minguez-Mosquera, M.I.** (2007) Varietal differences in catabolic intermediates of chlorophylls in *Olea europaea* (L.) fruit cvs. Arbequina and Blanqueta. *Postharvest Biol. Technol.*, **44**, 150-156.
- Roca, M., James, C., Pruzinska, A., Hortensteiner, S., Thomas, H. and Ougham, H.** (2004) Analysis of the chlorophyll catabolism pathway in leaves of an introgression senescence mutant of *Lolium temulentum*. *Phytochemistry*, **65**, 1231-1238.
- Roca, M. and Minguez-Mosquera, M.I.** (2003) Involvement of chlorophyllase in chlorophyll metabolism in olive varieties with high and low chlorophyll content. *Physiol. Plant.*, **117**, 459-466.

- 
- Sárvári, É. and Nyitrai, P.** (1994) Separation of chlorophyll-protein complexes by diphosphate polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **15**, 1068-1071.
- Sato, Y., Morita, R., Katsuma, S., Nishimura, M., Tanaka, A. and Kusaba, M.** (2009) Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll *b* and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J.*, **57**, 120-131.
- Scheer, H.** (2006) An Overview of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. In *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Grimm, B., Porra, R.J., Rüdiger, W. and Scheer, H. eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, pp. 1-26.
- Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K. and Hortensteiner, S.** (2009) Pheophytin Pheophorbide Hydrolase (Pheophytinase) Is Involved in Chlorophyll Breakdown during Leaf Senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**, 767-785.
- Schenk, N., Schelbert, S., Kanwischer, M., Goldschmidt, E.E., Dörmann, P. and Hörtensteiner, S.** (2007) The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **581**, 5517-5525.
- Scheumann, V., Schoch, S. and Rüdiger, W.** (1999) Chlorophyll *b* reduction during senescence of barley seedlings. *Planta*, **209**, 364-370.
- Schreiber, U.** (1983) Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology I. The measuring system. *Photosynth. Res.*, **4**, 361-373.
- Schreiber, U.** (2004) Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. In *Chlorophyll *a* Fluorescence* (Papageorgiou, G.C. and Govindjee eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, pp. 279-319.
- Schreiber, U., Kühl, M., Klimant, I. and Reising, H.** (1996) Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM Fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynth. Res.*, **47**, 103-109.
- Schreiber, U., Müller, J., Haugg, A. and Gademann, R.** (2002) New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynth. Res.*, **74**, 317-330.
- Schreiber, U., Neubauer, C. and Schliwa, U.** (1993) PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed Xe-flash measuring light: A highly sensitive new tool in basic and applied photosynthesis research. *Photosynth. Res.*, **36**, 65-72.
- Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W.** (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.*, **10**, 51-62.
- Sims, D.A. and Gamon, J.A.** (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens. Environ.*, **81**, 337-354.
- Suck, R.W.L. and Krupinska, K.** (1996) Repeated Probing of Western Blots Obtained from Coomassie Brilliant Blue-Stained or Unstained Polyacrylamide Gels. *BioTechniques*, **21**, 418-422.
-

- 
- Sun, X., Fu, T., Chen, N., Guo, J., Ma, J., Zou, M., Lu, C. and Zhang, L.** (2010) The Stromal Chloroplast Deg7 Protease Participates in the Repair of Photosystem II after Photoinhibition in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **152**, 1263-1273.
- Sun, X., Peng, L., Guo, J., Chi, W., Ma, J., Lu, C. and Zhang, L.** (2007) Formation of DEG5 and DEG8 Complexes and Their Involvement in the Degradation of Photodamaged Photosystem II Reaction Center D1 Protein in Arabidopsis. *Plant Cell*, **19**, 1347-1361.
- Takamiya, K.-i., Tsuchiya, T. and Ohta, H.** (2000) Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends Plant Sci.*, **5**, 426-431.
- Tambussi, E.A., Bartoli, C.G., Beltrano, J., Guiamet, J.J. and Araus, J.L.** (2000) Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.*, **108**, 398-404.
- Tang, Y., Wen, X. and Lu, C.** (2005) Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice. *Plant Physiol. Biochem.*, **43**, 193-201.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T. and Takamiya, K.-i.** (1999) Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 15362-15367.
- Urantowka, A., Knorpp, C., Olczak, T., Kolodziejczak, M. and Janska, H.** (2005) Plant Mitochondria Contain at Least Two *i*-AAA-like Complexes. *Plant Mol. Biol.*, **59**, 239-252.
- Wagner, R., Aigner, H., Pružinská, A., Jänkänpää, H.J., Jansson, S. and Funk, C.** (2011) Fitness analyses of *Arabidopsis thaliana* mutants depleted of FtsH metalloproteases and characterization of three FtsH6 deletion mutants exposed to high light stress, senescence and chilling. *New Phytol.*, **191**, 449-458.
- Želisko, A., García-Lorenzo, M., Jackowski, G., Jansson, S. and Funk, C.** (2005) AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13699-13704.



## *CAPÍTULO 3*

—

### **EFFECTOS PLEIOTRÓPICOS DE LAS MUTACIONES EN LAS CLOROFILASAS DE *ARABIDOPSIS* *THALIANA***

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>CAPÍTULO 3 — EFECTOS PLEIOTRÓPICOS DE LAS MUTACIONES EN LAS CLOROFILASAS DE ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	162
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	163
ÍNDICE DE FIGURAS.....	165
RESUMEN.....	166
INTRODUCCIÓN .....	167
MATERIALES Y MÉTODOS .....	170
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	170
Aislamiento de ADN de hojas de <i>Arabidopsis</i> .....	170
Selección de mutantes homocigotas .....	171
Detección de insertos de T-DNA fuera de los genes de ATCHL1 y ATCHL2.....	174
Determinación del sitio de inserción del T-DNA .....	176
Obtención del doble mutante <i>atch11/atchl2</i> .....	180
RESULTADOS.....	182
Líneas mutantes KO por inserción de T-DNA.....	182
Caracterización fenotípica a día largo.....	183
Caracterización fenotípica a día corto.....	184
Longitud del hipocotilo .....	184
Desarrollo de la roseta.....	185
Hojas cortadas expuestas a la luz.....	186
Efectos de la disponibilidad de nutrientes minerales sobre la acumulación de antocianinas y retraso de la floración en las líneas mutantes.....	186
FIGURAS.....	188
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	215
Mutaciones KO por inserción de T-DNA .....	215
Fenotipo a día largo.....	216
Fenotipo a día corto.....	216
Acortamiento del hipocotilo.....	217
Desarrollo de la roseta.....	220

Producción de antocianinas.....	222
BIBLIOGRAFÍA.....	225

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 3.1 – PANELES LUMINOSOS PARA EL CULTIVO DE <i>ARABIDOPSIS</i> .....	188
FIGURA 3.2 – INSERCIÓNES DE T-DNA EN <i>ARABIDOPSIS</i> .....	190
FIGURA 3.3 – SELECCIÓN DE MUTANTES KO POR INSERCIÓN DE T-DNA.....	192
FIGURA 3.4 – INSERCIÓNES <i>EXTRAS</i> DE T-DNA EN LAS LÍNEAS MUTANTES DE <i>ARABIDOPSIS</i> PARA LAS CLOROFILASAS. ....	194
FIGURA 3.5 – LÍNEAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> MUTANTES PARA LAS CLOROFILASAS CRECIENDO A <i>DÍA LARGO</i> . .....	197
FIGURA 3.6 – LONGITUD DEL HIPOCOTILO DE LAS LÍNEAS MUTANTES DE <i>ARABIDOPSIS</i> .....	199
FIGURA 3.7 – LÍNEAS MUTANTES DE <i>ARABIDOPSIS</i> PARA LAS CLOROFILASAS CRECIENDO A <i>DÍA CORTO</i> Y BAJA IRRADIANCIA. ....	202
FIGURA 3.8 – TIEMPO DE FLORACIÓN Y NÚMERO DE HOJAS DE LAS LÍNEAS MUTANTES DE <i>ARABIDOPSIS</i> A BAJA IRRADIANCIA. ....	204
FIGURA 3.9 – LÍNEAS MUTANTES DE <i>ARABIDOPSIS</i> PARA LAS CLOROFILASAS CRECIENDO A <i>DÍA CORTO</i> Y ALTA IRRADIANCIA.....	206
FIGURA 3.10 – TIEMPO A FLORACIÓN Y NÚMERO DE HOJAS DE LAS LÍNEAS MUTANTES DE <i>ARABIDOPSIS</i> A ALTA IRRADIANCIA.....	208
FIGURA 3.11 – HOJAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> CORTADAS Y COLOCADAS A LA LUZ.....	210
FIGURA 3.12 – LÍNEAS MUTANTES DE <i>ARABIDOPSIS</i> PARA LAS CLOROFILASAS CULTIVADAS CON DIFERENTES NIVELES DE FERTILIZACIÓN EN LA MACETA. ....	212

## RESUMEN

Con el fin de avanzar en la caracterización de las primeras reacciones del catabolismo de la clorofila, principalmente en la caracterización de la actividad clorofilasa encontrada inicialmente en las VAS de *Nicotiana tabacum*, se continuaron los estudios en plantas de *Arabidopsis thaliana*, en la cual se han identificado dos genes con esta actividad enzimática. Para ello se emplearon líneas mutantes simples y doble *KO* para las clorofilas ATCHL1 y ATCHL2.

En esta primera etapa se comenzó con la caracterización fenotípica de las plantas mutantes *KO* para ATCHL1 y ATCHL2, las cuales exhibieron al ser cultivadas a día corto, características fenotípicas (incremento en el contenido de antocianinas, acortamiento del hipocotilo, etc.) *a priori* inconexas con su función asignada *in vitro* de remover el fitol de la clorofila. Por tanto, se cultivaron plantas de los cuatro genotipos (*i.e.* la línea silvestre y los mutantes simples y doble *KO*) a distintas irradiancias para comprobar si el fenotipo particular observado en las líneas mutantes está relacionado con la luz. Se observó que a alta irradiancia ( $250\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) los mutantes *KO* presentaron un contenido notablemente mayor de antocianinas que la línea silvestre, mientras que a baja irradiancia ( $70\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) estas diferencias no fueron notoriamente visibles.

También se observó que las plántulas de los genotipos *KO* desarrollan hipocotilos menos elongados que la línea silvestre, tanto a irradiancia baja como alta, pero de igual longitud al germinar en oscuridad. Notoriamente, los mutantes *KO* desarrollaron un número significativamente mayor de hojas, y sólo la línea mutante *atchl1* presentó además un retraso en la fecha hasta *bolting*.

## **INTRODUCCIÓN**

*Escribe, pues, lo que vieres, tanto lo presente como lo que ha de ser después de esto.*

*Apocalipsis 1:19*

Las investigaciones previas, en las que se observó en las VAS aisladas de tabaco la presencia de actividades enzimáticas con capacidad para degradar proteínas del Fotosistema I y clorofila, y en especial de actividad clorofilasa, nos orientó a profundizar los estudios sobre dicha actividad enzimática y la posible regulación de la misma. En este sentido, es importante destacar la utilización de plantas modelo en estudios de la biología celular y molecular.

Inicialmente, se comenzaron nuestros estudios en tabaco dado su “gran porte”, lo que principalmente facilitó suficiente material (hojas) para los aislamientos de las VAS. En cambio, en el campo de la biología molecular, las plantas de tabaco no poseen grandes ventajas, como sí lo hacen las plantas de *Arabidopsis thaliana* ([Meinke et al. 1998](#)). *Arabidopsis* ha tomado suma importancia en esta disciplina, dada su facilidad de cultivo, el corto ciclo reproductivo, facilidad de manipular genéticamente, y principalmente su reducido genoma diploide, y ha sido la primer especie vegetal de la que se ha obtenido la secuencia completa de su genoma ([The Arabidopsis Genome Initiative 2000](#)).

En *Arabidopsis thaliana*, han sido encontrados dos genes, *ATCHL1* y *ATCHL2*, cuyas proteínas poseen actividad clorofilasa *in vitro* (e indirectamente *in vivo*) ([Benedetti & Arruda 2002](#); [Tsuchiya et al. 1999](#)). Una aproximación experimental usualmente empleada en estudios de genómica funcional es la utilización de plantas mutantes *KO* (*Knock-Out*), es decir, plantas en las cuales la función de alguno de sus genes ha sido eliminada. En *Arabidopsis*, existen diversas colecciones de líneas mutantes disponibles en el dominio público, y entre las primeras colecciones generadas “masivamente” se encuentran las líneas mutagenizadas por inserción de T-DNA ([Alonso et al. 2003](#); [Rosso et al. 2003](#); [Sessions et al. 2002](#); [Woody et al. 2007](#)). Actualmente, se encuentran disponibles

estas colecciones en el ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*; [abrc.osu.edu](http://abrc.osu.edu)), a través del cual hemos conseguido las líneas mutantes *KO* para las clorofilasas (*atchl1* y *atchl2*), siendo estas inicialmente localizadas a través de la base de los datos *SIGnAL T-DNA Express* ([signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress](http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress)).

El *fenotipo* de un organismo, entendido como todas las características que pueden ser observables por algún medio o método, está dado por las interacciones que puedan ocurrir entre *genotipo* (*G*), y el medio ambiente o entorno (*E*) en el cual se encuentre el organismo ([Mather 1975](#); [Mather & Caligari 1974](#)), por lo que la caracterización del fenotipo (también definido como *Interacción G×E*) diferirá en tanto se modifiquen las condiciones de cultivo de las plantas, y así mismo, ciertas características puntuales en el genotipo, podrían llegar a permanecer encubiertas y ser pasadas por alto. En los últimos años, grandes esfuerzos se están realizando en la construcción y ampliación de bases de datos conteniendo información con diversidad de características fenotípicas de *Arabidopsis*, y cuando estos estudios se realizan a gran escala han sido denominados, *Fenómicos* (del inglés, *Phenomics* = *Phenotype* + “*omics*”) ([Boyes et al. 2001](#); [Kuromori et al. 2006](#)). Por lo tanto, el primer paso en el análisis genómico funcional de las líneas mutantes para las clorofilasas es realizar el estudio del fenotipo de las mismas.

Las primeras caracterizaciones realizadas en plantas, principalmente en aspectos relacionados con el metabolismo de la clorofila, han conducido a la identificación de plantas con defectos notorios en el catabolismo de la misma o de los complejos clorofila-proteína. Este conjunto de alteraciones han sido enmarcadas en los denominados fenotipos *stay-green* ([Thomas & Howarth 2000](#); [Thomas & Smart 1993](#)), caracterizados por un bloqueo o demora en la degradación de clorofila. Por tanto, en estudios funcionales de la enzima clorofilasa con líneas mutantes *KO* es importante evaluar si estas líneas presentan un fenotipo *stay-green*. Así mismo, dada la importancia en el metabolismo general de la planta que representa la existencia de la molécula de clorofila en los cloroplastos, y todas las funciones que desempeña esta organela en el desarrollo de las plantas, es esperable notar algunas otras características destacables en el fenotipo, que *a priori* no estarían relacionadas estrictamente con la degradación de clorofila.

Por lo tanto el objetivo en esta sección fue en primer lugar, la correcta identificación genética de las líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* para las clorofilasas, y en segundo lugar, la caracterización del fenotipo a nivel “macroscópico” y de planta entera. La caracterización de la degradación de clorofila y complejos clorofila-proteína en estos mutantes se profundizará en la próxima sección.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Se cultivaron las distintas líneas de *Arabidopsis thaliana* en recipientes de aproximadamente 170-200ml, utilizando como sustrato una mezcla de suelo (“tierra negra”) con perlita en iguales proporciones en volumen. Las plantas fueron cultivadas en cámaras de cultivo de temperatura controlada 18/25°C (noche/día), bajo paneles de tubos fluorescentes (Osram Lumilux® cool white L 36W/840) diseñados y contruidos de modo tal de permitir variar la irradiancia entre 50-350 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig. 3.1), con un fotoperíodo programado en 10 ó 14h de luz, para día corto o largo, respectivamente.

Las semillas de las distintas líneas mutantes por inserción de T-DNA fueron solicitadas al *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, [www.arabidopsis.org/abrc](http://www.arabidopsis.org/abrc)). Se utilizó el germoplasma SALK\_124978.38.40.x (*seed stock* SALK\_124978) (Alonso *et al.* 2003), con inserción en el locus AT1G19670 (ATCHL1), y el germoplasma SAIL\_646\_E09 (*seed stock* CS827897) (Sessions *et al.* 2002), con inserción en el locus AT5G43860 (ATCHL2). Las inserciones fueron mapeadas en el intrón del gen *At1g19670* (mutantes *atchl1*) y en el segundo exón del gen *At5g43860* (mutantes *atchl2*) (Fig. 3.2), respectivamente para cada línea, y en ninguna de ellas se ha observado transcripción del gen mutado (Schenk *et al.* 2007). Ambas inserciones se encuentran en el *background* de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0, por lo cual se utilizó como línea silvestre dicho ecotipo.

### **Aislamiento de ADN de hojas de *Arabidopsis***

Para el aislamiento de ADN se siguió el procedimiento descrito por Rogers & Bendich (1988) con algunas modificaciones. Se colocaron 2-3 discos de 9mm de diámetro de hojas de *Arabidopsis* en un tubo Eppendorf® de 1,5ml. Se congeló el tubo en N<sub>2</sub> líquido, se mortearon rápidamente los discos de hojas con un pequeño

pilón plástico para tubos, y se agregaron 200µl de buffer CTAB 2X [2% Bromuro de cetiltrimetilamonio (Bromuro de *N, N, N*-trimetil-hexadecan-amonio); 100mM Tris•HCl pH 8; 20mM EDTA; 1,4mM NaCl; 1% p/v PVP], se mezcló bien y se colocó en un bloque calefactor a 65°C durante una hora. Luego se agregaron 200µl de solución CI (Cloroformo : Alcohol Isoamílico, 24:1 v/v), se mezcló fuertemente y se centrifugó a 16000g durante 15min a temperatura ambiente. Se transfirió luego la fase acuosa superior a un nuevo tubo *Eppendorf*® conteniendo 200µl de alcohol isopropílico. Se mezcló bien, y se incubó 5min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 16000g durante 10min, se descartó el sobrenadante y se agregaron 700µl de etanol 70% v/v. Se centrifugó nuevamente a 16000g durante 5min, se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos abiertos en una cámara de flujo laminar hasta que se evaporó el resto de etanol. Finalmente se resuspendió el *pellet* en 20µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q.

Generalmente por este método se obtuvieron rendimientos de entre ~1-2µg/µl (determinados espectrofotométricamente mediante absorbancia a 260nm), con variaciones debidas al estado del material original.

## **Selección de mutantes homocigotas**

Debido a que los germoplasmas solicitados no son enviados originalmente como líneas mutantes homocigotas, y que generalmente suelen tener más de una inserción de T-DNA, es necesario seleccionar líneas mutantes homocigotas *KO* y eliminar otras posibles inserciones extras.

La selección de líneas mutantes homocigotas *KO* se realizó mediante PCR, en la cual los *primers* utilizados fueron diseñados con “*The iSECT Tools*” ([signal.salk.edu/isects.html](http://signal.salk.edu/isects.html)). Se utilizaron los parámetros por defecto para diseñar los *primers* para las líneas mencionadas. Por cada planta a analizar se requiere la combinación de tres *primers*, dos para las secuencias genómicas adyacentes al inserto de T-DNA (*primers* LP y RP) y el tercero correspondiente a la secuencia del extremo izquierdo del inserto (*primer* BP). Para las líneas SAIL se puede realizar la reacción de PCR colocando una mezcla de los tres *primers*, en cambio para las líneas

SALK se requiere colocar los *primers* de a pares (LP+RP y BP+RP) en dos reacciones de PCR por cada planta a analizar. De acuerdo al tamaño del producto de amplificación por PCR se puede definir si el genotipo de la planta se corresponde con una inserción de T-DNA homocigota o heterocigota para los genes en cuestión (Fig. 3.3). Para la selección de las líneas mutantes se utilizaron los siguientes *primers*:

Nombre	Línea	Secuencia del <i>primer</i> (5'→3')
LP_ATCHL1	<i>atchl1</i>	CCGAAAATGATAAATGCATGG
RP_ATCHL1	<i>atchl1</i>	ATGTCCAGCTCGAAAGATTCC
LBa1	SALK	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
LBb1.3	SALK	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
LBb1	SALK	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
LP_ATCHL2	<i>atchl2</i>	GAGGGTGGAGAGAATTTGAGG
RP_ATCHL2	<i>atchl2</i>	CGGTATAGATCCAGTCGATGG
LB1	SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
LB2	SAIL	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA
LB3	SAIL	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC

Para la selección de las líneas mutantes se realizaron reacciones de PCR en una termocicladora *Thermo® PCR Sprint*, en tubos de polipropileno de 0,2ml, utilizando los siguientes programas:

Ciclo ATCHL1		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
94°C	2min	×1
94°C	30seg	}×35
55°C	45seg	
72°C	1,5min	
72°C	5min	×1

Ciclo ATCHL2		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
94°C	2min	×1
94°C	30seg	}×35
53°C	45seg	
72°C	1,5min	
72°C	5min	×1

El ciclo ATCHL1 se utilizó para la detección de los mutantes *atchl1*, y el ciclo ATCHL2 se utilizó para la detección de los mutantes *atchl2*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con las siguientes mezclas de reacción:

Selección mutantes <i>atchl1</i>		
Buffer <i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> Green 10X ( <i>Fermentas</i> )		1X
dNTP Mix, 10mM ( <i>Invitrogen</i> )		0,8mM
DMSO ( <i>J.T.Baker</i> )		5% v/v
<i>Primers</i>	LP_ATCHL1, 50µM	0,5µM
	RP_ATCHL1, 50µM	0,5µM
	LBb1.3, 50µM	0,5µM
<i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> ADN Polimerasa, 5U/µl ( <i>Fermentas</i> )		0,025U/µl
ADN molde (muestras) (~1-2µg/µl)		0,01µl (muestra)/µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q		c.s.p. 20µl/tubo

Selección mutantes <i>atchl2</i>		
Buffer <i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> Green 10X ( <i>Fermentas</i> )		1X
dNTP Mix, 10mM ( <i>Invitrogen</i> )		0,8mM
DMSO ( <i>J.T.Baker</i> )		5% v/v
<i>Primers</i>	LP_ATCHL2, 50µM	0,5µM
	RP_ATCHL2, 50µM	0,5µM
	LB1, 50 µM	0,25µM
<i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> ADN Polimerasa, 5U/µl ( <i>Fermentas</i> )		0,025U/µl
ADN molde (muestras) (~1-2µg/µl)		0,01µl (muestra)/µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q		c.s.p. 20µl/tubo

Como se mencionó previamente, para las reacciones de PCR para la selección de mutantes *atchl1*, la combinación de los tres *primers* en simultáneo no permite una correcta amplificación de los fragmentos de ADN, por lo que la mezcla de reacción debe llevar las combinaciones LP\_ATCHL1 + RP\_ATCHL1 y RP\_ATCHL1 + LBb1.3, en tubos separados. Para ambas mezclas de reacción se indica el *primer* BP (*i.e.* LBb1.3 y LB1, respectivamente) que mejores resultados mostró.

Los productos de la reacción de PCR fueron observados en un gel de agarosa 1% p/v, en buffer TAE 1X (Tris•HCl-Acetato 40mM; EDTA 1mM pH 8,0), y separados electroforéticamente en una cuba de acrílico aplicando ~ 5V/cm.

## Detección de insertos de T-DNA fuera de los genes de ATCHL1 y ATCHL2

La transformación de plantas mediante *Agrobacterium* utilizando vectores de alta copia tiende generalmente a producir múltiples inserciones de T-DNA en el genoma (v.g. [Lee, L.-Y. & Gelvin 2008](#); [Yan & Rommens 2007](#)), y uno de los puntos más importantes en el estudio fenotípico de mutantes con pérdida de función en uno de sus genes es el empleo de líneas con sólo una inserción de T-DNA ([Ülker et al. 2008](#)). Por tanto, para determinar la posible presencia de otras inserciones se examinó la presencia del gen de resistencia (*nptII* en líneas SALK y *bar* en líneas SAIL) en generaciones F2 de plantas provenientes de padres heterocigotas para las inserciones en los genes de las clorofilasas de *Arabidopsis*. En plantas sin las inserciones de TDNA en los genes de las clorofilasas, *i.e.* plantas WT para dichos genes, se analizó la presencia de los genes de resistencia correspondientes a una posible inserción extra. Para ellos se utilizaron los siguientes *primers*:

Nombre	Gen/Línea Mutante	Secuencia del <i>primer</i> (5'→3')
FP_pROK2	<i>nptII</i> /SALK	GGCGCCCGGTTCTTTTGTC
RP_pROK2	<i>nptII</i> /SALK	AGCACGAGGAAGCGGTCAGC
FP_pDAP101	<i>bar</i> /SAIL	CGTACCGAGCCGCAGGAAC
RP_pDAP101	<i>bar</i> /SAIL	ATCTCGGTGACGGGCAGGAC

Las reacciones de PCR fueron realizadas en una termocicladora *Thermo*® *PCR Sprint*, en tubos de polipropileno de 0,2ml, utilizando los siguientes programas:

Ciclo PROK2		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
94°C	2min	×1
94°C	30seg	}×35
51°C	45seg	
72°C	1min	
72°C	5min	×1

Ciclo PDAP101		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
94°C	2min	×1
94°C	20seg	}×35
65°C	20seg	
72°C	35seg	
72°C	4min	×1

El ciclo PROK2 se utilizó para la detección de los mutantes SALK, y el ciclo PDAP101 se utilizó para la detección de los mutantes SAIL.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con las siguientes mezclas de reacción:

Identificación mutantes SALK	
Buffer <i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> <i>Green</i> 10X ( <i>Fermentas</i> )	1X
dNTP Mix, 10mM ( <i>Invitrogen</i> )	0,8mM
DMSO ( <i>J.T.Baker</i> )	5% v/v
<i>Primers</i>	FP_pROK2, 50µM
	RP_pROK2, 50µM
<i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> ADN Polimerasa, 5U/µl ( <i>Fermentas</i> )	0,025U/µl
ADN molde (muestras) (~1-2µg/µl)	0,01µl (muestra)/µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q	c.s.p. 20µl/tubo

Identificación mutantes SAIL	
Buffer <i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> <i>Green</i> 10X ( <i>Fermentas</i> )	1X
dNTP Mix, 10mM ( <i>Invitrogen</i> )	0,8mM
DMSO ( <i>J.T.Baker</i> )	5% v/v
<i>Primers</i>	FP_pDAP101, 50µM
	RP_pDAP101, 50µM
<i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> ADN Polimerasa, 5U/µl ( <i>Fermentas</i> )	0,025U/µl
ADN molde (muestras) (~1-2µg/µl)	0,01µl (muestra)/µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q	c.s.p. 20µl/tubo

En las plantas en la cuales se halló la presencia del gen resistencia se debieron amplificar las regiones genómicas adyacentes al sitio de inserción del extremo LB del T-DNA, para luego secuenciarlas y así poder localizar su posición en el genoma de *Arabidopsis*. Para lograr la amplificación mencionada se realizó una TAIL-PCR, según se describe a continuación.

### Determinación del sitio de inserción del T-DNA

Las reacciones de PCR entrelazadas de asimetría térmica, o TAIL-PCR (*Thermal Asymmetric InterLaced-PCR*), desarrollada por [Liu, Y.-G. & Whittier \(1995\)](#), es una simple y poderosa herramienta para la recuperación de fragmentos de ADN adyacentes a secuencias conocidas. Esta técnica utiliza un set de *primers* “anidados” de secuencia específica junto con un *primer* corto arbitrariamente degenerado (AD). En cada una de las tres reacciones de PCR consecutivas se mantiene el mismo primer AD y se cambia el *primer* específico, por el siguiente más distal, correspondiente a la secuencia conocida. Las eficiencias relativas de amplificación de productos específicos y no específicos son controladas térmicamente.

Para las reacciones de TAIL-PCR se siguió el procedimiento descrito en [Liu, Y.-G. et al. \(1995\)](#) para aislar y mapear inserciones de T-DNA en *Arabidopsis thaliana*. Para ello se utilizaron los siguientes *primers* degenerados:

Nombre	Degeneración	Secuencia del <i>primer</i> (5'→3')
AD1	64 veces	NTCGASTWTSGWGTT
AD2	128 veces	NGTCGASWGANAAGAA
AD3	256 veces	WGTGNAGWANCANAGA

Dichos *primers* se indican con el código de bases degeneradas según el código de bases oficial del IUB (*International Union of Biochemistry*), donde cada

base degenerada representa dos o más posibles bases tradicionales (A, C, G, T). En dicho código, S, W y N representan:

S	C ó G
W	A ó T
N	Cualquier base (A ó C ó G ó T)

La primera y segunda de las reacciones de PCR se realizaron en una termocicladora *Minicycler™* PTC-150 (*MJ Research*), en tubos de polipropileno de 0,2ml, con los siguientes programas:

1° Ciclo		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
93°C	1min	×1
95°C	1min	×1
94°C	1min	}×5
62°C	1min	
72°C	2,5min	
94°C	1min	×1
25°C	3min	×1
+47°C	0,3°C/seg	—
72°C	2,5min	×1
94°C	30seg	}×15
68°C	1min	
72°C	2,5min	
94°C	30seg	
68°C	1min	
72°C	2,5min	
94°C	30seg	
44°C	1min	
72°C	2,5min	
72°C	5min	×1



2° Ciclo		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
95°C	1min	×1
94°C	30seg	}×12
64°C	1min	
72°C	2,5min	
94°C	30seg	
64°C	1min	
72°C	2,5min	
94°C	30seg	
44°C	1min	
72°C	2,5min	}×1
72°C	5min	

La tercera de las reacciones de PCR fue realizada en una termocicladora *Thermo® PCR Sprint*, en tubos de polipropileno de 0,2ml, utilizando el siguiente programa:

3° Ciclo		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
94°C	1min	}×20
44°C	1min	
72°C	2,5min	
72°C	5min	×1

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con las siguientes mezclas de reacción:

1° Reacción TAILPCR		
Buffer <i>DreamTaq™ Green 10X (Fermentas)</i>		1X
dNTP Mix, 10mM ( <i>Invitrogen</i> )		0,2mM
<i>Primers</i>	TR1, 50µM	0,2µM
	AD1, 50µM	2µM
	AD2, 50µM	3µM
	AD3, 50µM	4µM
<i>DreamTaq™</i> ADN Polimerasa, 5U/µl ( <i>Fermentas</i> )		0,04U/µl
ADN molde (muestras) (~1-2µg/µl)		0,01µl (muestra)/µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q		c.s.p. 20µl/tubo

Donde TR1 representa al *primer* LBa1 o LB1, según se corresponda con líneas SALK o SAIL, respectivamente. En cada mezcla de reacción se utilizó la combinación del *primer* TR1 con sólo uno de los *primers* AD.

2° Reacción TAIL-PCR		
Buffer <i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> Green 10X ( <i>Fermentas</i> )		1X
dNTP Mix, 10mM ( <i>Invitrogen</i> )		0,3mM
<i>Primers</i>	TR2, 50µM	0,2µM
	AD1, 50µM	1,5µM
	AD2, 50µM	2µM
	AD3, 50µM	2µM
<i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> ADN Polimerasa, 5U/µl ( <i>Fermentas</i> )		0,03U/µl
ADN molde (dilución 1:50 de 1° TAIL-PCR)		0,02µl (muestra)/µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q		c.s.p. 20µl/tubo

Donde TR2 representa al *primer* LBb1.3 o LB2, según se corresponda con líneas SALK o SAIL, respectivamente. En cada mezcla de reacción se utilizó la combinación del *primer* TR2 con sólo uno de los *primers* AD, siendo el mismo utilizado en la reacción previa.

3° Reacción TAIL-PCR		
Buffer <i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> Green 10X ( <i>Fermentas</i> )		1X
dNTP Mix, 10mM ( <i>Invitrogen</i> )		0,3mM
<i>Primers</i>	TR3, 50µM	0,2µM
	AD1, 50µM	1,5µM
	AD2, 50µM	2µM
	AD3, 50µM	2µM
<i>DreamTaq</i> <sup>TM</sup> ADN Polimerasa, 5U/µl ( <i>Fermentas</i> )		0,03U/µl
ADN molde (dilución 1:10 de 2° TAIL-PCR)		0,01µl (muestra)/µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q		c.s.p. 50µl/tubo

Donde TR3 representa al *primer* LBb1 o LB3, según se corresponda con líneas SALK o SAIL, respectivamente. En cada mezcla de reacción se utilizó la combinación del *primer* TR3 con sólo uno de los *primers* AD, siendo el mismo utilizado en la reacción previa. Esta última reacción se realizó en un mayor volumen para obtener mayor cantidad de ADN amplificado para luego poder secuenciarlo.

Luego los productos de cada reacción se visualizaron en un gel de agarosa 1% p/v (en buffer TAE 1X). Las bandas específicas se identificaron por sus tamaños relativos entre sí, ya que cada producto de amplificación específico de cada reacción

consecutiva de PCR poseerá un tamaño relativo menor, dado por la distancia entre los *primers* específicos. Los fragmentos de ADN correspondientes a bandas específicas de la tercera reacción (o también de la segunda) fueron extraídos utilizando el *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare Life Sciences*) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Los fragmentos purificados, junto con el *primer* específico correspondiente, fueron luego enviados para su secuenciación directa al servicio de secuenciación del IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria, CONICET-UNLP). El servicio de secuenciación se realiza allí utilizando el *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (*GE Healthcare Life Sciences*) que contiene la ADN polimerasa *Thermo Sequenase II*. El análisis se lleva a cabo en un secuenciador automático capilar *MegaBACE™ 1000* (*GE Healthcare Life Sciences*). Normalmente, si el ADN molde es de buena calidad, se pueden leer entre 650 y 700 bases por reacción.

Con los resultados de las secuenciaciones, se procedió a identificar la secuencia obtenida con la región genómica correspondiente. Para ello se realizó un *BLAST* ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), a partir del cual se debe encontrar que la primera porción de nuestra secuencia *query* se corresponde con el extremo izquierdo del T-DNA, y la porción restante es concordante con una región genómica de *Arabidopsis thaliana*.

Una vez conocido el sitio de inserción del TDNA, se procedió al diseño de *primers* apropiados de modo tal de poder luego obtener productos de amplificación por PCR de ~1000pb para la combinación de *primers* LB + RP, y de ~500pb para la combinación de *primers* BP+RP.

### **Obtención del doble mutante *atch11/atch12***

Una vez halladas las líneas mutantes homocigotas, y reproducidas (como ya hemos mencionado anteriormente, las plantas de *Arabidopsis thaliana* son naturalmente autógamias) para obtener suficiente cantidad de semillas para los futuros experimentos, se realizaron los cruzamientos entre ellas para producir la línea doble mutante homocigota *atch11/atch12* (*atch11/2*). Las flores de *Arabidopsis*

*thaliana* permiten la posibilidad de realizar fecundación “cruzada” sin necesidad de emasculación del receptor materno (*i.e.* remover las anteras), puesto que el gineceo se desarrolla, y es apto para ser fecundado, antes que el androceo (estambre) de la misma flor complete su desarrollo, permitiendo con alta probabilidad que la fecundación sea realizada sólo por el polen inoculado sobre el estigma, si es colocado antes que el propio androceo madure.

Los cruzamientos se realizaron colocando el polen de una de las líneas (frotando las anteras) sobre el estigma (carpelo) de la otra línea, de la cual se utilizaron flores cuyas anteras aún permanecían inmaduras. De este modo y debido a la gran cantidad de polen colocado, la flor sería fecundada sólo por la línea paterna deseada. Este procedimiento fue realizado bajo una lupa binocular debido al reducido tamaño de las flores de *Arabidopsis*. La flor fecundada fue marcada para luego colectar las semillas. Estas semillas obtuvieron la mitad de las cargas génicas parentales, es decir, serán mutantes heterocigotas para ambos genes. Una vez confirmada la heterocigosis para ambos genes en las plantas obtenidas de este cruzamiento, se procedió a colectar las semillas de estas plantas. En esta segunda generación se analizó por PCR nuevamente la presencia del inserto de T-DNA hasta encontrar las líneas doble mutantes homocigotas para ambos genes de las clorofilasas de *Arabidopsis*. Finalmente de estas plantas doble mutantes se colectaron semillas para los futuros experimentos.

## RESULTADOS

### Líneas mutantes KO por inserción de T-DNA

Como se mencionó anteriormente, las transformaciones de plantas mediante *Agrobacterium* utilizando vectores de alta copia tienden generalmente a producir múltiples inserciones de T-DNA en el genoma (v.g. [Lee, L.-Y. & Gelvin 2008](#); [Yan & Rommens 2007](#)), por lo que se procedió simultáneamente a la identificación y selección de plantas homocigotas para las inserciones de T-DNA en los genes correspondientes las clorofilasas, y a la búsqueda de inserciones “extras” de T-DNA.

En primer lugar, se encontró que las semillas proporcionadas por ABRC provenían de plantas heterocigotas para las inserciones en las clorofilasas, por lo que se requirió multiplicar las semillas hasta lograr la identificación de alguna planta con homocigosis para el inserto de T-DNA en los respectivos genes de interés.

Paralelamente se fue examinando la posible presencia de otras inserciones mediante la identificación de la presencia del gen de resistencia (*nptII* en líneas SALK y *bar* en líneas SAIL) en generaciones F2 de plantas provenientes de padres heterocigotas para los genes de las clorofilasas de *Arabidopsis*. En plantas que mostraron no poseer las inserciones de T-DNA en los genes de las clorofilasas, *i.e.* plantas WT para dichos genes, se analizó la presencia de los genes de resistencia correspondientes. De estos análisis surgió la presencia de una segunda inserción de T-DNA en la línea SALK (*atch11*) y dos inserciones extras en la línea SAIL (*atch12*), por lo que se procedió luego a identificar la posición de las inserciones extras mediante la técnica de TAIL-PCR y posterior secuenciación, como se describió anteriormente. De estos análisis se localizaron las inserciones extras en el extremo 3' del gen *At4g31680* en la línea SALK ([Fig. 3.4A](#)), y en regiones intergénicas en los cromosomas 1 y 5 en la línea SAIL ([Figs. 3.4B y C](#)).

Con los resultados de las secuenciaciones correspondientes, se procedió al diseño de *primers* de modo tal de poder identificar la presencia de la inserción de T-DNA en uno o ambos cromosomas del linaje de plantas con estas inserciones

extras, siguiendo la estrategia de selección descripta ([Fig. 3.3](#)). Los *primers* diseñados y utilizados fueron los siguientes:

Nombre	Línea Mutante	Secuencia del <i>primer</i> (5'→3')
RP_TFB3	SALK (2° inserto)	GTT TTG TAT TGT TTT TGG CTA TGG
LP_TFB3		TCA CGA AAG GGA ATG GAC TC
RP_SAIL417	SAIL (2° inserto)	TTG TCG TAC GTG CTT CAA TAA TG
LP_SAIL417		TAA CTG CAA GTC TGC AAC TAA CG
RP_3'ATL63	SAIL (3° inserto)	GCT CAT TTG ATG GAA AAC CAT AC
LP_3'ATL63		TGA AGA AAA TCT TAA GCT GGC C

Finalmente se continuó con la selección de las plantas mutantes hasta localizar individuos que sólo poseyeran las inserciones de T-DNA en los genes de las clorofilasas, y que además fueran homocigotas para dicha inserción.

Lamentablemente no se pudo localizar ninguna planta de la línea SAIL, libre del 2° inserto ([Fig. 3.4B](#)), y poseyendo a su vez la inserción de T-DNA en el gen *atchl2*. A pesar de que ambas inserciones se encuentran físicamente en cromosomas “separados”, se especula que este aparente ligamiento sea debido a una translocación recíproca entre los cromosomas conteniendo originalmente las inserciones de T-DNA, hecho que ha sido reportado como algo frecuente en mutaciones por inserciones múltiples de T-DNA en *Arabidopsis* ([Clark & Krysan 2010](#); [Curtis et al. 2009](#)). De todos modos se prosiguió igualmente con el estudio fenotípico y funcional empleando la línea mutante SAIL para el gen *atchl2*.

En las secciones siguientes se reporta la caracterización de las líneas mutantes para caracteres fenotípicos aparentemente no relacionados con la degradación de clorofila. En análisis funcional de la participación de ATCHL1 y ATCHL2 en la degradación de clorofila se aborda en el Capítulo 4.

## Caracterización fenotípica a día largo

Tradicionalmente, la mayoría de los estudios con *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0), y principalmente aquellos relacionados con estudios genéticos, son

realizados cultivando las plantas en un fotoperíodo de día largo (14h luz o más), que se corresponde con un fotoperíodo rápidamente inductivo de floración en este ecotipo de *Arabidopsis*. Bajo estas condiciones de cultivo, el ciclo completo de vida de las plantas es de aproximadamente 30 días, la mitad (o menos) que el tiempo que dura el ciclo de vida de estas plantas creciendo a día corto (fotoperíodo no-inductivo).

Por tanto se procedió inicialmente al cultivo de las líneas mutantes bajo días largos, en una cámara de cultivo. Bajo estas condiciones, ninguna de las líneas mutantes (*chl1*, *chl2* y *chl1/2*) mostró características visibles distintivas de la línea silvestre (*wt*) ([Fig. 3.5](#)).

### **Caracterización fenotípica a día corto**

Dado que los cuatro genotipos empleados, presentaron a día largo características fenotípicas no-distinguibles entre sí, se procedió al cultivo de las plantas en condiciones de día corto (10h de luz).

#### ***Longitud del hipocotilo***

Bajo días cortos, las plantas mutantes presentaron hipocotilos de menor longitud que el genotipo silvestre, tanto a baja ( $70\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) como a alta ( $250\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) irradiancia ([Fig. 3.6A](#)).

Así mismo, a alta irradiancia la línea doble mutante *chl1/2* presentó similar longitud a la línea *chl2*, siendo ambas las de menor longitud. A baja irradiancia, la línea *chl1/2* presentó una longitud intermedia entre las otras líneas mutantes, siendo en este caso la línea *chl1* la de menor longitud ([Fig. 3.6A](#)). Comparando entre las distintas irradiancias, el acortamiento de los hipocotilos en las líneas mutantes parece responder más sensiblemente a la luz, fundamentalmente a bajos flujos cuánticos, que el genotipo silvestre.

Con el fin de dilucidar si las diferencias de longitud del hipocotilo en las líneas mutantes de las clorofilasas también ocurre durante la escotomorfogénesis

(desarrollo en oscuridad), se germinaron semillas en oscuridad en placas de Petri (con medio MS/agar, [ver Capítulo 4](#)). Para este ensayo, se expusieron las semillas 1h a la luz para interrumpir la dormición, y luego se cubrieron las placas con papel de aluminio, y se las colocó en la cámara de cultivo, en posición inclinada ( $\sim 60^\circ$ ) a modo de minimizar problemas en el crecimiento de los hipocotilos ocasionados por el reducido espacio en altura de las placas. Luego de 7 días se determinó la longitud del hipocotilo ([Fig. 3.6A](#)). Aquí no se observaron diferencias significativas entre los cuatro genotipos.

También se hizo un recuento del número de hojas desarrolladas al momento de medir la longitud del hipocotilo ([Fig. 3.6B](#)). A alta irradiancia las líneas mutantes presentaron un mayor número de hojas que la línea silvestre, aunque a baja irradiancia, sólo la línea *chl1/2* presentó un número de hojas levemente mayor al silvestre.

### ***Desarrollo de la roseta***

El desarrollo de la roseta de las líneas mutantes para las clorofilasas, cultivadas a día corto, baja irradiancia ( $70\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ([Figs. 3.7A y B](#)) y alta irradiancia ( $250\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ([Fig. 3.9A](#)) fue modificado de distintas maneras.

Se observó que las plantas de la línea *chl1* presentaron un mayor número de hojas en la roseta (determinado al día en que se observó que las plantas entraron en *bolting*, es decir, de la aparición del escapo floral, [Fig. 3.8A](#)), las líneas *chl2* y *chl1/2* presentaron un número intermedio de hojas, mientras que la línea silvestre presentó un número significativamente menor que el resto de los genotipos. Asimismo, se observó que la línea *chl1* demoró más tiempo en entrar en *bolting* ([Fig. 3.8B](#)), mientras que el resto de las líneas demoraron aproximadamente el mismo tiempo.

Las plantas cultivadas a alta irradiancia presentaron una notoria diferencia en el contenido de antocianinas, que fue siempre mayor en todas las líneas *KO*. La acumulación de antocianinas fue observada a simple vista en las hojas ([Fig. 3.9A](#)), y cualitativamente en un extracto con solventes ([Fig. 3.9B](#)), y estas diferencias fueron evidentes luego de que las plantas entraron en *bolting*. Notoriamente, las plantas



cultivadas a baja irradiancia no presentaron diferencias acentuadas en el contenido visible de antocianinas.

Al ser cultivadas a alta irradiancia, las plantas desarrollaron menores números de hojas ([Fig. 3.10A](#)) y menores tiempos hasta *bolting* ([Fig. 3.10B](#)) que las plantas creciendo a baja irradiancia, pero el comportamiento relativo entre los genotipos fue exactamente el mismo en alta y baja irradiancia, es decir un aumento del número de hojas en todos los mutantes y una demora cronológica en *chl1*.

### ***Hojas cortadas expuestas a la luz***

Se cortaron hojas jóvenes y maduras de plantas de 34 días cultivadas a día corto y  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , las cuales fueron luego colocadas en cajas de Petri (conteniendo papel absorbente humedecido) y expuestas a la luz, en las mismas condiciones a las cuales fueron cultivadas las plantas. A los 7 días las líneas mutantes mostraron notoriamente una elevada formación de antocianinas, a diferencia de la línea silvestre que no acumuló niveles de antocianinas apreciables en forma visible ([Fig. 3.11](#)).

### **Efectos de la disponibilidad de nutrientes minerales sobre la acumulación de antocianinas y retraso de la floración en las líneas mutantes**

Diversos factores pueden inducir la acumulación de antocianinas en las hojas, entre los cuales el estado nutricional es uno de los más importantes. Por tal motivo se cultivaron las plantas de los cuatro genotipos a  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y día corto, y a un grupo de plantas se les agregó en el centro de la maceta de 170ml (previo a la siembra) aproximadamente 500mg del fertilizante granulado de liberación lenta *Nitrophoska*® 15-15-6-4, el resto de las plantas crecieron cultivadas en las macetas sólo con la mezcla de tierra negra : perlita, 1:1 v/v.

Luego de 50 días se observaron y fotografiaron las plantas ([Figs. 3.12A y B](#)). Las plantas cultivadas sin el agregado del fertilizante granulado presentaron las

características descritas anteriormente, destacándose la acumulación diferencial de antocianinas en las líneas mutantes, así como también que sólo algunas de las mismas estaban entrando en *bolting*, mientras que todas las plantas de línea silvestre comenzaban la floración ([Fig. 3.12A](#)). En el caso de las plantas cultivadas con la aplicación del fertilizante, ninguna de ellas mostró acumulación visiblemente notoria de antocianinas ([Fig. 3.12B](#)), así como tampoco diferencias de otras características visibles como el número de hojas y tiempo de floración, siendo este último similar (o levemente mayor) al observado para la línea silvestre en el ensayo sin fertilizante.

## **FIGURAS**

Figura 3.1 – Paneles luminosos para el cultivo de *Arabidopsis*.



Figura 3.1

Figura 3.2 – Inserciones de T-DNA en *Arabidopsis*.

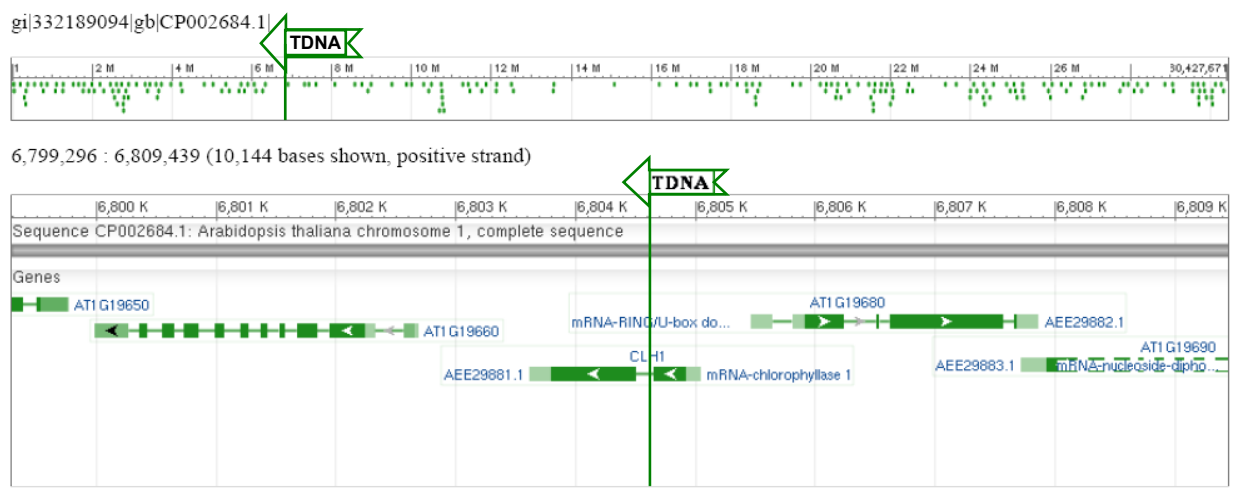
(A) Posición de la inserción de T-DNA en la línea SALK\_124978 en el locus At1g19670 (ATCHL1).

(B) Posición de la inserción de T-DNA en la línea SAIL\_646\_E09 en el locus At5g43860 (ATCHL2).

Las flechas indican la dirección derecha a izquierda del vector de T-DNA.

Figura 3.2

**A** *Arabidopsis thaliana* chromosome 1, complete sequence



**B** *Arabidopsis thaliana* chromosome 5, complete sequence

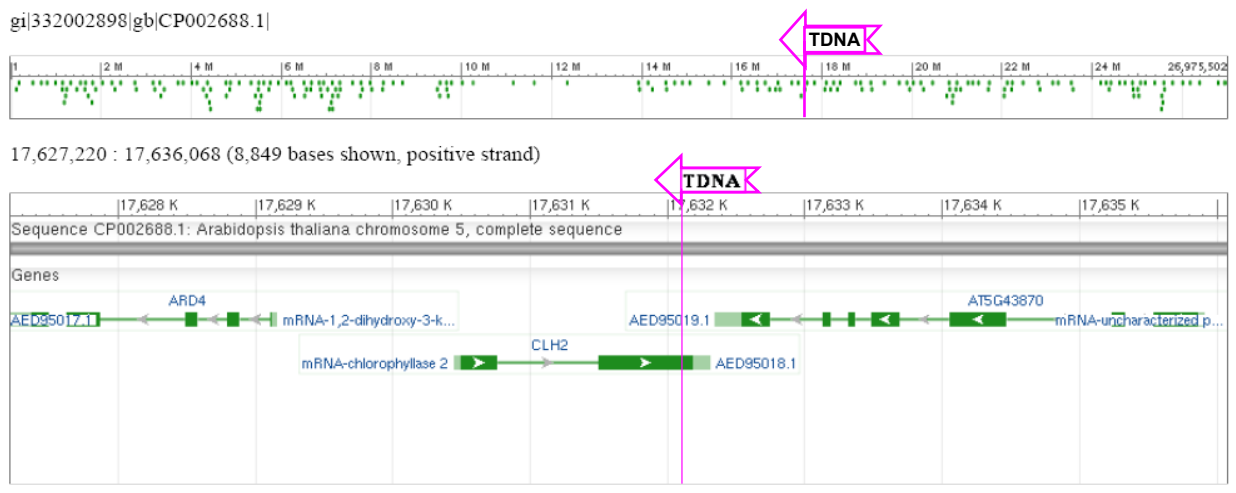


Figura 3.3 – Selección de mutantes KO por inserción de T-DNA.

(A) Esquema demostrativo del diseño de *primers* para la identificación de las líneas mutantes (tomado de *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory*, [signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html](http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html)). N, distancia entre el sitio actual de inserción y la posición de la secuencia adyacente al sitio de inserción, usualmente entre 0-300 bases; MaxN, diferencia máxima entre el sitio actual de inserción y la posición de la secuencia adyacente al sitio de inserción (por defecto son 300 bases); pZone, regiones utilizadas para seleccionar los *primers* (por defecto con 100 bases); Ext5 y Ext3, regiones medias reservadas en las cuales no se seleccionarán los *primers*; LP y RP, *primers* genómicos a izquierda y derecha del sitio de inserción del T-DNA; BP, *primer* del borde izquierdo del T-DNA; BPos, distancia entre el sitio de inserción y el *primer* BP.

(B) Imagen ejemplificando los resultados obtenidos para la identificación de las distintas combinaciones alélicas. MWM, marcadores de pesos moleculares (Ladder 100bp, *Productos Bio-Lógicos*); WT, homocigosis para el alelo silvestre; HM, homocigosis para el alelo mutante; HZ, heterocigosis para los alelos silvestre y mutante.

Figura 3.3

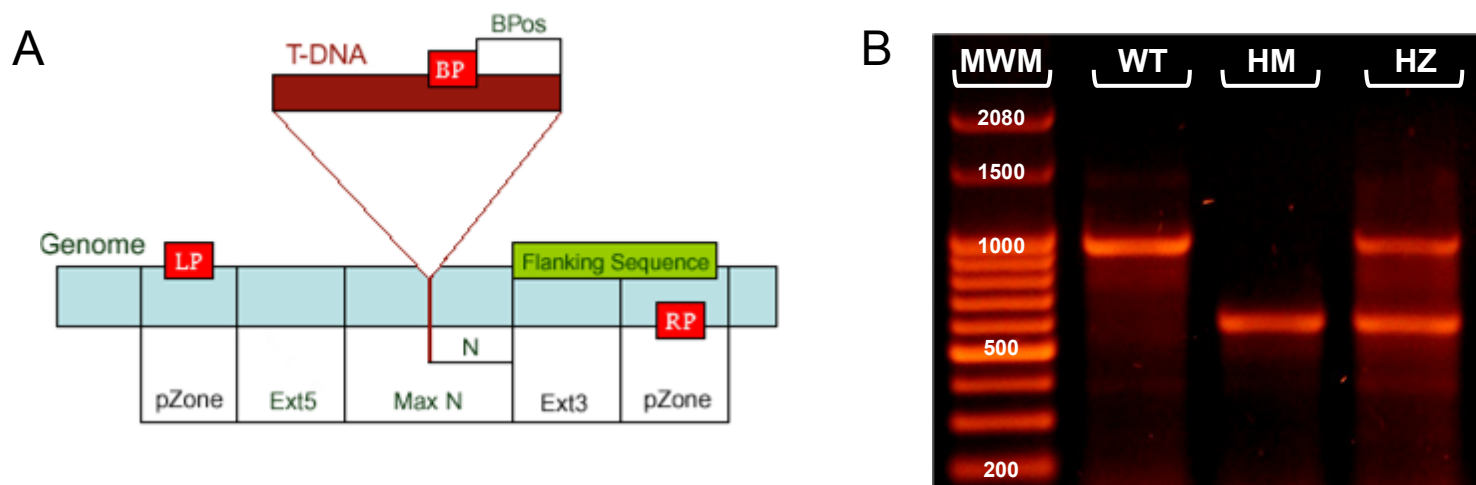




Figura 3.4 – Inserciones *extras* de T-DNA en las líneas mutantes de *Arabidopsis* para las clorofilasas.

(A) Posición de la inserción *extra* de T-DNA en la línea SALK\_124978 (*atch11*)

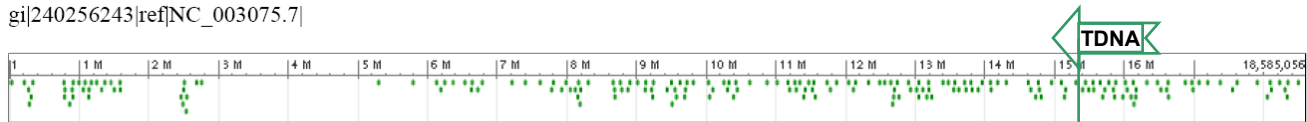
(B) y (C) Posiciones de las inserciones *extras* de T-DNA en la línea SAIL\_646\_E09 (*atch12*).

Las flechas indican la dirección derecha a izquierda del vector de T-DNA.

Figura 3.4

**A** *Arabidopsis thaliana* chromosome 4, complete sequence

gi|240256243|ref|NC\_003075.7|



15,335,001 : 15,345,000 (10,000 bases shown, positive strand)

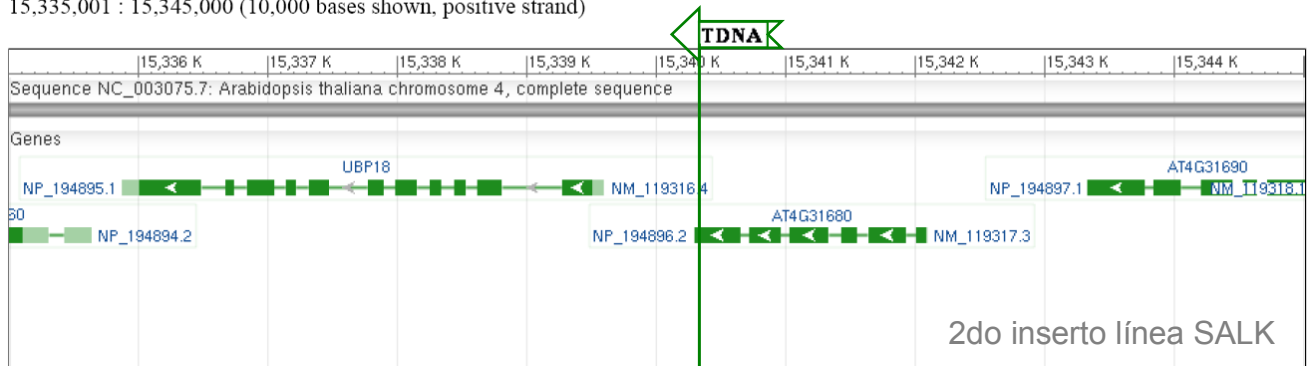


Figura 3.4

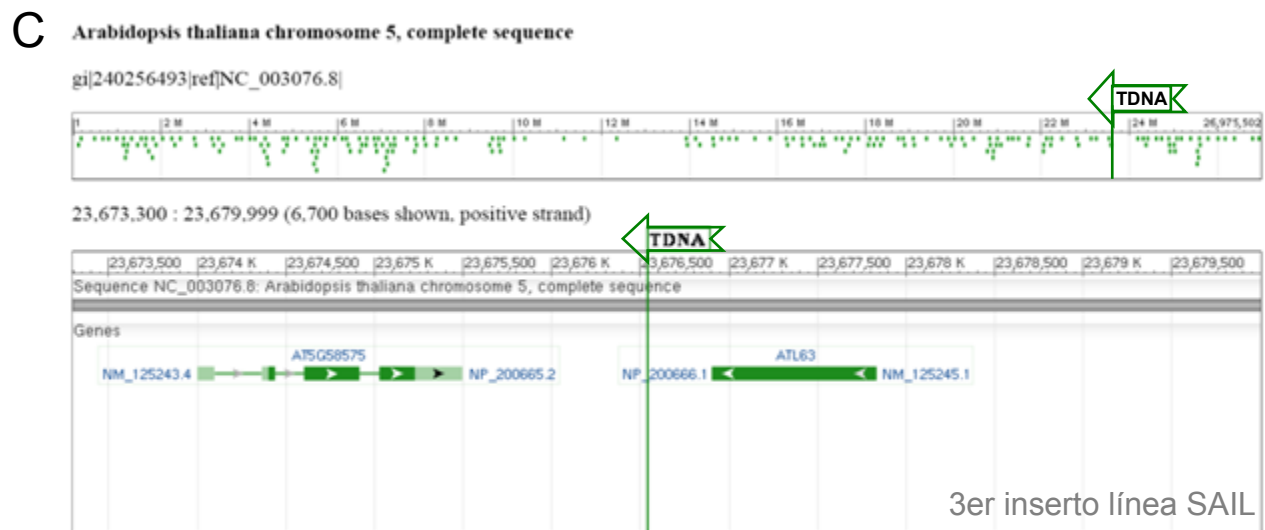
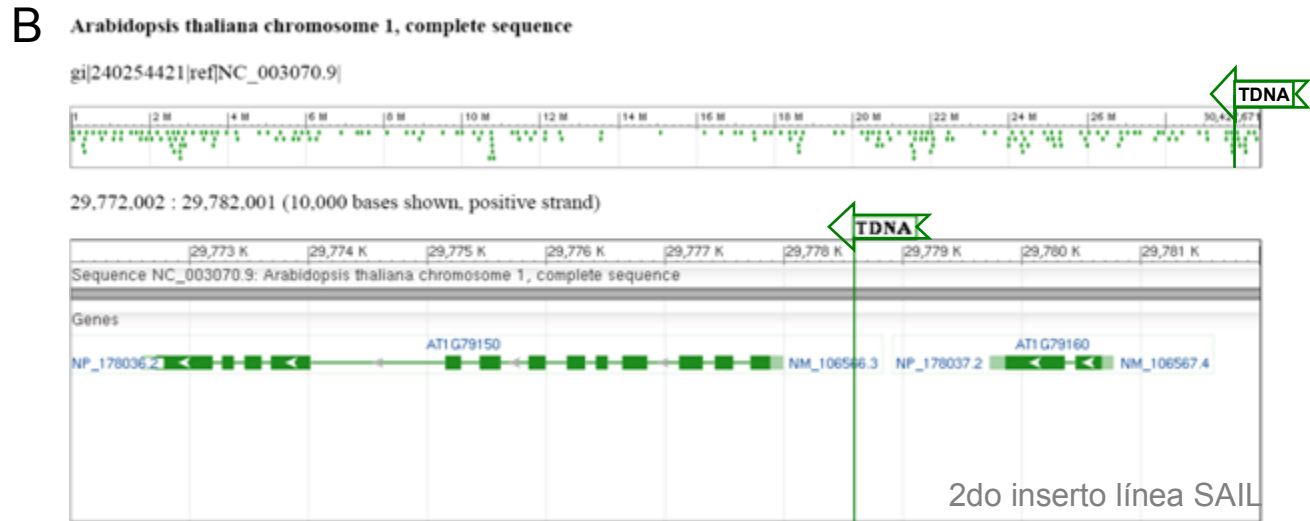
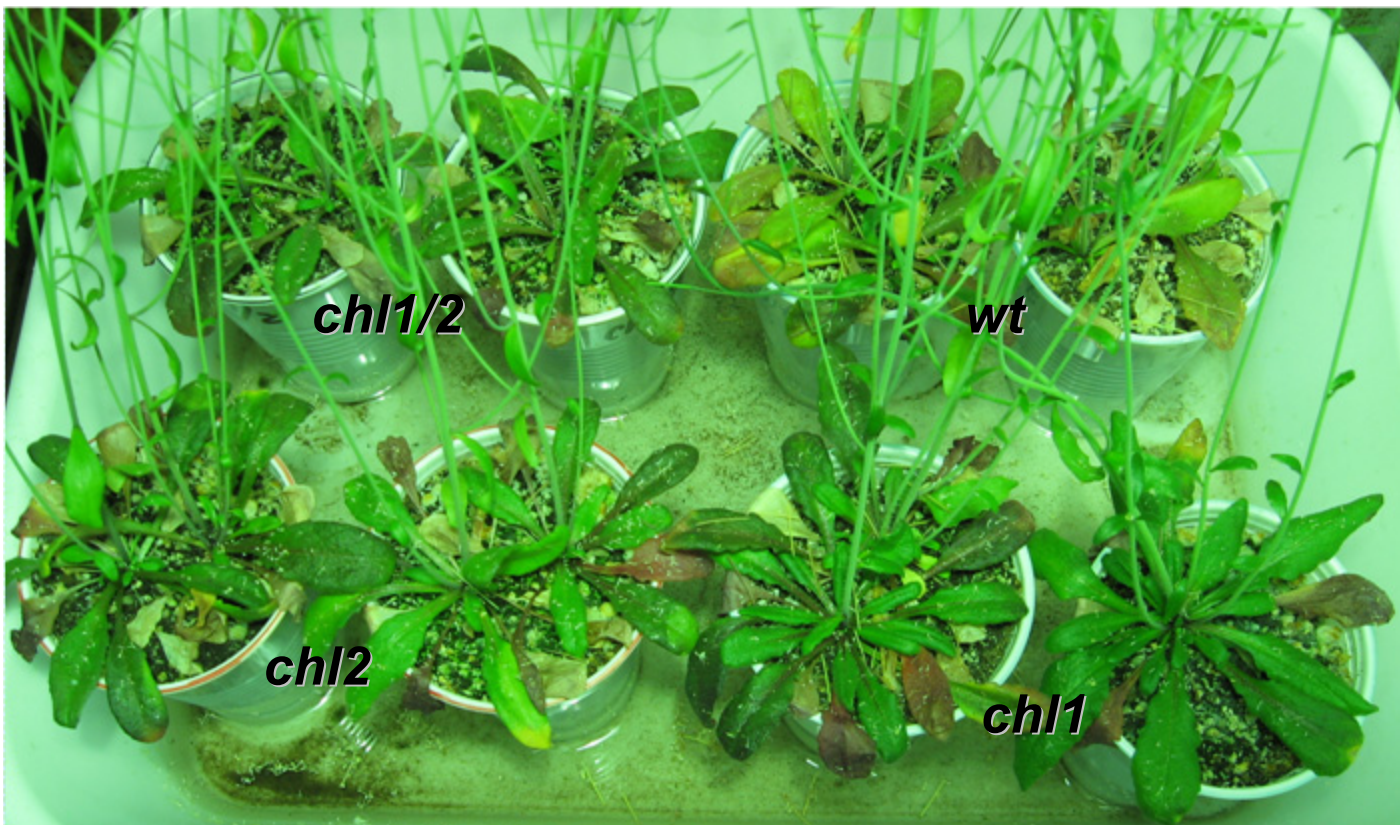


Figura 3.5 – Líneas de *Arabidopsis* mutantes para las clorofilasas creciendo a *día largo*.

Imagen de plantas de *Arabidopsis* creciendo a día largo (fotoperíodo inductivo). Las plantas fueron cultivadas en cámaras de cultivo a  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 45 días.

Figura 3.5

Plantas a día largo



Plantas de 45 días, cultivadas a  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Figura 3.6 – Longitud del hipocotilo de las líneas mutantes de *Arabidopsis*.

(A) Longitud del hipocotilo de las líneas silvestre y mutantes de *Arabidopsis* creciendo a alta ( $250\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y baja ( $70\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) irradiancia durante 19 días; y en oscuridad durante 7 días. Las plantas fueron cultivadas en cámaras de cultivo a día corto (fotoperíodo no-inductivo).

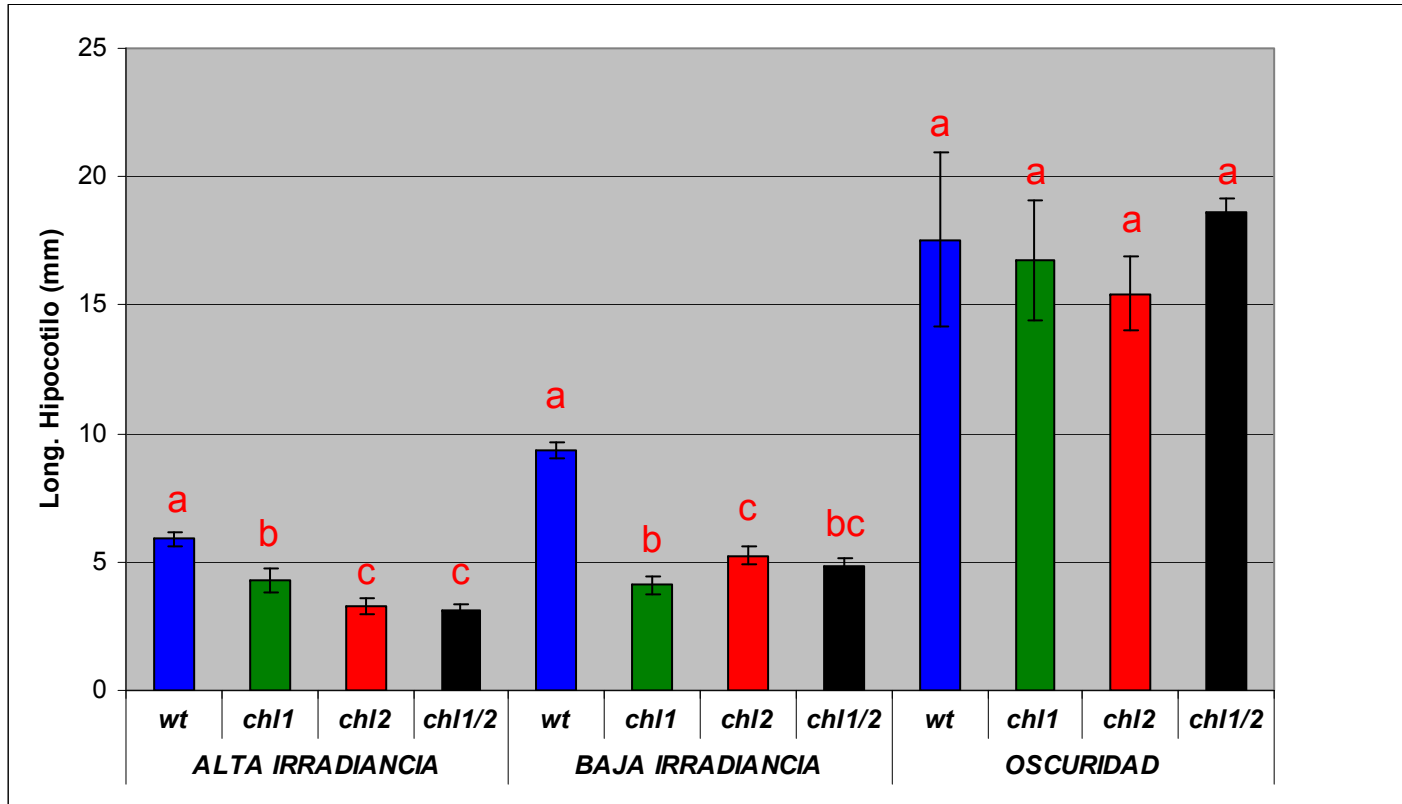
(B) Número de hojas de las mismas plantas a las cuales se les determinó la longitud del hipocotilo en (A). Las plantas creciendo en oscuridad no desarrollaron hojas.

Las barras de error indican el *error estándar*.

Se indica sobre las barras con letras a/b/c, los grupos homogéneos *LSD*  $\alpha=0,05$ .

Figura 3.6

A



Plantas creciendo a baja y alta irradiancia

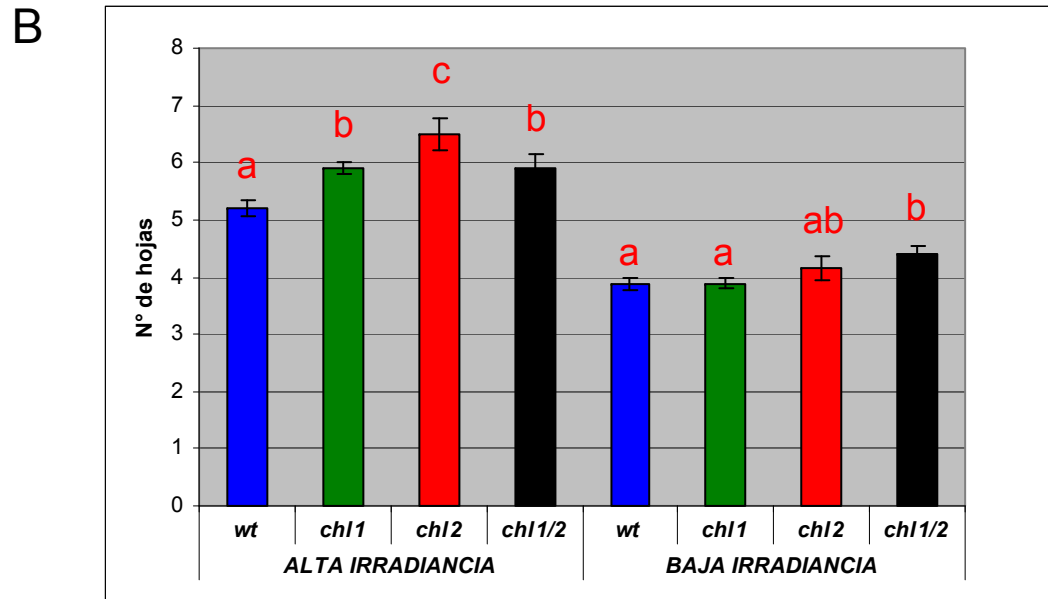
Plantas de 19 días, cultivadas a 70 (baja) y 250 (alta)  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

a/b/c Grupos Homogeneos (LSD  $\alpha=0,05$ )

Plantas creciendo en oscuridad

Mediciones a los 7 días

Figura 3.6



Plantas creciendo a baja y alta irradiancia  
 Plantas de 19 días, cultivadas a 70 (baja) y 250 (alta)  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

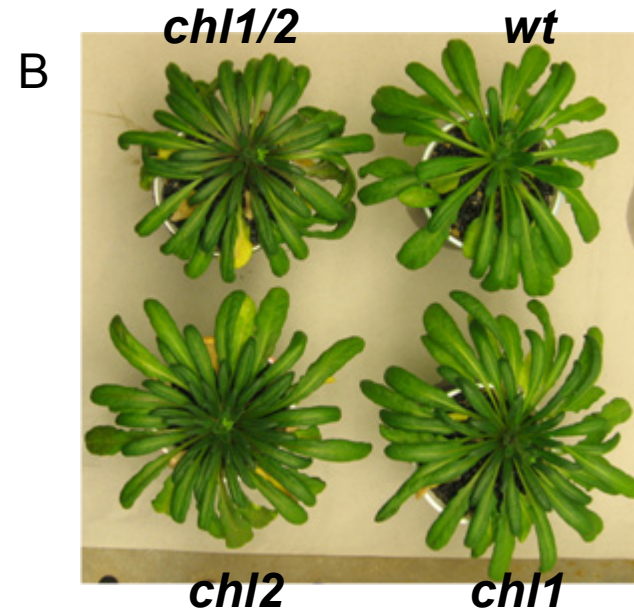
**a/b/c** Grupos Homogéneos (LSD  $\alpha=0,05$ )



Figura 3.7 – Líneas mutantes de *Arabidopsis* para las clorofilasas creciendo a *día corto* y baja irradiancia.

(A) y (B) Imágenes de plantas de *Arabidopsis* creciendo a día corto (fotoperíodo no-inductivo), cultivadas en cámaras de cultivo a  $70\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 83 días. (A) Bandeja con varias plantas. (B) Plantas separadas individualmente para denotar el fenotipo de la roseta.

Figura 3.7



Plantas creciendo a baja irradiancia  
Plantas de 83 días, cultivadas a  $70\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

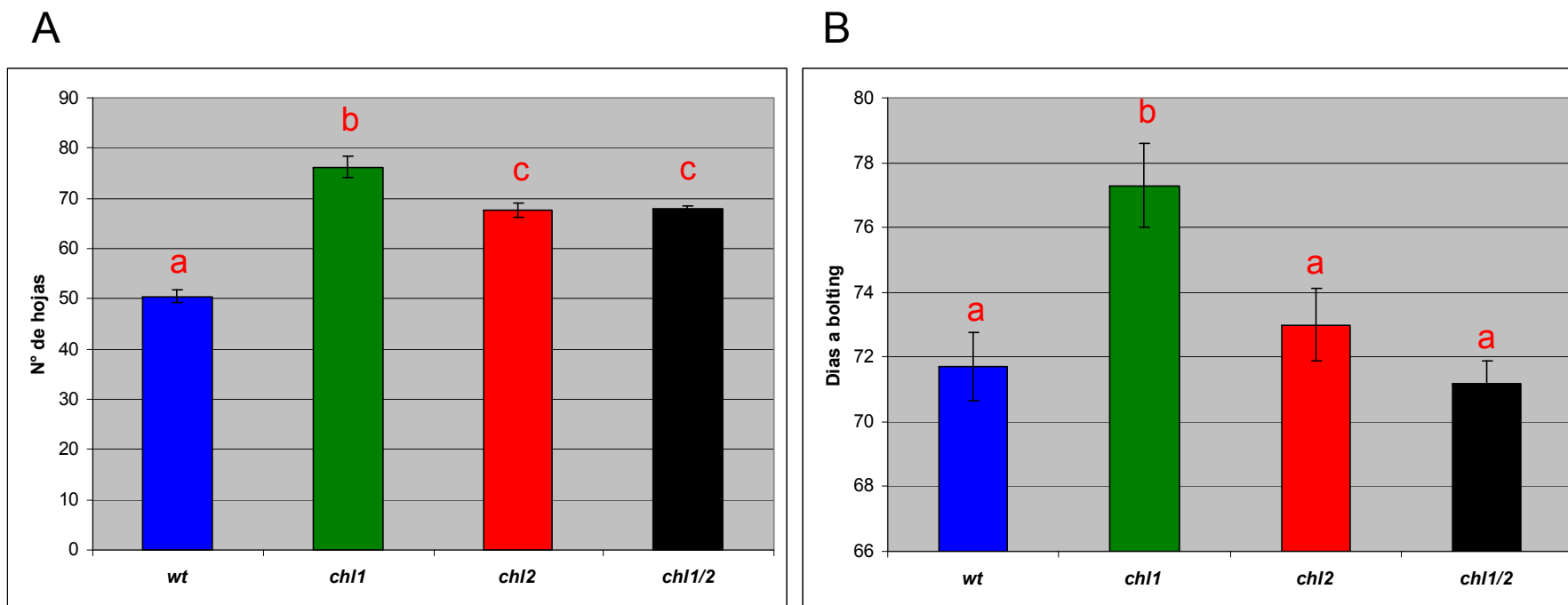
Figura 3.8 – Tiempo de floración y número de hojas de las líneas mutantes de *Arabidopsis* a baja irradiancia.

Número de hojas (A) y Tiempo de floración (B) (inicio de *bolting*) de las líneas mutantes y silvestre de *Arabidopsis* creciendo a baja ( $70\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) irradiancia. Las plantas fueron cultivadas en cámaras de cultivo a día corto (fotoperíodo no-inductivo).

Las barras de error indican el *error estándar*.

Se indica sobre las barras con letras a/b/c, los grupos homogéneos *LSD*  $\alpha=0,05$ .

Figura 3.8



Plantas creciendo a baja irradiancia  
Plantas cultivadas a  $70\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (día corto)

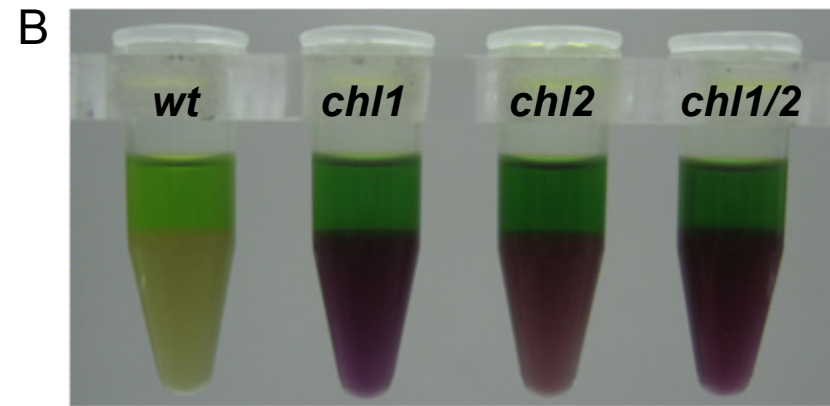
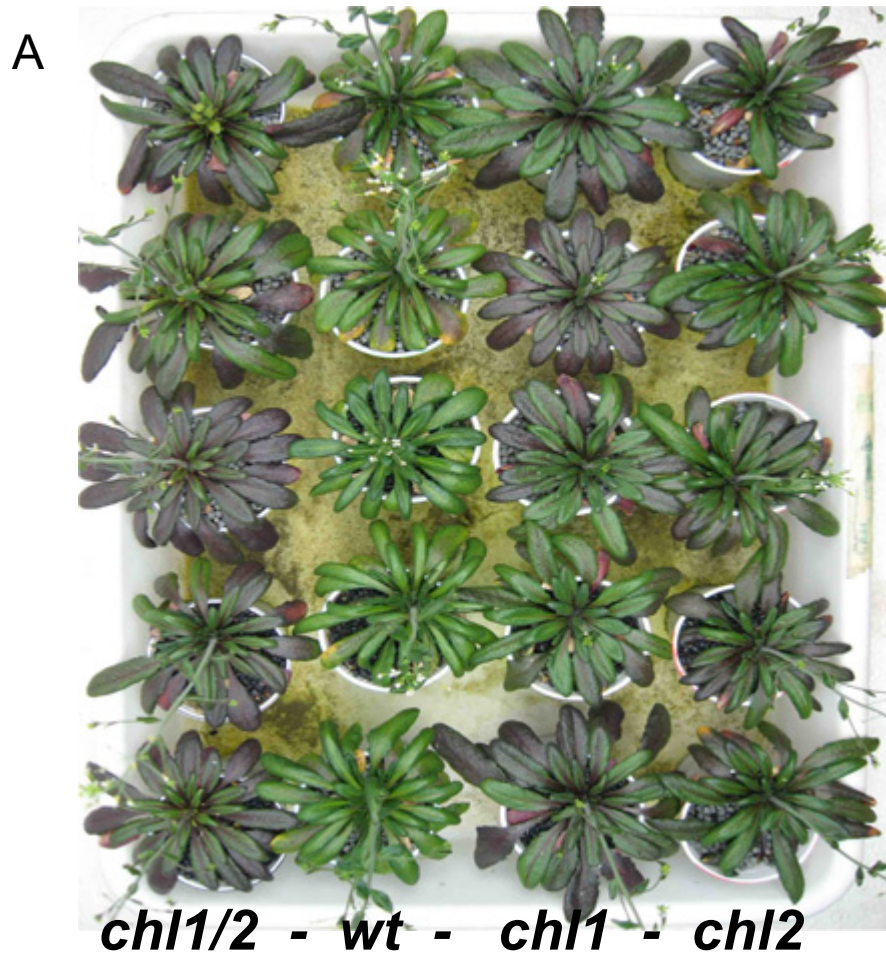
a/b/c Grupos Homogeneos (LSD  $\alpha=0,05$ )

Figura 3.9 – Líneas mutantes de *Arabidopsis* para las clorofilas creciendo a *día corto* y alta irradiancia.

(A) Imagen de plantas de *Arabidopsis* creciendo a día corto (fotoperíodo no-inductivo), cultivadas en cámaras de cultivo a  $250\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 52 días.

(B) Tubos *Eppendorf*® mostrando cualitativamente los diferentes contenidos de antocianinas (fase acuosa inferior) entre las líneas mutantes y la silvestre de *Arabidopsis*. El extracto de los pigmentos fue realizado con acetona bufereada, y luego se agrega un volumen de *n*-hexano que extrae las clorofilas (fase orgánica superior), permaneciendo las antocianinas solubles en la fase (acuosa) acetónica.

Figura 3.9



Plantas creciendo a alta irradiancia

Plantas de 52 días, cultivadas a  $250\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Día corto)

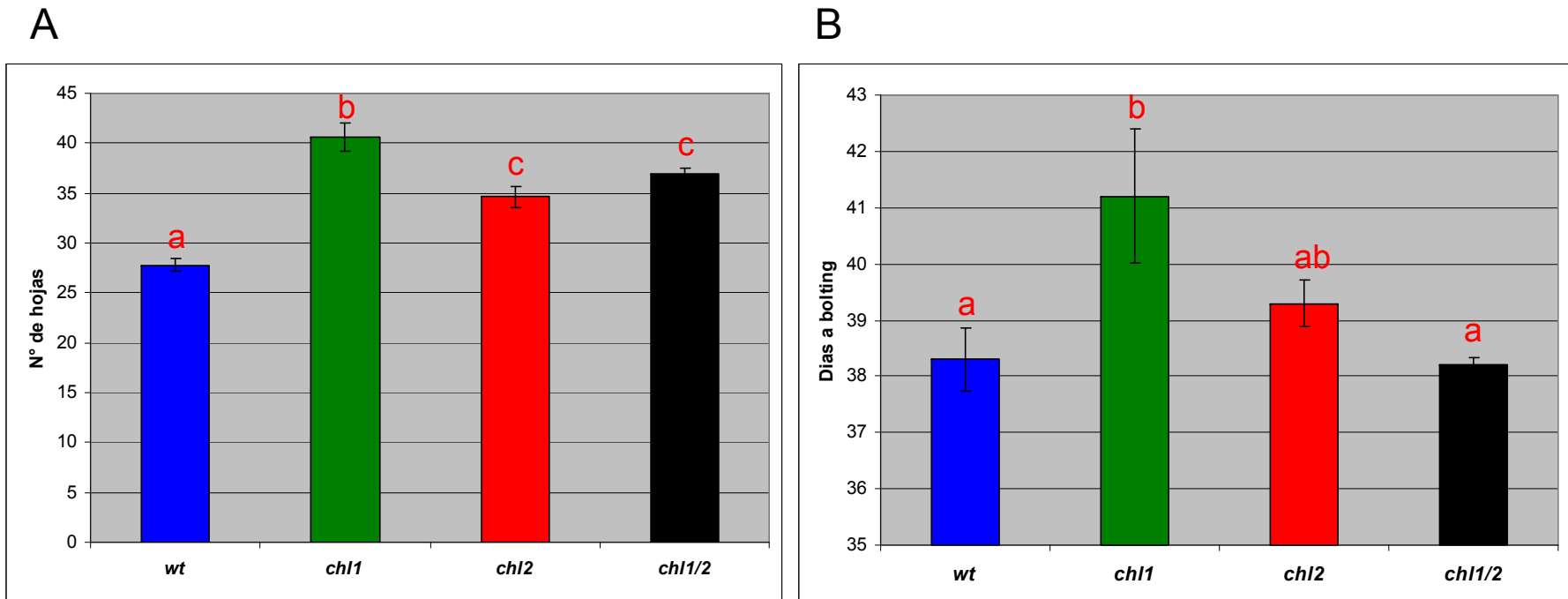
Figura 3.10 – Tiempo a floración y número de hojas de las líneas mutantes de *Arabidopsis* a alta irradiancia.

Número de hojas (A) y Tiempo de floración (B) (inicio de *bolting*) de las líneas mutantes y silvestre de *Arabidopsis* creciendo a alta ( $250\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) irradiancia. Las plantas fueron cultivadas en cámaras de cultivo a día corto (fotoperíodo no-inductivo).

Las barras de error indican el *error estándar*.

Se indica sobre las barras con letras a/b/c/d, los grupos homogéneos *LSD*  $\alpha=0,05$ .

Figura 3.10



Plantas creciendo a alta irradiancia

Plantas cultivadas a  $250\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Día corto)

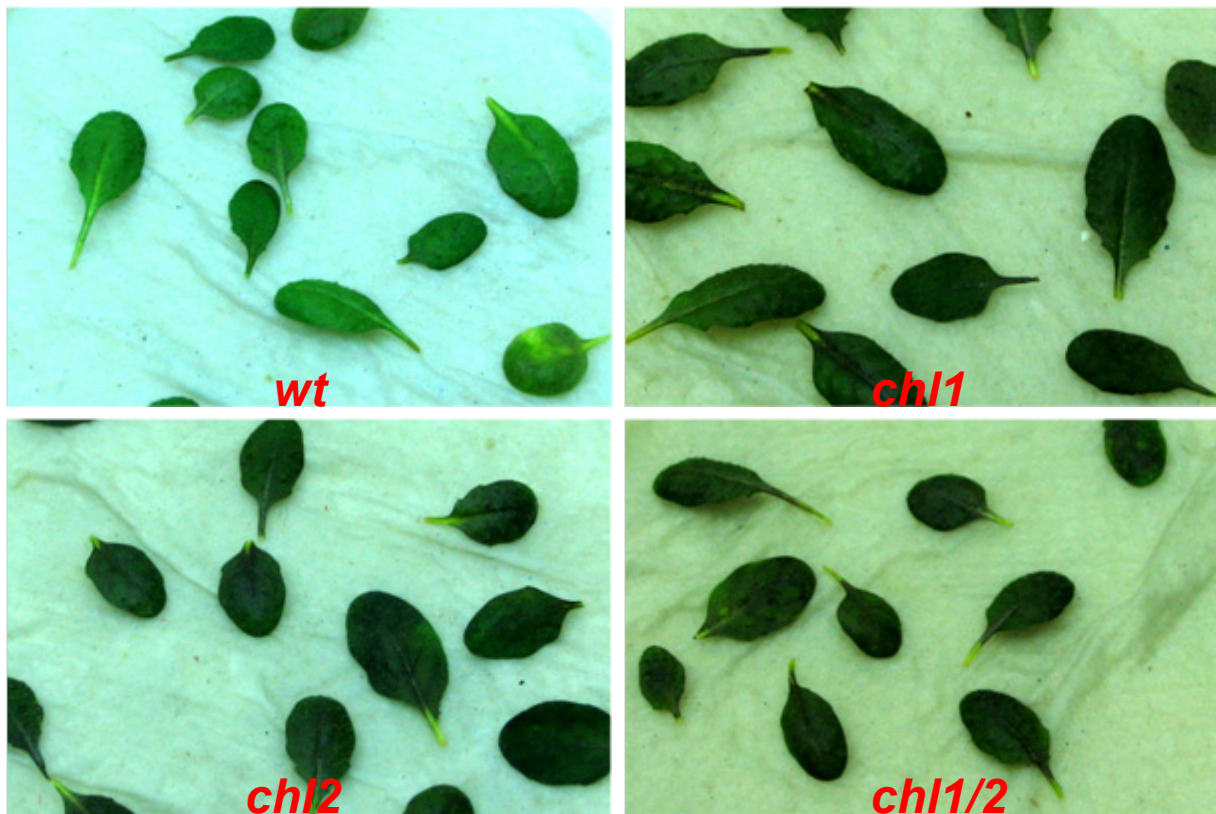
**a/b/c** Grupos Homogeneos (LSD  $\alpha=0,05$ )



Figura 3.11 – Hojas de *Arabidopsis* cortadas y colocadas a la luz.

Imagen de hojas cortadas de plantas de *Arabidopsis* y luego colocadas en cápsulas de Petri a la luz. Las plantas fueron cultivadas en cámaras de cultivo a  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 34 días creciendo a día corto (fotoperíodo no-inductivo). Luego las hojas fueron cortadas y colocadas a la misma irradiancia durante 7 días.

Figura 3.11



Hojas cortadas y puestas a la luz

Hojas de plantas de 34 días, cultivadas a  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Día corto), Colocadas a la luz durante 7 días luego de la escisión.

Todas las líneas presentaron  $F_v/F_m \sim 0,85$  al momento de la imagen

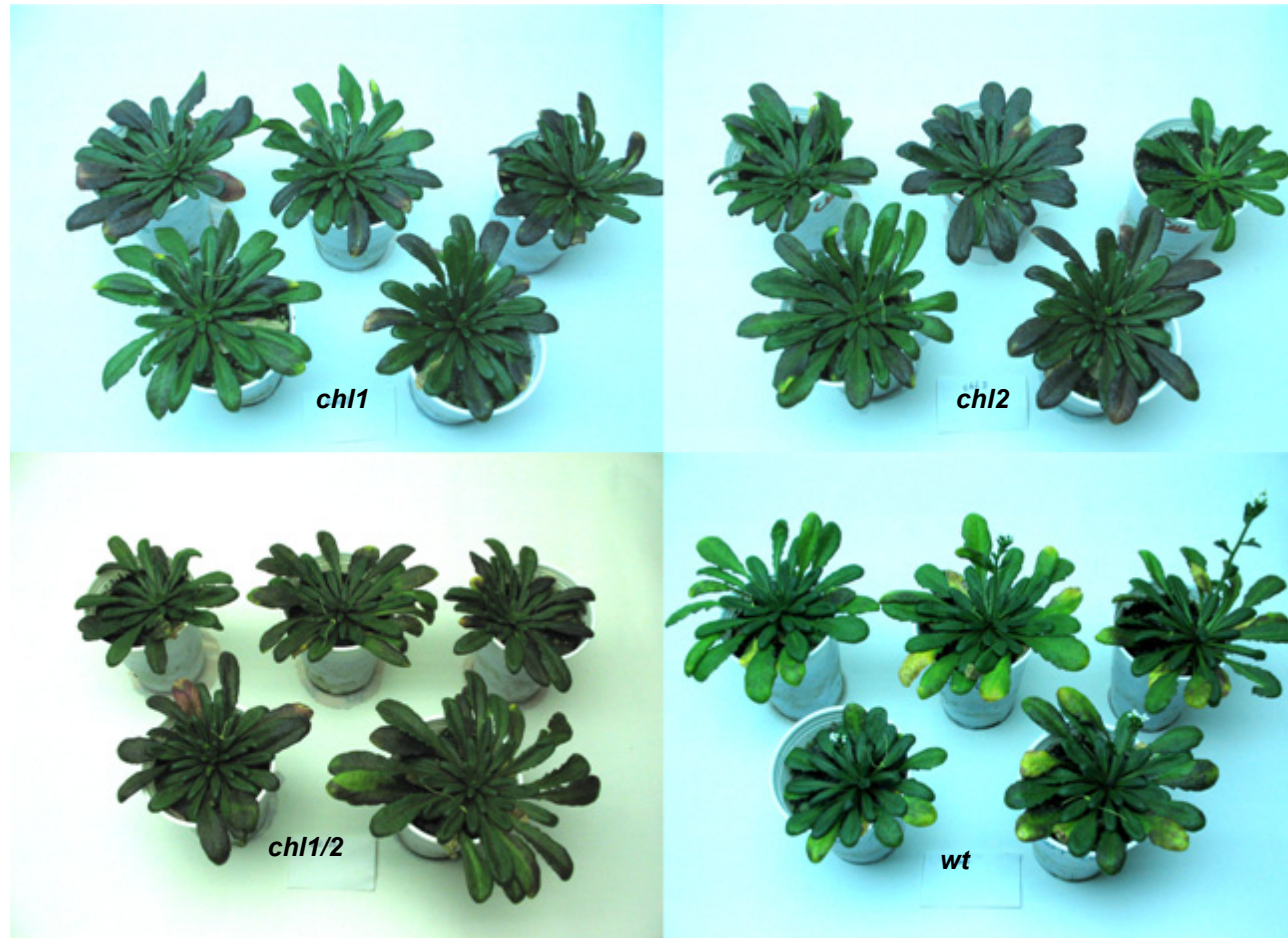
Figura 3.12 – Líneas mutantes de *Arabidopsis* para las clorofilasas cultivadas con diferentes niveles de fertilización en la maceta.

Imagen de plantas de *Arabidopsis* sin (A) y con (B) aplicación de 500mg del fertilizante granulado *Nitrophoska*® 15-15-6-4 por maceta. Las plantas fueron cultivadas a día corto (fotoperíodo no-inductivo) en cámaras de cultivo a  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 50 días en macetas de 170ml.

Figura 3.12

Plantas a día corto

A



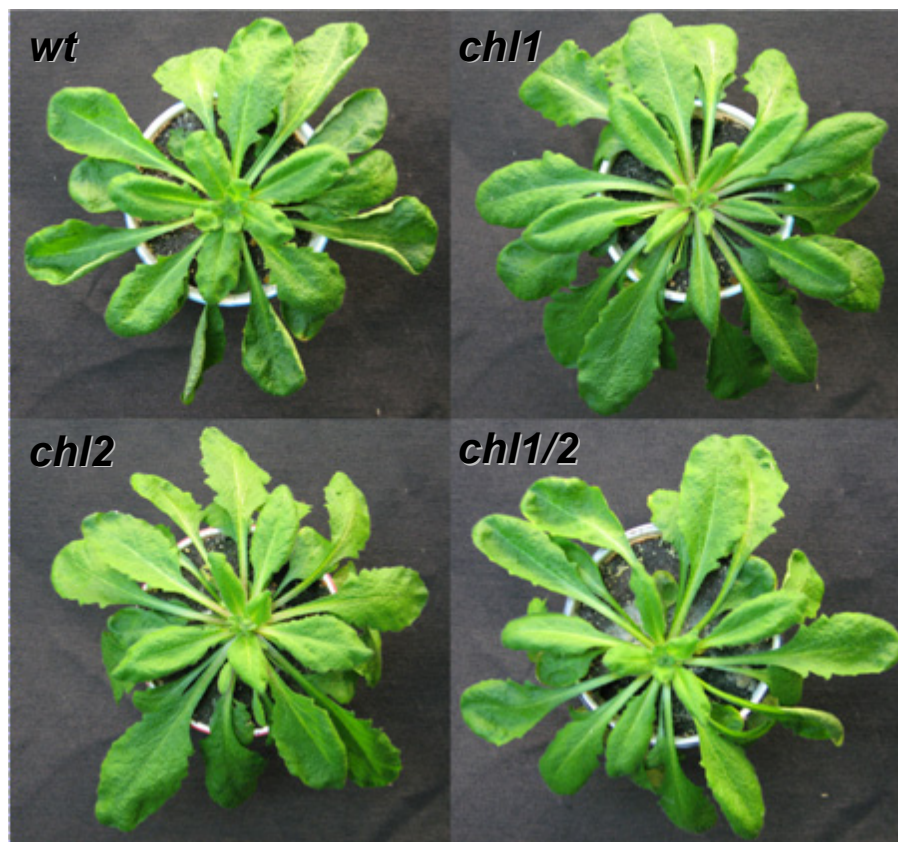
Plantas creciendo a irradiancia media y SIN fertilización

Plantas de 52 días, cultivadas a  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Día corto)

Figura 3.12

B

Plantas a día corto



Plantas creciendo a irradiancia media y CON alta fertilización

~500 mg *Nitrophoska* [15-15-6-4] por vaso de 170ml (mezcla 1:1, tierra negra:perlita)  
Adición equivalente a 192ppm P y 441ppm N

Plantas de 50 días, cultivadas a  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Día corto)

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

### **Mutaciones KO por inserción de T-DNA**

Un punto importante en el análisis funcional de genes mediante el empleo de mutaciones *Knock-Out*, es el empleo de organismos en los cuales la única mutación sea la del gen de interés, y así poder asignar cualquier diferencia observada respecto del organismo control a dichos genes.

Como ya hemos mencionado, las mutaciones por inserción de T-DNA mediante el empleo de *Agrobacterium* causan generalmente más de una inserción en el genoma de la planta (v.g. [Lee, L.-Y. & Gelvin 2008](#); [Yan & Rommens 2007](#)), por lo cual no resultó extraño encontrar más de un inserto de T-DNA en las semillas solicitadas al ABRC.

Para que las inserciones de T-DNA logren anular la función de un gen, estas deben localizarse *a priori* en regiones internas del gen o en sectores donde se encuentran los dominios regulatorios, los cuales generalmente se ubican en posiciones *upstream* de la secuencia génica. En nuestro caso, la inserción del 2° inserto hallado en la línea SAIL, y que no pudo ser “removida” para el estudio de las clorofilasas, se localizó en una región intergénica, aunque posicionada *upstream* del gen *At1g79150*. Ciertamente confirmar la “normal” funcionalidad de este segundo posible gen afectado, requeriría un análisis en profundidad sobre la expresión de este gen en distintos órganos y bajo distintas condiciones de desarrollo, lo cual se torna demasiado complejo, motivo por el cual normalmente se intenta localizar líneas carentes de inserciones de T-DNA “indeseables”.

La no-segregación de los genes *At5g43860* y *At1g79150* plantea la hipótesis de que haya ocurrido una translocación cromosómica recíproca causando un “ligamiento” entre ambos genes. Si bien los re-arreglos cromosómicos han sido reportados como un hecho frecuente en mutaciones por inserciones múltiples de T-DNA en *Arabidopsis* ([Clark & Krysan 2010](#); [Curtis et al. 2009](#)), también se ha reportado en esos casos varios tipos de anomalías en el desarrollo de las plantas (v.g. polen anormal, esterilidad), las cuales en nuestro caso no han sido observadas.

Todo el resto de las inserciones “extras” encontradas en las líneas SALK y SAIL pudieron ser “removidas” exitosamente.

Finalmente se decidió continuar el estudio funcional del gen *At5g43860* (*chl2*), puesto que si bien el gen *At1g79150* en el cual se encuentra el inserto “extra” (región *upstream*) se corresponde con una proteína de funciones desconocidas y aún no estudiadas, este no presentaría *a priori* relación alguna con el metabolismo de la clorofila. Asimismo, la caracterización de la posible función de este gen excede a este trabajo. Nuevas metodologías emergentes en el estudio de genómica funcional, como por ejemplo TILLING ([McCallum et al. 2000](#)), podrían facilitar a futuro el estudio funcional de las clorofilasas, evitando algunos de los problemas relacionados a mutaciones por inserción de T-DNA. Al momento, no hay disponibles públicamente mutaciones inducidas en los genes correspondientes a las clorofilasas ([tilling.fhcrc.org/search.html](http://tilling.fhcrc.org/search.html)).

### **Fenotipo a día largo**

Los estudios clásicos empleando *Arabidopsis* como planta modelo generalmente utilizan condiciones de fotoperíodo inductivo (*i.e.* día largo). En estas condiciones de cultivo, no hemos podido observar ninguna característica distintiva entre las líneas mutantes y la línea silvestre, y en particular en aspectos relacionados con el desarrollo y senescencia de la planta, como tampoco en el amarillamiento de las hojas.

Ha sido reportado previamente ([Schenk et al. 2007](#)) que estas líneas mutantes para las clorofilasas no mostraron ningún fenotipo evidente durante el desarrollo de la planta cultivada a día largo, en concordancia con nuestras observaciones.

### **Fenotipo a día corto**

Es bien sabido que las condiciones de crecimiento influyen notablemente el desarrollo de una planta. En muchas especies monocárpicas, como *Arabidopsis*, bajo un fotoperíodo inductivo, ocurrirá rápidamente la transición desde la fase

vegetativa a reproductiva, por lo que la planta entera “senescerá” aceleradamente ([Levey & Wingler 2005](#)). Los análisis genómicos han mostrado que las plantas de *Arabidopsis* desarrollándose a día largo expresan un *set* de genes distintos a los que se expresan bajo día corto, por lo que se estima que la regulación de la senescencia es diferente en ambas condiciones ([Breeze et al. 2011](#)). Por tales motivos, se evaluó el desarrollo y senescencia de las líneas mutantes creciendo a día corto.

### ***Acortamiento del hipocotilo***

El hipocotilo es un órgano de gran plasticidad, fuertemente influenciado por diversos factores, entre los cuales se encuentra la luz, la cual ocasiona la inhibición de la elongación del hipocotilo como parte de las respuestas fotomorfogénicas durante el desarrollo de la plántula ([De Grauwe et al. 2007](#)). Si bien se considera que las respuestas fotomorfogénicas en esta etapa del desarrollo están mediadas principalmente por los fitocromos ([Chen & Chory 2011](#); [Han et al. 2007](#)), también participan en la misma muchos otros factores y señales que se entrelazan con el fin de ajustar la respuesta al entorno lumínico en el cual la plántula se encuentra emergiendo ([Chen et al. 2004](#); [Ghassemian et al. 2006](#); [Jiao et al. 2007](#); [Paul & Khurana 2008](#)). Otra de las respuestas fotomorfogénicas que ocurren durante el desarrollo de la plántula es el desarrollo de los cloroplastos, por lo que se observará un aumento de la expresión de muchos genes relacionados con las actividades metabólicas que ocurren en dicha organela, por ejemplo, *RbcS* (subunidad pequeña de RubisCO), *CAB* (*chlorophyll a/b-binding protein*) y genes involucrados en la biosíntesis de porfirinas, entre muchos otros ([Hooper 2006](#)).

Varios de los compuestos intermediarios en la biosíntesis de los compuestos tetrapirrólicos (clorofilas, corrinas, fitocromobilinas, hemo, sirohemo) actúan como mediadores en la señalización entre el cloroplasto y el núcleo, regulando la expresión de diversos genes ([Beck & Grimm 2006](#); [Tanaka, R. et al. 2011](#)). Por ejemplo, la acumulación de Mg-Protoporfirina IX reduce la expresión de diversos genes nucleares asociados con la fotosíntesis ([Strand et al. 2003](#); [Zhang, Z.-W. et al. 2011](#)). Estos mismos compuestos intermediarios también actúan modulando la actividad de



varias de las enzimas de la misma vía, por ejemplo, el hemo es un inhibidor alostérico de la enzima GluTR (Glutamil-tRNA Reductasa) ([Beale 2006](#)). Por otro lado, la inhibición o reducción de la actividad de alguna de las enzimas de la biosíntesis de estos compuestos tetrapirrólicos no siempre conduce a la acumulación del metabolito sustrato de la misma. Por ejemplo, en plantas transgénicas en las cuales se ha reducido la actividad de la Clorofila Sintasa no se ha observado acumulación de clorofilido u otro precursor, pero sin embargo se redujo la formación del Ácido 5-AminoLevulínico ( $\delta$ -ALA, uno de los primeros precursores en la biosíntesis de los compuestos tetrapirrólicos) ([Shalygo et al. 2009](#)). Otra evidencia sobre la participación de las porfirinas en la señalización celular es la observada en las plántulas mutantes *laf6* (*long after far-red*, gen que codifica para una proteína transportadora tipo *ATP-Binding-Cassette* de localización cloroplástica) de *Arabidopsis* que poseen mayor contenido de protoporfirina IX en el citoplasma ([Møller et al. 2001](#)). Estas proteínas transportadoras tipo ABC (*ATP-Binding-Cassette*) pueden trasladar compuestos tetrapirrólicos entre distintos compartimentos subcelulares en las plantas ([Hörtensteiner et al. 1993](#); [Lu et al. 1998](#); [Tommasini et al. 1998](#)). Se observó que los mutantes *laf6* presentan un hipocotilo de mayor longitud al crecer bajo luz roja lejana y de menor longitud al crecer con luz roja comparado con el genotipo silvestre, y no mostrando diferencias al desarrollarse en oscuridad, por lo que se especula que la protoporfirina IX participa en las respuestas fotomorfogénicas del hipocotilo ([Møller et al. 2001](#)).

También como parte de las respuestas de “des-etiolación” de la plántula mediada por fitocromos, varios de los genes correspondientes a las enzimas del metabolismo de la clorofila aumentan su expresión ([Hooper 2006](#); [Jiao et al. 2007](#); [Tanaka, R. et al. 2011](#)). Uno de los factores “corriente abajo” en las respuestas mediadas por fitocromos, HY5, es un factor de transcripción que interactúa con las regiones promotoras de casi todos los genes involucrados en biosíntesis de clorofila *a* y *b*: *CHLH* (subunidad H de la Mg-quelatasa), *GUN4* (proteína de unión a porfirinas, regulatoria de la actividad de Mg-quelatasa), *CHL27* (Mg-protoporfirina IX monometil éster ciclase), *PORC* (isoforma C de la NADPH:Protoporfirido oxidoreductasa luz dependiente), *DVR* (3,8-divinil clorofilido 8-vinil reductasa),

CAO (clorofilido *a* oxigenasa) ([Lee, J. et al. 2007](#)). Incluso también interacciona con la región promotora de la *ATCHL2* ([Lee, J. et al. 2007](#)).

Así mismo la expresión de los genes de las clorofilasas aumenta durante la “des-etilolación” de las plántulas, es decir son inducidos por la luz ([Ghassemian et al. 2006](#)). Utilizando la “herramienta” *Arabidopsis eFP Browser* ([Winter et al. 2007](#)) notamos que ambas clorofilasas aumentan su expresión durante la “des-etiolación”. Así mismo, se ha encontrado recientemente que la expresión de los genes de las clorofilasas siguen un ciclo circadiano, siendo el mismo controlado y modulado en forma diferencial por los criptocromos, fitocromos y fototropinas ([Banaś et al. 2011](#)), y que la fototropina PHOT2, que está involucrada en mecanismos de fotoprotección a alta irradiancia (*e.g.* movimiento de “escape” del cloroplasto) ([Sakai et al. 2001](#)), también induce la expresión de los genes de las clorofilasas ([Banaś et al. 2011](#)).

En conclusión, en base a los resultados expuestos en los que se observa claramente que las plántulas de las líneas mutantes de las clorofilasas muestran hipersensibilidad a la luz respecto de la elongación del hipocotilo, es factible que al anular la función de las clorofilasas se vea alterado el normal metabolismo biosintético de la clorofila, ocasionando algunas de las características fenotípicas también observadas para otras mutaciones relacionadas con el metabolismo de los compuestos tetrapirrólicos.

En la vía biosintética de clorofila *b* a partir de clorofila *a*, la clorofilasa sería la primera enzima involucrada, y luego sobre el clorofilido *a* formado, la enzima CAO (clorofilido *a* oxigenasa) oxidaría el grupo metilo de la posición 7 del anillo de clorina ([Espineda et al. 1999](#); [Tanaka, A. et al. 1998](#)). La conversión de clorofila *b* a clorofila *a* (a través de otras enzimas) completarían el denominado “Ciclo de la Clorofila”, a través del cual se regula principalmente el balance entre clorofila *a/b* ([Rüdiger 2002](#); [Tanaka, R. et al. 2011](#)). Asimismo, a través de este ciclo se regula la homeostasis (*i.e.*, síntesis y degradación) de los complejos LHC ([Reinbothe et al. 2006](#); [Tanaka, R. & Tanaka 2011](#)). Consiguientemente, es posible que las clorofilasas participen en el “Ciclo de la Clorofila”, el cual adquiriría notoriedad en esta etapa temprana del desarrollo.

Aunque, asumiendo la nueva hipótesis postulada por [Tanaka, R. & Tanaka \(2011\)](#) de que la CAO pueda actuar *in vivo* directamente sobre la clorofila *a*,

contrariamente a lo observado *in vitro*, se ha propuesto un camino alternativo en el cual la clorofilasa podría ser “salteada” en la síntesis de clorofila *b*. Este último postulado sería concordante con el hecho de que los dobles mutantes *chl1/2* no son deficientes en clorofila *b*, al menos en etapas avanzadas del desarrollo ([ver Capítulo 4](#)).

A su vez, esta característica fenotípica de los mutantes de las clorofilasas no es observada a día largo, debido a que en estas condiciones la inhibición de la elongación del hipocotilo sea probablemente dominada por otros factores preferentemente controlados por el fotoperíodo (ciclo circadiano) ([Niwa et al. 2009](#); [Nozue et al. 2007](#)), imposibilitando observar las mismas diferencias que a día corto.

### ***Desarrollo de la roseta***

Un criterio habitualmente empleado en estudios del desarrollo foliar, y en especial en aquellos relacionados con la senescencia ([Breeze et al. 2011](#); [Zentgraf et al. 2004](#)) es la identificación y seguimiento de una determinada hoja en una cierta posición de la planta, de manera de poder comparar la respuesta o comportamiento de la misma en diferentes condiciones (v.g. longevidad foliar), evitando así discrepancias debidas a las distintas edades foliares, y simplificando el comportamiento de la planta entera a una porción de la misma. Para cumplir con esos requisitos, la hoja elegida debe mantener su correlatividad en relación a la planta entera, por lo que diferencias en el número total de hojas modificarían, por ejemplo, las longevidades de cada hoja en referencia a la longevidad de la planta entera. En conclusión, el mayor número de hojas observado en las líneas mutantes de las clorofilasas debe ser tenido en cuenta en estudios referidos al desarrollo y senescencia foliar. Presumiblemente, la mayor producción de hojas observadas en las líneas mutantes se deba a alteraciones en el balance del metabolismo nitrogenado y carbonado, relacionados con alteradas actividades cloroplásticas ([Sahrawy et al. 2004](#)), ocasionando una reducción en el filocrono ([Bertero 2001](#); [Birch et al. 1998](#)), aunque esta hipótesis requerirá mayores análisis.

El tiempo a floración (*bolting*), indicando la transición entre el desarrollo vegetativo a reproductivo, suele ser considerado como un parámetro indicativo de la longevidad de la planta entera, fundamentalmente en *Arabidopsis*, donde una vez que ha ocurrido esta transición, la planta deja de producir hojas y en breve “senesce” y muere. De este modo, en especies monocárpicas como *Arabidopsis*, la senescencia de la planta entera estará afectada por la duración de la fase vegetativa, por lo que una planta de *floración demorada* “senescerá” tardíamente en relación a una de *floración acelerada*. Por lo tanto, desde este punto de vista, la línea mutante *chl1* posee senescencia (de la planta entera) demorada, puesto que florece tardíamente. Cabe mencionar que diversas situaciones de estrés anticipan la floración (transición a la fase reproductiva) ([Martínez et al. 2004](#); [Wada & Takeno 2010](#)), aunque este no parece ser el caso, ya que aquí el tiempo a floración en las líneas mutantes es igual o mayor al genotipo silvestre. Al comparar las distintas irradiancias de crecimiento, tanto el tiempo a floración y el número total de hojas se reducen cuando la irradiancia es mayor.

La relación entre la fecha de floración y el “estado” nutricional en diferentes ecotipos de *Arabidopsis* es muy diversa y hasta contradictoria, tal vez debido a la múltiple diversidad de combinaciones entre formas de cultivo (hidroponía o macetas con diversos sustratos, fotoperíodos, irradiancia, temperatura) y modificaciones en el “estado” nutricional (restricciones severas o moderadas de fertilizante, o agregado de fertilizante), por lo que se dificulta definir cuándo ocurre una situación de estrés y cuándo no ([Kolář & Seňková 2008](#); [Luquez et al. 2006](#); [Pigliucci & Schlichting 1995](#); [Pigliucci et al. 1995](#); [Zhang, J. & Lechowicz 1994](#)). En el caso de las líneas mutantes para las clorofilasas, si existiera una posible deficiencia en la degradación de fotocomplejos clorofila-proteína ([ver Capítulo 4, “Geles Verdes” de Deriphat®-PAGE](#)), esto causaría un menor contenido de nitrógeno intracelular disponible para ser trasladado a otros órganos en la última etapa del desarrollo. Este efecto podría ser equivalente a una situación de cultivo con disminución moderada de la disponibilidad de nitrógeno, condición en la cual se observa una demora en la fecha de floración o extensión de la duración de la fase vegetativa ([Pigliucci & Schlichting 1995](#); [Pigliucci et al. 1995](#); [Zhang, J. & Lechowicz 1994](#)).

En *Arabidopsis*, el tiempo a floración y el número total de hojas están claramente relacionados con variaciones en las condiciones ambientales (temperatura-fotoperíodo) de crecimiento ([Lempe et al. 2005](#); [Méndez-Vigo et al. 2010](#)). Por ejemplo, aumentando la longitud del día, el tiempo a floración y el número total de hojas disminuirán. En nuestro caso, la demora en el tiempo a floración y el aumento en el número total de hojas observado a día corto en las líneas mutantes de las clorofilasas, no fueron manifestadas a día largo tal vez debido a que los factores que estimulan la floración en estas condiciones no se ven afectados por el efecto pleiotrópico de la mutación *KO* en los genes de las clorofilasas.

### ***Producción de antocianinas***

La tonalidad rojiza en las hojas debidas principalmente a la acumulación de antocianinas, es una característica notoriamente visible durante la senescencia foliar, y en particular en especies plurianuales caducifolias ([Matile 2000](#); [Ougham et al. 2008](#)). Asimismo, la acumulación de antocianinas en las hojas puede deberse a múltiples factores de estrés, entre los que destacamos la alta irradiancia y la deficiencia de nutrientes (v.g. nitrógeno) ([Peng et al. 2008](#)). Se considera que la formación y acumulación de antocianinas en las hojas adquiere la función de “filtro solar” disminuyendo así la irradiancia transmitida a través de la superficie de la hoja o que alcanza a las hojas basales. En hojas senescentes, donde la movilización de nutrientes hacia otros órganos se incrementa, la acumulación de antocianinas permitiría minimizar el potencial daño foto-oxidativo ([Hoch et al. 2003](#); [Steyn et al. 2002](#)). Así mismo, se ha observado que en hojas “pre-senescentes” el contenido de azúcares se ve incrementado ([Pourtau et al. 2006](#); [van Doorn 2008](#)), lo que también estimularía la biosíntesis de antocianinas ([Cottage et al. 2010](#); [Solfanelli et al. 2006](#); [Teng et al. 2005](#)), en conjunto con otros eventos que ocurren durante la senescencia foliar.

La señalización cloroplástica en la inducción de la biosíntesis de antocianinas estaría principalmente mediada por el estado redox de la cadena transportadora de electrones ([Akhtar et al. 2010](#); [Lepistö et al. 2009](#); [Page et al. 2012](#)) y también por

porfirinas integrando señales lumínicas ([Møller et al. 2001](#); [Ruckle & Larkin 2009](#)). Las especies reactivas del oxígeno (v.g.,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{-1}$ ), las cuales son mayoritariamente generadas por el cloroplasto en situaciones de alta irradiancia ([Galvez-Valdivieso & Mullineaux 2010](#); [Ledford & Niyogi 2005](#)), cumplirían un rol minoritario en la inducción de la acumulación de antocianinas ([Lepistö & Rintamäki 2011](#); [Vanderauwera et al. 2005](#)), aunque posiblemente aditivo en la señalización.

El mayor contenido de antocianinas en las líneas mutantes, notoriamente visible a alta irradiancia en etapas avanzadas del desarrollo de la planta, es concordante con la hipótesis de una mayor susceptibilidad al daño foto-oxidativo que podría estar incrementada por alteraciones en el metabolismo de la clorofila, lo cual también ha sido observado con mayor severidad en otras plantas mutantes con deficiencias más notorias en el catabolismo de la clorofila ([Kariola et al. 2005](#); [Mach et al. 2001](#); [Yang et al. 2004](#)). Así mismo, la acumulación de antocianinas en las hojas cortadas y expuestas a la luz es indicativo de la rápida acumulación de azúcares debido a la escisión del órgano, que ha sido reportada como inductora de la expresión de diversos genes implicados en la biosíntesis de antocianinas ([Lloyd & Zakhleniuk 2004](#); [Pourtau et al. 2006](#); [Solfanelli et al. 2006](#)). La rápida acumulación de antocianinas en las líneas mutantes de las clorofilasas podría deberse a que las alteraciones en el metabolismo de la clorofila ocasionen una mayor foto-sensibilidad, que actuaría en forma sinérgica con el estímulo proveniente del incremento de azúcares durante la senescencia o al escindir las hojas. Estas posibles hipótesis requerirán análisis más completos en el futuro.

Como hemos mencionado, la producción de antocianinas durante la senescencia foliar es frecuentemente asignada a la necesidad de protección del daño foto-oxidativo en esta etapa de mayor sensibilidad. Durante la senescencia foliar, la degradación de proteínas con el objetivo de movilizar el nitrógeno hacia otros órganos no-senescentes o aún en desarrollo, es una estrategia importante ([Hörtensteiner & Feller 2002](#)). La movilización de nitrógeno foliar durante la senescencia reduce la necesidad de asimilar, fijar y transportar nitrógeno proveniente del suelo, y que en etapas avanzadas del desarrollo de un cultivo puede haber disminuido marcadamente ([Killingbeck 2004](#)). Usualmente las plantas creciendo en condiciones limitantes de nitrógeno muestran una acelerada senescencia secuencial

de sus hojas, es decir, las hojas basales “senescen” rápidamente con el objetivo de suplir la deficiencia de nutrientes de las hojas aún en desarrollo ([Liu, J. et al. 2008](#); [Masclaux-Daubresse et al. 2008](#)). Consecuentemente, en estas condiciones, tanto la movilización del nitrógeno (mayoritariamente contenido en los cloroplastos) hacia otros órganos, como la deficiencia de nitrógeno, promueven una condición de estrés que puede estimular la síntesis y acumulación de antocianinas. En este sentido, análisis genéticos han sugerido que la acumulación de antocianinas no estaría asociada a la senescencia secuencial de las hojas, sino más bien a la senescencia monocárpica de la planta ([Diaz et al. 2006](#)), y que la expresión de genes asociados a la biosíntesis de antocianinas se ve incrementada bajo condiciones de deficiencias de nitrógeno ([Peng et al. 2008](#); [Rubin et al. 2009](#); [Scheible et al. 2004](#)). En concordancia con lo sugerido, las líneas mutantes para las clorofilasas muestran mayor contenido de antocianinas hacia el final de su desarrollo y además floración demorada. En los ensayos a baja irradiancia, se observa también floración demorada, pero no ocurre la acumulación de antocianinas en las líneas mutantes. Es posible que estas condiciones lumínicas no sean suficientes para inducir la biosíntesis de antocianinas, a diferencia de lo observado a mayor irradiancia, donde tal vez deficiencias en la degradación de los fotocomplejos en combinación con una alta irradiancia ocasione suficiente estrés foto-oxidativo como para inducir la acumulación de antocianinas ([Vanderauwera et al. 2005](#)). Por otra parte, la “inhibición” de la acumulación de antocianinas en las plantas con agregado del fertilizante granulado (*Nitrophoska*® 15-15-6-4) sustenta observaciones previas ([Peng et al. 2008](#); [Rubin et al. 2009](#); [Scheible et al. 2004](#)), que muestran que las deficiencias de nitrógeno inducen la biosíntesis de antocianinas.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Akhtar, T.A., Lees, H.A., Lampi, M.A., Enstone, D., Brain, R.A. and Greenberg, B.M. (2010) Photosynthetic redox imbalance influences flavonoid biosynthesis in *Lemna gibba*. *Plant, Cell Environ.*, **33**, 1205-1219.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. and Ecker, J.R. (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- Banaś, A.K., Łabuz, J., Sztatelman, O., Gabryś, H. and Fiedor, L. (2011) Expression of enzymes involved in chlorophyll catabolism in *Arabidopsis* is light-controlled. *Plant Physiol.*, **157**, 1497-1504.
- Beale, S.I. (2006) Biosynthesis of 5-Aminolevulinic Acid. In *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls* (Grimm, B., Porra, R.J., Rüdiger, W. and Scheer, H. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 147-158.
- Beck, C.F. and Grimm, B. (2006) Involvement of Tetrapyrroles in Cellular Regulation. In *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls* (Grimm, B., Porra, R.J., Rüdiger, W. and Scheer, H. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 223-235.
- Benedetti, C.E. and Arruda, P. (2002) Altering the Expression of the Chlorophyllase Gene *ATHCOR1* in Transgenic *Arabidopsis* Caused Changes in the Chlorophyll-to-Chlorophyllide Ratio. *Plant Physiol.*, **128**, 1255-1263.
- Bertero, H.D. (2001) Effects of Photoperiod, Temperature and Radiation on the Rate of Leaf Appearance in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under Field Conditions. *Ann. Bot.*, **87**, 495-502.
- Birch, C.J., Vos, J., Kiniry, J., Bos, H.J. and Elings, A. (1998) Phyllochron responds to acclimation to temperature and irradiance in maize. *Field Crops Res.*, **59**, 187-200.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R. and Görlach, J. (2001) Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell*, **13**, 1499-1510.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y.-s., Penfold, C.A., Jenkins, D., Zhang, C., Morris, K., Jenner, C., Jackson, S., Thomas, B., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J.D., Wild, D.L., Ott, S., Rand, D., Beynon, J., Denby, K., Mead, A. and Buchanan-Wollaston, V. (2011) High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during *Arabidopsis* Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation. *Plant Cell*, **23**, 873-894.



- Clark, K.A. and Krysan, P.J.** (2010) Chromosomal translocations are a common phenomenon in *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion lines. *Plant J.*, **64**, 990-1001.
- Cottage, A., Mott, E.K., Kempster, J.A. and Gray, J.C.** (2010) The *Arabidopsis* plastid-signalling mutant *gun1* (*genomes uncoupled1*) shows altered sensitivity to sucrose and abscisic acid and alterations in early seedling development. *J. Exp. Bot.*, **61**, 3773-3786.
- Curtis, M., Belcram, K., Bollmann, S., Tominey, C., Hoffman, P., Mercier, R. and Hays, J.** (2009) Reciprocal chromosome translocation associated with TDNA-insertion mutation in *Arabidopsis*: genetic and cytological analyses of consequences for gametophyte development and for construction of doubly mutant lines. *Planta*, **229**, 731-745.
- Chen, M. and Chory, J.** (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biol.*, **21**, 664-671.
- Chen, M., Chory, J. and Fankhauser, C.** (2004) Light Signal Transduction in Higher Plants. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 87-117.
- De Grauwe, L., Vandenbussche, F. and Van Der Straeten, D.** (2007) Signal Crosstalk in the Control of Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis*. In *The Expanding Cell* (Verbelen, J.-P. and Vissenberg, K. eds): Springer Berlin / Heidelberg, pp. 271-293.
- Diaz, C., Saliba-Colombani, V., Loudet, O., Belluomo, P., Moreau, L., Daniel-Vedele, F., Morot-Gaudry, J.-F. and Masclaux-Daubresse, C.** (2006) Leaf Yellowing and Anthocyanin Accumulation are Two Genetically Independent Strategies in Response to Nitrogen Limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **47**, 74-83.
- Espineda, C.E., Linford, A.S., Devine, D. and Brusslan, J.A.** (1999) The *AtCAO* gene, encoding chlorophyll *a* oxygenase, is required for chlorophyll *b* synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10507-10511.
- Galvez-Valdivieso, G. and Mullineaux, P.M.** (2010) The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiol. Plant.*, **138**, 430-439.
- Ghassemian, M., Lutes, J., Tepperman, J.M., Chang, H.-S., Zhu, T., Wang, X., Quail, P.H. and Markus Lange, B.** (2006) Integrative analysis of transcript and metabolite profiling data sets to evaluate the regulation of biochemical pathways during photomorphogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **448**, 45-59.
- Han, Y.-J., Song, P.-S. and Kim, J.-I.** (2007) Phytochrome-mediated photomorphogenesis in plants. *J. Plant Biol.*, **50**, 230-240.
- Hoch, W.A., Singaas, E.L. and McCown, B.H.** (2003) Resorption Protection. Anthocyanins Facilitate Nutrient Recovery in Autumn by Shielding Leaves from Potentially Damaging Light Levels. *Plant Physiol.*, **133**, 1296-1305.
- Hooper, J.K.** (2006) Chloroplast Development: Whence and Whither. In *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R.R. and Hooper, J.K. eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 27-51.
- Hörtensteiner, S. and Feller, U.** (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.*, **53**, 927-937.

- Hörtensteiner, S., Vogt, E., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Amrhein, N. and Martinoia, E.** (1993) Direct energization of bile acid transport into plant vacuoles. *J. Biol. Chem.*, **268**, 18446-18449.
- Jiao, Y., Lau, O.S. and Deng, X.-W.** (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 217-230.
- Kariola, T., Brader, G., Li, J. and Palva, E.T.** (2005) Chlorophyllase 1, a Damage Control Enzyme, Affects the Balance between Defense Pathways in Plants. *Plant Cell*, **17**, 282-294.
- Killingbeck, K.T.** (2004) Nutrient Resorption. In *Plant Cell Death Processes* (Noodén, L.D. ed. San Diego: Academic Press, pp. 215-226.
- Kolář, J. and Seňková, J.** (2008) Reduction of mineral nutrient availability accelerates flowering of *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.*, **165**, 1601-1609.
- Kuromori, T., Wada, T., Kamiya, A., Yuguchi, M., Yokouchi, T., Imura, Y., Takabe, H., Sakurai, T., Akiyama, K., Hirayama, T., Okada, K. and Shinozaki, K.** (2006) A trial of phenome analysis using 4000 *Ds*-insertional mutants in gene-coding regions of *Arabidopsis*. *Plant J.*, **47**, 640-651.
- Ledford, H.K. and Niyogi, K.K.** (2005) Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell Environ.*, **28**, 1037-1045.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I. and Deng, X.W.** (2007) Analysis of Transcription Factor HY5 Genomic Binding Sites Revealed Its Hierarchical Role in Light Regulation of Development. *Plant Cell*, **19**, 731-749.
- Lee, L.-Y. and Gelvin, S.B.** (2008) T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiol.*, **146**, 325-332.
- Lempe, J., Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Singh, A., Schmid, M. and Weigel, D.** (2005) Diversity of Flowering Responses in Wild *Arabidopsis thaliana* Strains. *PLoS Genet.*, **1**, e6.
- Lepistö, A., Kangasjärvi, S., Luomala, E.-M., Brader, G., Sipari, N., Keränen, M., Keinänen, M. and Rintamäki, E.** (2009) Chloroplast NADPH-Thioredoxin Reductase Interacts with Photoperiodic Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **149**, 1261-1276.
- Lepistö, A. and Rintamäki, E.** (2011) Coordination of Plastid and Light Signaling Pathways upon Development of *Arabidopsis* Leaves under Various Photoperiods. *Mol. Plant*, **PREVIEW**.
- Levey, S. and Wingler, A.** (2005) Natural variation in the regulation of leaf senescence and relation to other traits in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ.*, **28**, 223-231.
- Liu, J., Wu, Y., Yang, J., Liu, Y. and Shen, F.** (2008) Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. *J. Plant Biol.*, **51**, 11-19.
- Liu, Y.-G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whittier, R.F.** (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.*, **8**, 457-463.
- Liu, Y.-G. and Whittier, R.F.** (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, **25**, 674-681.
- Lu, Y.-P., Li, Z.-S., Drozdowicz, Y.M., Hortensteiner, S., Martinoia, E. and Rea, P.A.** (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP Binding Cassette Transporter

- Able to Transport Glutathione S-Conjugates and Chlorophyll Catabolites: Functional Comparisons with AtMRP1. *Plant Cell*, **10**, 267-282.
- Luquez, V.M., Sasal, Y., Medrano, M., Martín, M.I., Mujica, M. and Guiamét, J.J.** (2006) Quantitative trait loci analysis of leaf and plant longevity in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **57**, 1363-1372.
- Lloyd, J.C. and Zakhleniuk, O.V.** (2004) Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the *Arabidopsis* mutant, *pho3*. *J. Exp. Bot.*, **55**, 1221-1230.
- Mach, J.M., Castillo, A.R., Hoogstraten, R. and Greenberg, J.T.** (2001) The *Arabidopsis*-accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 771-776.
- Martínez, C., Pons, E., Prats, G. and León, J.** (2004) Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J.*, **37**, 209-217.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M. and Orsel, M.** (2008) Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biol.*, **10**, 23-36.
- Mather, K.** (1975) Genotype  $\times$  environment interactions. II. Some Genetical Considerations. *Heredity*, **35**, 31-53.
- Mather, K. and Caligari, P.D.S.** (1974) Genotype  $\times$  environment interactions. I. Regression of Interaction on Overall Effect of the Environment. *Heredity*, **33**, 43-59.
- Matile, P.** (2000) Biochemistry of Indian summer: physiology of autumnal leaf coloration. *Exp. Gerontol.*, **35**, 145-158.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A. and Henikoff, S.** (2000) Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for Plant Functional Genomics. *Plant Physiol.*, **123**, 439-442.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. and Koornneef, M.** (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, **282**, 662-682.
- Méndez-Vigo, B., de Andrés, M.T., Ramiro, M., Martínez-Zapater, J.M. and Alonso-Blanco, C.** (2010) Temporal analysis of natural variation for the rate of leaf production and its relationship with flowering initiation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **61**, 1611-1623.
- Møller, S.G., Kunkel, T. and Chua, N.-H.** (2001) A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes Dev.*, **15**, 90-103.
- Niwa, Y., Yamashino, T. and Mizuno, T.** (2009) The Circadian Clock Regulates the Photoperiodic Response of Hypocotyl Elongation through a Coincidence Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 838-854.
- Nozue, K., Covington, M.F., Duek, P.D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S.L. and Maloof, J.N.** (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature*, **448**, 358-361.
- Ougham, H., Thomas, H. and Archetti, M.** (2008) The adaptive value of leaf colour. *New Phytol.*, **179**, 9-13.
- Page, M., Sultana, N., Paszkiewicz, K., Florance, H. and Smirnoff, N.** (2012) The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant, Cell Environ.*, **35**, 388-404.

- Paul, L.K. and Khurana, J.P.** (2008) Phytochrome-mediated light signaling in plants: emerging trends. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **14**, 9-22.
- Peng, M., Hudson, D., Schofield, A., Tsao, R., Yang, R., Gu, H., Bi, Y.-M. and Rothstein, S.J.** (2008) Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the *NLA* gene. *J. Exp. Bot.*, **59**, 2933-2944.
- Pigliucci, M. and Schlichting, C.D.** (1995) Reaction Norms of *Arabidopsis* (Brassicaceae). III. Response to Nutrients in 26 Populations from a Worldwide Collection. *Am. J. Bot.*, **82**, 1117-1125.
- Pigliucci, M., Whitton, J. and Schlichting, C.D.** (1995) Reaction norms of *Arabidopsis*. I. Plasticity of characters and correlations across water, nutrient and light gradients. *J. Evol. Biol.*, **8**, 421-438.
- Pourtau, N., Jennings, R., Pelzer, E., Pallas, J. and Wingler, A.** (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta*, **224**, 556-568.
- Reinbothe, C., Bartsch, S., Eggink, L.L., Hooper, J.K., Brusslan, J., Andrade-Paz, R., Monnet, J. and Reinbothe, S.** (2006) A role for chlorophyllide a oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4777-4782.
- Rogers, S.O. and Bendich, A.J.** (1988) Extraction of DNA from plant tissues. In *Plant Molecular Biology Manual* (Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. and Verma, D.P.S. eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-10.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. and Weisshaar, B.** (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.*, **53**, 247-259.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K. and Scheible, W.-R.** (2009) Members of the LBD Family of Transcription Factors Repress Anthocyanin Synthesis and Affect Additional Nitrogen Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**, 3567-3584.
- Ruckle, M.E. and Larkin, R.M.** (2009) Plastid signals that affect photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana* are dependent on GENOMES UNCOUPLED 1 and cryptochrome 1. *New Phytol.*, **182**, 367-379.
- Rüdiger, W.** (2002) Biosynthesis of chlorophyll *b* and the chlorophyll cycle. *Photosynth. Res.*, **74**, 187-193.
- Sahrawy, M., Ávila, C., Chueca, A., Cánovas, F.M. and López-Gorgé, J.** (2004) Increased sucrose level and altered nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants expressing antisense chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Exp. Bot.*, **55**, 2495-2503.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M. and Okada, K.** (2001) *Arabidopsis* *nph1* and *npl1*: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6969-6974.
- Scheible, W.-R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K. and Stitt, M.** (2004) Genome-Wide Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism, Protein Synthesis, Cellular Growth Processes, and the Regulatory Infrastructure of *Arabidopsis* in Response to Nitrogen. *Plant Physiol.*, **136**, 2483-2499.

- Schenk, N., Schelbert, S., Kanwischer, M., Goldschmidt, E.E., Dörmann, P. and Hörtensteiner, S.** (2007) The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **581**, 5517-5525.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M. and Goff, S.A.** (2002) A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell*, **14**, 2985-2994.
- Shalygo, N., Czarnecki, O., Peter, E. and Grimm, B.** (2009) Expression of chlorophyll synthase is also involved in feedback-control of chlorophyll biosynthesis. *Plant Mol. Biol.*, **71**, 425-436.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A. and Perata, P.** (2006) Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **140**, 637-646.
- Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M. and Jacobs, G.** (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol.*, **155**, 349-361.
- Strand, Å., Asami, T., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Chory, J.** (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature*, **421**, 79-83.
- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N.K., Yoshida, K. and Okada, K.** (1998) Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12719-12723.
- Tanaka, R., Kobayashi, K. and Masuda, T.** (2011) Tetrapyrrole Metabolism in Arabidopsis thaliana. *Arabidopsis Book*, **9**, e0145.
- Tanaka, R. and Tanaka, A.** (2011) Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **1807**, 968-976.
- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M. and Smeekens, S.C.M.** (2005) Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Requires the MYB75/PAP1 Gene. *Plant Physiol.*, **139**, 1840-1852.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, **408**, 796-815.
- Thomas, H. and Howarth, C.J.** (2000) Five ways to stay green. *J. Exp. Bot.*, **51**, 329-337.
- Thomas, H. and Smart, C.M.** (1993) Crops that stay green. *Ann. Appl. Biol.*, **123**, 193-219.
- Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hortensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N. and Martinoia, E.** (1998) An ABC transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.*, **13**, 773-780.
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T. and Takamiya, K.-i.** (1999) Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 15362-15367.

- Ülker, B., Peiter, E., Dixon, D.P., Moffat, C., Capper, R., Bouché, N., Edwards, R., Sanders, D., Knight, H. and Knight, M.R.** (2008) Getting the most out of publicly available T-DNA insertion lines. *Plant J.*, **56**, 665-677.
- van Doorn, W.G.** (2008) Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? *J. Exp. Bot.*, **59**, 1963-1972.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inzé, D. and Van Breusegem, F.** (2005) Genome-Wide Analysis of Hydrogen Peroxide-Regulated Gene Expression in *Arabidopsis* Reveals a High Light-Induced Transcriptional Cluster Involved in Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Physiol.*, **139**, 806-821.
- Wada, K.C. and Takeno, K.** (2010) Stress-induced flowering. *Plant Signal. Behav.*, **5**, 944-947.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. and Provart, N.J.** (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE*, **2**, e718.
- Woody, S., Austin-Phillips, S., Amasino, R. and Krysan, P.** (2007) The *WiscDsLox* T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *J. Plant Res.*, **120**, 157-165.
- Yan, H. and Rommens, C.M.** (2007) Transposition-Based Plant Transformation. *Plant Physiol.*, **143**, 570-578.
- Yang, M., Wardzala, E., Johal, G. and Gray, J.** (2004) The Wound-Inducible *Lls1* Gene from Maize is an Orthologue of the *Arabidopsis Acd1* Gene, and the LLS1 Protein is Present in Non-Photosynthetic Tissues. *Plant Mol. Biol.*, **54**, 175-191.
- Zentgraf, U., Jobst, J., Kolb, D. and Rentsch, D.** (2004) Senescence-Related Gene Expression Profiles of Rosette Leaves of *Arabidopsis thaliana*: Leaf Age Versus Plant Age. *Plant Biol.*, **6**, 178-183.
- Zhang, J. and Lechowicz, M.J.** (1994) Correlation Between Time of Flowering and Phenotypic Plasticity in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.*, **81**, 1336-1342.
- Zhang, Z.-W., Yuan, S., Feng, H., Xu, F., Cheng, J., Shang, J., Zhang, D.-W. and Lin, H.-H.** (2011) Transient accumulation of Mg-protoporphyrin IX regulates expression of PhANGs – New evidence for the signaling role of tetrapyrroles in mature *Arabidopsis* plants. *J. Plant Physiol.*, **168**, 714-721.

## ***CAPÍTULO 4***

—

### **ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS CLOROFILASAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA***

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>CAPÍTULO 4 — ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS CLOROFILASAS DE ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	232
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	233
ÍNDICE DE FIGURAS.....	235
RESUMEN.....	236
INTRODUCCIÓN .....	238
MATERIALES Y MÉTODOS .....	242
Determinación de la actividad clorofilásica.....	242
Expresión y purificación de clorofilasa recombinante.....	243
Determinación del contenido de clorofila y clorofilido en hojas de <i>Arabidopsis</i> .....	245
Determinación de clorofila y sus pigmentos derivados en las VAS aisladas de hojas de <i>Arabidopsis</i> .....	246
Determinaciones de fluorescencia modulada de clorofila .....	247
Electroforesis en gel no-desnaturalizante de proteínas tilacoidales de <i>Arabidopsis</i> .....	248
Desarrollo de las enzimas clorofilasas de <i>Arabidopsis</i> fusionadas a proteínas fluorescentes.....	250
Expresión <i>in planta</i> de las clorofilasas fusionadas a proteínas fluorescentes..	252
Observaciones a través de microscopía confocal de los mutantes de <i>Arabidopsis</i> .....	255
RESULTADOS.....	258
Ensayos de actividad clorofilasa .....	258
Degradación de clorofila durante la senescencia .....	258
Rendimiento cuántico potencial del Fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) .....	260
“Geles Verdes” de <i>Deriphat</i> ®-PAGE.....	261
Fluorescencia modulada de la clorofila .....	261
Cromatogramas HPLC de <i>Arabidopsis</i> .....	262
Cromatogramas HPLC de las VAS de <i>Arabidopsis</i> .....	263



Observaciones por microscopía láser confocal .....	264
FIGURAS.....	267
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	308
Actividad de las clorofilasas en <i>Arabidopsis</i> .....	308
Senescencia foliar en las líneas mutantes para las clorofilasas.....	310
Foto-protección en las líneas mutantes .....	312
Localización de las clorofilasas en <i>Arabidopsis</i> .....	313
BIBLIOGRAFÍA.....	315

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 4.1 – VECTORES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES PARA PLANTAS. ....	267
FIGURA 4.2 – PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE LAS CLOROFILASAS FUSIONADAS A PROTEÍNAS FLUORESCENTES. ....	270
FIGURA 4.3 – ACTIVIDAD CLOROFILASA DE HOJAS CORTADAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> DE LOS CUATRO GENOTIPOS. ....	273
FIGURA 4.4 – ACTIVIDAD CLOROFILASA DE HOJAS CORTADAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> CON INHIBIDORES DE HIDROLASAS. ....	275
FIGURA 4.5 – CONTENIDO DE CLOROFILA Y CLOROFÍLIDO EN <i>ARABIDOPSIS</i> . ....	277
FIGURA 4.6 – SENESCENCIA INDUCIDA POR OSCURIDAD EN TODAS LAS HOJAS DE LA ROSETA. ....	280
FIGURA 4.7 – SENESCENCIA INDUCIDA POR OSCURIDAD EN HOJAS UNIDAS A LA PLANTA. ....	282
FIGURA 4.8 – RENDIMIENTO CUÁNTICO POTENCIAL DEL FOTOSISTEMA II ( $F_v/F_m$ ). ....	284
FIGURA 4.9 – RENDIMIENTO CUÁNTICO POTENCIAL DEL FOTOSISTEMA II ( $F_v/F_m$ ) EN HOJAS TRATADAS CON HORMONAS. ....	286
FIGURA 4.10 – <i>GELES VERDES</i> DE PROTEÍNAS TILACOIDALES DE <i>ARABIDOPSIS</i> . ....	288
FIGURA 4.11 – FLUORESCENCIA MODULADA DE LA CLOROFILA EN <i>ARABIDOPSIS</i> . ....	290
FIGURA 4.12 – CROMATOGRAMAS HPLC DE HOJAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> . ....	292
FIGURA 4.13 – CROMATOGRAMAS HPLC DE LAS VAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> . ....	294
FIGURA 4.14 – IMAGEN EN MICROSCOPIO CONFOCAL DE HOJAS SENESCENTES DE <i>ARABIDOPSIS</i> . ....	296
FIGURA 4.15 – IMAGEN EN MICROSCOPIO CONFOCAL DE LAS PROTEÍNAS CERULEAN E YFP. ....	298
FIGURA 4.16 – IMAGEN EN MICROSCOPIO CONFOCAL DE LA PROTEÍNA ATCHL1::YFP. ....	300
FIGURA 4.17 – IMAGEN EN MICROSCOPIO CONFOCAL DE LA PROTEÍNA ATCHL2::CERULEAN. ....	302
FIGURA 4.18 – IMAGEN EN MICROSCOPIO CONFOCAL DE LA PROTEÍNA ATCHL1::YFP (EXPRESIÓN ESTABLE). ....	304
FIGURA 4.19 – IMAGEN EN MICROSCOPIO CONFOCAL DE LA PROTEÍNA ATCHL1::YFP (EXPRESIÓN ESTABLE). ANÁLISIS DE CO-LOCALIZACIÓN. ....	306

## **RESUMEN**

El primer paso en el proceso catabólico de la clorofila corresponde a la defitilación de la misma, reacción que es catalizada por la clorofilasa. El hallazgo de actividad clorofilásica (*i.e.*, formación de clorofilido) en las VAS de tabaco, nos conduce a evaluar el rol que cumplen las enzimas clorofilasas. En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado dos genes (*ATCLH1* y *ATCLH2*) cuyos productos dan enzimas con actividad clorofilasa. Estas enzimas difieren en varias características, como ser su secuencia de aminoácidos, señales de tránsito y localización, e incluso señales de activaciones hormonales y externas. Se desconoce actualmente el significado de la existencia de estas isoformas de la clorofilasa y sus roles en el proceso de degradación de la clorofila. El estudio de líneas mutantes *KO* para las clorofilasas permitió observar efectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos de la inactivación de las clorofilasas, lo cual denota la importancia y el rol diferencial de dichas enzimas en distintos procesos. Entre las observaciones realizadas destacamos la demora en aproximadamente 14 días de la senescencia foliar en las líneas *KO*, en plantas cultivadas a día corto (10h luz /14h oscuridad), y los menores niveles de clorofilido en las líneas *KO* para las clorofilasas.

La evaluación de la degradación de clorofila en VAS aisladas de las distintas líneas mutantes mostró claramente que aún en ausencia de las enzimas clorofilasas ocurre degradación de clorofila, la cual podría transcurrir en las VAS de *Arabidopsis* a través de otros mecanismos, presumiblemente oxidativos, al no estar presentes las clorofilasas.

Para establecer la localización subcelular de *ATCLH1* y *ATCLH2*, se fusionaron las mismas a proteínas fluorescentes (YFP y Cerulean, respectivamente). Mediante el sistema de expresión transiente en *Nicotiana benthamiana*, se observaron localizaciones diferentes para ambas enzimas, siendo *ATCLH1::YFP* observada mayoritariamente en apoplasto, y *ATCLH2::Cerulean*, con bajos niveles de expresión, distribuida en el citosol. La evaluación de *ATCLH1::YFP* en el sistema de expresión estable en *Nicotiana tabacum* mostró que la misma se localiza, con

bajos niveles de expresión, en los cloroplastos, y en menor medida en la vacuola central.

## INTRODUCCIÓN

*Al presente, nuestro conocimiento es imperfecto, y lo mismo la profecía, cuando llegue el fin desaparecerá eso que es imperfecto.*

I Corintios 13:9-10

La clorofila es uno de los compuestos orgánicos más abundantes de la naturaleza ([Matile et al. 1996](#)) y también unos de los más importantes. De ella dependen, directa o indirectamente, la mayoría de los organismos vivientes en la biósfera puesto que es esencial para la fotosíntesis ([Takamiya et al. 2000](#)). Más de 10<sup>9</sup> toneladas de clorofila se degradan al año mundialmente ([Hendry et al. 1987](#)). La degradación de clorofila, y de las proteínas del aparato fotosintético, ocurre con especial intensidad durante la senescencia, que definimos como la etapa final del desarrollo, el cual es un proceso de cambios fisiológicos cronológicamente ordenados, pero que no ocasionan intrínsecamente, inevitablemente, o irreversiblemente un proceso de deterioro ([Thomas 2003](#)). La degradación de clorofila tiene lugar durante la senescencia de las hojas en el otoño, en la maduración de frutos, el deterioro post-cosecha de vegetales verdes, en respuesta al ataque por patógenos y en etapas iniciales del desarrollo de flores ([Matile et al. 1999](#)). En especies de cultivo, la senescencia prematura del follaje puede ser una importante limitante del rendimiento. Asimismo el mantenimiento de la actividad fotosintética por un período más prolongado puede aumentar el rendimiento de diversos cultivos de interés ([Borrell & Hammer 2000](#); [He, P. et al. 2004](#)).

La degradación de clorofila es un proceso que requiere un alto grado de control y regulación puesto que los compuestos que se forman inicialmente son altamente fototóxicos ([Mach et al. 2001](#)). En este sentido, la degradación de la clorofila involucra varias etapas en las cuales se destruyen las propiedades foto-dinámicas de los compuestos intermediarios por la disrupción del sistema conjugado de electrones  $\pi$  ([Hörtensteiner 2004](#)). Por otro lado, la formación de estos compuestos podría ser beneficiosa para la planta bajo ciertas circunstancias como por

ejemplo el ataque de organismos patógenos ya que aumentarían indirectamente la formación de compuestos aún más tóxicos para el organismo invasor (v.g. especies reactivas del oxígeno, [Kariola et al. 2005](#)).

Los conocimientos de los procesos de degradación de clorofila son potencialmente útiles en la industria, agricultura, farmacéutica y horticultura, donde puede ser necesario retrasar o acelerar la degradación de clorofila, ya sea por ingeniería genética o por otros métodos. Por ejemplo, el retraso podría mantener el color verde de las hojas y por tanto la apariencia fresca de los vegetales, o podría incrementar el rendimiento de cereales y oleaginosas. Su aceleración podría aumentar la facilidad con que se elimina la clorofila o sus derivados contaminantes en productos elaborados a partir de vegetales, resultando en un incremento de su valor comercial ([Takamiya et al. 2000](#)).

A pesar de que la primera enzima involucrada en el catabolismo de clorofila, la clorofilasa [clorofil-clorofilido hidrolasa, *E.C.* 3.1.1.14], fue descubierta hace casi 100 años por [Willstätter & Stoll \(1913\)](#), sólo recientemente se ha conseguido avanzar sobre su conocimiento y el de las distintas enzimas involucradas en las diferentes etapas de este proceso. Con el avance de la biología molecular y la ingeniería genética en las últimas décadas, se han conseguido identificar varios de los genes correspondientes a las enzimas involucradas en el catabolismo de la clorofila ([Takamiya et al. 2000](#)). Sin embargo, gran parte del proceso permanece desconocido, y existen incertidumbres sobre el posible funcionamiento de vías alternativas de degradación de clorofila ([Takamiya et al. 2000](#)). Durante la senescencia se desencadenan una serie de eventos que varían notablemente según cuales sean las causas que la iniciaron ([Buchanan-Wollaston et al. 2005](#)). Varios estudios transcriptómicos muestran que distintos grupos de genes se expresan en hojas que “senescen” normalmente adheridas, o separadas de la planta, o en respuesta a hormonas que aceleran la senescencia ([Buchanan-Wollaston et al. 2003](#); [He, Y. et al. 2001](#)). Por tanto no es extraño que exista más de una vía de degradación de la clorofila y sus complejos proteicos, y más aún que la verdadera función de las diversas isoformas de las clorofilasas en muchas especies aún sea desconocida ([Chen et al. 2008](#); [Schenk et al. 2007](#)).

En hojas senescentes de soja, *Arabidopsis* y tabaco aparecen pequeños compartimientos ácidos, denominados “*Vacuolas Asociadas a la Senescencia*” (VAS), claramente distinguibles del cloroplasto y de la vacuola central ([Martínez et al. 2008](#); [Otegui et al. 2005](#)). Estas VAS, que participan en la degradación de proteínas cloroplásticas, también contienen clorofila y algunos de sus catabolitos iniciales, reforzando la idea de que existen vías alternativas, extra-plastídicas de degradación de clorofila.

Aún menos conocido es el proceso por el cual la clorofila, que se encuentra formando parte de complejos proteicos en los fotosistemas, se pone en contacto con la clorofilasa. En estudios de fraccionamiento subcelular, la clorofilasa cloroplástica aparece localizada en la membrana externa del cloroplasto, separada de las clorofilas de las membranas tilacoidales ([Matile & Schellenberg 1996](#)), y en experimentos de expresión transiente las clorofilasas aparecen en estructuras esféricas, no caracterizadas hasta el momento, pero claramente fuera de los cloroplastos ([Schenk et al. 2007](#)). Es decir que la etapa previa al primer paso catabólico que es la defitilación mencionada precedentemente, requiere el desmantelamiento de los fotosistemas y desensamblaje de la clorofila de sus complejos, y el transporte de las clorofilas al menos hasta la membrana externa del cloroplasto ([Matile 2001](#)) o hasta las VAS ([Martínez et al. 2008](#)).

En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado dos genes (*ATCLH1* y *ATCLH2*) cuyos productos dan enzimas con actividad clorofilasa *in vitro*. Estas isoenzimas difieren en varias características, como ser su secuencia de aminoácidos, señales de tránsito y localización, e incluso señales de activación hormonales y externas ([Benedetti et al. 1998](#); [Liao et al. 2007](#)). En especial, es interesante que, mientras *ATCLH2* posee una secuencia típica de un péptido de tránsito para localización cloroplástica, *ATCLH1* estaría dirigida a la vía secretoria. Algo similar ocurre con los correspondientes genes ortólogos en *Citrus sinensis* ([Jacob-Wilk et al. 1999](#)) y *Chenopodium album* ([Tsuchiya et al. 1999](#)). Se desconoce actualmente el significado de la existencia de estas isoformas de la clorofilasa y sus roles en el proceso de degradación. El estudio de líneas mutantes *KO* para las clorofilasas de *Arabidopsis* permitiría observar características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas

distintivas con respecto de la línea silvestre, lo cual denotaría la importancia y el rol diferencial de dichas enzimas en distintos procesos.

Aunque una parte importante de esta tesis se desarrolló utilizando *Nicotiana tabacum* como material vegetal dado que permite obtener importantes cantidades de tejido foliar para ensayos bioquímicos o el aislamiento de estructuras subcelulares, en esta sección en particular se utilizó *Arabidopsis thaliana* debido a la variedad de herramientas de biología molecular y bioinformática que se han desarrollado en esta especie. Si bien la reducida biomasa foliar de *Arabidopsis* no la hizo nuestra especie de elección al momento de iniciar los estudios de degradación de clorofila, por el contrario se torna una planta muy conveniente al momento de realizar ensayos que involucran técnicas de biología molecular.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Determinación de la actividad clorofilásica**

Para la determinación de actividad de clorofilasa en hojas de *Arabidopsis* se siguió el procedimiento descrito por [Todorov et al. \(2003\)](#) con algunas modificaciones. Para ello se tomó una hoja de *Arabidopsis* previamente pesada, o una determinada porción de área medida de la hoja, se la colocó en un tubo *Eppendorf*® de 1,5ml, y se la mortereó en N<sub>2</sub> líquido. Luego se agregó rápidamente 1ml de acetona bufereada 80% v/v (buffer Tris•HCl 100mM pH 7,8), y se mantuvo en hielo y oscuridad mientras se continuó con el resto de las muestras. Luego se centrifugó a 16000g durante 2min a 4°C. El sobrenadante se reservó para determinar el contenido de clorofilas y pigmentos, según se describirá más adelante. El sedimento se lavó nuevamente con 1ml de acetona bufereada 80% v/v, y centrifugó luego del mismo modo. Finalmente el precipitado se resuspendió en 0,5ml de buffer “Todorov modificado” (5mM Buffer Fosfato de Potasio pH 7; 50mM KCl; 0,24% v/v Triton X-100; 0,5% p/v PVP; 1mM Cys) con 1% p/v PVPP, y se colocó la muestra en un baño sonicador con hielo, aplicando pulsos de 15seg durante 1min, para mejorar la extracción de las proteínas. Luego se centrifugó a 16000g durante 1min a 4°C, y el sobrenadante se reservó para los ensayos de actividad enzimática.

Para los ensayos de actividad se mezclaron 100µl de la muestra con 400µl de buffer Todorov modificado y 50µl de clorofila *a* (~20µg en acetona 100%), y se incubó la mezcla a 37°C, con agitación y en oscuridad. La reacción fue detenida a los 5-10min tomando una alícuota de 250µl de la mezcla de reacción, y agregándole 250µl de acetona : hexano (1:1 v/v). Se agitó vigorosamente, y luego se separaron las fases centrifugando a 16000g durante 1min a 4°C. La actividad clorofilasa se definió como la cantidad de clorofilido *a* formado en la fase acuosa por unidad de tiempo y área foliar. La determinación del área foliar fue estimada pesando discos de la hoja, y luego extrapolando el área total al peso de toda la hoja. Para la cuantificación de clorofilido *a* en la fase acuosa se determinó la absorbancia de la misma a 667nm, considerando  $\epsilon^{667}=74,9\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (valor tomado de [McFeeters et al. 1971](#)).

## Expresión y purificación de clorofilasa recombinante

Para obtener la enzima clorofilasa ATHCOR1 (ATCHL1) recombinante, se utilizó una construcción en el vector de expresión pMAL<sup>™</sup>-c2X ([New England BioLabs, Inc.](#)), cedida gentilmente por el Dr. C. E. Benedetti ([Benedetti & Arruda 2002](#)). Dicho plásmido fue introducido en *Escherichia coli* BL21(DE3) conteniendo el plásmido pG-KJE8 ([Takara Bio, Inc.](#)) para la expresión de las chaperonas GroEL, GroES, DnaK, DnaJ y DrpE.

Para introducir el vector de expresión en *E. coli*, en primer lugar se prepararon células ultra-competentes siguiendo el protocolo descrito por [Inoue et al. \(1990\)](#), para lo cual se utilizó en los medios de cultivos iniciadores el antibiótico cloranfenicol (20µg/ml), debido a que el vector pG-KJE8 posee el gen de resistencia para dicho antibiótico. Luego de realizar la transformación de las células de *E. coli*, el plaqueo final fue realizado sobre medio de cultivo SOB (con MgSO<sub>4</sub> 20mM) conteniendo los antibióticos cloranfenicol (20µg/ml) y ampicilina (100µg/ml), este último debido a que el vector pMAL<sup>™</sup>-c2X posee el gen de resistencia a dicho antibiótico. Finalmente, a partir de las colonias transformadas, se inoculó un nuevo medio de cultivo líquido, del cual se realizó un *stock* en glicerol 30% v/v, y se almacenó a -70°C para su posterior uso.

Para la expresión de las chaperonas y la proteína recombinante, partiendo de un cultivo *overnight* en medio LB conteniendo los antibióticos cloranfenicol (20µg/ml) y ampicilina (100µg/ml), se inoculó un nuevo medio LB con dichos antibióticos y glucosa 20mM, y se incubó con agitación a 37°C hasta DO<sub>600</sub> ~0,5. Luego se continuó con la inducción de las chaperonas agregando al medio de cultivo L-arabinosa (0,5mg/ml) y tetraciclina (5ng/ml), y se incubó a 30°C durante 5hs. Finalmente se realizó la inducción de la clorofilasa recombinante añadiendo al medio de cultivo IPTG (0,2mM), y se continuó la incubación a 30°C durante 12h. Previo a cada etapa de inducción se tomó una alícuota de 1ml del cultivo como control negativo de la inducción de la clorofilasa recombinante. Las alícuotas de cada etapa de inducción fueron centrifugadas a 16000g durante 2min, se descartó el

sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 50-100µl de buffer de muestra (Tris•HCl 0,055M pH 6,8; SDS 2% p/v; Glicerol 7% v/v; 2-Mercaptoetanol 4,3% v/v; Azul de Bromofenol 0,001% p/v), y luego se realizó una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (Acrilamida 10% p/v) según el procedimiento descrito por [Fling & Gregerson \(1986\)](#) (ver [Capítulo 2, Análisis de Western blot y ensayos de autodigestión](#)). Los geles se tiñeron como describen [Echan & Speicher \(2001\)](#) utilizando el procedimiento con Coomasie (0,1% p/v *Coomassie brilliant Blue R-250*; 50% v/v metanol; 10% v/v ácido acético) y luego desteñidos con solución decolorante (15% v/v metanol; 10% v/v ácido acético).

Para purificar la enzima inducida se siguieron las indicaciones del proveedor del vector de expresión pMAL<sup>™</sup>-c2X ([New England BioLabs, Inc.](#)) colectando las células por centrifugación a 4000g durante 20min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 50ml de buffer columna (20mM Tris•HCl pH 7,4; 200mM NaCl; 1mM EDTA) por cada litro de medio de cultivo centrifugado. Luego se lo congeló en un freezer a -20°C durante la noche. Al día siguiente, se colocó la muestra en un baño sonicador con hielo, aplicando pulsos de 15seg durante 5min. Se centrifugó la muestra a 9000g durante 30min a 4°C, se guardó el sobrenadante, y se lo diluyó 5 veces con el buffer columna, y se lo hizo pasar a través de una columna conteniendo la resina con amilosa provista junto con el vector de expresión, a la cual debe unirse la proteína de unión a maltosa (MBP) que se expresó unida a la clorofilasa. La columna fue previamente lavada con buffer columna con 8 veces el volumen de la misma. La muestra se hizo pasar a través de la columna a bajo flujo, en un circuito cíclico conectado a una bomba peristáltica durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó la columna con buffer columna con 12 veces el volumen de la misma. Luego se procedió a la elución de la proteína de fusión agregando buffer columna con Maltosa 10mM. Se colectaron las fracciones de 1,5ml de la elución, y se fue controlando la liberación de la proteína midiendo la absorbancia a 280nm. Finalmente se juntaron las fracciones con el mayor contenido de proteína de fusión, y se concentró a través de un tubo *Nanosep*® 10K.

## Determinación del contenido de clorofila y clorofilido en hojas de *Arabidopsis*

Para determinar el contenido de clorofila de manera no destructiva, se utilizó el colorímetro SPAD-502 (*Konica Minolta*), cuyos valores relativos en “unidades SPAD” pueden luego ser relacionados con el contenido de clorofila por unidad de área foliar o por unidad de peso fresco ([Ling et al. 2011](#)).

Para la determinación del contenido de clorofila y clorofilido espectrofotométricamente, se tomó una hoja de *Arabidopsis* previamente pesada, o una determinada porción de área medida de la hoja, se la colocó en un tubo *Eppendorf*® de 1,5ml, y se la mortereó en N<sub>2</sub> líquido. Luego se agregó rápidamente 1ml de acetona bufereada 80% v/v (buffer Tris•HCl 100mM pH 7,8), y se mantuvo en hielo y oscuridad mientras se continuó con el resto de las muestras. Luego se centrifugó a 16000g durante 2min a 4°C. El sobrenadante se reservó para determinar el contenido de clorofilas y pigmentos. En hojas de *Arabidopsis* hemos notado que el contenido de clorofilidos es relativamente alto, por lo que la determinación espectrofotométrica directa de clorofilas en un extracto acetónico aporta errores significativos (~10-20%), sobre todo en etapas avanzadas del desarrollo foliar. Por tal motivo, para la determinación espectrofotométrica de clorofilas y clorofilidos, se agregó 0,8ml de *n*-hexano a 0,7ml del extracto acetónico, se agitó fuertemente y se centrifugó a 16000g durante 1min a 4°C para separar las fases. Se tomó la fase orgánica superior para determinar el contenido de clorofilas, y la fase acetónica inferior para determinar el contenido de clorofilidos, utilizando las siguientes ecuaciones:

➤ **Clorofila *a* (mmol/ml) = 0,01732·A<sub>662,5</sub> – 0,00271·A<sub>645</sub>**

➤ **Clorofila *b* (mmol/ml) = 0,02948·A<sub>645</sub> – 0,00744·A<sub>662,5</sub>**

➤ **Clorofilido *a* (mmol/ml) = 0,017889·A<sub>668</sub> – 0,009054·A<sub>652</sub>**

➤ **Clorofilido *b* (mmol/ml) = 0,028388·A<sub>652</sub> – 0,014229·A<sub>668</sub>**

Donde  $A_{645}$ ;  $A_{652}$ ;  $A_{662,5}$  y  $A_{668}$  representan la absorbancia de la muestra a las longitudes de onda de 645nm, 652nm, 662,5nm y 668nm, respectivamente.

Estas ecuaciones fueron desarrolladas utilizando patrones puros de cada compuesto y estableciendo su concentración en acetona bufereada 80%. Luego se realizó una partición de solventes con n-hexano, y se determinó la absorbancia y así los nuevos coeficientes de extinción, para las clorofilas en la fase orgánica (n-hexano) y para los clorofilidos en la fase acuosa (acetónica) inferior. Para ello tomaron los valores de [Porra et al. \(1989\)](#) para los coeficientes de extinción de clorofila *a* ( $\epsilon^{645,6} = 76,79\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y clorofila *b* ( $\epsilon^{646,6} = 47,04\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) en acetona 80%; y los valores de [McFeeters et al. \(1971\)](#) para los coeficientes de extinción de clorofilido *a* ( $\epsilon^{667} = 74,90\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y clorofilido *b* ( $\epsilon^{650} = 47,20\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) en acetona 80%. Por lo tanto, para las ecuaciones anteriormente desarrolladas se utilizaron los siguientes coeficientes de extinción:

Long. onda / nm	Coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) / $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$			
	645	652	662,5	668
Clorofila <i>a</i> (fase org.)	15,18	—	60,10	—
Clorofila <i>b</i> (fase org.)	35,31	—	5,52	—
Clorofilido <i>a</i> (fase acuo.)	—	37,54	—	74,90
Clorofilido <i>b</i> (fase acuo.)	—	47,20	—	23,89

### **Determinación de clorofila y sus pigmentos derivados en las VAS aisladas de hojas de *Arabidopsis***

El aislamiento de las VAS de hojas de *Arabidopsis* fue realizado en forma análoga al realizado para hojas de tabaco ([ver Capítulo 2, Aislamiento de las VAS](#)). Partiendo de aproximadamente 6g de hojas, la homogeneización del tejido fue realizada con una mezcladora *VirTis® modelo 45* (*VirTis Co., Inc.*) agregando buffer de homogeneización (25mM HEPES pH 7,5; 0,6M manitol; 6,2mM cisteína; 2mM EDTA; 1% p/v PVPP), ~3ml/g de tejido foliar, y se homogeneizó en un recipiente

rodeado con hielo durante 30seg a máxima velocidad. El homogeneizado fue filtrado a través de una malla de nylon de 20 $\mu$ m de poro, y posteriormente centrifugado.

Para el ensayo de degradación *in vitro* de la clorofila en las VAS aisladas, se diluyeron las mismas con igual volumen de solución buffer (Hepes 25mM pH 7,5; 0,6M manitol) y luego fueron centrifugadas a 16000g durante 25min a 4°C. El sedimento enriquecido en las VAS fue incubado a 30°C durante 6h en oscuridad, y luego congelado rápidamente para su posterior análisis por HPLC.

Para la determinación de clorofila y sus pigmentos derivados en las VAS aisladas de hojas de *Arabidopsis* se procedió de igual modo al descrito previamente para las VAS aisladas de tabaco ([ver Capítulo 2, Determinación de clorofila y sus pigmentos derivados en VAS aisladas](#)).

## **Determinaciones de fluorescencia modulada de clorofila**

Para las determinaciones de la fluorescencia de la clorofila se utilizó un fluorómetro *FMS-2* (*Hansatech Instrumenst Ltd.*). En las mediciones del rendimiento cuántico fotoquímico máximo del Fotosistema II ( $F_v/F_m$ , definido como igual a  $(F_m - F_0)/F_0$ , donde  $F_m$  es la fluorescencia máxima bajo un pulso de luz saturante y  $F_0$  la fluorescencia mínima en hojas adaptadas a oscuridad) ([Maxwell & Johnson 2000](#)), las hojas fueron adaptadas a la oscuridad por ~15min con los broches para hojas provistos con el instrumento. En las mediciones de  $F_v/F_m$  de hojas cortadas y con tratamiento de senescencia inducida en oscuridad, así como también con aplicación de distintas hormonas, las determinaciones fueron realizadas en un cuarto con tenue luz (verde) de “seguridad”, es decir, fotosintéticamente no-activa, y con el broche para hojas.

Para las mediciones en hojas adaptadas a la luz, las determinaciones fueron realizadas aproximadamente a mitad del fotoperíodo, momento en el cual se determinó inicialmente el rendimiento cuántico del Fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ , definido como igual a  $(F_m' - F_s)/F_m'$ , donde  $F_m'$  es la fluorescencia máxima bajo un pulso de luz saturante y  $F_s$  la fluorescencia en estado estacionario de hojas aclimatadas a la luz) a la misma irradiancia a la cual las plantas fueron cultivadas (*i.e.*

$200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y luego empleando el broche para las determinaciones en hojas adaptadas en oscuridad, se adaptó la hoja durante 30min a la oscuridad, momento en el cual se determinó  $F_0$  (en el modo “ $F_v/F_m$ ”). Luego se aumentó la irradiancia sobre la misma planta, primero a 500 y luego  $700\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , manteniéndola durante 3h a cada irradiancia previo a las determinaciones (realizadas de igual modo que anteriormente). Finalmente con los parámetros determinados en las hojas adaptadas a la luz y a la oscuridad, se calculó el valor de mitigación no-fotoquímica de la energía (*Non-Photochemical Quenching*, NPQ), definido como  $(F_m - F_m')/F_m'$ .

### **Electroforesis en gel no-desnaturalizante de proteínas tilacoidales de *Arabidopsis***

La electroforesis en gel no-desnaturalizante de proteínas tilacoidales de *Arabidopsis* fue realizada siguiendo el procedimiento descrito por [Peter & Thornber \(1991\)](#) con algunas leves modificaciones. Para el aislamiento de las membranas tilacoidales se partió de ~1,5g de hojas de *Arabidopsis* y se las homogeneizó con 4ml de buffer de homogeneización (0,4M Sorbitol; 10mM Tricina•NaOH pH 7,6; 10mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,1mM PMSF) en hielo con una mezcladora *VirTis® modelo 45* (*VirTis Co., Inc.*) en frascos de 10ml, durante 30seg a máxima velocidad. El homogeneizado fue filtrado a través de cuatro capas de *Miracloth®* y colectado en tubos *Falcon®* de 15 ml, para luego ser centrifugada. Para disminuir el contenido de restos de almidón en las muestras, primero se centrifugó rápidamente las muestras por 15seg a máxima aceleración, y luego se pasó el sobrenadante a otro tubo y centrifugó a 3500g durante 5min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* de cloroplastos en 2ml de buffer de lisis (10mM Tricina•NaOH pH 7,6; 1mM EDTA). Luego se centrifugó nuevamente a 18000g durante 10min a 4°C. El *pellet* de tilacoides fue resuspendido en 1,5ml de NaBr 2M, y centrifugado nuevamente de igual modo. Luego se lavó el *pellet* de tilacoides nuevamente con 2ml de buffer de lisis, y centrifugado de igual modo. Finalmente se resuspendieron los tilacoides en 100 $\mu\text{l}$  de buffer de extracción (6,2mM Tris — 48mM Glicina pH 8,3; 10% v/v Glicerol),

aproximando la concentración final de clorofila a 1mg/ml, se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -70°C hasta su posterior utilización.

Las muestras de membranas tilacoidales fueron solubilizadas en una mezcla de detergentes (*n*-Decil-β-D-maltopiranosido : *n*-Heptil-β-D-tioglucopiranosido : SDS; 4,5:4,5:1 p/p) en una relación de Detergente : Clorofila, 30:1 p/p.

Para la electroforesis en gel no-desnaturalizante se armaron geles de 4mm de espesor (~8cm ancho × ~9cm alto) con un gradiente de concentración de acrilamida de 5,5-12% p/v en el gel. Para realizar el gel con un gradiente de concentración de acrilamida, se colocaron las soluciones de máxima (alta densidad) y mínima (baja densidad) concentración de acrilamida en el dispositivo para realizar gradientes del tipo de vasos comunicantes con un agitador magnético del lado donde se realizará la mezcla previo a ser vertida por gravedad entre los vidrios para que polimerice la solución, para lo cual una vez que se vertieron las soluciones, se cubrió la misma con una fina capa isopropanol o butanol. Una vez que polimerizó la solución, se lavó con agua destilada el alcohol agregado, para agregar encima el buffer con acrilamida de concentración igual a la de menor densidad (con cuatro veces la concentración de APS) y se colocan los peines para formar las fosetas de siembra de las muestras.

La composición de las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

#### Solución de Alta Densidad

Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilen- <i>bis</i> -acrilamida (33,5:0,33)	12% p/v Acril.
Tris•HCl pH 8,3	12,4mM
Glicina	48mM
APS (Peroxidisulfato amónico)	0,05% p/v
TEMED ( <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etano-1,2-diamina)	0,025% v/v

#### Soluciónd de Baja Densidad

Acrilamida: <i>N,N'</i> -metilen- <i>bis</i> -acrilamida (33,5:0,33)	5,5% p/v Acril.
Tris•HCl pH 8,3	12,4mM
Glicina	48mM
APS (Peroxidisulfato amónico)	0,05% p/v
TEMED ( <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etano-1,2-diamina)	0,025% v/v



La electroforesis fue realizada aplicando una corriente de 100V (constante), durante aproximadamente 1h. En la misma se usó un buffer de electroforesis de la siguiente composición:

Tris•HCl pH 8,3	12,4mM
Glicina	96mM
Deriphat® 160 (N-lauril-β-iminodipropinato sódico)	0,2% p/v

Para la electroforesis se sembró un volumen de muestra correspondiente a un área foliar equivalente a 100mm<sup>2</sup> (~15-25µg de clorofila total), según el contenido de clorofila total determinado previamente en las hojas.

### **Desarrollo de las enzimas clorofilasas de *Arabidopsis* fusionadas a proteínas fluorescentes**

Para permitir la observación microscópica y examinar la posible localización subcelular de las clorofilasas de *Arabidopsis*, se desarrollaron construcciones de los genes de las clorofilasas fusionados a las proteínas fluorescentes YFP y Cerulean. En primer lugar se debieron crear los vectores de expresión apropiados, para lo cual se extrajo el fragmento *d35S-YFP-nos3'* del vector pAN95 ([Fig. 4.1A](#)) (análogo a [pAN581](#)) y el fragmento *d35S-Cerulean-nos3'* del vector [pAN578](#) ([Fig. 4.1B](#)). Estos fragmentos fueron clonados en el vector binario pCAMBIA1300 ([Cambia Labs](#)) ([Fig. 4.1C](#)) empleando los sitios de restricción *SacI/HindIII*. Los vectores pAN95 y [pAN578](#) fueron cedidos amablemente por el Dr. Andreas Nebenführ.

Los fragmentos genómicos de los genes de las clorofilasas fueron clonados en los nuevos vectores, pAN95C1300 ([Fig. 4.1D](#)) y pAN578C1300 ([Fig. 4.1E](#)). El gen de *ATCHL1* fue clonado añadiendo la secuencia de 1,7Kpb por encima de la región 5'UTR introduciendo los sitios de restricción *SacI/XbaI* ([Figs. 4.2 A y B](#)). El gen *ATCHL2* fue clonado añadiendo la secuencia de 1,8Kpb por encima de la región 5'UTR introduciendo los sitios de restricción *SacI/BamHI* ([Figs. 4.2 C y D](#)). Los vectores (pAN95C1300 y pAN578C1300) sin los genes de las clorofilasas fueron utilizados como controles de expresión y localización de las proteínas fluorescentes

en plantas bajo la regulación del promotor *d35S*. Para el clonado de los genes de las clorofilas se utilizaron los siguientes *primers*:

Nombre	Gen	Secuencia del <i>primer</i> (5'→3')
CHL1-SacI	<i>ATCHL1</i>	GACGGAGcTcATCTGGGAGGAAG
CHL1-XbaI	<i>ATCHL1</i>	GTACATtctAgAAATCgAGACGAAGATACCAG
CHL2-SacI	<i>ATCHL2</i>	CTCCgAgCTCTACAAAACACAACA ACTATATTTGTG
CHL2-BamHI	<i>ATCHL2</i>	CCAGgggatccAAGAAAAACTTtTGTTaACATGATAACC

Se indica en las secuencias de los *primers* en letras minúsculas las bases que fueron cambiadas respecto de la secuencia genómica original (TAIR *Build* 9.1), y subrayadas las secuencias de los sitios de restricción correspondientes a las enzimas respectivas con las cuales se ha formulado el nombre de cada *primer*.

Las reacciones de PCR para las amplificaciones de los genes de las clorofilasas para ser clonados en los mencionados vectores fueron realizadas en una termocicladora *Thermo® PCR Sprint*, en tubos de polipropileno de 0,2ml, utilizando los siguientes programas:

Ciclo CLORCLO		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
98°C	1min	×1
98°C	15seg	}×35
55°C	30seg	
72°C	2min	
72°C	5min	×1

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la siguiente mezcla de reacción:

Amplificaciones genes de clorofilasas para clonación		
Buffer <i>Phusion</i> ® HF 5X ( <i>Finnzymes</i> )		1X
dNTP Mix, 10mM ( <i>Invitrogen</i> )		0,8mM
DMSO ( <i>Finnzymes</i> )		3% v/v
<i>Primers</i>	FP, 50µM	0,5µM
	RP, 50µM	0,5µM
<i>Phusion</i> ® ADN Polimerasa, 2U/µl ( <i>Finnzymes</i> )		0,02U/µl
ADN molde (muestra <i>A.thaliana</i> col-0) (~1-2µg/µl)		0,005µl (muestra)/µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q		c.s.p. 50µl/tubo

La combinación de *primers* FP/RP utilizados fue CHL1-SacI/CHL1-XbaI y CHL2-SacI/CHL2-BamHI para los genes de ATCHL1 y ATCHL2, respectivamente.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1% p/v (en buffer TAE 1X), y luego los fragmentos de ADN fueron purificados utilizando el *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* ([GE Healthcare Life Sciences](#)) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

Las construcciones de las clorofilasas fusionadas a las proteínas fluorescentes ([Fig. 4.2](#)) fueron introducidas en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90, por el método de congelamiento/descongelamiento, siguiendo el protocolo descrito por [Wise et al. \(2006\)](#).

## Expresión *in planta* de las clorofilasas fusionadas a proteínas fluorescentes

Para la expresión de las clorofilasas fusionadas a las proteínas fluorescentes en *Arabidopsis thaliana* se siguió el procedimiento de transformación estable descrito por [Clough & Bent \(1998\)](#). Las semillas colectadas de las plantas transformadas fueron esterilizadas superficialmente sumergiéndolas en etanol 95% durante 30-60seg, luego en una solución de ~3% p/v hipoclorito de sodio con 0,05% v/v Tween-20® durante 5min, y finalmente enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas estériles fueron sembradas en placas conteniendo el medio de selección para la identificación de las plantas transgénicas siguiendo el procedimiento descrito por [Harrison et al. \(2006\)](#). Las plantas seleccionadas

positivamente fueron luego transferidas a macetas para permitir su completo desarrollo.

Para la expresión estable de las clorofilasas fusionadas a las proteínas fluorescentes en *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana se siguió el procedimiento descrito por [Obermeyer et al. \(2004\)](#) para la transformación de discos de hojas, con algunas leves modificaciones. Un cultivo *overnight* de *Agrobacterium* conteniendo los vectores de expresión en medio LB con los antibióticos apropiados se diluyó con medio fresco hasta  $OD^{600} \sim 0,8$ , se centrifugaron 2ml del cultivo a 16000g durante 15seg, y se lo resuspendió en igual volumen de NaCl 0,85M estéril. A partir de una planta de tabaco de 4-6 semanas, se tomaron las hojas y se las esterilizó colocándolas 8min en una solución de hipoclorito de sodio  $\sim 0,6\%$  p/v y SDS 0,1% p/v. Luego se las secó entre papeles estériles en la cámara de flujo laminar, y se las colocó durante 5seg en alcohol 70% v/v, y se las secó nuevamente. A continuación se cortaron trocitos de hojas de  $\sim 1\text{cm}^2$ , en cantidad suficiente para dos placas de Petri por construcción analizada, colocándolos con la cara adaxial hacia abajo en el medio de inoculación. Luego a cada placa de Petri se le agregó 200 $\mu\text{l}$  del cultivo preparado, y se incubaron las placas en oscuridad durante 2 días a 30°C.

Al tercer día los trocitos de hojas fueron lavados con medio de inoculación fresco conteniendo 500 $\mu\text{g/ml}$  de Carbenicilina, y luego transferidos a otra placa de Petri con medio de regeneración, con la cara abaxial hacia el agar. Al cabo de 1-2 semanas, se cortaron los trocitos de hojas en fragmentos más pequeños que fueron transferidos a un nuevo medio de regeneración. Luego de 1-2 semanas más, se cortaron los callos generados y se los transfirió a un nuevo medio de regeneración. A las de 4-6 semanas posteriores, se transfirieron los explantos diferenciados de los callos a medio de enraizamiento en tubos *Falcon*® de 50ml conteniendo 20ml de medio. Finalmente cuando se observó que los explantos generaron raíces, fueron transferidos a macetas para permitir su completo desarrollo.

<i>Sales basales medio <a href="#">Murashige &amp; Skoog (1962)</a></i>	
KNO <sub>3</sub>	18,8mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6mM
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	3mM
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1,5mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25mM
Na <sub>2</sub> EDTA	0,1mM
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,1mM
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	0,1mM
ZnSO <sub>4</sub>	0,03mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1mM
KI	0,1mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,001mM
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,0001mM
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,0001mM

<i>Vitaminas medio <a href="#">Gamborg et al. (1968)</a></i>	
myo-Inositol (Inositol, Vit B8)	100mg/l
Ácido Nicotínico (Niacina, Vit. B3)	1mg/l
Piridoxina•HCl (Vit. B6)	1mg/l
Tiamina•HCl (Vit. B1)	10mg/l

<i>Medio de Inoculación</i>	
Sales basales medio Murashige & Skoog	1X
Vitaminas medio Gamborg	1X
Sacarosa	30g/l
pH	5,8

<i>Medio de Regeneración</i>	
Sales basales medio Murashige & Skoog	1X
Vitaminas medio Gamborg	1X
Sacarosa	30g/l
pH	5,8
Agar	8g/l
Benciladenina (BAP)	1ppm
Ácido α-Naftalenacético (ANA)	0,1ppm
Carbenicilina	500mg/l
Higromicina	30mg/l

<i>Medio de Enraizamiento</i>	
Sales basales medio Murashige & Skoog	1X
Vitaminas medio Gamborg	1X
pH	5,8
Agar	8g/l
Ácido $\alpha$ -Naftalenacético (ANA)	2ppm
Carbenicilina	500mg/l
Higromicina	30mg/l

Para las expresiones transientes en *Nicotiana benthamiana* Domin. mediante agroinfiltración utilizando hojas maduras intactas ([Kapila et al. 1997](#)) se partió de un cultivo *overnight* de *Agrobacterium* transformada con las construcciones realizadas. Se centrifugó 1,5ml del cultivo a 9000g durante 5min, luego se resuspendieron las bacterias en 1ml de medio de infiltración (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM; MES 50mM pH 5,6; Glucosa 5mg/ml; Acetosiringona 100 $\mu$ M), y se centrifugó nuevamente. Se repitió una vez más el procedimiento anterior, y finalmente se resuspendieron las bacterias en medio de infiltración de modo tal que la OD<sup>600</sup> fuera  $\sim$ 0,1 para las construcciones con promotores *d35S* y  $\sim$ 0,4 para las construcciones con promotores endógenos. Para infiltrar las hojas de *N. benthamiana* se asperjó la cara abaxial con agua destilada y se le realizaron pequeños raspados cerca de las nervaduras. Luego se procedió a agroinfiltrar el tejido con una jeringa de 1 ml, sin aguja, y aplicando una suave presión con el émbolo sobre el tejido ([Schöb et al. 1997](#)). Se infiltraron  $\sim$ 100-200 $\mu$ l de la resuspensión de bacterias, y se marcó la zona infiltrada en la cual penetró el medio de infiltración para el posterior análisis de la expresión de las proteínas de interés a los 3 días. Las plantas infiltradas fueron mantenidas hasta las observaciones en cámara de crecimiento con temperatura controlada  $\sim$ 20-25°C y  $\sim$ 100 $\mu$ mol $\cdot$ m<sup>-2</sup> $\cdot$ s<sup>-1</sup> con fotoperíodo de 14h de luz.

### **Observaciones a través de microscopía confocal de los mutantes de *Arabidopsis***

Las observaciones por microscopía láser confocal de los mutantes *KO* de *Arabidopsis thaliana* fueron realizadas en el microscopio Zeiss LSM510 Meta,

ubicado en el Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG) de la UNLP. Las observaciones de las plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana y *Nicotiana benthamiana* Domin. fueron realizadas en el microscopio *Leica TCS SP5*, ubicado en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

Las muestras para las observaciones microscópicas fueron preparadas a partir de pequeños cortes de tejido (tomados entre las nervaduras visibles) de hojas maduras o recién mostrando síntomas tempranos de senescencia.

Para las observaciones realizadas con las líneas de *Arabidopsis KO* para las clorofilasas, previo al corte de tejido, se realizó un *peeling*, es decir, se removió la capa epidérmica del tejido utilizando una pequeña pinza metálica. Luego los pequeños trozos de hoja sin la epidermis, fueron sumergidos 5-20min en una solución de Rojo Neutro 0,005% p/v (en buffer Hepes 25mM pH 7,5), el cual es un marcador de compartimentos ácidos ([Ehara et al. 1996](#); [Guilliermond 1930](#)) que, dadas sus propiedades fisicoquímicas, puede ser empleado en microscopía láser confocal ([Di Sansebastiano et al. 1998](#); [Dubrovsky et al. 2006](#)), y a su vez ha sido previamente utilizado por [Otegui et al. \(2005\)](#) como marcador de las VAS. Finalmente, el tejido fue colocado entre el vidrio *porta* y *cubreobjetos*, para ser observado en el microscopio utilizando la siguiente configuración: láseres de excitación: 543nm y 633nm; filtros: B.P. 585-615nm (para Rojo Neutro) y L.P. 650nm (para clorofila); objetivo: Plan-Neofluar 40×/1,3 Oil DIC.

Para las observaciones realizadas con las plantas transgénicas de tabaco, se tomaron pequeños trozos de tejido de la hoja, y colocándolos sobre el *portaobjetos* se les agregaron unas gotas de Perfluorodecalina (FLUOROCROM® *Deca* – Croma-Pharma *GmbH*), que es empleado en microscopía confocal para mejorar la calidad de la imagen pues ocupa los espacios aéreos del mesófilo en cortes relativamente gruesos de tejido vegetal ([Littlejohn et al. 2010](#)). Finalmente la observación en el microscopio fue realizada utilizando las siguientes configuraciones: láseres de excitación: 458nm y 488nm; “filtros” (PMT): 468-536nm (para Cerulean), 520-550nm (para YFP), 650-750nm (para clorofila); objetivos: HCX PL APO CS 20×/0,70 IMM UV ó HCX PL APO CS 63×/1,40 OIL UV.

Todas las imágenes obtenidas fueron procesadas con el *software* gratuito *ImageJ* v1.44i (Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda,

Maryland, USA, [imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/), 1997-2011; [Abràmoff et al. 2004](#)) conteniendo los complementos (*plug-ins*) para microscopía de *McMaster Biophotonics Facility* ([www.macbiophotonics.ca/imagej/](http://www.macbiophotonics.ca/imagej/)).



## **RESULTADOS**

### **Ensayos de actividad clorofilasa**

Con el objetivo de evaluar la posible participación de alguna de las clorofilasas de *Arabidopsis* en la degradación de clorofila en hojas cortadas y colocadas en oscuridad, se analizó la actividad de la enzima en el extracto acetónico de las hojas ([Fig. 4.3](#)). La actividad enzimática (definida por unidad de área foliar), durante los días evaluados, no mostró diferencias significativas entre los genotipos, así como tampoco ninguna tendencia visible al progresar la senescencia de la hojas en oscuridad.

Dado que los extractos acetónicos poseen la gran mayoría de las proteínas (enzimas) presentes en el tejido, y al no realizar ningún tipo de enriquecimiento de las clorofilasas, la hidrólisis observada podría deberse a otro tipo de enzimas hidrolíticas “inespecíficas”. Por ello se evaluó la actividad clorofilasa mediante el empleo de dos inhibidores de enzimas del tipo hidrolasas serínicas (PMSF y AEBSF), grupo al que pertenecen las clorofilasas, uno de ellos (PMSF) de comprobada inhibición *in vitro* de las clorofilasas clonadas ([Tsuchiya et al. 2003](#)).

Por lo tanto, teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, se evaluó la actividad de clorofilasa en los cuatro genotipos empleando los inhibidores PMSF y AEBSF ([Fig. 4.4](#)). En este ensayo, bajo las condiciones de reacción empleadas, no se logró reducir significativa y consistentemente la actividad clorofilasa en ninguno de los genotipos evaluados.

### **Degradación de clorofila durante la senescencia**

Se evaluó el ritmo de degradación de clorofila durante la senescencia inducida por oscuridad en hojas cortadas ([Fig. 4.5A](#)), y de hojas unidas a la planta “senesciendo naturalmente” ([Fig. 4.5C](#)). Se observó que las hojas cortadas de todos los genotipos degradan linealmente la clorofila en oscuridad, y sólo se notó una leve

demora significativa estadísticamente en la línea *chl1* hacia el décimo día. Por el contrario, en hojas “senesciendo” unidas a la planta, el contenido de clorofila total de las líneas mutantes prácticamente permaneció en los mismos niveles durante el período analizado, a diferencia del genotipo silvestre que mostró una disminución notoria.

En forma paralela se analizó en las mismas hojas el contenido de clorofilido *a* (determinado espectrofotométricamente) (Figs. 4.5 B y D), observándose tanto en hojas cortadas y en oscuridad, como en hojas unidas a la planta, niveles significativamente mayores de clorofilido en las líneas silvestre y *chl2*, y valores apenas detectables en las líneas *chl1* y *chl1/2*.

En forma similar, la relación clorofilido *a*/clorofila total (Figs. 4.5 E y F), fue siempre mayor en las líneas silvestre y *chl2* que en *chl1* y *chl1/2*, con valores notoriamente bajos en estas últimas.

Dado que las líneas *KO* desarrollan un mayor número de hojas, y la evolución de la senescencia en los experimentos descritos precedentemente podría estar afectada por la posición relativa de la hoja estudiada dentro de la roseta, se procedió a evaluar la variación en el contenido de clorofila medido a través del colorímetro SPAD-502 (*Konica Minolta*) en las líneas silvestre y doble mutante en todas las hojas de la planta (Fig. 4.6). Por lo tanto se cortaron las hojas de toda la roseta, y se colocaron en oscuridad (sólo las hojas de posiciones impares). Todas las hojas empleadas poseían valores de SPAD similares (Fig. 4.6A). Luego de 7 días en oscuridad, en este análisis no se observaron diferencias notorias en la caída del contenido de clorofila, comparando hojas en la misma posición entre las líneas silvestre y doble mutante (Figs. 4.6 B y C). Así mismo se observa nuevamente el mayor número de hojas de la línea *chl1/2*, y la mayor longitud de sus hojas a partir de la posición 20<sup>a</sup> (Fig. 4.6C).

En este mismo sentido, se evaluó la senescencia de hojas unidas a la planta y cubiertas individualmente con papel de aluminio de modo de inducir la senescencia en las mismas (Fig. 4.7). En este ensayo se analizó la caída en contenido de clorofila (mediante el SPAD) en hojas jóvenes y maduras, con el objetivo de tener en cuenta una posible respuesta diferencial según la edad de la hoja.

En las hojas jóvenes cubiertas no se observaron diferencias notorias entre las líneas silvestre y doble mutante ([Fig. 4.7A](#)), pero en las hojas maduras se hicieron notorias las diferencias al 8º día, permaneciendo las hojas de la línea *chl1/2* con valores de clorofila levemente superiores al genotipo silvestre ([Fig. 4.7B](#)).

## Rendimiento cuántico potencial del Fotosistema II ( $F_v/F_m$ )

Varios trabajos han demostrado que el rendimiento cuántico potencial del Fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) disminuye durante la senescencia en *Arabidopsis* (v.g. [Woo et al. 2002](#)). Continuando la caracterización fenotípica de las líneas mutantes de *Arabidopsis* para las clorofilasas, se analizó la variación de  $F_v/F_m$  durante la senescencia inducida por oscuridad en hojas cortadas ([Fig. 4.8A](#)) y durante la senescencia “natural” de la 15ª hoja sin escindir de la planta ([Fig. 4.8B](#)).

En hojas cortadas ([Fig. 4.8A](#)) no hubo diferencias en  $F_v/F_m$  hasta el octavo día. A partir del décimo día se observó claramente una demora en la senescencia, medida a través de  $F_v/F_m$ , en las líneas mutantes; y en particular las plantas con la mutación simple mostraron una leve demora sobre la línea doble mutante.

El seguimiento de la senescencia foliar de la 15ª hoja adherida a la planta ([Fig. 4.8B](#)) mostró una notable demora de aproximadamente 10 días en el inicio de la caída de  $F_v/F_m$  en las líneas mutantes respecto del genotipo silvestre.

Teniendo en cuenta reportes previos sobre la regulación mediada por hormonas de la expresión génica de las clorofilasas (v.g. [Benedetti et al. 1998](#); [Jacob-Wilk et al. 1999](#); [Kariola et al. 2005](#)), y la conocida participación del etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico en la regulación de la senescencia, se evaluó el efecto de estas hormonas sobre la evolución de  $F_v/F_m$  durante la senescencia en hojas cortadas de las líneas mutantes. En los distintos tratamientos se aplicó una dosis de 50ppm de Etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico, compuesto químico generador exógeno de etileno), 10µM de ácido salicílico o 30µM de jasmonato de metilo (compuesto fisiológicamente equivalente al ácido jasmónico), y luego las hojas fueron colocadas en oscuridad ([Fig. 4.9](#)).

En el tratamiento con Etefón ([Fig. 4.9A](#)) se observó una demora en la caída de  $F_v/F_m$  de la línea mutante *chl1*, siendo esta caída similar a la observada previamente sin el tratamiento de la hormona. El resto de los genotipos no difirieron significativamente.

En el tratamiento con ácido salicílico ([Fig. 4.9B](#)) se observó una demora en la caída de  $F_v/F_m$  de las líneas mutantes respecto del genotipo silvestre, siendo esta diferencia notoria al 8° día del inicio del tratamiento.

En el tratamiento con jasmonato de metilo ([Fig. 4.9C](#)) también se observó una demora en la caída de  $F_v/F_m$  de las líneas mutantes respecto del genotipo silvestre, siendo esta diferencia notoria al 6° día del inicio del tratamiento.

### **“Geles Verdes” de *Deriphat*®-PAGE**

Se analizó cualitativamente la composición relativa de los diferentes complejos clorofila-proteína tilacoidales de los cuatro genotipos en hojas jóvenes y senescentes empleando electroforesis en gel no-desnaturalizante, comúnmente denominados *Geles Verdes* de *Deriphat*®-PAGE ([Fig. 4.10](#), panel superior, [Peter & Thornber 1991](#)). En estos geles se observa una composición similar de los complejos en todas las líneas en las hojas jóvenes. Sin embargo, en hojas senescentes de las líneas mutantes *chl2* y *chl1/2*, se observa claramente un mayor contenido de todos los complejos, y una alta retención de los complejos LHCII (antenas colectoras del Fotosistema II).

En el panel inferior de la [Figura 4.10](#) se observa la fluorescencia del mismo gel del panel superior expuesto a la luz UV, permitiendo identificar claramente los complejos pertenecientes al Fotosistema I, por la mitigación (*quenching*) de la fluorescencia en los mismos ([Allen & Staehelin 1991](#)).

### **Fluorescencia modulada de la clorofila**

Las diferencias en la degradación de los complejos clorofila-proteína reportadas en la sección anterior llevaron a evaluar el rendimiento cuántico del

Fotosistema II ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), la fluorescencia basal en oscuridad ( $F_0$ ) y la mitigación no-fotoquímica (NPQ) del Fotosistema II ([Fig. 4.11](#)) en plantas de las líneas silvestre y doble mutante a diferentes irradiancias.

Se observaron solamente a la más alta irradiancia evaluada ( $700\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) diferencias significativas estadísticamente entre ambos genotipos para el  $\Phi_{\text{PSII}}$  y el NPQ ([Figs. 4.11 A y B](#), respectivamente). El  $\Phi_{\text{PSII}}$  fue menor y el NPQ fue mayor en la línea doble mutante con respecto al genotipo silvestre. Si bien la evaluación de la fluorescencia basal  $F_0$  no mostró diferencias estadísticamente significativas, se observó en el doble mutante una tendencia levemente superior a las tres irradiancias analizadas, ([Fig. 4.11C](#)), lo que podría indicar un mayor contenido de los fotocomplejos LHCII desacoplados del Fotosistema II.

### **Cromatogramas HPLC de *Arabidopsis***

Con el fin de evaluar en detalle la composición relativa de los pigmentos relacionados con el catabolismo de la clorofila durante la senescencia, se analizaron los mismos mediante cromatografía de HPLC. Para ello, a partir de tejido homogeneizado (que posteriormente se empleó para aislar las VAS) de hojas cortadas y colocadas en oscuridad durante dos días, se realizó una extracción de los pigmentos con acetona bufereada, la cual fue analizada luego mediante cromatografía de HPLC ([Fig. 4.12](#)). Para las extracciones se partió de cantidades iguales de tejido foliar de los distintos genotipos.

En los cromatogramas del homogeneizado ([Fig. 4.12](#)) se observa notoriamente un mayor contenido de clorofilido *a* en la línea silvestre, un poco menor en la línea *chl2*, y niveles apenas detectables en las líneas *chl1* y *chl1/2*. Curiosamente el contenido de feofórbido *a* en la línea doble mutante fue levemente superior al del resto de los otros genotipos. En los cuatro genotipos, el contenido de feofitina *a* fue similar.

## Cromatogramas HPLC de las VAS de *Arabidopsis*

Continuando con el análisis de los pigmentos presentes en las VAS y de las actividades enzimáticas presentes en las VAS e involucradas en la degradación de clorofila, se emplearon aquí las líneas mutantes de *Arabidopsis*. Para ello se analizaron mediante HPLC la composición relativa de los pigmentos relacionados a la degradación de clorofila en VAS aisladas de hojas cortadas y colocadas en oscuridad durante dos días; una porción del aislamiento se incubó a 30°C durante 6h ([Fig. 4.13](#)), en modo análogo a lo realizado previamente con las VAS aisladas de tabaco.

En los cromatogramas obtenidos de las VAS ([Fig. 4.13A](#)), se observa un contenido similar de clorofila *a* y *b* en los cuatro genotipos, mientras que los niveles más elevados de clorofilo *a* se observan en las líneas *chl1* y *chl2*, levemente menores en la línea silvestre, y casi imperceptibles en la línea *chl1/2*.

Luego de ser incubadas a 30°C durante 6h ([Fig. 4.13B](#)), se observó que en todos los genotipos el contenido de clorofila *a* disminuyó notoriamente. En cuanto al contenido de clorofilo *a*, sólo las líneas silvestre y *chl1* mostraron niveles elevados de este catabolito. Cabe destacar que la línea *chl1/2*, posee la capacidad de degradar clorofila, aún en ausencia de la actividad de ambas clorofilasas identificadas hasta el momento.

Analizando el comportamiento general de las VAS evaluadas en estos cromatogramas, la línea silvestre se asemeja a *chl1*, mientras que *chl2* y *chl1/2* tienen un comportamiento similar ([Fig.4.13](#)).

Debido a la atenuación de la señal analógica del espectrofotómetro del HPLC para los cromatogramas de las VAS ([Fig. 4.13](#)), no es apropiada la comparación visual con los cromatogramas del homogeneizado de hojas realizado previamente ([Fig. 4.12](#)).

## Observaciones por microscopía láser confocal

A través de observaciones microscópicas se observó la aparición de las VAS en hojas senescentes de las líneas silvestre y doble mutante para las clorofilasas ([Fig. 4.14](#)). En estas observaciones se emplearon hojas “senesciendo” naturalmente unidas a la planta, y no se observaron diferencias notorias en el número de las VAS observadas por campo, ni en la proporción o el tamaño de partículas próximas a 1µm mostrando fluorescencia de clorofila, rojo neutro o la co-localización de ambas señales (análisis con el *software* ImageJ).

Con el fin de evaluar la localización de las clorofilasas de *Arabidopsis*, cuya actividad enzimática hemos observado en las VAS aisladas, se fusionaron las mismas a las proteínas fluorescentes YFP y Cerulean, como se describió previamente ([Fig. 4.2](#)).

Empleado un sistema de expresión transiente en *Nicotiana benthamiana*, se evaluó la expresión de ambas proteínas fluorescentes bajo el control del promotor 35S ([Fig. 4.15](#)). La fluorescencia de dichas proteínas se observó principalmente en el tejido epidérmico, en el apoplasto, núcleo celular y citoplasma, mostrando ambas proteínas patrones de localización similares.

En un segundo paso, empleado un sistema de expresión transiente en *Nicotiana benthamiana*, se evaluó la expresión de la clorofilasa ATCHL1 fusionada a YFP ([Fig. 4.16](#)) y de la clorofilasa ATCHL2 fusionada a Cerulean ([Fig. 4.17](#)), ambas reguladas por el propio promotor de las clorofilasas. Si bien este sistema de expresión transiente no permite discriminar una posible localización de las enzimas en las VAS, puesto que estas no están presentes en el tejido epidérmico, permite realizar rápidamente una evaluación primaria sobre la construcción realizada y su nivel de expresión en este tejido.

En cuanto a la expresión transiente de ATCHL1::YFP ([Fig. 4.16](#)) observamos una clara señal de fluorescencia en el apoplasto de las células epidérmicas, y curiosamente también se observaron en el mismo, ciertos “puntos” con mayor intensidad de fluorescencia.

La expresión transiente de ATCHL2::Cerulean ([Fig. 4.17](#)) resultó en muy bajos niveles de expresión, con señal de fluorescencia distribuida por el citoplasma y el apoplasto de las células epidérmicas.

Con respecto a las construcciones introducidas en *Nicotiana tabacum* en forma “estable” se dispone actualmente sólo de la planta transgénica portando la construcción ATCHL1::YFP. El resto de las plantas transgénicas, tanto de *Nicotiana tabacum* como de *Arabidopsis thaliana*, se encuentran a la fecha en fase de desarrollo y evaluación de la transgénesis.

Se procedió a evaluar la expresión de ATCHL1::YFP (insertado en forma estable) en las plantas de *Nicotiana tabacum*, en células del mesófilo de la hoja ([Fig. 4.18](#)). En estas plantas los niveles de expresión de la proteína fueron bajos, pero aún así logró observarse positivamente la señal de fluorescencia correspondiente a la proteína YFP, la cual pareciera localizarse “aglomerada” en la vacuola central en algunas células, y *a priori*, si bien con menor intensidad, en los cloroplastos.

Por lo tanto, dado que los niveles de expresión de esta proteína son muy bajos en estas condiciones, y la co-localización visual es muy dependiente de la intensidad de los colores (*i.e.* sensación visual de la señal), y de la subjetividad del operario, produciendo un análisis cualitativo poco sensible en la mayoría de las situaciones, se procedió a realizar un análisis cuantitativo de co-localización. Para ello se empleó el *plug-in* (integrado al programa *ImageJ*) de *Intensity Correlation Analysis* (ICA), que genera los coeficientes de Manders ([Manders et al. 1993](#)) y una imagen de los valores de *PDM* (*Product of the Differences from the Mean*), según se describe con mayor detalle en [Li et al. 2004](#).

Observamos en este análisis ([Fig. 4.19](#)) que efectivamente la proteína ATCHL1::YFP se localizó en los cloroplastos (*i.e.* sitios con fluorescencia de clorofila), además de otro/s sitio/s carente/s de fluorescencia de clorofila. Los valores cuantitativos obtenidos del análisis fueron los siguientes:

Manders' R	Pearson's (Rr)	M <sub>1</sub> (YFP)	M <sub>2</sub> (Clorofila)
0,633	0,116	0,996	0,366

En base a estos valores se confirma que casi la totalidad de la señal de fluorescencia de YFP está ubicada en el mismo sitio donde se localiza señal de



fluorescencia de la clorofila, aunque obviamente la mayor parte de la clorofila no co-localiza con la señal de YFP. Así mismo, en la imagen de *+vePDM* (valores positivos de *PDM*) resulta sencillo observar la co-localización de ambas señales de mayor intensidad ([Fig. 4.19D](#)), resultando en una imagen que claramente representa la localización de los cloroplastos, y confirmando que la co-localización cualitativa visual en cloroplastos puede no aportar resultados claros debido a la excesiva señal de fluorescencia proveniente de los mismos, principalmente en situaciones en las cuales la segunda señal es de baja intensidad.

## FIGURAS

Figura 4.1 – Vectores de expresión de proteínas fluorescentes para plantas.

(A) y (B), vectores cedidos gentilmente por A. Nebeführ, a partir de los cuales se tomaron las construcciones de las proteínas fluorescentes (sector marcado en rojo), y fueron introducidos en el vector binario pCAMBIA1300 (C) (*Cambia Labs.*) en los sitios de restricción *SacI/HindIII*.

(D) y (E), vectores binarios construidos a partir de combinar los anteriores. El segmento indicado en rojo muestra la región que se utilizó para introducir los genes de las clorofilasas según se muestra en la figura siguiente.

Los esquemas de los distintos vectores fueron realizado con el *software* gratuito *PlasmaDNA* ([Angers-Loustau et al. 2007](#)).

Figura 4.1

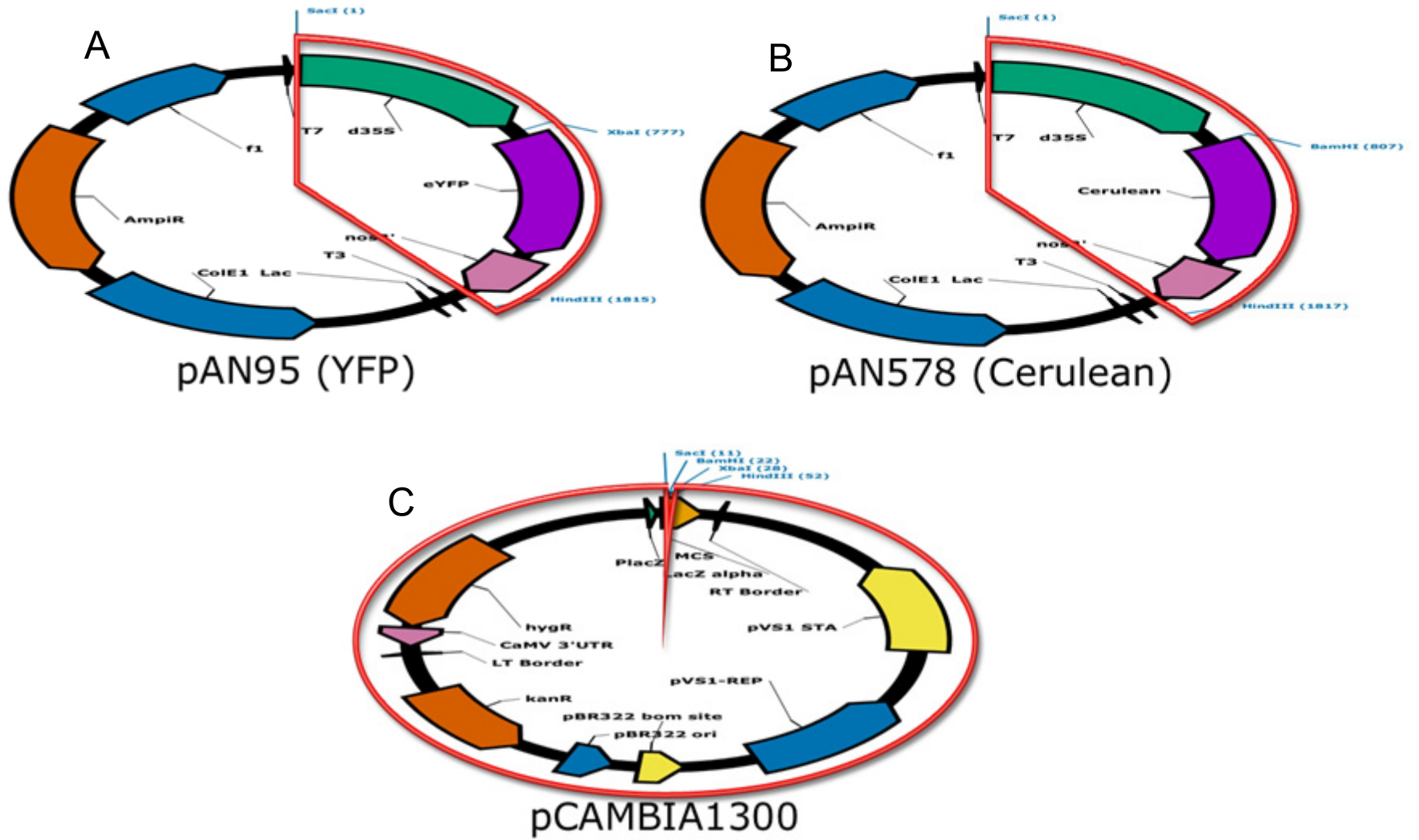


Figura 4.1

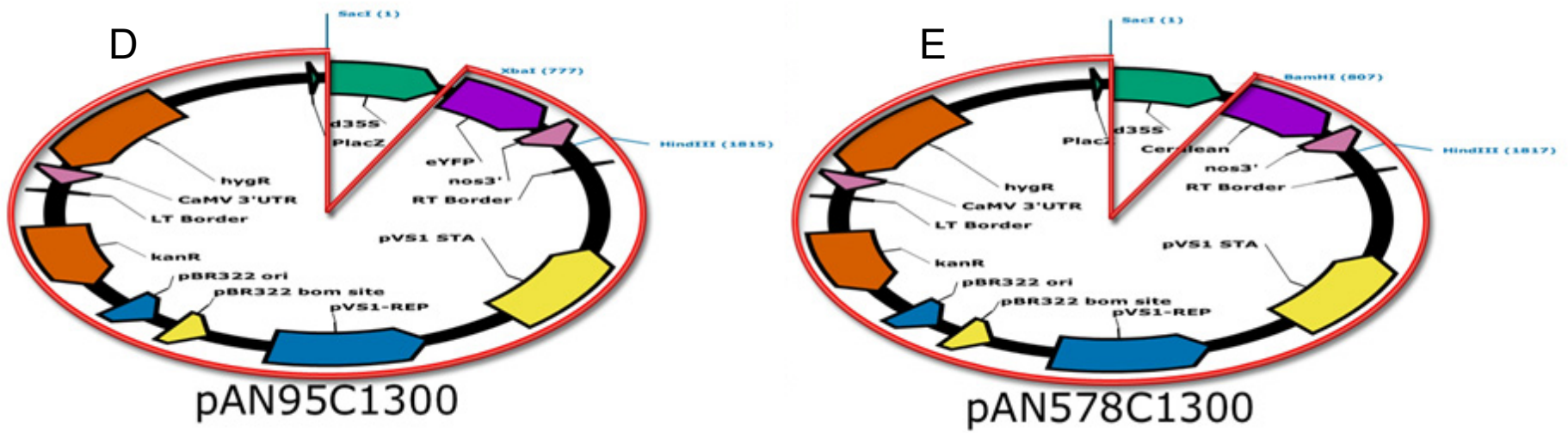


Figura 4.2 – Plásmidos de expresión de las clorofilasas fusionadas a proteínas fluorescentes.

(A) y (C) regiones genómicas de *A. thaliana* donde se localizan los genes de las clorofilasas ATCHL1 y ATCHL2, respectivamente; se indica con barras negras el segmento amplificado con los *primers* utilizados para cada gen.

(B) y (D) segmento genómico amplificado junto al sitio del vector binario en el cual fue insertado para obtener las clorofilasas fusionadas a las proteínas fluorescentes, bajo la regulación de sus propios promotores.

Los esquemas de los distintos vectores fueron realizados con el *software* gratuito *PlasmaDNA* ([Angers-Loustau et al. 2007](#)). Los esquemas de los segmentos genómicos fueron realizados con la herramienta *on-line* gratuita *FancyGENE* ([Rambaldi & Ciccarelli 2009](#)).

Figura 4.2

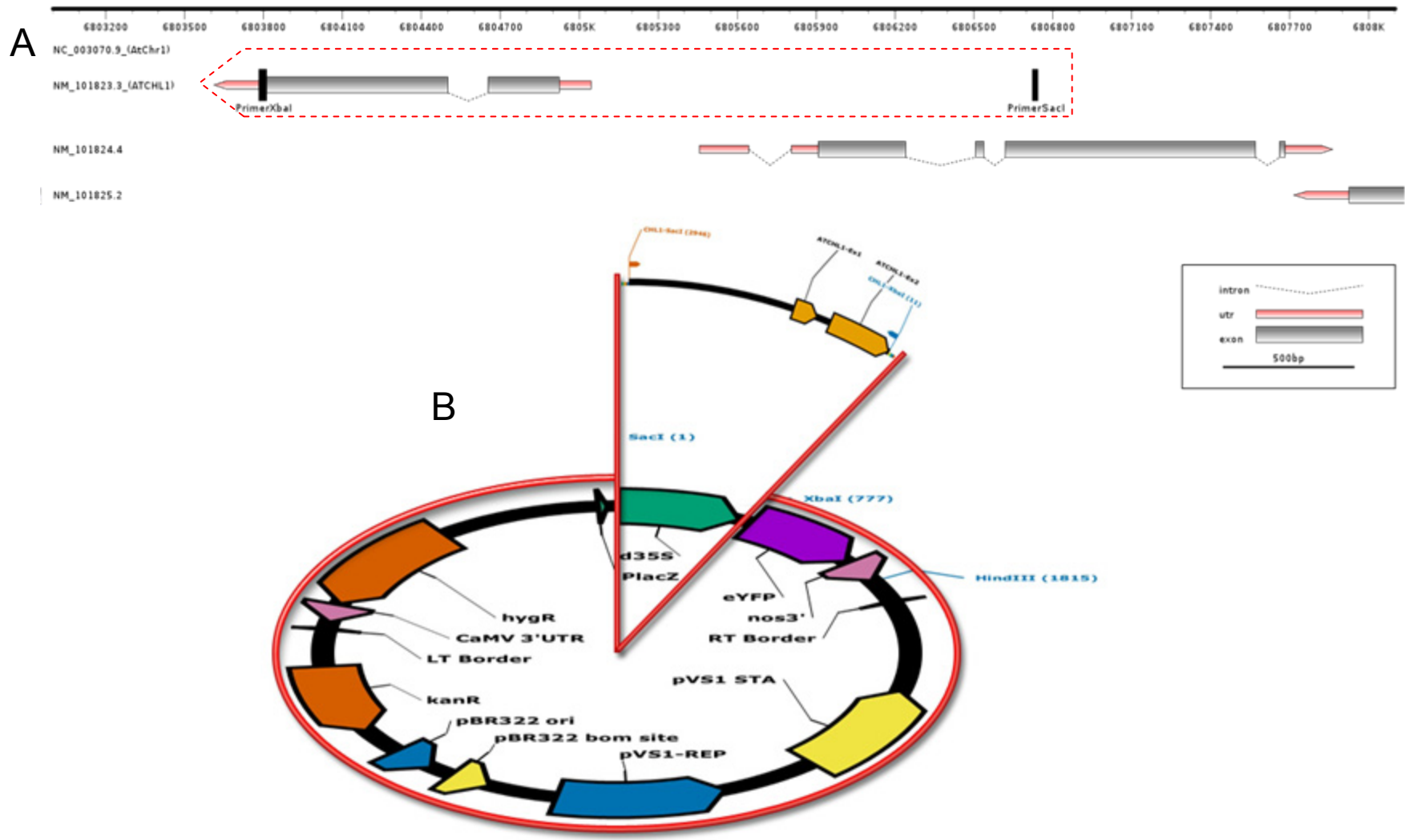


Figura 4.2

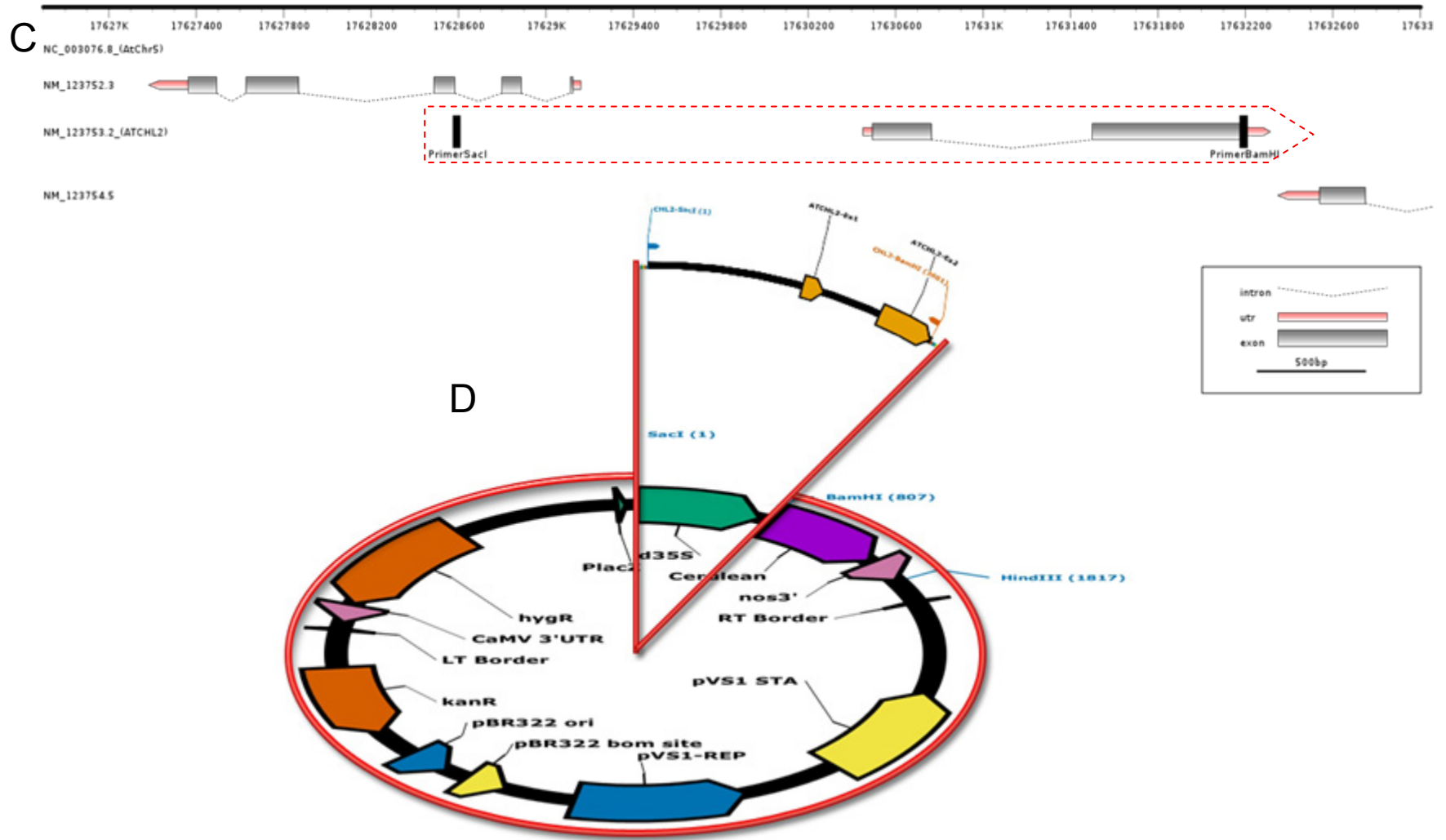


Figura 4.3 – Actividad clorofilasa de hojas cortadas de *Arabidopsis* de los cuatro genotipos.

(A) actividades agrupadas según los días en oscuridad. (B) actividades agrupadas según genotipo.

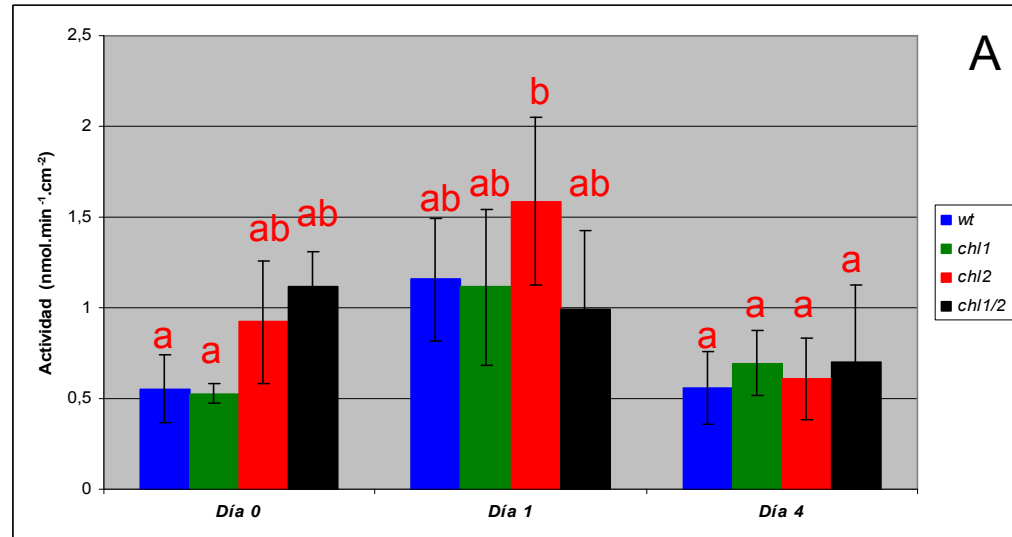
Las plantas fueron cultivadas a día corto en cámaras de cultivo a  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 62 días.

Las barras verticales en los gráficos representan el error estándar. Se indica con letras *a/b* los grupos homogéneos estadísticamente (*LSD*  $\alpha=0,05$ ), teniendo en cuenta las variables *Día* y *Genotipo*.

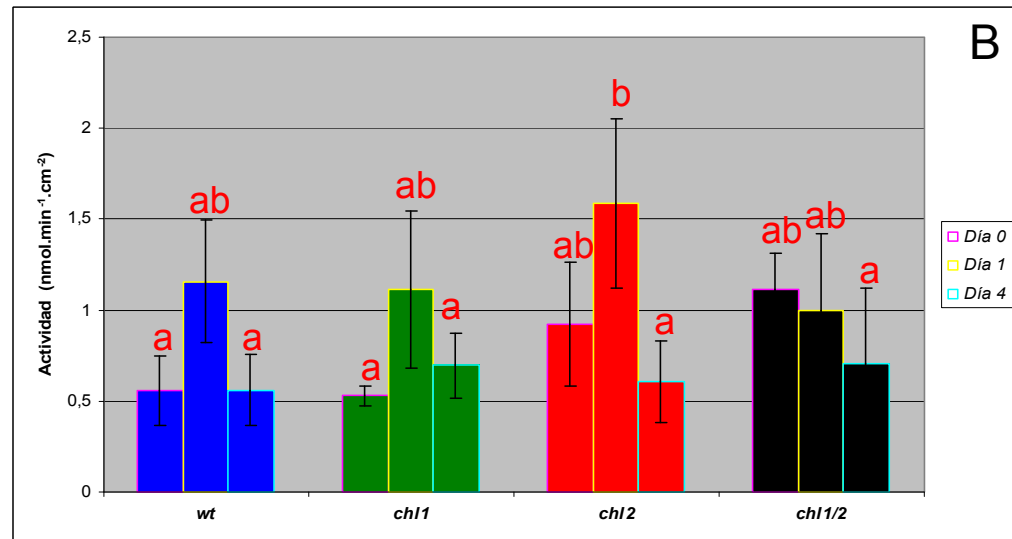


Figura 4.3

Agrupados por Día



Agrupados por Genotipo



Hojas cortadas y colocadas en oscuridad

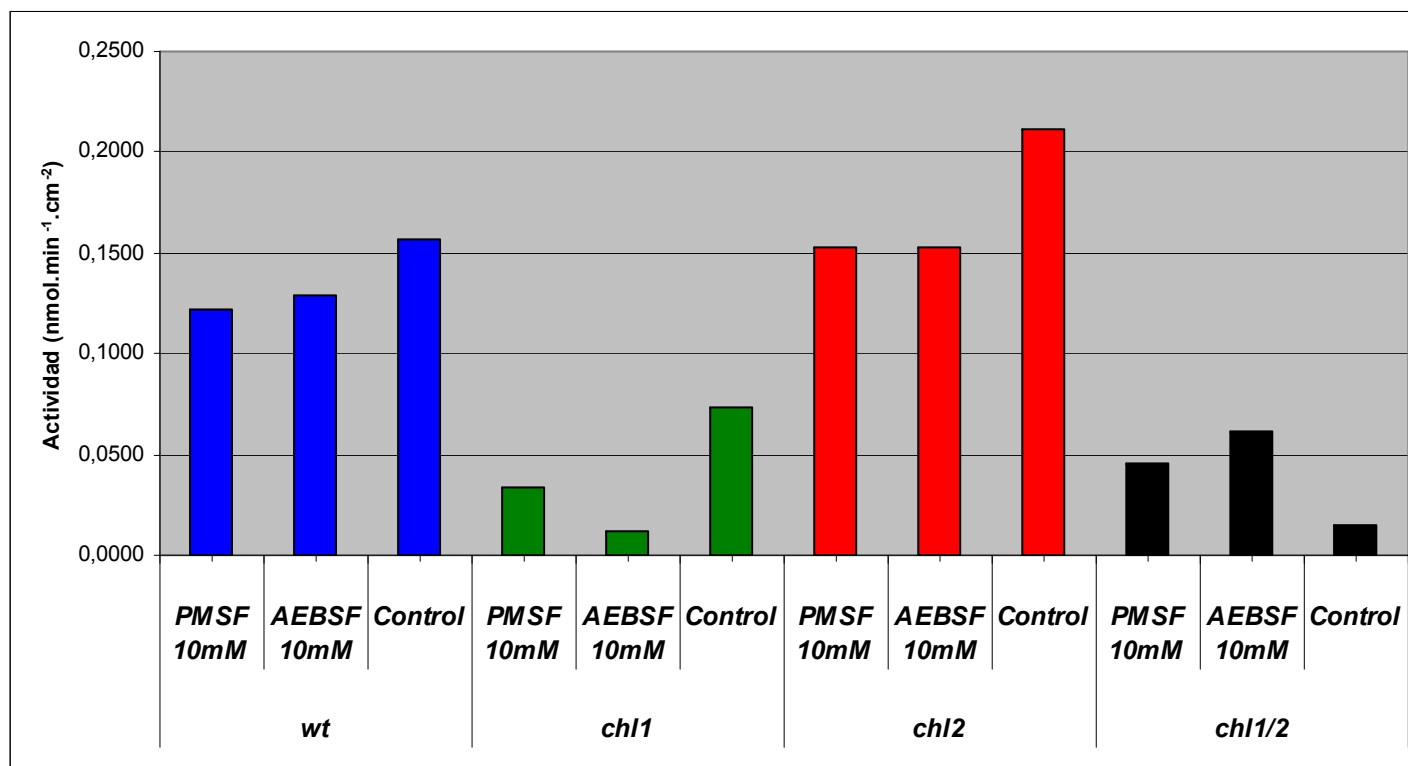
a/b Grupos Homogéneos (LSD  $\alpha=0,05$ )

Figura 4.4 – Actividad clorofilasa de hojas cortadas de *Arabidopsis* con inhibidores de hidrolasas.

Se muestra la actividad clorofilasa de una hoja (no-senescente) de plantas de las líneas mutantes y silvestre, empleando en cada ensayo inhibidores de hidrolasas serínicas, PMSF o AEBSF.

Las plantas fueron cultivadas a día corto en cámaras de cultivo a  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 62 días.

Figura 4.4



Actividad de clorofilasa  
con inhibidores

Figura 4.5 – Contenido de clorofila y clorofilido en *Arabidopsis*.

(A) y (C) contenido de clorofila total ( $a+b$ ) en hojas de las líneas silvestre y mutantes de *Arabidopsis* durante la senescencia (A) inducida por oscuridad en hojas cortadas, y (C) en hojas unidas a la planta a día corto.

(B) y (D) contenido de clorofilido  $a$  en hojas de las líneas silvestre y mutantes de *Arabidopsis* durante la senescencia (B) inducida por oscuridad en hojas cortadas, y (D) hojas unidas a la planta a día corto.

(E) y (F) relación clorofilido  $a$  / clorofila total ( $a+b$ ) en hojas de las líneas silvestre y mutantes de *Arabidopsis* durante la senescencia (E) inducida por oscuridad en hojas cortadas, y (F) en hojas unidas a la planta a día corto.

En las determinaciones de hojas cortadas (A, B, E) se emplearon hojas de plantas de 62d cultivadas a  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de día corto. En las determinaciones de hojas unidas a la planta (C, D, F), las mismas fueron cultivadas a  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de día corto.

Las barras verticales representan el error estándar. Se indica con letras  $a/b/c$  los grupos homogéneos estadísticamente ( $LSD \alpha=0,05$ ), analizados según *Genotipo* (para cada día).

Figura 4.5

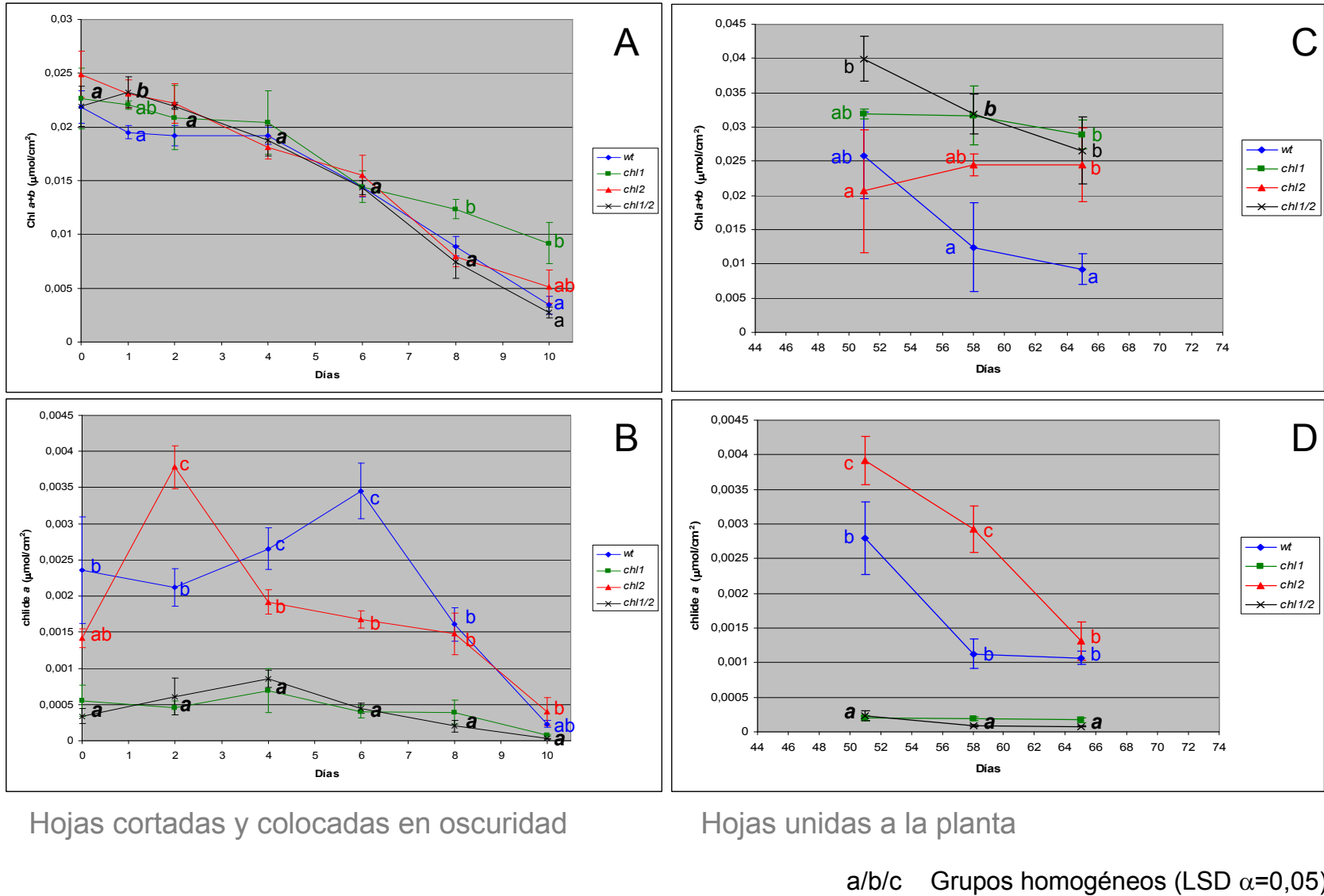
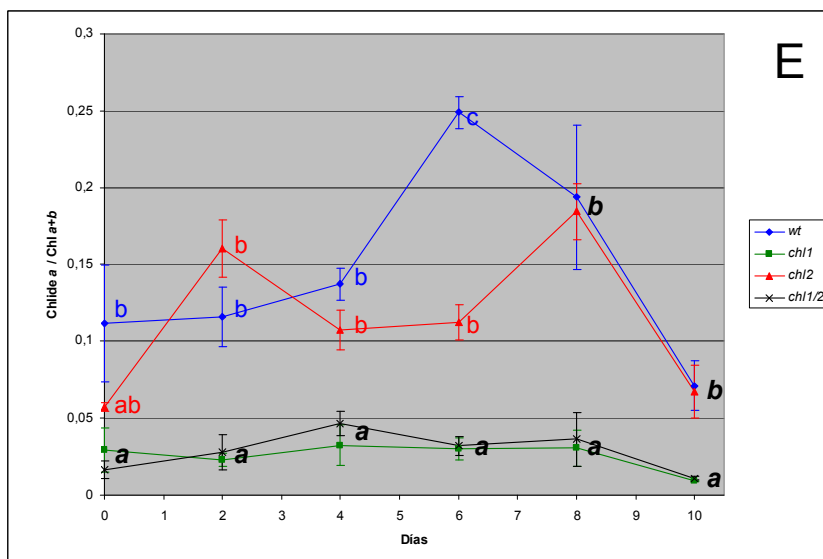
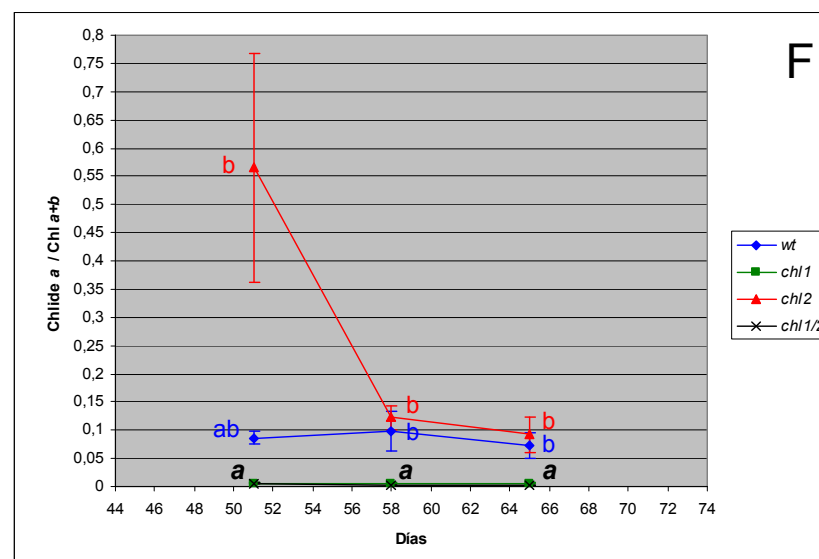


Figura 4.5



Hojas cortadas y colocadas en oscuridad



Hojas unidas a la planta

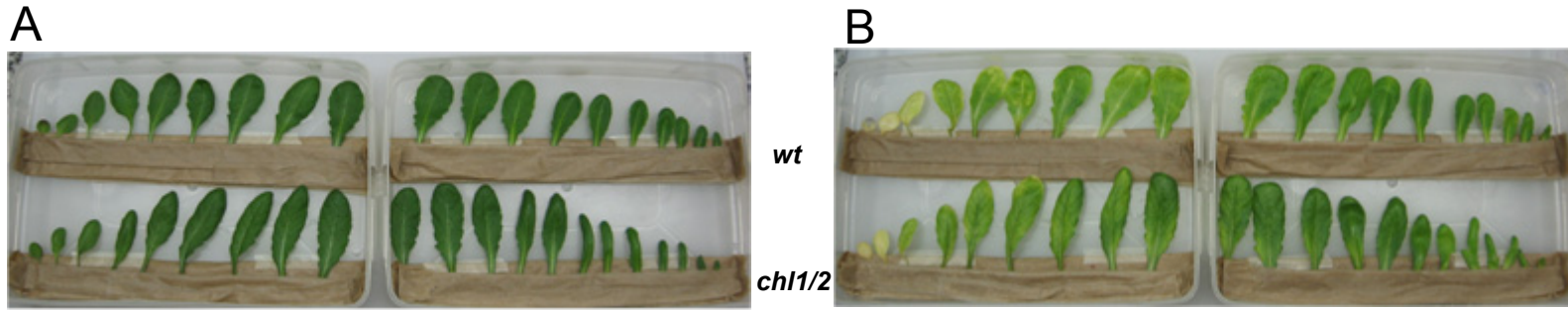
a/b/c Grupos homogéneos (LSD  $\alpha=0,05$ )

Figura 4.6 – Senescencia inducida por oscuridad en todas las hojas de la roseta.

(A) y (B) imágenes de las hojas *impares* cortadas de una planta de *Arabidopsis* para las líneas silvestre (fila superior) y doble mutante (fila inferior), al momento de cortarlas (A) y luego de permanecer en oscuridad (B) durante 7 días. Se emplearon plantas de 38d cultivadas a  $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de día corto.

En (C) se muestra valores del colorímetro SPAD (barras verticales) para cada hoja luego del tratamiento de oscuridad, y la longitud de cada hoja (líneas).

Figura 4.6



Hojas cortadas y colocadas en oscuridad

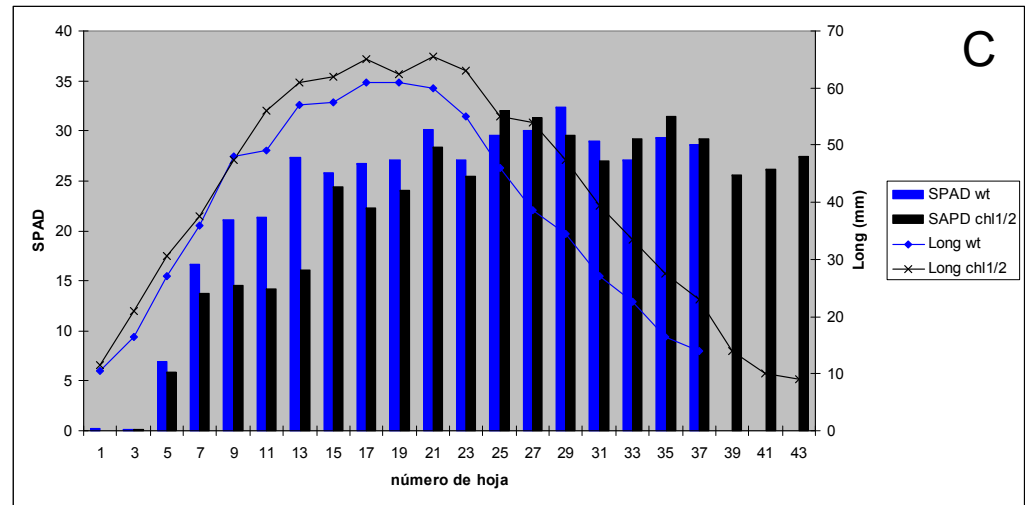


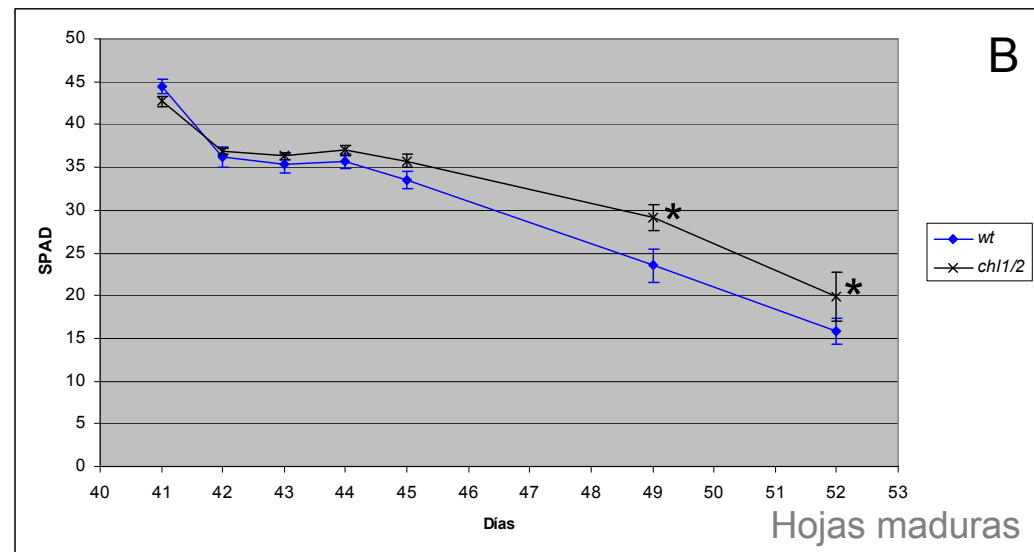
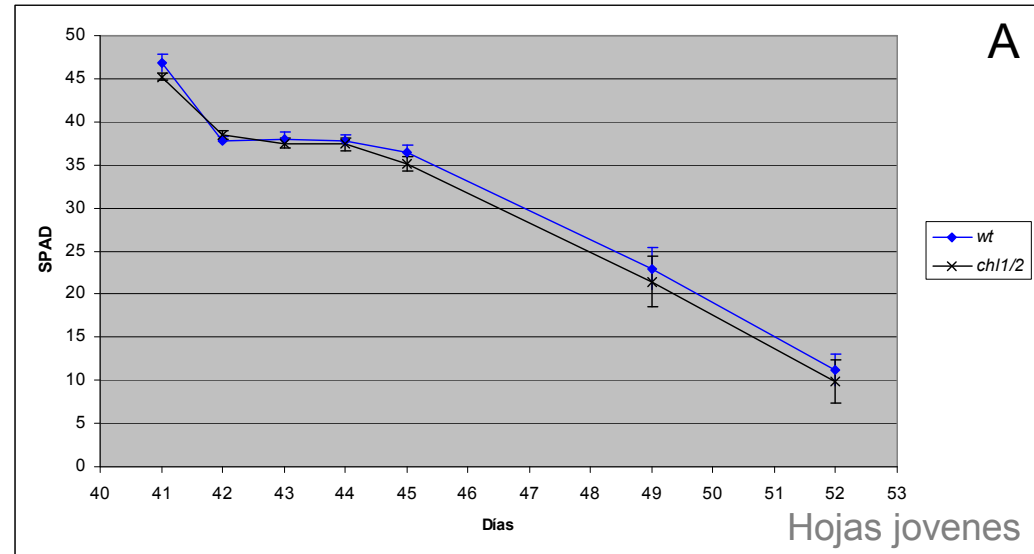


Figura 4.7 – Senescencia inducida por oscuridad en hojas unidas a la planta.

(A) y (B) valores de SPAD para hojas de las líneas silvestre y doble mutante, cubiertas con papel de aluminio y mantenidas unidas a la planta. En (A) se empleó la 30ª hoja y en (B) la 20ª hoja, considerándolas al momento de iniciar el ensayo como hojas jóvenes y maduras, respectivamente. Se emplearon plantas cultivadas a  $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de día corto.

Las barras verticales en los gráficos representan el error estándar. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $LSD \alpha=0,05$ ). La escala de las abscisas representa los días desde la germinación.

Figura 4.7



Hojas tapadas, unidas a la planta

\* Diferente significativamente (LSD  $\alpha=0,05$ )

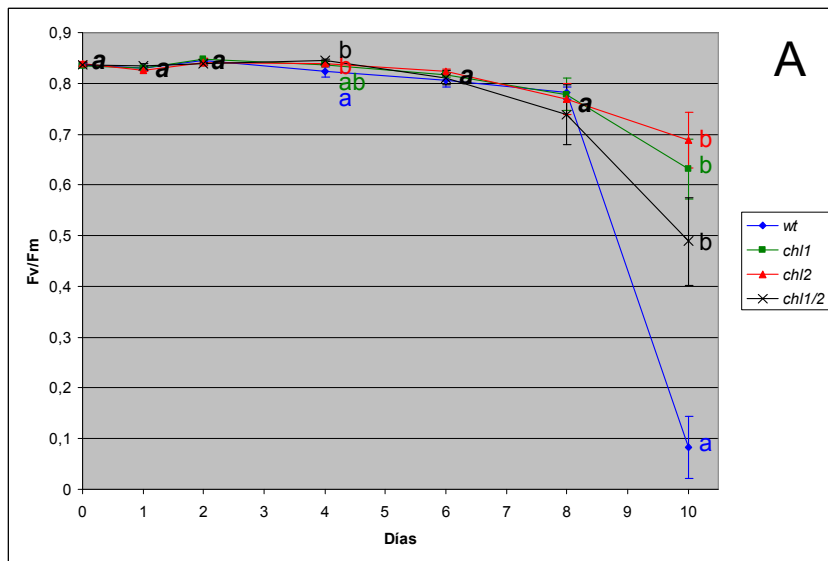
Figura 4.8 – Rendimiento cuántico potencial del Fotosistema II ( $F_v/F_m$ ).

(A)  $F_v/F_m$  de hojas cortadas y colocadas en oscuridad de las líneas mutantes de *Arabidopsis*. Se emplearon hojas de plantas de 62d cultivadas a  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de día corto.

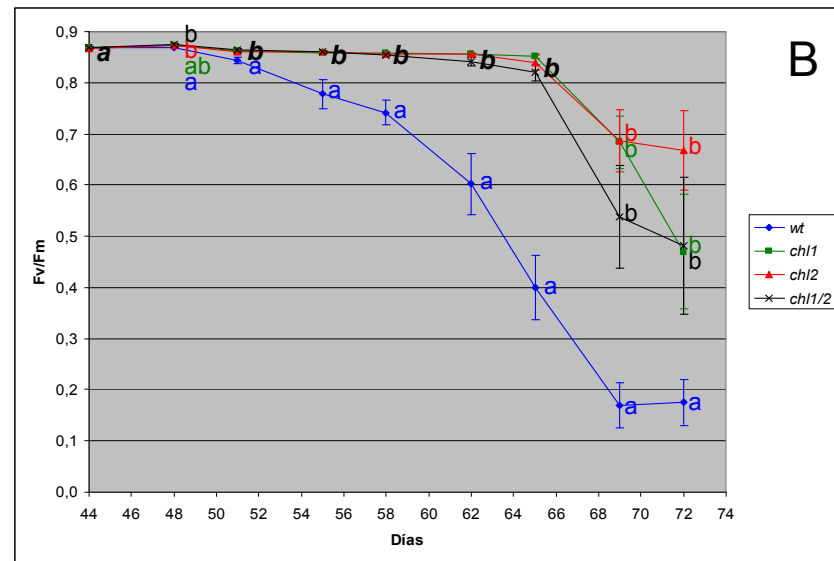
(B)  $F_v/F_m$  de la 15ª hoja, mantenida adherida a la planta. Se emplearon plantas cultivadas a  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de día corto.

Las barras verticales representan el error estándar. Se indica con letras *a/b* los grupos homogéneos estadísticamente ( $LSD \alpha=0,05$ ), analizados según *Genotipo* (para cada día).

Figura 4.8



Hojas cortadas y colocadas en oscuridad



Hojas unidas a la planta

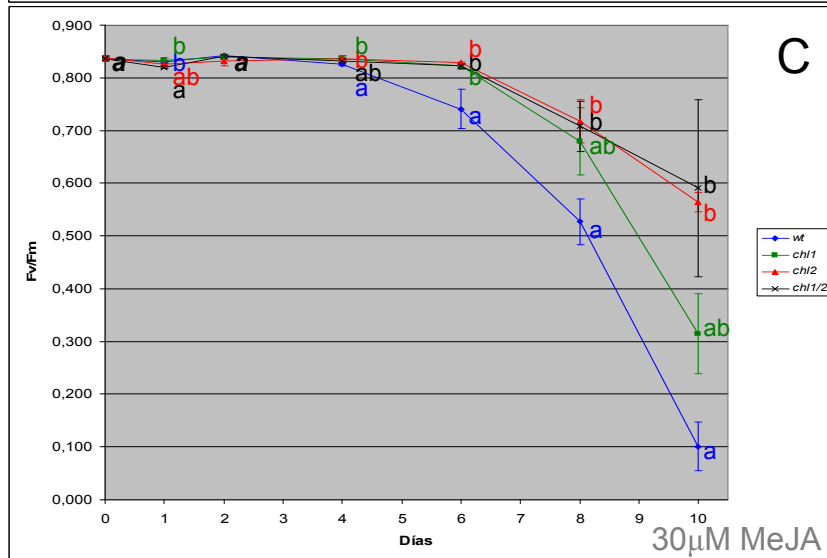
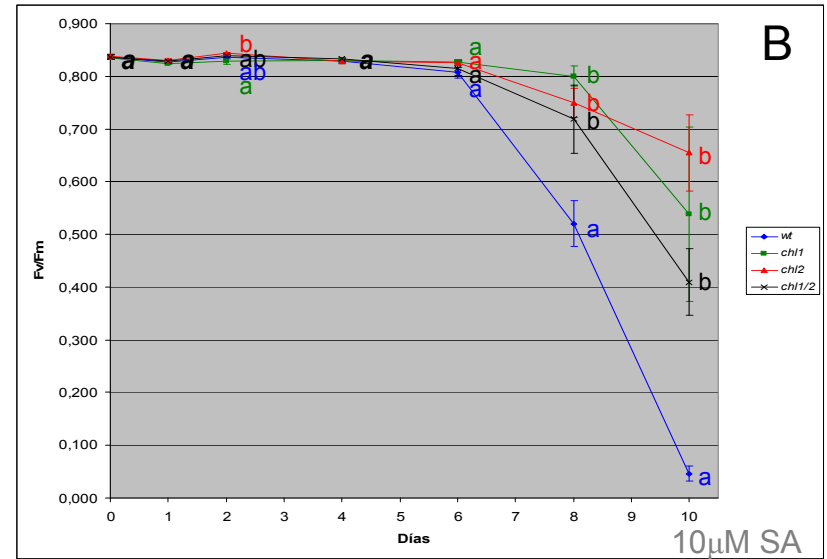
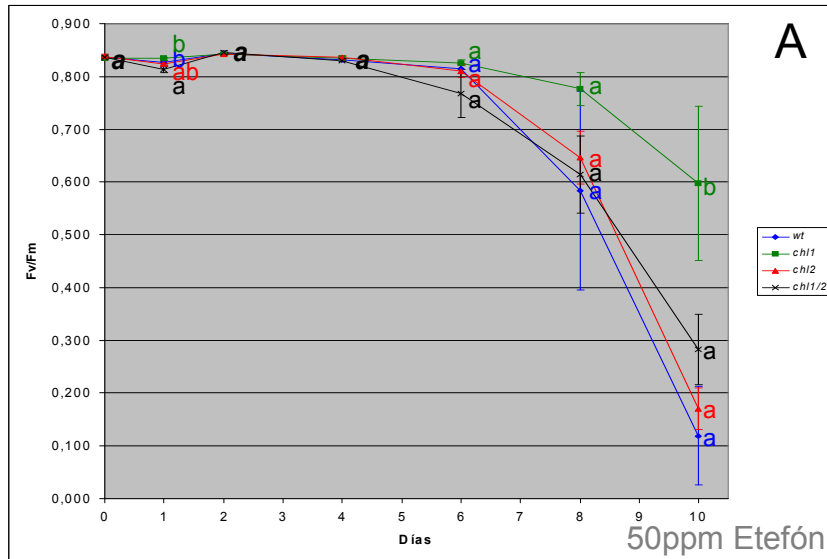
a/b Grupos Homogéneos (LSD  $\alpha=0,05$ )

Figura 4.9 – Rendimiento cuántico potencial del Fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) en hojas tratadas con hormonas.

Determinaciones de  $F_v/F_m$  en hojas cortadas y colocadas en oscuridad de las líneas mutantes de *Arabidopsis* tratadas con (A) Etefón, (B) Ácido Salicílico, (C) Jasmonato de Metilo. Se emplearon hojas de plantas de 62d cultivadas a  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de día corto.

Las barras verticales representan el error estándar. Se indica con letras *a/b* los grupos homogéneos estadísticamente ( $LSD \alpha=0,05$ ), analizados según *Genotipo* (para cada día).

Figura 4.9



Hojas cortadas, con aplicación de hormonas y colocadas en oscuridad

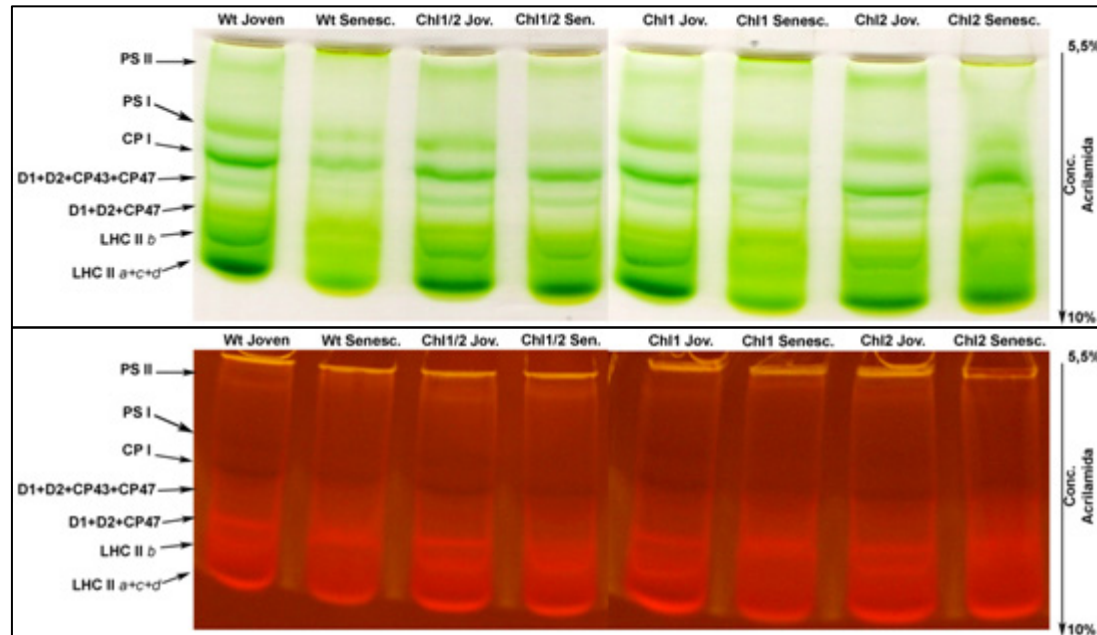
a/b Grupos Homogéneos (LSD  $\alpha=0,05$ )

Figura 4.10 – *Geles Verdes* de proteínas tilacoidales de *Arabidopsis*.

Se observan en el panel superior las bandas de los distintos complejos clorofila-proteína de los tilacoides de plantas de las líneas mutantes y silvestre. Se tomaron las hojas ~20<sup>a</sup>-30<sup>a</sup> (maduras o jóvenes) de plantas de 62d posgerminación, y 88d (senescentes), cultivadas a  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de día corto. En cada foseta se sembró una cantidad de clorofila equivalente a  $100\text{mm}^2$  de área foliar. En el panel inferior, se observa la fluorescencia al UV de la clorofila en los complejos.

A la izquierda se indica la identidad de los complejos, y a la derecha la concentración de acrilamida en el gel.

Figura 4.10



**“Geles Verdes” de Deriphat®-PAGE**

*Panel Superior:* Imagen del gel verde

*Panel Inferior:* Imagen del mismo gel verde en el UV.

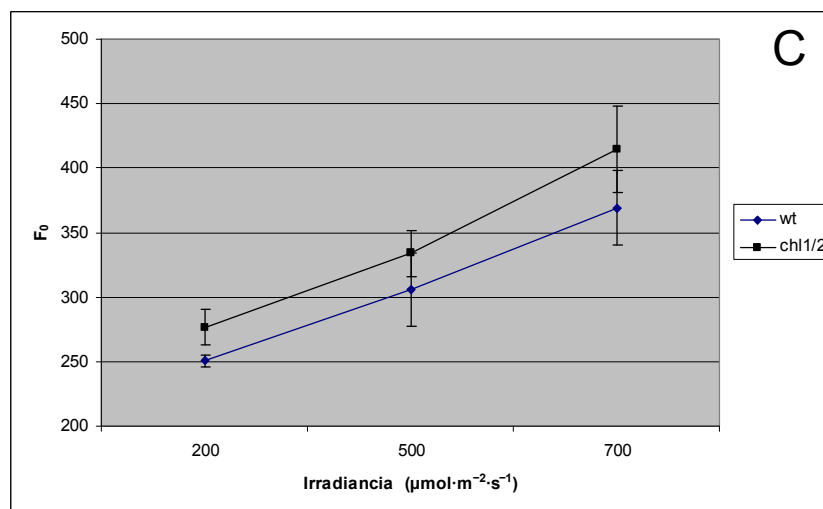
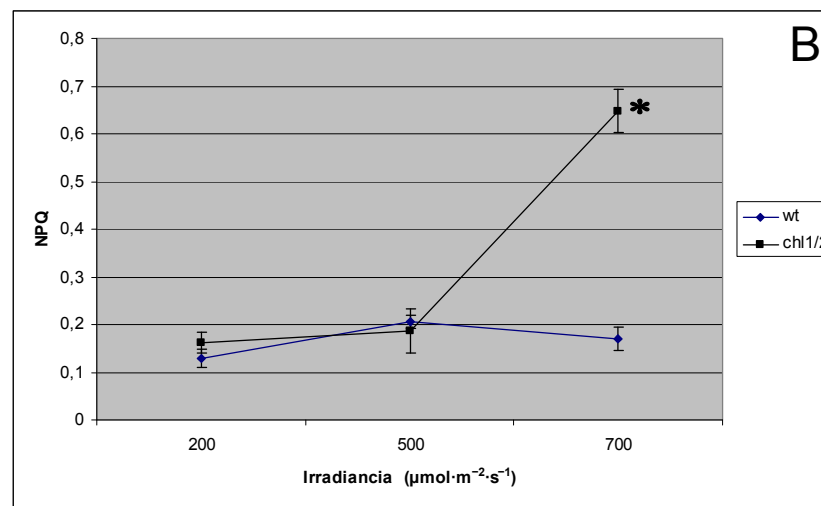
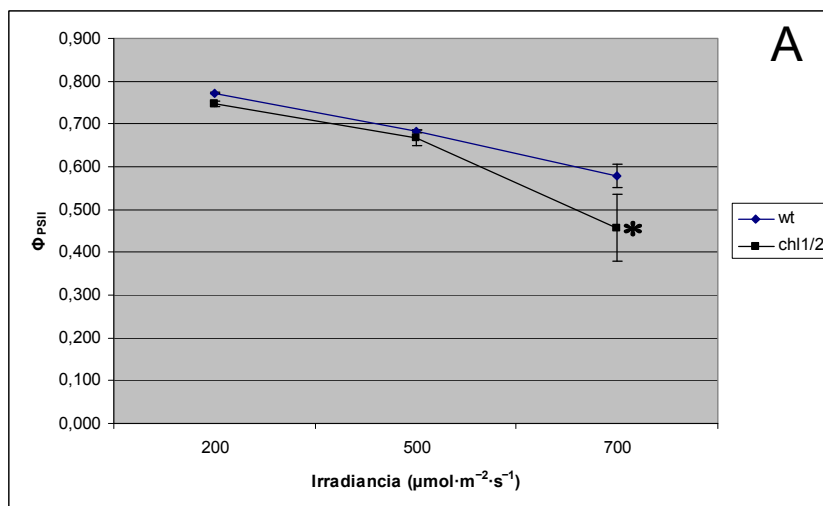


Figura 4.11 – Fluorescencia Modulada de la clorofila en *Arabidopsis*.

(A) rendimiento cuántico del Fotosistema II ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), (B) mitigación no-fotoquímica (NPQ), y (C) fluorescencia basal en oscuridad ( $F_0$ ) de la línea silvestre y doble mutante a tres irradiancias. Se emplearon hojas de plantas de 44d cultivadas a  $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperíodo de día corto.

Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas (*LSD*  $\alpha=0,05$ ).

Figura 4.11



Hojas unidas a la planta

\* Diferente significativamente (LSD  $\alpha=0,05$ )

Figura 4.12 – Cromatogramas HPLC de hojas de *Arabidopsis*.

Cromatogramas HPLC de los pigmentos detectados por su absorbancia a 667nm, extraídos del homogeneizado de hojas de *Arabidopsis*, y de las cuales se aislarán las VAS. Se emplearon hojas cortadas y colocadas en oscuridad durante 2 días, de plantas cultivadas a día corto en cámaras a  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 50 días.

Los picos señalados corresponden a 1- clorofilido *a* (Chlide *a*), 2- clorofilido *b* (Chlide *b*), 3- feofórbido *b* (Pheide *b*), 4- feofórbido *a* (Pheide *a*), 5- clorofila *b* (Chl *b*), 6-  $13^2\text{OH}$ -clorofila *a* ( $13^2\text{OH}$ -Chl *a*), 7- clorofila *a* (Chl *a*) y 8- feofitina *a* (Phein *a*).

Se indican con colores diferentes los cromatogramas correspondientes a cada genotipo.

Figura 4.12

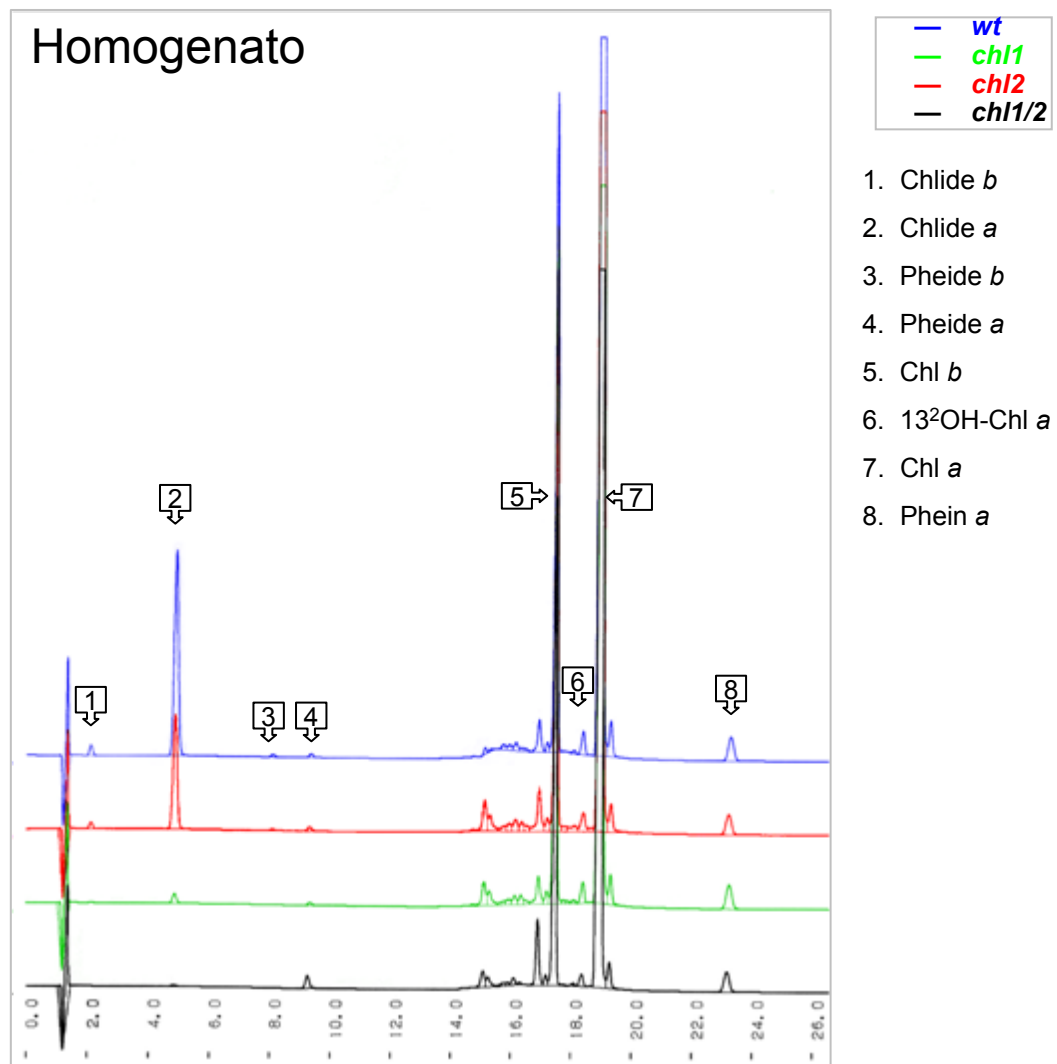


Figura 4.13 – Cromatogramas HPLC de las VAS de *Arabidopsis*.

Cromatogramas HPLC de (A) las VAS aisladas (0h) y (B) luego de ser incubadas en oscuridad a 30°C durante 6h.

Los picos señalados corresponden a 1- clorofilido *a* (Chlide *a*), 2- clorofilido *b* (Chlide *b*), 3- feofórbido *b* (Pheide *b*), 4- feofórbido *a* (Pheide *a*), 5- clorofila *b* (Chl *b*), 6-  $^{13}\text{C}$ -clorofila *a* ( $^{13}\text{C}$ -Chl *a*), 7- clorofila *a* (Chl *a*) y 8- feofitina *a* (Phein *a*).

Se indican con colores diferentes los cromatogramas correspondientes a cada genotipo.

Figura 4.13

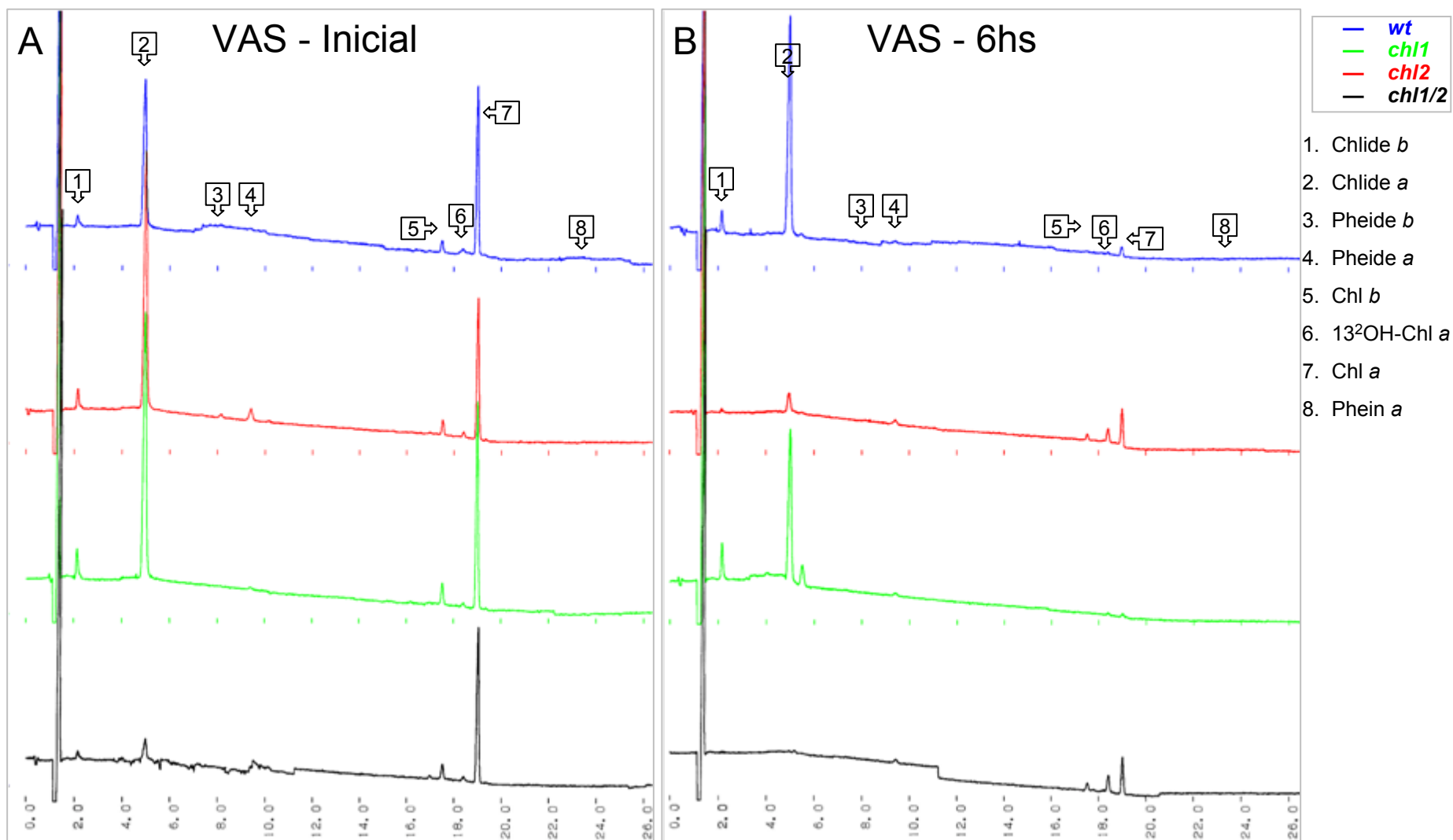
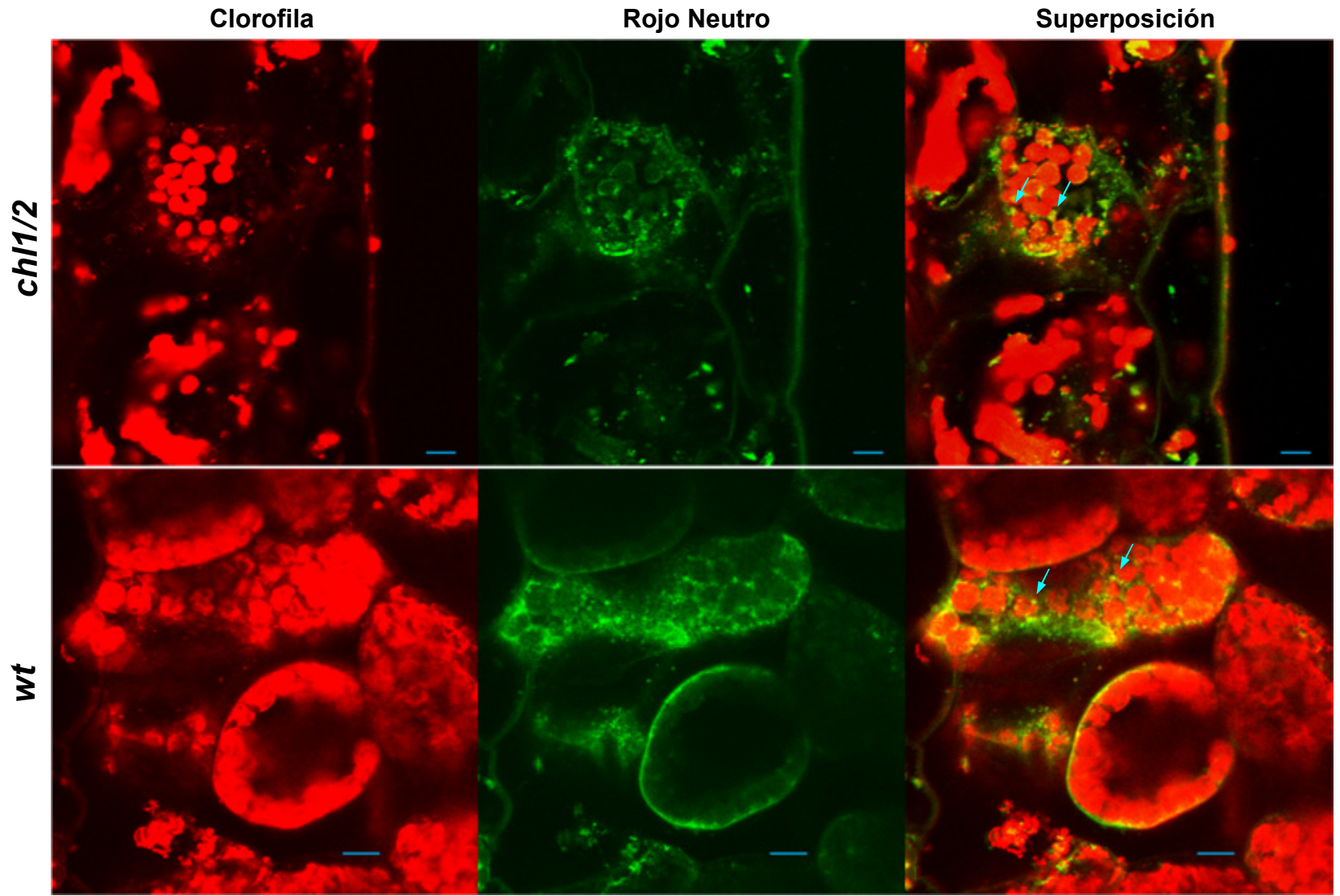


Figura 4.14 – Imagen en microscopio confocal de hojas senescentes de *Arabidopsis*.

En la imagen se observa una sección de tejido foliar senescente de la línea doble mutante (paneles superiores) y silvestre (paneles inferiores). Se muestra la fluorescencia de la clorofila en rojo (izquierda), de Rojo Neutro en verde (centro), y a la derecha la superposición de ambas señales de fluorescencia, donde se indica con las flechas algunas VAS conteniendo clorofila y el marcador Rojo Neutro.

La barra (azul) representa 10 $\mu$ m.

Figura 4.14



Barra 10  $\mu\text{m}$   
Imagen tomada en  
Zeiss LSM 510 Meta  
(CREG)

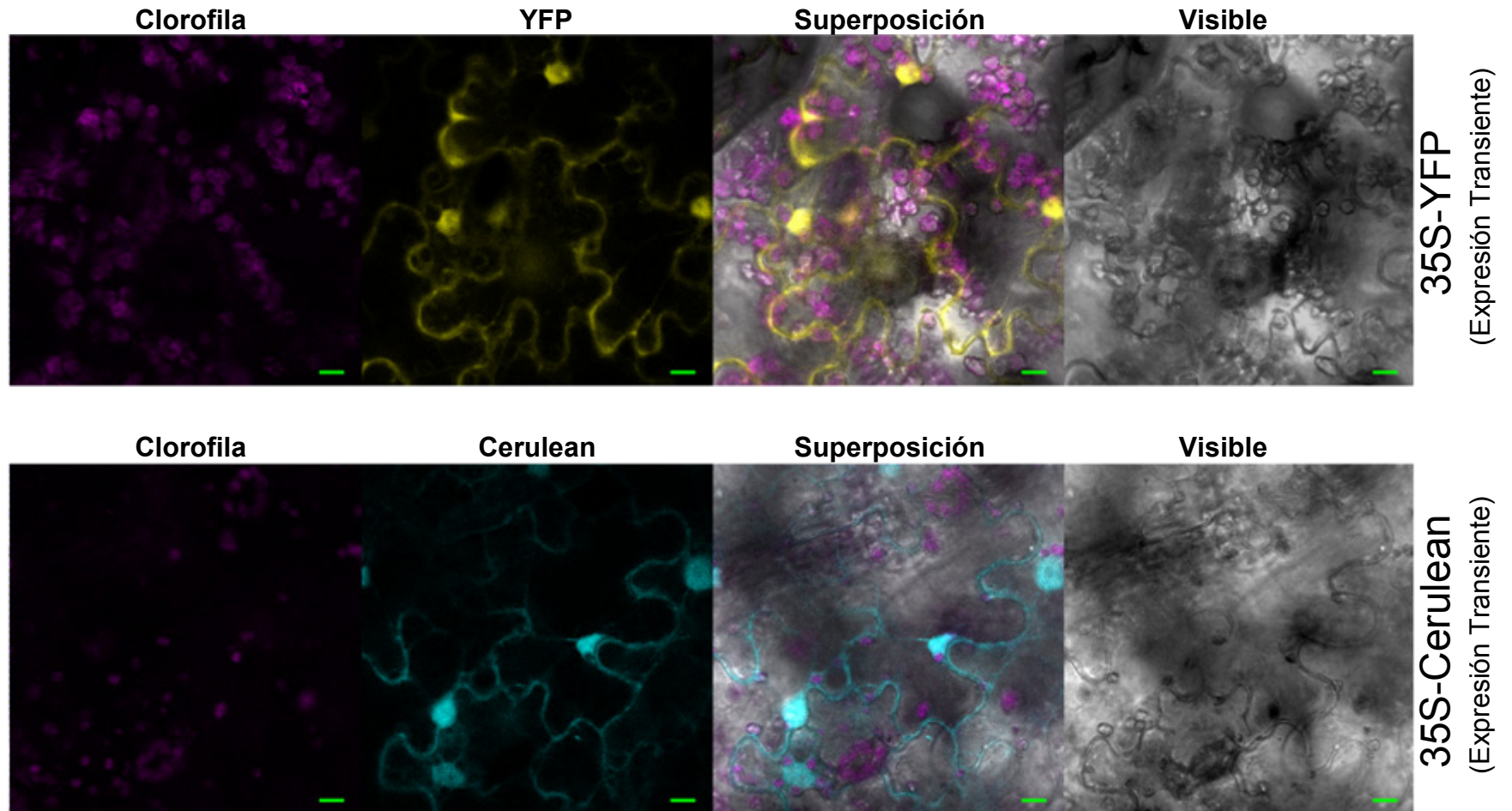


Figura 4.15 – Imagen en microscopio confocal de las proteínas Cerulean e YFP.

Se observan en las imágenes la fluorescencia de las proteínas fluorescentes YFP (paneles superiores) y Cerulean (paneles inferiores), expresadas en forma transiente bajo control del promotor *35S* en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Los paneles de la derecha muestran la imagen transmitida con luz blanca.

La barra (verde) representa 10 $\mu$ m.

Figura 4.15



Barra 10  $\mu\text{m}$

Imagen tomada en Leica TCS  
SP5 (Exactas-UNLP)

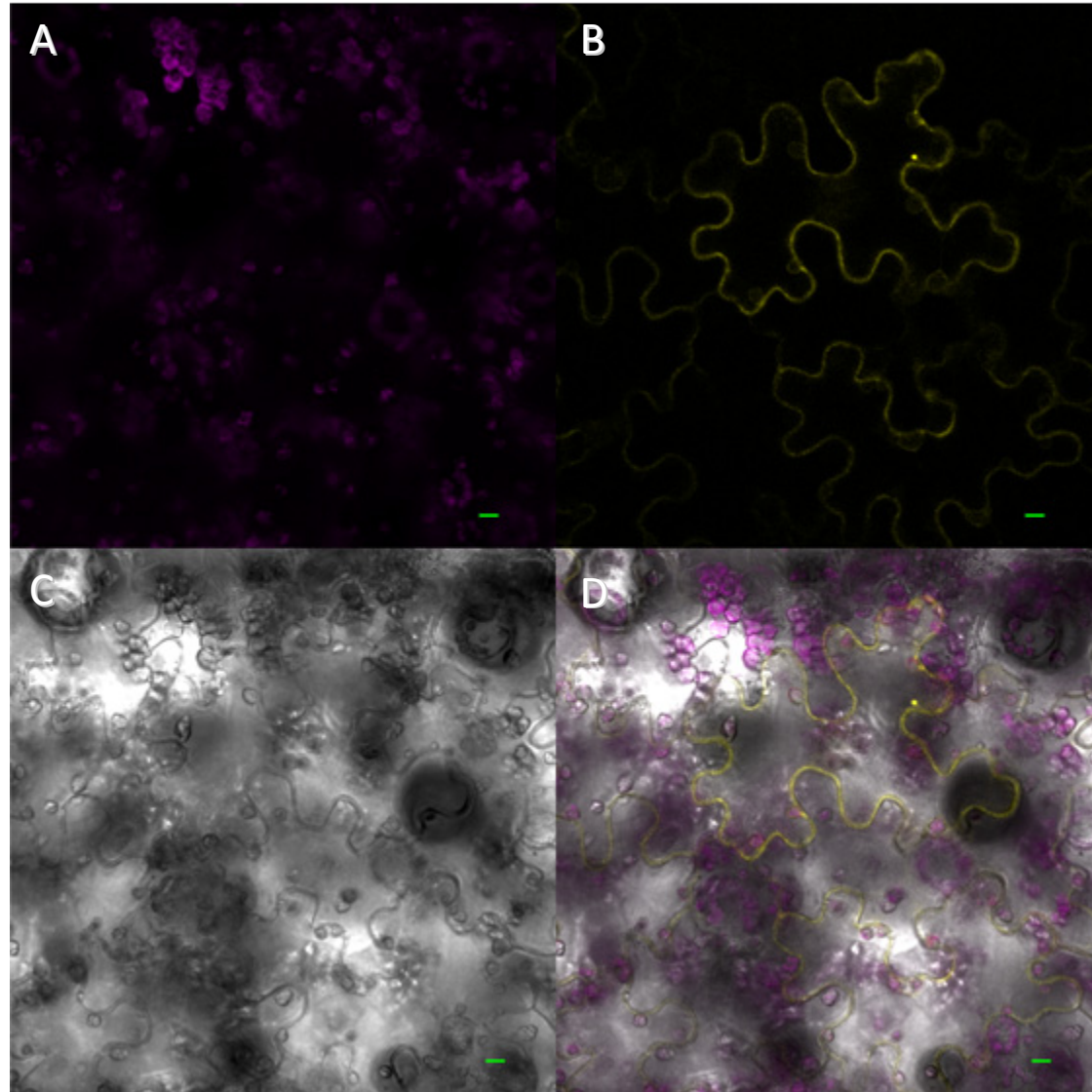
Figura 4.16 – Imagen en microscopio confocal de la proteína ATCHL1::YFP.

Se observan en las imágenes la fluorescencia de la proteína ATCHL1 fusionada a YFP, expresada en forma transiente bajo el control de su propio promotor en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Los paneles muestran la fluorescencia de la clorofila (A), la fluorescencia de YFP (B), la imagen transmitida con luz blanca (C), y la superposición de las imágenes (D).

La barra (verde) representa 10 $\mu$ m.

Figura 4.16

**CHL1-YFP**  
(expresión transiente)



Barra 10  $\mu\text{m}$

Imagen tomada en Leica TCS  
SP5 (Exactas-UNLP)

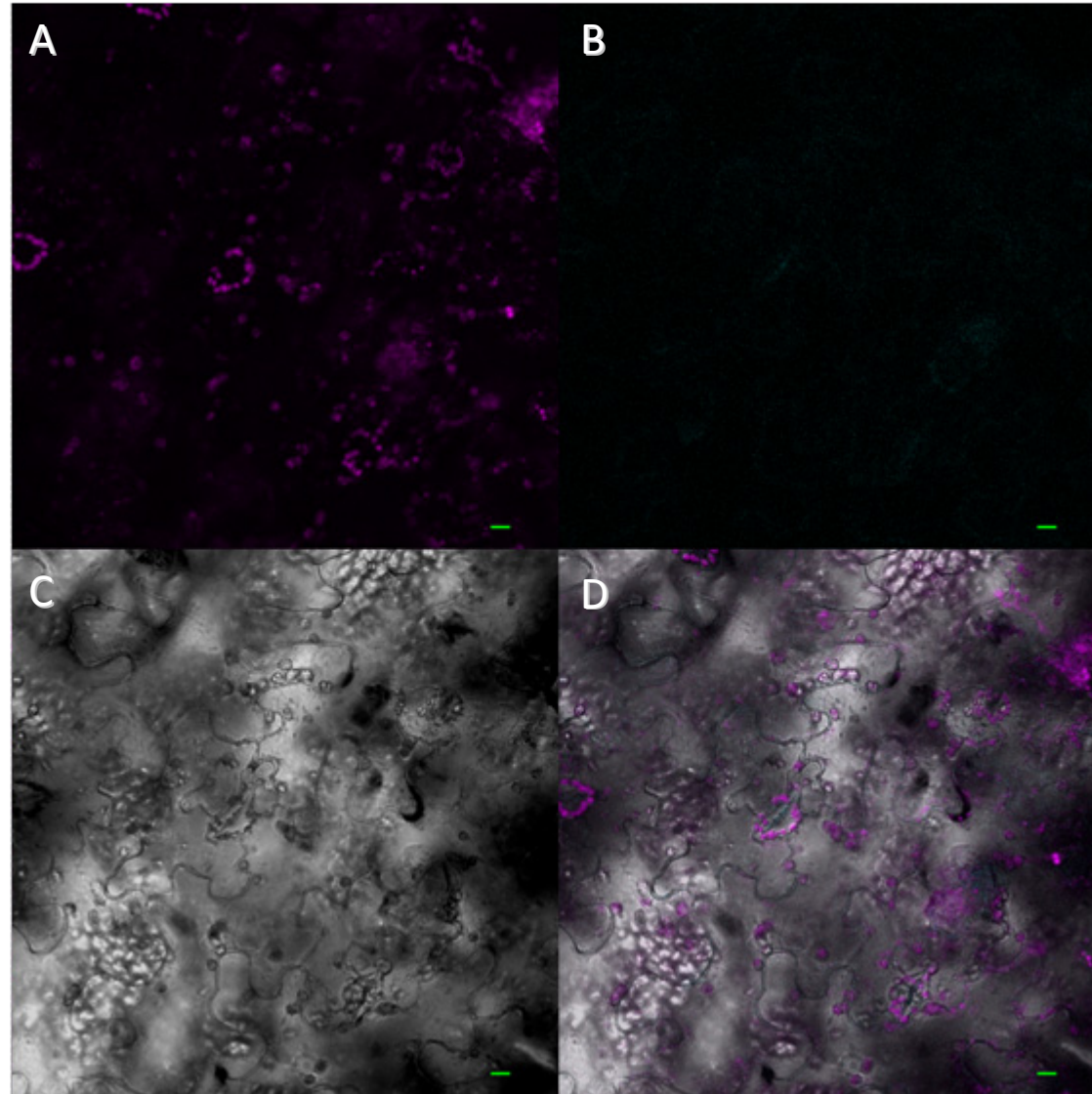
Figura 4.17 – Imagen en microscopio confocal de la proteína ATCHL2::Cerulean.

Se observan en las imágenes la fluorescencia de la proteína ATCHL2 fusionada a Cerulean, expresada en forma transiente bajo el control de su propio promotor en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Los paneles muestran la fluorescencia de la clorofila (A), la fluorescencia de Cerulean (B), la imagen transmitida con luz blanca (C), y la superposición de las imágenes (D).

La barra (verde) representa 10µm.

Figura 4.17

**CHL2-Cerulean**  
(expresión transiente)



Barra 10  $\mu\text{m}$

Imagen tomada en Leica TCS  
SP5 (Exactas-UNLP)

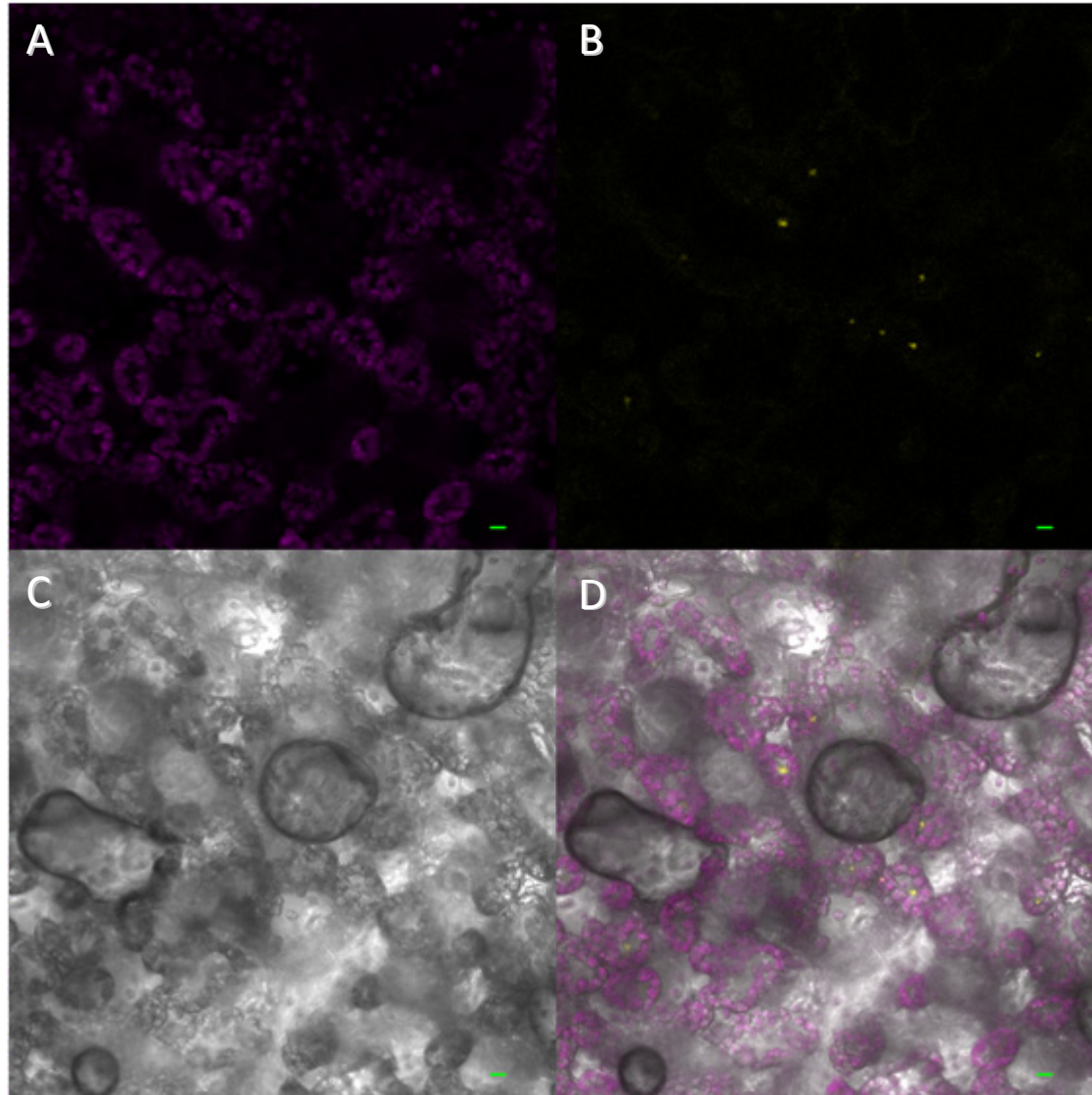
Figura 4.18 – Imagen en microscopio confocal de la proteína ATCHL1::YFP (expresión estable).

Se observan en las imágenes la fluorescencia de la proteína ATCHL1 fusionada a YFP, expresada en forma estable bajo el control de su propio promotor en hojas de plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum*. Los paneles muestran la fluorescencia de la clorofila (A), la fluorescencia de YFP (B), la imagen transmitida con luz blanca (C), y la superposición de las imágenes (D).

La barra (verde) representa 10 $\mu$ m.

Figura 4.18

**CHL1-YFP**  
(expresión estable)



Barra 10  $\mu$ m

Imagen tomada en Leica TCS  
SP5 (Exactas-UNLP)



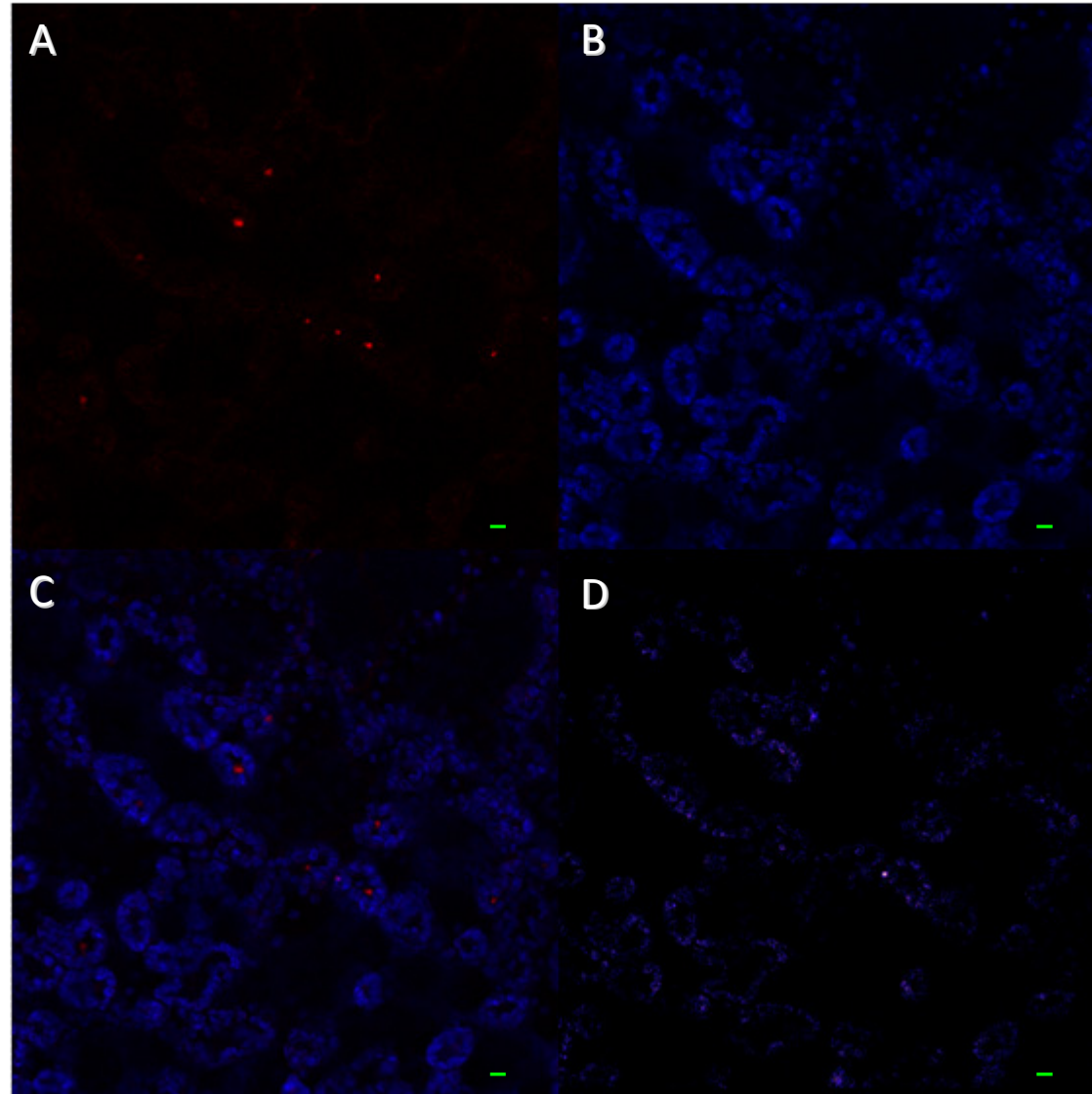
Figura 4.19 – Imagen en microscopio confocal de la proteína ATCHL1::YFP (expresión estable). Análisis de co-localización

Se observa en las imágenes la fluorescencia en hojas de plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* de la proteína ATCHL1 fusionada a YFP, expresada en forma estable bajo el control de su propio promotor. Los paneles muestran la fluorescencia de YFP (A), la fluorescencia de la clorofila (B), la superposición de las imágenes (C), y la co-localización de la señal de fluorescencia de YFP y clorofila (D). En este último panel (D) se muestra, con un gradiente de intensidad de colores, los valores positivos del *PDM* (*Product of the Differences from the Mean*) originados del *ICA* (*Intensity Correlation Analysis*), descritos por [Li et al. 2004](#).

La barra (verde) representa 10µm.

Figura 4.19

**CHL1-YFP**  
(expresión estable)



Barra 10  $\mu\text{m}$

Imagen tomada en Leica TCS  
SP5 (Exactas-UNLP)

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

### **Actividad de las clorofilasas en *Arabidopsis***

La degradación de clorofila, así como de las apoproteínas con las cuales forma los distintos complejos, es un tema que ha generado un creciente debate en los últimos años. Hasta poco tiempo atrás se consideraba que el único mecanismo posible por el cual todos los organismos fotosintéticos podían degradar clorofila se iniciaba por la remoción del fitol ([Hörtensteiner 2006, 2009](#)). Muy recientemente, la universalidad de este mecanismo ha sido puesto en duda, postulándose que el primer paso ocurre inicialmente por la remoción del  $Mg^{+2}$  y luego la enzima feofitina, remueve el fitol de la feofitina ([Schelbert et al. 2009](#)). Sin embargo, hasta este momento nunca se ha determinado *in vivo* la actividad de las clorofilasas u otra enzima con actividad de fitol-hidrolasa. En todas las determinaciones de la actividad enzimática *in vitro* se empleó algún tensioactivo (v.g. Triton X-100) o solvente (v.g. acetona) ([Liao et al. 2007](#); [Todorov et al. 2003](#)), es decir, condiciones alejadas de la realidad, y sólo algunas veces se procedió a una purificación parcial o total de la enzima ([Martinez et al. 1995](#); [McFeeters et al. 1971](#); [Trebitch et al. 1993](#); [Tsuchiya et al. 1997](#)). Así mismo, ensayos *in vitro* han mostrado que, si bien la clorofilasa posee mayor afinidad por la clorofila, también la feofitina puede ser su sustrato ([McFeeters 1975](#); [Schelbert et al. 2009](#)). Estas condiciones experimentales plantean interrogantes acerca de cuán representativo de lo que realmente ocurre en la célula vegetal es la determinación por las metodologías “tradicionales” o si puede tratarse de una actividad “artificial” ocasionada por la presencia de algún compuesto químico agregado al medio de reacción (*i.e.* detergentes o solventes) que actuaría a modo de “activador” de la enzima. Por lo tanto, si las líneas mutantes poseen niveles alterados del contenido de clorofilido *a*, como ocurre también en plantas transgénicas conteniendo ARNi para las clorofilasas ([Benedetti & Arruda 2002](#); [Chen et al. 2008](#); [Liao et al. 2007](#)), es posible que las clorofilasas participen en la degradación de clorofila durante la senescencia, o simplemente a través del mecanismo de reciclado (considerando que las mismas participarían en el “ciclo de la clorofila”, [Rüdiger](#)

[2002](#)) que pudiera desviarse hacia el catabolismo de la clorofila. Un mayor conocimiento sobre el mecanismo preponderante en la degradación de clorofila puede provenir de la identificación y caracterización del sustrato de la actividad  $Mg^{+2}$ -dequelatasa *in vivo*, discriminado si la remoción del  $Mg^{+2}$  ocurre antes o después de la escindir el fitol en *Arabidopsis thaliana* u otras especies, y de la caracterización de la secuencia y regulación del gen que codifica para la enzima con actividad  $Mg^{+2}$ -dequelatasa.

En muchos casos, la clonación de los genes de clorofilasas de distintas especies y la expresión (y purificación) de las mismas como proteínas recombinantes en sistemas heterólogos, ha conducido a la caracterización de la actividad asignada a estas enzimas ([Arkus et al. 2005](#); [Benedetti & Arruda 2002](#)), aunque ésta podría no ser la verdadera función *in vivo* de la enzima. Por ejemplo, hemos visto actividad clorofilasa *in vitro* aún en la línea doble mutante ([Fig. 4.3](#)), lo cual lleva a indagar si realmente existan otras enzimas con esta actividad enzimática “aparente” en las condiciones del ensayo, y que podrían ser la causa de actividades clorofilasa “erráticas” como en el caso de las determinaciones en las líneas mutantes para las clorofilasas ([Fig. 4.3](#)). En este sentido, en nuestro sistema experimental no hemos logrado inhibir la actividad clorofilasa ([Fig. 4.4](#)), mientras que con la enzima recombinante clonada sí lo ha sido ([Tsuchiya et al. 2003](#)), lo cual añade dudas al respecto de las determinaciones de la actividad clorofilasa *in vitro* por los procedimientos actualmente conocidos. Así mismo, teniendo en cuenta que en alguno de los fotocomplejos está presente la molécula de feofitina, es esperable que la enzima feofitinasas se “encargue” del catabolismo de este compuesto, pero en qué medida participa *in vivo* en la degradación de clorofila (previamente convertida a feofitina) en condiciones naturales de senescencia sigue siendo un interrogante, especialmente teniendo en cuenta que la enzima clorofilasa posee una alta capacidad para hidrolizar el fitol de la molécula de clorofila ([Aiamla-or et al. 2012](#)), y similar actividad y afinidad que la enzima feofitinasas para hidrolizar el fitol en la molécula de feofitina ([Aiamla-or et al. 2012](#); [Fiedor et al. 1992](#); [Schelbert et al. 2009](#)).

## Senescencia foliar en las líneas mutantes para las clorofilasas

Frecuentemente, dos de los parámetros más utilizados para evaluar el avance de la senescencia foliar son el contenido de clorofila total ([Noodén 2004](#)) y el rendimiento cuántico potencial del Fotosistema II, es decir,  $F_v/F_m$  ([Lichtenthaler & Babani 2004](#)). Si bien ambos parámetros reportan información que *a priori* estaría relacionada, el comportamiento de ambos parámetros durante la senescencia podría no ser similar. Diversos autores (v.g. [Miersch et al. 2000](#); [Oh et al. 2000](#)) han observado durante la senescencia una caída lineal del contenido de clorofila en las hojas, pero con una caída de  $F_v/F_m$  notoria con posterioridad, concluyendo que estos hechos ocurren debido a una degradación diferencial de los fotocomplejos, permaneciendo las unidades remanentes del Fotosistema II intactas sin ser degradado durante un tiempo más prolongado. Estas observaciones reportadas previamente, son concordantes con lo observado en este trabajo, donde la caída de  $F_v/F_m$  fue muy posterior al inicio de la pérdida de clorofila, tanto en senescencia inducida por oscuridad como en hojas unidas a la planta “senesciendo” normalmente ([Figs. 4.5 A y C](#), y [Figs. 4.8 A y B](#)). En cambio, en las líneas mutantes de *Arabidopsis* para las clorofilasas se observa un retraso en la senescencia foliar, evaluado tanto desde el punto de vista de la degradación de clorofila ([Figs. 4.5 A y C](#)) como a través de  $F_v/F_m$  ([Figs. 4.8 A y B](#)). Esto indica que ATCHL1 y ATCHL2 participan, ya sea directa o indirectamente, en el progreso de la senescencia foliar.

La degradación de clorofila durante la senescencia foliar *a priori* podría relacionarse en forma directa con la actividad de alguna de las enzimas clorofilasas, si la remoción del fitol fuera ineludiblemente la primera etapa en el catabolismo de clorofila. La vía degradación de clorofila podría variar según la especie vegetal, o el sistema experimental empleado, por ejemplo, hojas jóvenes y maduras de *Arabidopsis* no degradan clorofila con la misma velocidad ([Fig. 4.6](#) y [Fig. 4.7](#)). En este sentido, en *Arabidopsis thaliana* ([Schelbert et al. 2009](#)) y brócoli ([Büchert et al. 2011](#)) ha sido postulado que la remoción del fitol ocurriría en la segunda etapa de la degradación de clorofila (la primera etapa sería la remoción del  $Mg^{+2}$ ) mediada por la enzima feofitinasas, sin embargo en *Citrus spp.* ([Azoulay-Shemer et al. 2008](#); [Harpaz-Saad et al. 2007](#)) la clorofilasa sería la etapa limitante y la primera en iniciar la

degradación de clorofila. Por otra parte, la actividad y/o expresión de la clorofilasa puede no correlacionarse en forma directa y/o proporcional con la degradación de clorofila ([Ben-Yaakov et al. 2006](#)), habiéndose demostrado para la clorofilasa de *Citrus spp.* ([Azoulay-Shemer et al. 2011](#); [Harpaz-Saad et al. 2007](#)) que la misma posee una compleja regulación post-transcripcional con procesamiento dual en ambos extremos terminales de su secuencia. En este sentido, se ha encontrado que ATCHL1 interacciona con AT4G02010, una proteína transmembrana del tipo simil-extensina (*extensin-like*) receptor simil-quinasa (*RLK, Receptor-Like protein Kinase*) (*MIND* v0,5 [associomics.org/Associomics/MIND\\_0.5.html](http://associomics.org/Associomics/MIND_0.5.html); [Lalonde et al. 2010](#)), que podría actuar activando la clorofilasa como consecuencia de alguna señal externa recibida por este receptor transmembrana. Si bien la participación de las clorofilasas durante la senescencia foliar ha sido descartada ([Schenk et al. 2007](#)), alterando la expresión de *ATCHL1* en *Arabidopsis* ([Benedetti & Arruda 2002](#)) o de las clorofilasas de brócoli ([Chen et al. 2008](#)) se observan alteraciones en los niveles de clorofilido *a*, indicando claramente que las mismas poseen un rol en la degradación, o al menos en el reciclado, de clorofila.

De nuestros análisis, podríamos inferir que ATCHL1 aporta gran parte de la actividad *in vivo* de clorofilasa, y que su ausencia podría desencadenar o exacerbar otros mecanismos de degradación, los cuales podrían encontrarse latentes mientras la célula posea niveles “aceptables” de clorofilido *a*. En la situación de senescencia “natural” de la hojas unidas a la planta, el retraso en el inicio de la misma podría involucrar la participación sinérgica de otros mecanismos de respuesta a situaciones de estrés (*v.g.* foto-oxidativo), los cuales en intensidades moderadas pueden prolongar la vida de las hojas ([Gómez et al. 2008](#)), y en nuestro sistema causarían una prolongación en la funcionalidad del Fotosistema II ( $F_v/F_m$ , [Fig. 4.8B](#)), y la retención de los complejos clorofila-proteína del Fotosistema II ([Fig. 4.10](#)).

El empleo de las distintas hormonas, *i.e.* Etefón, SA o MeJA ([Fig. 4.9](#)) no aportó claras evidencias acerca de una participación diferencial de cada una de las clorofilasas en respuesta a este tratamiento, aunque en algunos casos, especialmente con MeJA y SA, se acentuaron las diferencias observadas previamente sin la aplicación de hormonas. Estos resultados apoyarían la hipótesis de la participación de las clorofilasas en la senescencia, principalmente en situaciones donde se requiera

un rápido desmantelamiento celular, como lo es en el proceso de *PCD* en respuesta al ataque por patógenos ([Kariola et al. 2005](#)).

### Foto-protección en las líneas mutantes

Una respuesta adaptativa a la alta irradiancia en los cloroplastos, es la degradación de los complejos de las antenas colectoras del Fotosistema II, es decir, de los LHCII ([Lindahl et al. 1995](#); [Yang et al. 1998](#)). Por tanto, si las clorofilasas participan en el reciclado de la clorofila que forma parte de los fotocomplejos, y si la remoción de la clorofila es necesaria para la degradación de los complejos, el retardo de la degradación de clorofila en los mutantes *KO* podría alterar la aclimatación lumínica. Esta hipótesis es concordante con el mayor contenido de fotocomplejos observados en hojas senescentes de las líneas mutantes ([Fig. 4.10](#)).

Reportes previos sobre plantas transgénicas de *Arabidopsis*, en las cuales se redujo la expresión de *ATCHL1* mediante la inserción de ARNi ([Kariola et al. 2005](#)), muestran una elevada producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y aumento de la expresión de *GST1* al someter estas plantas a alta irradiancia. Por tanto, la continua exposición durante su desarrollo a alta irradiancia (*stricto sensu* en nuestro sistema la irradiancia no fue excesivamente elevada como en [Kariola et al. 2005](#), sino más bien moderadamente alta) incrementaría los niveles de compuestos antioxidantes y fotoprotectores, como antocianinas y carotenoides, los cuales podrían disipar el exceso de energía lumínica captado por las clorofilas retenidas. A mayor irradiancia la acumulación de compuestos foto-protectores podría causar un aumento del NPQ y leve disminución del  $\Phi_{PSII}$ , como se observa en la línea *chl1/2* ([Fig. 4.11](#)), que evidentemente posee mayor sensibilidad a la alta intensidad lumínica.

Posteriores análisis con las líneas mutantes podrían resolver qué factores estarían involucrados en las respuestas a la luz observadas en la línea *chl1/2*, qué tipo de alteraciones ultraestructurales en los fotocomplejos causan mayor foto-sensibilidad como consecuencia de la deficiencia en las clorofilasas, en qué magnitud las líneas mutantes son más susceptibles al daño foto-oxidativo y cuál sería la extensión del daño.

## Localización de las clorofilasas en *Arabidopsis*

A partir de la detección de clorofila en las VAS ([Martínez et al. 2008](#)) se prosiguió a evaluar la degradación de clorofila en las mismas, encontrando claramente que en *Nicotiana tabacum* hay actividad clorofilasa en el interior de las VAS, y que la degradación de la clorofila presente en dichas organelas comienza por la remoción del fitol ([Ver Capítulo 2](#)).

Por tanto proseguimos a evaluar en las líneas mutantes de *Arabidopsis KO* para las clorofilasas el comportamiento de las VAS. En primer lugar se realizaron observaciones de microscopía confocal, partiendo de la hipótesis que anulando la actividad clorofilasa presente en el interior de las VAS podría observarse una prolongada persistencia de la clorofila presente en las mismas, lo que se podría reflejar en una mayor señal de clorofila en las VAS. No se observaron diferencias entre las líneas silvestre y doble mutante a través de microscopía confocal ([Fig.4.14](#)). Por consiguiente se procedió a evaluar las actividades enzimáticas del catabolismo de clorofila presentes en las VAS aisladas de los cuatro genotipos. Nuevamente observamos (en la línea silvestre) que las VAS son capaces de degradar clorofila, lo que resulta en un aumento en el contenido de clorofilido *a*, indicando la presencia de actividad clorofilasa en las VAS aisladas ([Fig. 4.13](#)). Así mismo, los resultados para las líneas *chl1* y *chl2* sugieren que la ATCHL2 es la que aportaría la mayor actividad presente. Sin embargo, la observación del cromatograma correspondiente a la línea doble mutante *chl1/2*, indica a su vez la posibilidad de que la clorofila sea degradada por otros mecanismos, posiblemente oxidativos, que generan productos cuyas propiedades espectrales no son detectables en nuestro sistema, junto con la serie de compuestos conteniendo el anillo de clorina/forbina ([Fig. 4.13](#)).

Futuras evaluaciones de las plantas transgénicas conteniendo las construcciones de las clorofilasas de *Arabidopsis* fusionadas a las proteínas fluorescentes, y bajo la regulación de su propio promotor endógeno, permitirán indagar sobre cuál de las clorofilasas está presente en las VAS. Recientemente, análisis translátomicos en plántulas de *Arabidopsis* ([Mustroph & Bailey-Serres 2010](#);



[Mustroph et al. 2009](#)) mostraron que en esta etapa del desarrollo ambas clorofilasas no son traducidas en el mismo tejido (datos visualizados en [efp.ucr.edu](http://efp.ucr.edu)), localizando ATCHL1 en tejido epidérmico y ATCHL2 en células del mesófilo y células oclusivas, en concordancia con su secuencia de direccionamiento hacia el cloroplasto. En nuestras evaluaciones preliminares en *Nicotiana tabacum* (que podrían objetarse por ser un sistema heterólogo) localizamos la presencia de ATCHL1::YFP en los cloroplastos ([Fig. 4.19](#)). Siendo esta enzima aún de localización no-predecible a través de análisis bioinformáticos, nuestra observación marca un punto importante en su análisis y futura evaluación sobre el direccionamiento de la misma al cloroplasto, el cual podría a su vez ser el punto de partida para que la misma se localice posteriormente en las VAS, ya que estas organelas reciben algunos componentes cloroplásticos ([Martínez et al. 2008](#)).

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. and Ram, S.J.** (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36-42.
- Aiamla-or, S., Nakajima, T., Shigyo, M. and Yamauchi, N.** (2012) Pheophytinase activity and gene expression of chlorophyll-degrading enzymes relating to UV-B treatment in postharvest broccoli (*Brassica oleracea* L. Italica Group) florets. *Postharvest Biol. Technol.*, **63**, 60-66.
- Allen, K.D. and Staehelin, L.A.** (1991) Resolution of 16 to 20 chlorophyll-protein complexes using a low ionic strength native green gel system. *Anal. Biochem.*, **194**, 214-222.
- Angers-Loustau, A., Rainy, J. and Wartiovaara, K.** (2007) PlasmaDNA: a free, cross-platform plasmid manipulation program for molecular biology laboratories. *BMC Mol. Biol.*, **8**, 77.
- Arkus, K.A.J., Cahoon, E.B. and Jez, J.M.** (2005) Mechanistic analysis of wheat chlorophyllase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **438**, 146-155.
- Azoulay-Shemer, T., Harpaz-Saad, S., Belausov, E., Lovat, N., Krokhn, O., Spicer, V., Standing, K.G., Goldschmidt, E.E. and Eyal, Y.** (2008) Citrus Chlorophyllase Dynamics at Ethylene-Induced Fruit Color-Break: A Study of Chlorophyllase Expression, Posttranslational Processing Kinetics, and in Situ Intracellular Localization. *Plant Physiol.*, **148**, 108-118.
- Azoulay-Shemer, T., Harpaz-Saad, S., Cohen-Peer, R., Mett, A., Spicer, V., Lovat, N., Krokhn, O., Brand, A., Gidoni, D., Standing, K.G., Goldschmidt, E.E. and Eyal, Y.** (2011) Dual N- and C-Terminal Processing of Citrus Chlorophyllase Precursor Within the Plastid Membranes leads to the Mature Enzyme. *Plant Cell Physiol.*, **52**, 70-83.
- Ben-Yaakov, E., Harpaz-Saad, S., Galili, D., Eyal, Y. and Goldschmidt, E.E.** (2006) The relationship between chlorophyllase activity and chlorophyll degradation during the course of leaf senescence in various plant species. *Isr. J. Plant Sci.*, **54**, 129-135.
- Benedetti, C.E. and Arruda, P.** (2002) Altering the Expression of the Chlorophyllase Gene *ATHCOR1* in Transgenic *Arabidopsis* Caused Changes in the Chlorophyll-to-Chlorophyllide Ratio. *Plant Physiol.*, **128**, 1255-1263.
- Benedetti, C.E., Costa, C.L., Turcinelli, S.R. and Arruda, P.** (1998) Differential Expression of a Novel Gene in Response to Coronatine, Methyl Jasmonate, and Wounding in the *Coil* Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **116**, 1037-1042.
- Borrell, A.K. and Hammer, G.L.** (2000) Nitrogen dynamics and the physiological basis of stay-green in Sorghum. *Crop Sci.*, **40**, 1295-1307.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. and Pink, D.** (2003) The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnol. J.*, **1**, 3-22.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.-F., Wu, S.-H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. and Leaver, C.J.** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in

- gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **42**, 567-585.
- Büchert, A.M., Civello, P.M. and Martínez, G.A.** (2011) Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytylation during senescence of broccoli. *J. Plant Physiol.*, **168**, 337-343.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16**, 735-743.
- Chen, L.-F.O., Lin, C.-H., Kelkar, S.M., Chang, Y.-M. and Shaw, J.-F.** (2008) Transgenic broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with antisense chlorophyllase (*BoCLH1*) delays postharvest yellowing. *Plant Sci.*, **174**, 25-31.
- Di Sansebastiano, G.-P., Paris, N., Marc-Martin, S. and Neuhaus, J.-M.** (1998) Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant J.*, **15**, 449-457.
- Dubrovsky, J.G., Guttenberger, M., Saralegui, A., Napsucialy-Mendivil, S., Voigt, B., Baluška, F. and Menzel, D.** (2006) Neutral Red as a Probe for Confocal Laser Scanning Microscopy Studies of Plant Roots. *Ann. Bot.*, **97**, 1127-1138.
- Echan, L.A. and Speicher, D.W.** (2001) Protein Detection in Gels Using Fixation - Unit 10.5. In *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, J.E., Dunn, B.M., Speicher, D.W. and Wingfield, P.T. eds): John Wiley & Sons Inc.
- Ehara, M., Noguchi, T. and Ueda, K.** (1996) Uptake of Neutral Red by the Vacuoles of a Green Alga, *Micrasterias pinnatifida*. *Plant Cell Physiol.*, **37**, 734-741.
- Fiedor, L., Rosenbach-Belkin, V. and Scherz, A.** (1992) The stereospecific interaction between chlorophylls and chlorophyllase. Possible implication for chlorophyll biosynthesis and degradation. *J. Biol. Chem.*, **267**, 22043-22047.
- Fling, S.P. and Gregerson, D.S.** (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.*, **155**, 83-88.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K.** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, **50**, 151-158.
- Gómez, F., Fernández, L., Gergoff, G., Guiamet, J.J., Chaves, A. and Bartoli, C.G.** (2008) Heat shock increases mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and extends postharvest life of spinach leaves. *Postharvest Biol. Technol.*, **49**, 229-234.
- Guilliermond, A.** (1930) Le vacuome des cellules vegetales. *Protoplasma*, **9**, 133-174.
- Harpaz-Saad, S., Azoulay, T., Arazi, T., Ben-Yaakov, E., Mett, A., Shibolet, Y.M., Hörtensteiner, S., Gidoni, D., Gal-On, A., Goldschmidt, E.E. and Eyal, Y.** (2007) Chlorophyllase Is a Rate-Limiting Enzyme in Chlorophyll Catabolism and Is Posttranslationally Regulated. *Plant Cell*, **19**, 1007-1022.
- Harrison, S., Mott, E., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. and Cottage, A.** (2006) A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*, **2**, 19.

- He, P., Zhou, W. and Jin, J.** (2004) Carbon and Nitrogen Metabolism Related to Grain Formation in Two Different Senescent Types of Maize. *J. Plant Nutr.*, **27**, 295-311.
- He, Y., Tang, W., Swain, J.D., Green, A.L., Jack, T.P. and Gan, S.** (2001) Networking Senescence-Regulating Pathways by Using Arabidopsis Enhancer Trap Lines. *Plant Physiol.*, **126**, 707-716.
- Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. and Brown, S.B.** (1987) The Degradation Of Chlorophyll — A Biological Enigma. *New Phytol.*, **107**, 255-302.
- Hörtensteiner, S.** (2004) The loss of green color during chlorophyll degradation—a prerequisite to prevent cell death? *Planta*, **219**, 191-194.
- Hörtensteiner, S.** (2006) Chlorophyll Degradation During Senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 55-77.
- Hörtensteiner, S.** (2009) Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends Plant Sci.*, **14**, 155-162.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Jacob-Wilk, D., Holland, D., Goldschmidt, E.E., Riov, J. and Eyal, Y.** (1999) Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the *Chlase1* gene from ethylene-treated *Citrus* fruit and its regulation during development. *Plant J.*, **20**, 653-661.
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. and Angenon, G.** (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.*, **122**, 101-108.
- Kariola, T., Brader, G., Li, J. and Palva, E.T.** (2005) Chlorophyllase 1, a Damage Control Enzyme, Affects the Balance between Defense Pathways in Plants. *Plant Cell*, **17**, 282-294.
- Lalonde, S., Sero, A., Pratelli, R., Pilot, G., Chen, J., Sardi, M.I., Parsa, S.A., Kim, D.-Y., Acharya, B.R., Stein, E.V., Hu, H.-C., Villiers, F., Takeda, K., Yang, Y., Han, Y.S., Schwacke, R., Chiang, W., Kato, N., Loqué, D., Assmann, S.M., Kwak, J.M., Schroeder, J., Rhee, S.Y. and Frommer, W.B.** (2010) A membrane protein / signaling protein interaction network for Arabidopsis version AMPv2. *Front. Physiol.*, **1**, article 24.
- Li, Q., Lau, A., Morris, T.J., Guo, L., Fordyce, C.B. and Stanley, E.F.** (2004) A Syntaxin 1,  $G\alpha_o$ , and N-Type Calcium Channel Complex at a Presynaptic Nerve Terminal: Analysis by Quantitative Immunocolocalization. *J. Neurosci.*, **24**, 4070-4081.
- Liao, Y., An, K., Zhou, X., Chen, W.-J. and Kuai, B.-K.** (2007) *AtCLH2*, a Typical but Possibly Distinctive Chlorophyllase Gene in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.*, **49**, 531-539.
- Lichtenthaler, H.K. and Babani, F.** (2004) Light Adaptation and Senescence of the Photosynthetic Apparatus. Changes in Pigment Composition, Chlorophyll Fluorescence Parameters and Photosynthetic Activity. In *Chlorophyll a Fluorescence. A Signature of Photosynthesis*. (Papageorgiou, G.C. and Govindjee, G. eds): Springer Netherlands, pp. 713-736.
- Lindahl, M., Yang, D.-H. and Andersson, B.** (1995) Regulatory Proteolysis of the Major Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein of Photosystem II by a Light-Induced Membrane-Associated Enzymic System. *Eur. J. Biochem.*, **231**, 503-509.

- Ling, Q., Huang, W. and Jarvis, P.** (2011) Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.*, **107**, 209-214.
- Littlejohn, G.R., Gouveia, J.D., Edner, C., Smirnoff, N. and Love, J.** (2010) Perfluorodecalin enhances *in vivo* confocal microscopy resolution of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *New Phytol.*, **186**, 1018-1025.
- Mach, J.M., Castillo, A.R., Hoogstraten, R. and Greenberg, J.T.** (2001) The *Arabidopsis*-accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 771-776.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J. and Aten, J.A.** (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.*, **169**, 375-382.
- Martínez, D.E., Costa, M.L., Gomez, F.M., Otegui, M.S. and Guiamet, J.J.** (2008) 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J.*, **56**, 196-206.
- Martinez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R. and Añon, M.C.** (1995) Partial Characterization Of Chlorophyllase From Strawberry Fruit (*Fragaria Ananassa*, Duch.). *J. Food Biochem.*, **18**, 213-226.
- Matile, P.** (2001) Senescence and Cell Death in Plant Development: Chloroplast Senescence and its Regulation. In *Regulation of Photosynthesis* (Aro, E.-M. and Andersson, B. eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer / Kluwer Academic Press, pp. 277-297.
- Matile, P., Hortensteiner, S. and Thomas, H.** (1999) Chlorophyll Degradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 67-95.
- Matile, P., Hortensteiner, S., Thomas, H. and Krautler, B.** (1996) Chlorophyll Breakdown in Senescent Leaves. *Plant Physiol.*, **112**, 1403-1409.
- Matile, P. and Schellenberg, M.** (1996) The cleavage of phaeophorbide *a* is located in the envelope of barley gerontoplasts. *Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 55-59.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N.** (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.*, **51**, 659-668.
- McFeeters, R.F.** (1975) Substrate Specificity of Chlorophyllase. *Plant Physiol.*, **55**, 377-381.
- McFeeters, R.F., Chichester, C.O. and Whitaker, J.R.** (1971) Purification and Properties of Chlorophyllase from *Ailanthus altissima* (Tree-of-Heaven). *Plant Physiol.*, **47**, 609-618.
- Miersch, I., Heise, J., Zelmer, I. and Humbeck, K.** (2000) Differential Degradation of the Photosynthetic Apparatus During Leaf Senescence in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Biol.*, **2**, 618-623.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Mustroph, A. and Bailey-Serres, J.** (2010) The *Arabidopsis* translome cell-specific mRNA atlas: Mining suberin and cutin lipid monomer biosynthesis genes as an example for data application. *Plant Signal. Behav.*, **5**, 320-324.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J.H., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T. and Bailey-Serres, J.** (2009) Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities

- during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 18843-18848.
- Noodén, L.D.** (2004) Introduction. In *Plant Cell Death Processes* (Noodén, L.D. ed. San Diego: Academic Press, pp. 1-18.
- Obermeyer, G., Gehwolf, R., Sebesta, W., Hamilton, N., Gadermaier, G., Ferreira, F., Commandeur, U., Fischer, R. and Bentrup, F.-W.** (2004) Over-expression and production of plant allergens by molecular farming strategies. *Methods*, **32**, 235-240.
- Oh, M.-H., Kim, Y.-J. and Lee, C.-H.** (2000) Leaf Senescence in a Stay-Green Mutant of *Arabidopsis thaliana*: Disassembly Process of Photosystem I and II during Dark-Incubation *J. Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 256-262.
- Otegui, M.S., Noh, Y.-S., Martínez, D.E., Petroff, M.G.V., Staehelin, L.A., Amasino, R.M. and Guamet, J.J.** (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J.*, **41**, 831-844.
- Peter, G.F. and Thornber, J.P.** (1991) Electrophoretic Procedures for Fractionation of Photosystem I and II Pigment-Proteins of Higher Plants and for Determination of Their Subunit Composition. In *Methods in Plant Biochemistry* (Rogers, L.J. ed. San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 195-210.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E.** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **975**, 384-394.
- Rambaldi, D. and Ciccarelli, F.D.** (2009) FancyGene: dynamic visualization of gene structures and protein domain architectures on genomic loci. *Bioinformatics*, **25**, 2281-2282.
- Rüdiger, W.** (2002) Biosynthesis of chlorophyll *b* and the chlorophyll cycle. *Photosynth. Res.*, **74**, 187-193.
- Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., Krupinska, K. and Hörteneiner, S.** (2009) Pheophytin Pheophorbide Hydrolase (Pheophytinase) Is Involved in Chlorophyll Breakdown during Leaf Senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**, 767-785.
- Schenk, N., Schelbert, S., Kanwischer, M., Goldschmidt, E.E., Dörmann, P. and Hörteneiner, S.** (2007) The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **581**, 5517-5525.
- Schöb, H., Kunz, C. and Meins Jr, F.** (1997) Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Mol. Gen. Genet.*, **256**, 581-585.
- Takamiya, K.-i., Tsuchiya, T. and Ohta, H.** (2000) Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends Plant Sci.*, **5**, 426-431.
- Thomas, H.** (2003) Do green plants age, and if so, how? In *Model Systems in Aging* (Nyström, T. and Osiewacz, H.D. eds). Berlin / Heidelberg: Springer-Verlag Berlin / Heidelberg, pp. 145-171.

- 
- Todorov, D.T., Karanov, E.N., Smith, A.R. and Hall, M.A.** (2003) Chlorophyllase Activity and Chlorophyll Content in Wild and Mutant Plants of *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Plant.*, **46**, 125-127.
- Trebitsh, T., Goldschmidt, E.E. and Riov, J.** (1993) Ethylene Induces *de novo* Synthesis of Chlorophyllase, a Chlorophyll Degrading Enzyme, in *Citrus* Fruit Peel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9441-9445.
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Masuda, T., Mikami, B., Kita, N., Shioi, Y. and Takamiya, K.-i.** (1997) Purification and Characterization of Two Isozymes of Chlorophyllase from Mature Leaves of *Chenopodium album*. *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1026-1031.
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T. and Takamiya, K.-i.** (1999) Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 15362-15367.
- Tsuchiya, T., Suzuki, T., Yamada, T., Shimada, H., Masuda, T., Ohta, H. and Takamiya, K.-i.** (2003) Chlorophyllase as a Serine Hydrolase: Identification of a Putative Catalytic Triad. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 96-101.
- Willstätter, R. and Stoll, A.** (1913) *Untersuchungen über Chlorophyll. Methoden und Ergebnisse.* Berlin: Verlag von Julius Springer.
- Wise, A.A., Liu, Z. and Binns, A.N.** (2006) Three Methods for the Introduction of Foreign DNA into *Agrobacterium*. In *Agrobacterium Protocols* (Wang, K. ed. New Jersey: Humana Press, pp. 43-54.
- Woo, H.R., Goh, C.-H., Park, J.-H., De La Serve, B.T., Kim, J.-H., Park, Y.-I. and Nam, H.G.** (2002) Extended leaf longevity in the *ore4-1* mutant of *Arabidopsis* with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. *Plant J.*, **31**, 331-340.
- Yang, D.-H., Webster, J., Adam, Z., Lindahl, M. and Andersson, B.** (1998) Induction of Acclimative Proteolysis of the Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein of Photosystem II in Response to Elevated Light Intensities. *Plant Physiol.*, **118**, 827-834.

## *CAPÍTULO 5*

—

### **CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>CAPÍTULO 5</i> — CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	321
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	322
CONCLUSIONES GENERALES.....	323
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	324
Sobre las VAS y su participación en la degradación de componentes cloroplásticos.....	324
Sobre el pleiotropismo de las clorofilasas de <i>Arabidopsis</i> .....	326
BIBLIOGRAFÍA.....	328

## CONCLUSIONES GENERALES

*Ahora bien: es la fe la firme seguridad  
de lo que esperamos, la convicción de  
lo que no vemos; pues por ella  
adquirieron gran nombre los antiguos.  
Hebreos 1:1-2*

Numerosos cambios ocurren a nivel celular durante la senescencia foliar. La degradación de los componentes cloroplásticos es probablemente el evento más notorio. La degradación de clorofila, y de las proteínas del aparato fotosintético, adquieren especial importancia durante la senescencia foliar ([Thomas 2002](#)). En este trabajo se afrontó la degradación de clorofila durante la senescencia foliar, focalizándose en la participación de las VAS y en el rol de las clorofilasas.

Los aportes más relevantes que surgen de este trabajo son los siguientes:

- Las VAS poseen clorofila, y la capacidad de degradarla comenzando por la hidrólisis del grupo fitol.
- En las VAS ocurre la degradación preferencial de las proteínas del Fotosistema I, en el cual están involucradas mayoritariamente las proteasas de tipo cisteínicas presentes.
- Previamente a ser degradada, la clorofila presente en las VAS se encuentra formando parte de las proteínas de unión a clorofila del Fotosistema I.
- La actividad de clorofilasa presente en las VAS de *Arabidopsis* estaría aportada mayoritariamente por las isoenzima ATCHL2.

- Las líneas mutantes de *Arabidopsis KO* presentan una demora en la senescencia foliar (a día corto), indicando un rol para las clorofilasas en el progreso de la senescencia foliar.
- Las mutaciones *KO* para las clorofilasas de *Arabidopsis* ocasionan efectos pleiotrópicos, alterando el control de la elongación del hipocotilo, la duración del filocrono, el tiempo a floración y la acumulación de antocianinas.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

### **Sobre las VAS y su participación en la degradación de componentes cloroplásticos**

La participación de las VAS en la degradación de clorofila por las enzimas allí presentes, y como compartimento lítico con selectividad para los complejos proteína-clorofila del Fotosistema I, representa un gran avance en el conocimiento de los mecanismos proteolíticos celulares. Los resultados presentados en este trabajo en los aspectos mencionados deberían continuarse en investigaciones relacionadas con la biogénesis de las VAS, y en especial en el mecanismo de direccionamiento selectivo de las proteínas del Fotosistema I hacia estas organelas. Posiblemente estudios biofísicos puedan aportar evidencias acerca de la estructura y entorno de las proteínas del Fotosistema I en las VAS, y también el análisis de la composición de la membrana de las VAS, proporcionando datos relacionados con el origen de estos compartimentos líticos. Así mismo, evaluar la proporción de clorofila que es degradada en las VAS sería también una dirección posible como continuación de este trabajo.

Hasta el momento, diversas cuestiones relativas a la degradación de clorofila siguen sin ser resueltas. Una cuestión aún sin resolver es cómo la clorofila,

encontrándose originalmente unida a otra proteína, es posible que sea atacada inicialmente por alguna enzima hidrolítica (*i.e.* clorofilasa, feofitinas). Solamente ha sido postulado por el momento que la proteína SGR de *Oryza sativa* ([Park et al. 2007](#)) o su ortólogo SGN en *A. thaliana* ([Ren et al. 2007](#)), dada su interacción con las proteínas del complejo LHCII, interviene en la desestabilización de la clorofila permitiendo su hidrólisis. Pero esto sólo limitaría la degradación de clorofila a la que se encuentra presente en estos complejos, siguiendo sin quedar resultado el problema para el resto de los complejos clorofila-proteína (*v.g.* Fotosistema I). Otra cuestión sin resolver es qué fracción de la clorofila es degradada a través de la vía catabólica “clásica” ([Hörtensteiner & Kräutler 2011](#)), de la vía decarboxilativa ([Suzuki, Y. et al. 2008](#)) o a través de reacciones oxidativas no-enzimáticas, y si depende también de la situación o del factor que desencadene la senescencia.

Diversas cuestiones en cuanto a las metodologías y condiciones experimentales empleadas en estudios relacionados con la degradación de clorofila durante la senescencia, siguen aún siendo a mí entender poco confiables. Como hemos mencionado previamente, las respuestas manifestadas durante el *síndrome de la senescencia* estarán marcadas por el sistema experimental empleado, dentro del cual diferentes condiciones en el cultivo de las plantas, edad relativa y absoluta de las hojas, o la metodología empleada para acelerar la senescencia foliar, claramente afectarán la participación relativa de los mecanismos implicados en el síndrome, sumado a la complejidad multifactorial del *síndrome de la senescencia*. Por lo tanto, se plantea el interrogante sobre cuál deba ser el sistema experimental empleado para evaluar la degradación de los componentes cloroplásticos (o celulares) sin crear una situación artificial que conduzca a conclusiones alejadas de la “realidad”, o hasta qué punto más allá de nuestro sistema experimental podemos extender nuestras afirmaciones. En lo referido a las determinaciones de actividades enzimáticas involucradas en la degradación de clorofila, el ensayo con las VAS aisladas es probablemente uno de los que menos modificaciones “artefactuales” pueda introducir, aunque limitando las conclusiones a estas organelas.

En relación con las clorofilasas de *Arabidopsis*, claramente continuando lo desarrollado en este trabajo, posteriores estudios podrían orientarse en discriminar el rol que cumplen ambas clorofilasas durante el desarrollo y su posible localización

tisular, celular y subcelular diferentes. Para estos análisis serían de gran utilidad el empleo de anticuerpos específicos para cada una de las clorofilasas, así como también plantas transgénicas de *Arabidopsis* con las clorofilasas fusionadas a diferentes proteínas fluorescentes, cuyo desarrollo fue iniciado en este trabajo.

### **Sobre el pleiotropismo de las clorofilasas de *Arabidopsis***

Los efectos pleiotrópicos observados en las plantas mutantes *KO* en este trabajo apuntan claramente hacia nuevas líneas de investigación en relación con nuevos mecanismos o etapas en la regulación de la elongación del hipocotilo, la duración del filocrono, la transición a la fase reproductiva y la biosíntesis de antocianinas. En los últimos años, ha sido creciente el interés relacionado con la participación del cloroplasto en la señalización y regulación de diversas respuestas fisiológicas a diversos factores externos, por ejemplo estreses biótico y abiótico ([Galvez-Valdivieso & Mullineaux 2010](#); [Pogson et al. 2008](#); [Suzuki, N. et al. 2012](#)). A las nuevas evidencias sobre los múltiples aspectos fisiológicos en los que el cloroplasto se encuentra involucrado, podrían ahora agregarse los resultados obtenidos en este trabajo.

Continuando con el trabajo en relación con los efectos pleiotrópicos, tal vez una de las primeras preguntas que debería responderse es si algún compuesto intermediario en la biosíntesis de la clorofila o algún catabolito de la misma participa en el control de alguno de estos efectos pleiotrópicos, para lo que tal vez sea de utilidad re-evaluar las diversas plantas mutantes (v.g. mutantes *gun*) en cuanto a similitudes con lo observado en este trabajo. Así mismo, tampoco se debería descartar la posibilidad de que una alteración en el metabolismo de la clorofila genere como consecuencia una alteración en el estado redox celular y la producción de las especies reactivas del oxígeno (*ROS*), por lo cual también cabe indagar en los mecanismos de señalización en los cuales participan el estado redox y las *ROS* acerca de los efectos pleiotrópicos observados en este trabajo.

Finalmente, una cuestión general que surge del análisis global de este trabajo es la necesidad de definir cuáles son las condiciones experimentales apropiadas en los ensayos para diversos estudios del desarrollo de la planta y en qué magnitud podemos extrapolar o generalizar los diferentes resultados. En este sentido, ha sido publicado recientemente un interesante trabajo ([Massonnet \*et al.\* 2010](#)) en el cual fue abordado comparativamente entre 10 grupos europeos el análisis fenotípico de tres ecotipos de *Arabidopsis*, y en el cual concluyen entre otras cuestiones la necesidad de controlar y monitorear rigurosamente las condiciones de cultivo experimentales.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Galvez-Valdivieso, G. and Mullineaux, P.M.** (2010) The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiol. Plant.*, **138**, 430-439.
- Hörtensteiner, S. and Kräutler, B.** (2011) Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **1807**, 977-988.
- Massonnet, C., Vile, D., Fabre, J., Hannah, M.A., Caldana, C., Lisec, J., Beemster, G.T.S., Meyer, R.C., Messerli, G., Gronlund, J.T., Perkovic, J., Wigmore, E., May, S., Bevan, M.W., Meyer, C., Rubio-Díaz, S., Weigel, D., Micol, J.L., Buchanan-Wollaston, V., Fiorani, F., Walsh, S., Rinn, B., Gruissem, W., Hilson, P., Hennig, L., Willmitzer, L. and Granier, C.** (2010) Probing the Reproducibility of Leaf Growth and Molecular Phenotypes: A Comparison of Three Arabidopsis Accessions Cultivated in Ten Laboratories. *Plant Physiol.*, **152**, 2142-2157.
- Park, S.-Y., Yu, J.-W., Park, J.-S., Li, J., Yoo, S.-C., Lee, N.-Y., Lee, S.-K., Jeong, S.-W., Seo, H.S., Koh, H.-J., Jeon, J.-S., Park, Y.-I. and Paek, N.-C.** (2007) The Senescence-Induced Staygreen Protein Regulates Chlorophyll Degradation. *Plant Cell*, **19**, 1649-1664.
- Pogson, B.J., Woo, N.S., Förster, B. and Small, I.D.** (2008) Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci.*, **13**, 602-609.
- Ren, G., An, K., Liao, Y., Zhou, X., Cao, Y., Zhao, H., Ge, X. and Kuai, B.** (2007) Identification of a Novel Chloroplast Protein AtNYE1 Regulating Chlorophyll Degradation during Leaf Senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **144**, 1429-1441.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. and Miller, G.** (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell Environ.*, **35**, 259-270.
- Suzuki, Y., Soga, K., Yoshimatsu, K. and Shioi, Y.** (2008) Expression and purification of pheophorbide, an enzyme catalyzing the formation of pyropheophorbide during chlorophyll degradation: comparison with the native enzyme. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 1260-1266.
- Thomas, H.** (2002) Ageing in plants. *Mech. Ageing. Dev.*, **123**, 747-753.

