



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

FISIOLOGÍA COMPARADA DE UNA LÍNEA CELULAR  
CLOROFÍLICA Y UNA MUTANTE AMARILLA DEL ZACATE  
*Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths EN  
CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO

BETZAIDA JIMÉNEZ FRANCISCO

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

**La presente tesis titulada:** Fisiología comparada de una línea celular clorofílica y una mutante amarilla del zacate *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths en condiciones de estrés osmótico, **realizada por la alumna:** Betzaida Jiménez Francisco **bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de**

MAESTRO EN CIENCIAS  
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

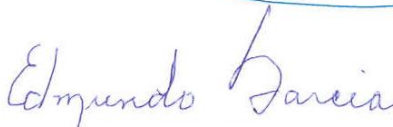
CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
DR. CARLOS TREJO LÓPEZ

DIRECTOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. GERARDO ARMANDO AGUADO SANTACRUZ

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. EDMUNDO GARCÍA MOYA

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. F. VÍCTOR CONDE MARTÍNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2013

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados**, en especial al **Posgrado de Botánica** por la oportunidad y facilidades brindadas para continuar con mi formación académica.

A los integrantes de mi Consejo Particular: **Dr. Carlos Trejo López, Dr. Armando Aguado Santacruz, Dr. Edmundo García Moya y Dr. F. Víctor Conde Martínez.** Mi más sincero agradecimiento por el tiempo, paciencia, conocimiento y disposición que cada uno de ustedes aportó para que este trabajo de maestría llegara a su culminación.

Al **Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304** por el apoyo económico para la realización del trabajo de investigación.

Agradezco a la **Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera** por su colaboración en el trabajo de microscopía electrónica.

Al **Dr. Marcos Soto** y al **M.C. Rubén San Miguel** por su aporte en la realización del análisis de ácido abscísico.

A la M.C. **Blanca Moreno Gómez** por su asesoría y capacitación brindada al inicio de este trabajo.

## Dedicatoria

A mi familia en especial a mis padres, **Jenaro Jiménez y Flora Francisco**, aunque se encuentren lejos siempre están en mis pensamientos. Porque me han brindado apoyo incondicional y consejos sabios en el momento oportuno. A ustedes les dedico cada día de esfuerzo para lograr lo que soy, espero que la vida me permita tenerlos muchos años más, para reeditar un poco de los mucho que ustedes me han dado.

A todas esas personas que hicieron muy agradable mi estancia dentro y fuera del Colegio de Postgraduados compartiendo su tiempo, diferentes maneras de ver y disfrutar la vida brindándome una amistad sincera: **Josefina, Nora, Eli, Sandra, Mariana, Silvia, Angélica, Lupita Valadez, Roxana, Arturo F., Raúl** entre muchos otros....

# Contenido

|   | Página     |
|---|------------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....  | <b>iii</b> |
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>v</b>   |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>vi</b>  |
| <b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....   | <b>1</b>   |
| 1.2 Objetivo general .....  | 2          |
| 1.3 Objetivos específicos .....   | 2          |
| 1.4 Hipótesis.....  | 3          |
| <b>CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....  | <b>4</b>   |
| 2.1 El agua en las plantas .....  | 4          |
| 2.1 Factores que afectan la disponibilidad de agua en las plantas .....                           | 5          |
| 2.3 Respuesta de las plantas al estrés hídrico .....  | 6          |
| 2.3 Suspensiones celulares de plantas superiores .....  | 8          |
| 2.3.1 Suspensiones celulares del zacate <i>Bouteloua gracilis</i> como modelo<br>de estudio ..... | 9          |
| 2.4 Plastidios y cloroplastos .....   | 12         |
| 2.4.1 Los cloroplastos .....  | 13         |
| 2.4.2 Origen y evolución de los cloroplastos .....  | 15         |
| 2.4.3 Biogénesis de cloroplastos.....   | 16         |
| 2.5 Comunicación cloroplasto-núcleo.....  | 19         |
| 2.6 Biosíntesis de pigmentos fotosintéticos y ácido abscísico .....                               | 21         |
| 2.6.1 Biosíntesis de clorofila .....  | 21         |
| 2.6.2 Biosíntesis de carotenoides .....   | 25         |
| 2.6.2.1 Biosíntesis de ácido abscísico (ABA).....   | 28         |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.7 Mutaciones relacionadas con la biogénesis de cloroplasto y la síntesis de clorofila .....   | 30        |
| <b>2.8 LITERATURA CITADA .....</b>  | <b>34</b> |
| <b>Capítulo III. Ultrastructural and physiological characterization of YELP, a novel, yellow, chlorophyll-deficient cell mutant line that develops etioplast-like plastids in the light .....</b>             | <b>41</b> |
| <b>Capítulo IV. A physiological approach of chloroplast participation in osmotic stress response of <i>Bouteloua gracilis</i> (Kunth) Lag. ex Griffiths cell suspension culture.....</b>                      | <b>70</b> |
| <b>Capítulo V. Ácido abscísico y estrés osmótico en la respuesta fisiológica de dos líneas celulares <i>Bouteloua gracilis</i> (Kunth) Lag. ex Griffiths contrastantes en su contenido de clorofila .....</b> | <b>96</b> |

## Índice de figuras

Página

- Figura 1. Suspensiones celulares y ejemplar del zacate *Bouteloua gracilis*..... 11
- Figura 2. Micrografías representativas de algunos tipos de plastidios no fotosintéticos. A) Proplastidio de punta de raíz de *Ipomea batatas*, carecen de estructura interna y poseen inclusión de cuerpos proteicos (P) Barra de escala=0.5  $\mu\text{m}$ . B) Etioplasto de plantas de avena crecidas en oscuridad, se muestra la estructura del cuerpo prolamelar (PLB). C) Amiloplasto con gránulos de almidón (S) vistos en receptáculo en anthesis de fresa. D) Elaioplasto de *Brassica napus* donde se observan las gotas de lípidos (L). E) Cromoplastos de frutos maduros de *Arum italicum*. F) Gerontoplasto que contiene plastoglobulos (PG) observados en hoja senescente de *Nicotiana tabacum*. Barra de escala en B-F=1  $\mu\text{m}$ . (Tomado de Wise, 2006)..... 13
- Figura 3. Micrografía y representación esquemática de la estructura de un cloroplasto. Micrografía fuente personal, esquema tomado de <http://uachfcqqbp.blogspot.mx> [Consulta: 050413]. ..... 15
- Figura 4. Esquema que muestra las diferentes vías para el desarrollo de cloroplastos y otros plastidios. Tomado de: <http://www.euita.upv.es> [Consulta: 050413]..... 18
- Figura 5. Modelo representativo que muestra algunas de las moléculas que funcionan para la señalización entre el cloroplasto y el núcleo, las cuales están fuertemente influenciados por cambios en el ambiente ocasionados por diversos estreses o bien por el estado de desarrollo del plastidio. (Tomado de Ceol, 2009). ..... 20
- Figura 6. Estructura de la molécula de clorofila y su espectro de absorción. Tomado de <http://lacienciaahora-bene.blogspot.mx> [Consulta: 050413]. ..... 22
- Figura 7. Ilustración esquemática de la ruta de biosíntesis de clorofila. ALA: ácido 5-aminolevulínico. Los nombres de las enzimas son: (1) Glutamil-tRNA sintetasa, (2) Glutamil tRNA reductasa, (3) Glutamato semialdehído aminotransferasa, (4) Ácido 5-aminolevulínico deshidratasa, (5) Porfobilinógeno desaminasa, (6) Uroporfirinógeno III sintetasa, (7) Uroporfirinógeno III descarboxilasa, (8) Coproporfirinógeno III oxidasa, (9) Protoporfirinógeno IX oxidasa, (10) Magnesio

quelatasa, (11) Mg-protoporfirina IX metiltransferasa, (12) Mg-protoporfirina IX metiltransferasa, (13) Protoclorofilida oxidoreductasa, (14) Divinil clorofilida reductasa, (15) Clorofila sintasa, (16) Clorofila *a* oxigenasa, (17) Clorofilasa, (18) Clorofila *b* reductasa, (19) 7-hidroximetil clorofila *a* reductasa. (Dibujado de acuerdo con Tanaka y Tanaka, 2007)..... 24

**Figura 8. Fotoprotección por disipación del exceso de energía luminosa asistido por el ciclo de las xantofilas. La xantofila violaxantina es convertida a zeaxantina (vía la intermediaria anteraxantina) mediante la enzima violaxantina de-epoxidasa cuando los cloroplastos absorben exceso de luz. La zeaxantina actúa como facilitador clave para la disipación del exceso de clorofila triplete. Contrariamente, cuando la luz no es excesiva, la zeaxantina es desacoplada de la energía disipación y regresa a violaxantina, así se retorna a una utilización eficiente de la energía luminosa en la fotosíntesis. (Tomado y modificado de Demming-Adams et al. 2012). .... 27**

**Figura 9. Vista simplificada de la ruta metabólica metileritritol fosfato donde el primer metabolito es la DOXP (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato). Geranilgeranil pirofosfato (GGPP), fitoeno sintasa (PSY), fotoeno desaturasa (PDS), zeta caroteno desaturasa (ZDS), caroteno isomerasa (CRTISO), licopeno β-ciclasa (LCY-b), ε-caroteno hidroxilasa (ECH), zeaxantina epoxidasa (ZEP), violaxantina deepoxidasa (VDE), neoxantina sintasa (NXS). (Tomado y modificado de Tan et al. 2003). .... 29**

**Figura 10. Ruta biosintética de ácido abscísico (ABA). Los isómeros 9-cis de la violaxantina y neoxantina son fragmentados para generar moléculas de 15 carbonos. En el último paso donde el ABA aldehído se convierte en ABA hay dos tipos de mutantes. Uno es en el gen *aao3* y el otro en la síntesis del cofactor molibdeno de esta enzima. NCED, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa; SDR1, deshidrogenasa/reductasa 1 de cadena corta; AAO3, ABA aldehído oxidasa 3. (Tomado y modificado de Tan et al. 1997). .... 30**



# Fisiología comparada de una línea celular clorofílica y una mutante amarilla del zacate *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths en condiciones de estrés osmótico

Betzaida Jiménez Francisco, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

## Resumen

Las suspensiones celulares clorofílicas de plantas superiores son una herramienta valiosa para estudiar las respuestas y señales a estrés hídrico asociadas con el cloroplasto. Debido a su importancia metabólica los cloroplastos actúan como sensores de los cambios ambientales y de las redes complejas de señales que coordinan las actividades celulares y ayudan a la célula durante el estrés. En el presente trabajo se realizó la caracterización fisiológica de dos líneas celulares en suspensión del zacate *B. gracilis*, que se caracterizan, una por ser altamente clorofílica y, la otra, una mutante deficiente de clorofila; se estudió el efecto de la deficiencia de clorofila en la respuesta al estrés osmótico mediante la evaluación de las relaciones hídricas, crecimiento, cambios en los niveles de pigmentos clorofílicos y carotenoides y en la acumulación de prolina y ácido abscísico (ABA). Y el efecto de un periodo de exposición a 0.375  $\mu$ M de ABA en las variables antes mencionadas. La deficiencia de clorofila en la línea mutante estuvo relacionada con daños en la estructura del cloroplasto, concentraciones bajas de carotenoides y menor acumulación de biomasa fresca. El estrés osmótico provocó disminución en el potencial hídrico y osmótico con efectos negativos en la acumulación de peso fresco para las células clorofílicas. Mientras que el peso seco solo se vio afectado en las células mutantes. Otros resultados encontrados fueron el incremento en la concentración de clorofila, carotenoides y ABA con el incremento de la tensión osmótica en el medio. Las células mutantes no mostraron cambios significativos en el contenido de clorofila. Contrariamente los niveles de carotenoides, prolina y ABA si presentaron incremento en estas células, aunque en menor grado a los observados en la línea clorofílica. La exposición a ABA previamente a la aplicación del estrés osmótico no mostró efecto en cuanto al comportamiento en las variables mencionadas anteriormente en comparación con el tratamiento en el cual las células no fueron expuestas al ABA. Los resultados obtenidos proporcionan información relevante para la realización de estudios posteriores sobre la participación del cloroplasto en la respuesta de la célula vegetal a estrés osmótico.

**Palabras clave:** estrés hídrico, ABA, prolina, biogénesis de cloroplasto, biosíntesis de clorofila, pigmentos fotosintéticos.

# **Comparative physiology of a chlorophyllous and a yellow mutant cell line of *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths in conditions of osmotic stress**

Betzaida Jiménez Francisco, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

## **Abstract**

Chlorophyllous cell suspensions from higher plants are a valuable tool for studying the responses to water stress and signal associated with the chloroplast. Because of its metabolic importance chloroplasts act as sensors of environmental changes and complex signaling networks that coordinate cellular activities and help the cell during stress. In this work, it was carried out the physiological characterization of two cell suspension lines of the grass *B. gracilis*, one of them characterized by being highly chlorophyllous and the other one for being a mutant deficient in chlorophyll accumulation is presented. We also studied the effect of the chlorophyll deficiency in the cell response to osmotic stress by evaluating water relations, growth, changes in the levels of chlorophyll and carotenoid pigments, as well as the accumulation of proline and abscisic acid (ABA). ABA is involved in major routes of adaptation to environmental stresses, so we studied the effect of cell exposure to 0.375  $\mu\text{M}$  of this growth regulator in the aforementioned variables. The chlorophyll deficiency in the mutant line was associated with damage to the chloroplast structure, low concentrations of carotenoids and lower accumulation of fresh biomass. The osmotic stress induced a decrease in water and osmotic potential with negative effects on the accumulation of fresh weight for chlorophyllous cells, while the dry weight was only affected in mutant cells. Other results were the increase in the concentration of chlorophyll, carotenoids and ABA with increasing osmotic tension in the medium. Mutant cells showed no significant change in the content of chlorophyll; on the contrary carotenoid, proline and ABA levels in these cells did show an increase, however, they were low with respect to the chlorophyll cell line. Exposure of cells to ABA as a pre-stress treatment did not affect the studied variables in comparison to cells directly grown in the hyperosmotic medium. The results obtained provide relevant information for further studies on the chloroplast involvement of the plant cell response to osmotic stress.

**Keywords:** drought stress, ABA, proline, chloroplast biogenesis, chlorophyll biosynthesis, photosynthetic pigments.

## Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las respuestas de las plantas para tolerar el déficit hídrico están integradas en un sistema complejo de mecanismos a nivel celular y del organismo completo (Munns, 2002). Dichas respuestas están directamente relacionadas con la especie y genotipo, tiempo y severidad del estrés, edad y estadio de desarrollo, tipo de célula y órgano, incluso del compartimento celular donde se presente (Bohnert et al. 1995). Pueden ser caracterizadas por diversas variables fisiológicas, bioquímicas y moleculares dentro de las cuales se puede mencionar el crecimiento, cambios en las relaciones hídricas y comportamiento estomático, acumulación de iones o moléculas orgánicas en los tejidos, alteraciones en los contenidos de los principales pigmentos que conforman el aparato fotosintético, y cambios en la expresión de genes.

Las investigaciones en el campo de la fisiología del estrés por déficit hídrico se han realizado principalmente con plantas completas, con particular énfasis en el comportamiento estomático. Sin embargo, las suspensiones celulares de plantas brindan condiciones controladas en relativamente poco espacio para el estudio de las respuestas celulares al estrés hídrico. Aparte de proporcionar un ambiente físico y nutricional estable, que es difícil de regular en un sistema experimental tradicional en campo o en invernadero (Gangopadhyay et al. 1997).

El zacate navajita azul, es una de las gramíneas de mayor importancia económica para Norteamérica y, en particular, para México por su alto valor forrajero, amplia distribución y adaptación (Gosz y Gosz, 1996). Esta gramínea es altamente tolerante al pastoreo, frío, fuego y a la sequía. Debido a sus características de tolerancia a sequía, el sistema de suspensiones celulares clorofílicas del zacate navajita azul es una excelente herramienta para estudiar el efecto del estrés osmótico en condiciones controladas de laboratorio. Las suspensiones celulares clorofílicas de esta gramínea fueron descritas originalmente por Aguado-Santacruz y colaboradores, en el año 2001. A partir de dicha línea clorofílica se estableció un sistema de suspensión celular deficiente de clorofila resultado de una mutación espontánea.

Debido a que las mutantes de clorofila solo se mantienen viables durante cierta etapa de su desarrollo, pocos estudios han sido publicados acerca de la relación entre la deficiencia de clorofila y los efectos del estrés hídrico. Además, la obtención de material con mutaciones identificadas principalmente por la deficiencia de pigmentos fotosintéticos representa una herramienta útil para estudiar el papel del cloroplasto en la adaptación a diferentes condiciones de

estrés como el osmótico, así como de otros procesos metabólicos que se llevan a cabo o dependen de las rutas bioquímicas llevadas a cabo en el cloroplasto.

Con la finalidad de contribuir al conocimiento del papel de los cloroplastos en el proceso de respuesta y adaptación al estrés osmótico en los sistemas de suspensión celular del zacate *B. gracilis* el presente trabajo consideró la realización de investigaciones que son descritas en tres capítulos. El primero consiste en el estudio de las diferencias fisiológicas entre dos líneas de suspensiones celulares del zacate *B. gracilis*, una altamente clorofílica y la otra deficiente con fenotipo amarillento. En el segundo se estudió la respuesta de estas líneas celulares a diferentes niveles de estrés osmótico (0%, 14% y 21% de polietilenglicol, PEG) para evaluar el contraste en el contenido de clorofila en las relaciones hídricas, contenido de pigmentos fotosintéticos, prolina y ABA. Finalmente, se estudió el efecto en el cultivo de las células de un medio suplementado con 0.375  $\mu\text{M}$  de ABA antes de la aplicación de estrés osmótico con 21% de PEG.

## **1.2 Objetivo general**

Realizar un análisis comparativo ultraestructural y fisiológico de dos líneas celulares del zacate *Bouteloua gracilis* bajo condiciones de estrés osmótico, analizando el efecto de un pre-tratamiento con ABA.

## **1.3 Objetivos específicos**

1.3.1 Caracterizar dos líneas celulares contrastantes en su contenido de clorofila del zacate *B. gracilis* en términos de crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos y estructura del cloroplasto.

1.3.2 Evaluar la respuesta al estrés osmótico de dos líneas celulares contrastantes en su contenido de clorofila del zacate *B. gracilis* analizando los cambios en relaciones hídricas, crecimiento, la acumulación de ABA, prolina y pigmentos fotosintéticos.

1.3.3 Analizar el efecto de un medio de cultivo suplementado con 0.375  $\mu\text{M}$  de ABA en la respuesta al estrés osmótico de dos líneas celulares del zacate *B. gracilis* contrastantes en su contenido de clorofila.

## 1.4 Hipótesis

1.4.1 Las diferencias en el crecimiento y contenido de clorofila de dos líneas celulares del pasto *B. gracilis* están ligadas a la desorganización en la estructura del cloroplasto.

1.4.2 Cualquier mutación que afecta la morfología y funcionamiento del cloroplasto trae como consecuencia alteraciones en la respuesta al estrés osmótico.

1.4.3 El ABA aplicado exógenamente tiene un efecto positivo en el proceso de adaptación y respuesta al estrés osmótico de dos líneas celulares del zacate *B. gracilis* contrastantes en su contenido de clorofila.

## Capítulo II. Revisión de literatura

### 2.1 El agua en las plantas

El agua es fundamental para los procesos vitales de los seres vivos: En plantas constituye del 80-95% de la masa de los tejidos en crecimiento. Las plantas necesitan mantener niveles de agua adecuados en sus tejidos para asegurar su crecimiento, sobrevivencia y realizar procesos fisiológicos como la fotosíntesis y asimilación de nutrimentos. Debido a sus propiedades polares, tiene gran influencia en la estructura y la estabilidad de moléculas tales como proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos (Kirkham, 2005). En las células vegetales la turgencia se genera por la presión de agua que es también la fuerza que permite la expansión celular.

El potencial de agua ( $\Psi_w$ ) es el factor principal que determina el movimiento de agua en el sistema suelo-planta-atmósfera. En la planta está integrado por dos componentes, el potencial osmótico (concentración de solutos) y potencial de turgencia (presión celular). A nivel celular, el flujo de agua hacia dentro o fuera de la célula es determinado por la permeabilidad de la membrana y por el gradiente en el potencial de agua ( $\Delta\Psi_w$ ) que actúa como la fuerza impulsora del movimiento a través de la membrana. Mediante ósmosis el agua se mueve de zonas con alta actividad acuosa (bajas concentraciones de solutos) a áreas con baja actividad acuosa (altas concentraciones de solutos). En condiciones normales de disponibilidad de agua, el citoplasma de la célula tiene más solutos que el medio, por lo que la célula toma el agua disponible en el medio para llevar a cabo sus funciones vitales. Cambios significativos del potencial hídrico en el ambiente genera estrés en la planta, el cual interfiere con las actividades celulares normales e incluso puede ser causa de muerte.

## **2.1 Factores que afectan la disponibilidad de agua en las plantas**

Considerando la importancia que tiene el agua para las plantas una cantidad limitada o excesiva de este líquido constituye un factor inductor de situaciones estresantes. Las plantas en algún momento de su ciclo están sujetas a algún grado de estrés por déficit hídrico. En los sistemas naturales un déficit de agua puede ser el resultado de poca precipitación y mala distribución, baja capacidad de retención de agua del suelo, salinidad excesiva, temperaturas extremas frías o calientes, baja presión de vapor atmosférico o por una combinación de estos agentes.

A lo largo de la evolución las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten tolerar diferentes niveles de déficit de agua hasta aquellas que han logrado sobrevivir en ambientes desérticos; estas adaptaciones pueden ser diferentes para especies cultivadas y no cultivadas. Las plantas responden de tres formas diferentes al déficit hídrico: especies que escapan, especies que evitan y especies que toleran el déficit hídrico (Levitt, 1980).

El escape es uno de los mecanismos más simples por el cual algunas plantas se enfrentan a la escasez de agua; se refiere a la habilidad de una planta de completar su ciclo de vida antes de comenzar un periodo de escasez de agua. El ejemplo más conocido lo constituyen las especies anuales efímeras que en regiones desérticas germinan, crecen, florecen y completan la maduración de sus semillas en pocas semanas después que una lluvia ha humedecido el suelo.

En el mecanismo de evasión, las plantas desarrollan características morfológicas o fisiológicas que reducen la pérdida de agua por evaporación, ó aumentan la absorción de agua para evitar la deshidratación. Dentro de las características morfológicas se encuentran la presencia de una cutícula gruesa, el enrollamiento y el cambio de orientación de las hojas que reducen la pérdida de agua. Por otro lado, el desarrollo de un sistema radical profundo aumenta la absorción de la misma.

Una planta es tolerante cuando evita los daños que causan el déficit hídrico a través de adaptaciones bioquímicas y fisiológicas a nivel celular. La tolerancia a la deshidratación incluye procesos que permiten crecer o sobrevivir después de exponer a la célula a un potencial de agua bajo. Si el déficit es severo, entonces las células de las plantas pierden la presión de turgencia o ésta se reduce hasta tal punto que se restringe la expansión celular necesaria para el crecimiento. Con el propósito de reanudar su crecimiento la célula debe ajustar su potencial osmótico interno de modo que la disminución del potencial osmótico sea suficiente para reanudar la expansión celular.

### **2.3 Respuesta de las plantas al estrés hídrico**

El proceso de deshidratación durante el estrés hídrico se caracteriza por cambios fundamentales en las relaciones hídricas, en los procesos fisiológicos y bioquímicos, la estructura de la membrana y estructura de los orgánulos celulares. Las células deben ser capaces de adaptar su metabolismo para sobrevivir en un ambiente osmóticamente dinámico.

Uno de los principales mecanismos que las plantas usan para contrarrestar los efectos detrimentales de la pérdida de agua es por la síntesis de solutos compatibles, típicamente ciertos polioles, azúcares, aminoácidos, betaínas entre otros compuestos relacionados (Ramanjulu y Bartels, 2002). Estos compuestos poseen la propiedad de proteger los componentes celulares de los daños ocasionados por la deshidratación, en ocasiones también pueden fungir como osmoreguladores (Nayyar, 2003). La elevada solubilidad en agua y no poseer carga a pH neutro son las propiedades comunes de estos compuestos. Además, a concentraciones elevadas poseen efectos bajos o nulos sobre las interacciones entre las macromoléculas como proteínas y ADN.

La prolina es un aminoácido que se acumula en grandes concentraciones en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico (Yamada et al. 2005). En diferentes especies de plantas sometidas a estrés hídrico las concentraciones altas de prolina se han relacionado con la tolerancia a este estrés, ya que



usualmente este aminoácido se sintetiza en mayor cantidad en especies tolerantes que en especies sensibles. (Ashraf y Foolad, 2007). La prolina es altamente soluble en agua y se acumula en hojas de varias plantas halófilas que crecen en ambientes salinos, en hojas y brotes de plantas creciendo a potenciales de agua bajos, granos de polen, regiones apicales de raíz que experimentan déficit hídrico y suspensiones celulares de plantas expuestas a choque osmótico. Se cree que los solutos compatibles, como la prolina, están involucrados en el proceso de osmoregulación (Kumar et al. 2003); otras funciones de la prolina es la estabilización de membranas y proteínas, desactivación de radicales libres y tampón celular del potencial redox bajo estrés. Además, se conoce que la prolina induce la expresión de genes de respuesta a estrés, el cual posee elementos de respuesta a prolina en sus promotores (Chinnusamy et al. 2005).

Los efectos del estrés hídrico se reflejan en las rutas metabólicas, asimilación de nutrimentos, estructura de membranas entre otras. Por lo tanto, no es sorprendente que el contenido de reguladores de crecimiento también presente cambios debido al estrés. La actividad de estas moléculas depende de la concentración y de sus interacciones (Pospíšilová, 2003). El estrés hídrico provoca cambios en el balance hormonal, incluyendo incremento en el contenido de ABA y, posiblemente, el declive en el contenido de citocininas, auxinas y giberelinas en las hojas. Sin embargo, el mecanismo preciso de estos cambios no está completamente elucidado.

El ABA es un importante regulador de diferentes procesos fisiológicos en las plantas y está considerado como un componente clave en las respuestas inducidas por déficit hídrico, salinidad y temperaturas bajas. En estas condiciones estresantes, el ABA controla la apertura estomática e incrementa la conductividad hidráulica de la raíz (Zhang et al. 1995); además induce la expresión de genes que codifican enzimas y otras proteínas involucradas en la tolerancia a la deshidratación celular (Zhu et al. 2002). El ABA está involucrada en la síntesis de solutos como la prolina; demostrado en hojas de *Lycopersicon esculentum* tratadas con ABA presentó incremento en la concentración de prolina comparada

con hojas no tratadas con este regulador de crecimiento. La respuesta también se observó en meristemos apicales de raíz donde la síntesis de prolina fue dependiente de ABA (Sharp et al. 1994).

Diversos estudios se han enfocado en la aplicación de reguladores de crecimiento con fines de mitigar los efectos dañinos de la salinidad y sequía, principalmente. Se encontró que la aplicación de ABA exógeno incrementa la actividad de enzimáticos antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa además de los no enzimáticos como el ascorbato, glutatión reducido, tocoferol y carotenoides (Jiang y Zhang, 2004).

Durante el estrés se producen las especies reactivas de oxígeno (ERO). Los efectos deletéreos de estas moléculas en las estructuras biológicas incluyen rompimiento de ADN, oxidación de aminoácidos y proteínas, y peroxidación de lípidos. Las moléculas dañadas deben ser reparadas o bien sintetizadas de nuevo. Sin embargo, cuando el estrés es muy intenso y no se puede contrarrestar el efecto, la célula muere. De hecho, se conoce que la mayoría de los daños en las plantas por exposición al estrés está asociado con el daño oxidativo a nivel celular (Allen, 1995). Por otro lado, el incremento en la producción de ERO causa inducción de genes con actividad antioxidante en esta vía la capacidad de los sistemas antioxidantes para desactivar las ERO se refleja en la tolerancia de la planta al estrés, que como se mencionó anteriormente esta mediado por ABA.

### **2.3 Suspensiones celulares de plantas superiores**

Desde el establecimiento de los primeros sistemas de suspensiones celulares, estos han tenido diversas aplicaciones que van desde la propagación clonal de plantas hasta la investigación de diversas funciones celulares en los aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares. De hecho, las células vegetales aisladas han sido extensamente utilizadas para el estudio de la fotosíntesis, división celular, replicación de cloroplasto (Takeda et al. 1992), susceptibilidad a infecciones virales, actividad de herbicidas (Sato et al. 1987), diferenciación celular y producción de metabolitos secundarios (Yeoman y Yeoman, 1996), entre otros.

Estos sistemas han sido iniciados de callos friables inducidos a partir de una gran variedad de explantes entre los que figuran discos de hojas, secciones de hipocotilo, tejidos de raíces o protoplastos (Hu et al. 1999). Cuando un callo friable es colocado en medio líquido en agitación, usualmente de la misma composición del medio sólido para el cultivo del callo, se dispersan fácilmente en el medio en células o en pequeños agregados. En condiciones adecuadas estas células continúan creciendo y dividiéndose, obteniéndose así un cultivo de suspensión celular.

La mayoría de las suspensiones celulares de plantas superiores son heterotróficas y crecen en medios complejos que incluyen sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y azúcares como fuente de carbono reducido; la adición de sacarosa al 3% es la cantidad más empleada en los medios de cultivo. Estas células contienen cloroplastos que no están bien desarrollados conteniendo muy bajas concentraciones de clorofila y sin capacidad de crecer de forma autótrofa.

### **2.3.1 Suspensiones celulares del zacate *Bouteloua gracilis* como modelo de estudio**

El zacate *Bouteloua gracilis* es una especie importante de los pastizales áridos y semiáridos de México y Estados Unidos (Kröel-Dulay et al. 2004); constituye en gran parte el sustento de la ganadería extensiva de muchos agostaderos del Altiplano Central Mexicano y también es fuente de forraje para la fauna silvestre de estos ecosistemas (Gosz y Gosz, 1996). Este zacate representa un excelente modelo para estudiar la respuesta a estrés hídrico y osmótico debido a que *B. gracilis* exhibe elevada resistencia al déficit hídrico y a otras condiciones de estrés abiótico.

El inicio de un sistema de cultivo *in vitro* y posteriormente un sistema de suspensión celular altamente clorofílica de *B. gracilis* abrieron perspectivas para el estudio de este zacate a nivel celular (Aguado-Santacruz et al. 2000; Aguado-Santacruz et al. 2001).

Se ha estudiado la respuesta de la línea celular altamente clorofílica al estrés osmótico inducido con polietilenglicol de peso molecular 8000 (PEG 8000), encontrándose una alta acumulación de clorofila en condiciones de estrés osmótico (21% PEG 8000) y logrando sobrevivir en concentraciones de hasta 28% de este agente osmótico (García-Valenzuela et al. 2005).

Por otro lado, la aplicación de cloruro de sodio para estudiar el efecto de estrés salino en esta línea celular, ha permitido establecer que concentraciones de 75 y 175  $\mu\text{M}$  de cloruro de sodio inhiben el crecimiento. Este estudio también arrojó resultados importantes referentes a la acumulación de niveles de prolina altos como una importante respuesta fisiológica al estrés salino (Moreno-Gómez, 2009).

De la línea celular clorofílica se aisló una mutante espontánea cuya característica principal es la deficiencia de clorofila y presenta fenotipo amarillo (Fig.1). La caracterización de esta línea a nivel fisiológico, es de suma importancia para estudiar la participación del cloroplasto en la respuesta de esta línea celular al estrés osmótico.

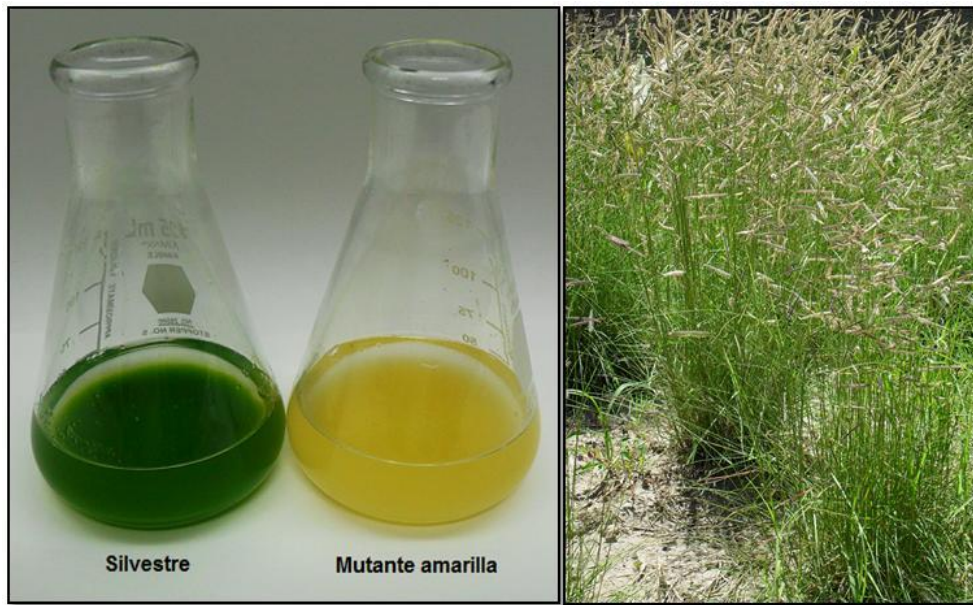


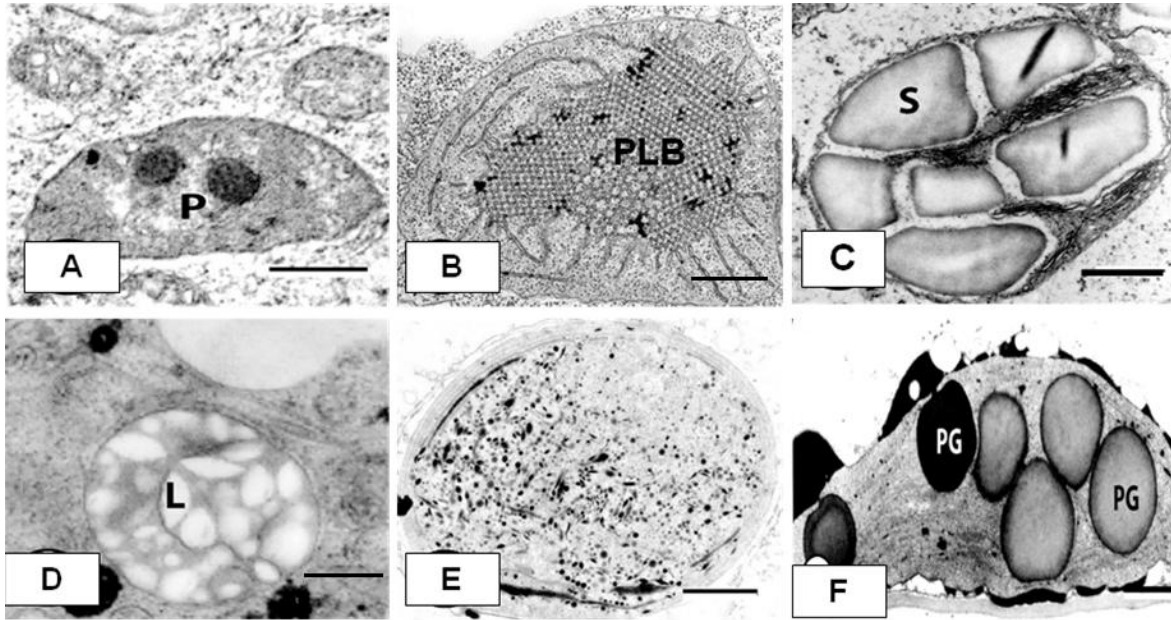
Figura 1. Suspensiones celulares y ejemplar del zacate *Bouteloua gracilis*.

## 2.4 Plastidios y cloroplastos

Los plastidios son un grupo diverso de orgánulos de origen procariótico que realizan diferentes funciones esenciales para el desarrollo de las células vegetales. Además de la fotosíntesis, están involucrados en numerosos procesos metabólicos, dentro de los que destacan la asimilación de nitrógeno, la síntesis de almidón, lípidos, aminoácidos y de pigmentos, pirimidinas, terpenos, tetrapirroles y reguladores del crecimiento vegetal (Neuhaus y Emes, 2000).

Los plastidios difieren en su estructura interna, sin embargo todos estos orgánulos tienen una envoltura compuesta por dos membranas, ribosomas similares al que poseen los procariontes, un genoma pequeño y se replican por división. Se reconocen dos grupos principales de plastidios: los no fotosintéticos y los fotosintéticos.

Los plastidios no fotosintéticos incluyen a los proplastidios, etioplastos y otros orgánulos especializados como son los leucoplastos, elaioplastos, cromoplastos y gerontoplastos (Fig. 2). Los cloroplastos son los plastidios fotosintéticos mejor conocidos; ya que se encuentran en todos los tejidos verdes de las plantas incluyendo hojas, cotiledones, tallos, flores y vainas inmaduras (López-Juez y Pyke, 2005).



**Figura 2.** Micrografías representativas de algunos tipos de plastidios no fotosintéticos. A) Proplastidio de punta de raíz de *Ipomea batatas*, carecen de estructura interna y poseen inclusión de cuerpos proteicos (P) Barra de escala=0.5  $\mu\text{m}$ . B) Etioplasto de plantas de avena crecidas en oscuridad, se muestra la estructura del cuerpo prolamelar (PLB). C) Amiloplasto con gránulos de almidón (S) vistos en receptáculo en antesis de fresa. D) Elaioplasto de *Brassica napus* donde se observan las gotas de lípidos (L). E) Cromoplastos de frutos maduros de *Arum italicum*. F) Gerontoplasto que contiene plastoglobulos (PG) observados en hoja senescente de *Nicotiana tabacum*. Barra de escala en B-F=1  $\mu\text{m}$ . (Tomado de Wise, 2006).

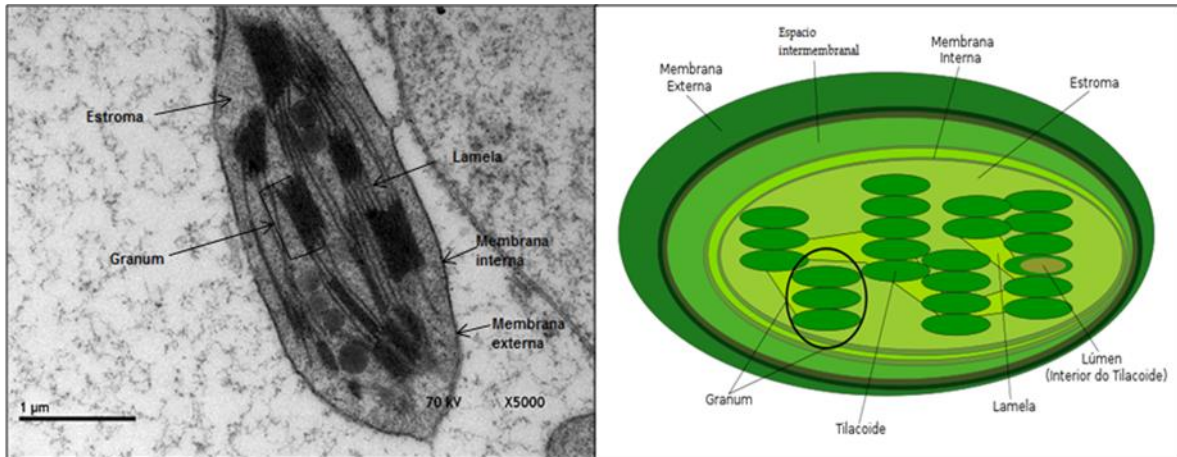
#### 2.4.1 Los cloroplastos

Los cloroplastos son estructuras discoideas, con un diámetro que oscila de 5-10  $\mu\text{m}$ , cada célula puede poseer de 10 a más de 100 cloroplastos, dependiendo del tipo celular y la especie. Son plastidios especializados para la fotosíntesis y contienen tres sistemas de membranas: la membrana interna y la membrana externa que conforman la envoltura del orgánulo y las membranas tilacoidales (Fig. 3). La membrana interna es altamente permeable y permite la difusión libre de moléculas entre el citoplasma y el compartimento intermembranal, que es el espacio acuoso entre las dos membranas. Por otro lado, la membrana interna posee permeabilidad más regulada que la envoltura externa, ya que contiene transportadores específicos que regulan el intercambio de metabolitos entre el cloroplasto y el citoplasma (Block et al. 2007).

Las membranas que conforman la envoltura del orgánulo encierran al estroma, que es un compartimento acuoso donde se alojan las enzimas involucradas en la fijación de CO<sub>2</sub>, moléculas de ADN y de ARNt, ribosomas y plastoglobulis que almacenan lípidos y carotenoides (Fig 3; Dekker y Boekema, 2005).

Los tilacoides están conformados por una red física continua y tridimensional de membranas diferenciadas en dos dominios físicos distintos: las granas que son estructuras cilíndricas de sacos aplanados de membranas las cuales están interconectadas por una región de membrana individual llamada lamela del estroma (Fig. 3). Los complejos fotosintéticos están anclados en las membranas que conforman al tilacoide: el fotosistema I se localiza en las lamelas del estroma, mientras que el fotosistema II se encuentra exclusivamente en las granas. En estos complejos proteicos enlazados a moléculas de clorofila, carotenoides y otros pigmentos ocurre el transporte de electrones durante la fotosíntesis que genera el poder reductor y ATP necesarios para la fijación de carbono. Otros complejos relacionados con la asimilación de azufre y nitrógeno también se encuentran en este compartimento del cloroplasto (Jarvis et al. 2000). El lumen es el espacio acuoso que encierran los sacos de membranas que conforman el tilacoide. En este compartimento se produce el oxígeno a partir de la ruptura de la molécula de agua. Los electrones producidos son transportados del lumen al estroma durante la fotosíntesis (Schubert et al. 2002).





**Figura 3. Micrografía y representación esquemática de la estructura de un cloroplasto. Micrografía fuente personal, esquema tomado de <http://uachfcqgqbp.blogspot.mx> [Consulta: 050413].**

#### **2.4.2 Origen y evolución de los cloroplastos**

Los cloroplastos son orgánulos semiautónomos. Esto significa que contienen los genes necesarios para los procesos que toman lugar en este orgánulo y un sistema para la expresión de estos genes, pero no son independientes de los productos de genes nucleares para su biogénesis y funcionamiento.

La interdependencia entre cloroplasto y núcleo se ha explicado mediante la teoría del origen endosimbionte. La primera contribución a esta teoría fue postulada por Schimper en 1883, quien basándose en observaciones microscópicas de diferentes protistas pensó que los plastidios podrían tener origen procariótico (Schimper, 1883). Para 1905, Constantin Mereschkowski introdujo la teoría de la simbiogénesis donde propuso que los cloroplastos fueron alguna vez una bacteria simbiótica (Mereschkowski, 1905). En 1967, Lynn Sagan-Margullis resumió estas evidencias y elaboró la teoría endosimbiótica como la base del origen de las células eucarióticas.

Estudios posteriores han apoyado esta teoría, de tal modo que se considera que tanto la mitocondria como el cloroplasto tienen origen procariótico; una alfa-proteobacteria es ancestro de la mitocondria y una cianobacteria lo es del

cloroplasto (Anderson et al. 1998; Gould et al. 2008). En el caso del cloroplasto, una cianobacteria fue engullida mediante fagocitosis por una célula ancestro de las plantas y en algunas de estas células, la cianobacteria no fue digerida sino que se mantuvo como un endosimbionte. A través del tiempo, el procarionte fue reducido a un orgánulo (plastidio) con sistema de doble membrana y transmitida verticalmente a las generaciones subsecuentes (Ochman, 2000).

El genoma de los cloroplastos es sustancialmente más pequeño que el genoma de una cianobacteria. Mientras que una cianobacteria típicamente tiene un genoma que codifica varios cientos de proteínas, el genoma del cloroplasto usualmente codifica de 60-200 proteínas, lo cual constituye solo del 5-10% del genoma cianobacterial que le dio origen. Se supone que esto es resultado de la pérdida de genes o la transferencia de los mismos al núcleo a través del proceso de evolución (Timmis et al. 2004).

### **2.4.3 Biogénesis de cloroplastos**

El desarrollo de los cloroplastos ocurre a partir de los etioplastos o los proplastidios, dependiendo de la disponibilidad de luz en el meristemo durante las primeras etapas del desarrollo (Fig. 4). Los proplastidios son pequeños orgánulos indiferenciados (0.5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro) desprovistos de pigmentos y precursores de todas las otras formas de plastidios (*i.e.* etioplastos, cloroplastos, cromoplastos, amiloplastos y gerontoplastos) (López-Juez, 2007).

En ausencia de luz, los proplastidios se desarrollan en etioplastos, los cuales son de 5-10 veces más grandes que sus progenitores. Los etioplastos poseen una estructura paracristalina de membranas llamado cuerpo prolamelar, el cual contiene galactolípidos, NADPH, niveles basales de carotenoides, precursores de la clorofila como la protoclorofilida enlazada a la enzima protoclorofilida oxidoreductasa (POR; Fig. 4). De forma radial al cuerpo prolamelar hay estructuras de membranas llamadas protilacoides, los cuales contienen el dominio CF1 de la ATP sintasa y varios transportadores de la cadena de electrones (*i.e.* Cyt b559, Cyt f) (Solymosi y Schoefs, 2010).

Cuando ocurre la exposición a la luz, tanto los proplastidios como los etioplastos, se desarrollan completamente en cloroplastos en un proceso llamado enverdecimiento o de-etiolación. Para tal efecto el proteoma del etioplasto muestra drásticos y rápidos cambios en las primeras dos horas después de exposición a iluminación, lo cual refleja el cambio del metabolismo heterotrófico a autotrófico (Waters y Langdale, 2009).

La luz induce la actividad de la enzima protoclorofilida oxidoreductasa (POR) la cual promueve la conversión de la protoclorofilida en clorofilida *a*, molécula que es subsecuentemente convertido en clorofila *a* y clorofila *b*. La enzima POR disminuye drásticamente su nivel y secuencialmente se forman los fotosistemas, primero el fotosistema I, seguido del fotosistema II y finalmente los complejos cosechadores de luz. Este proceso toma de 12-24 h para que el cuerpo prolamelar se transforme completamente y forme las membranas tilacoidales (Pogson y Albretch, 2011).

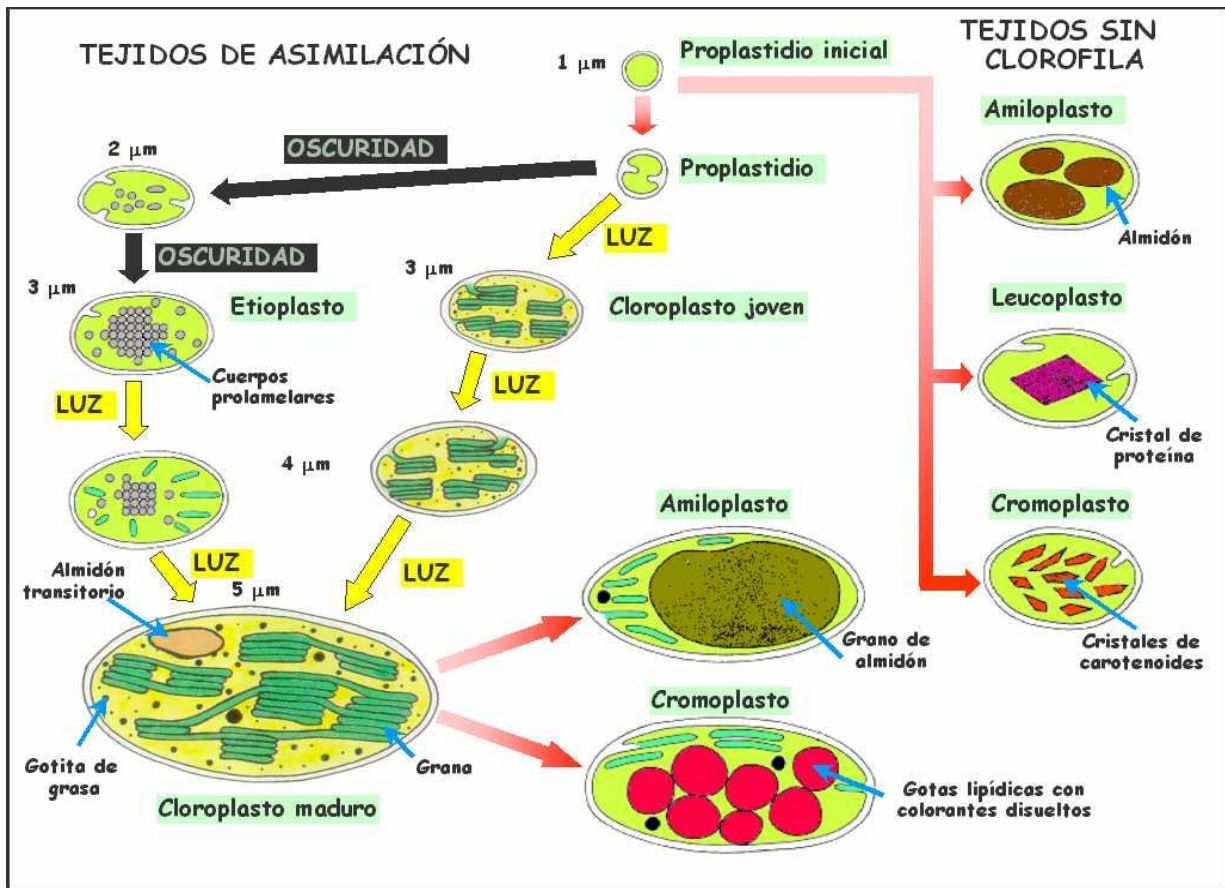


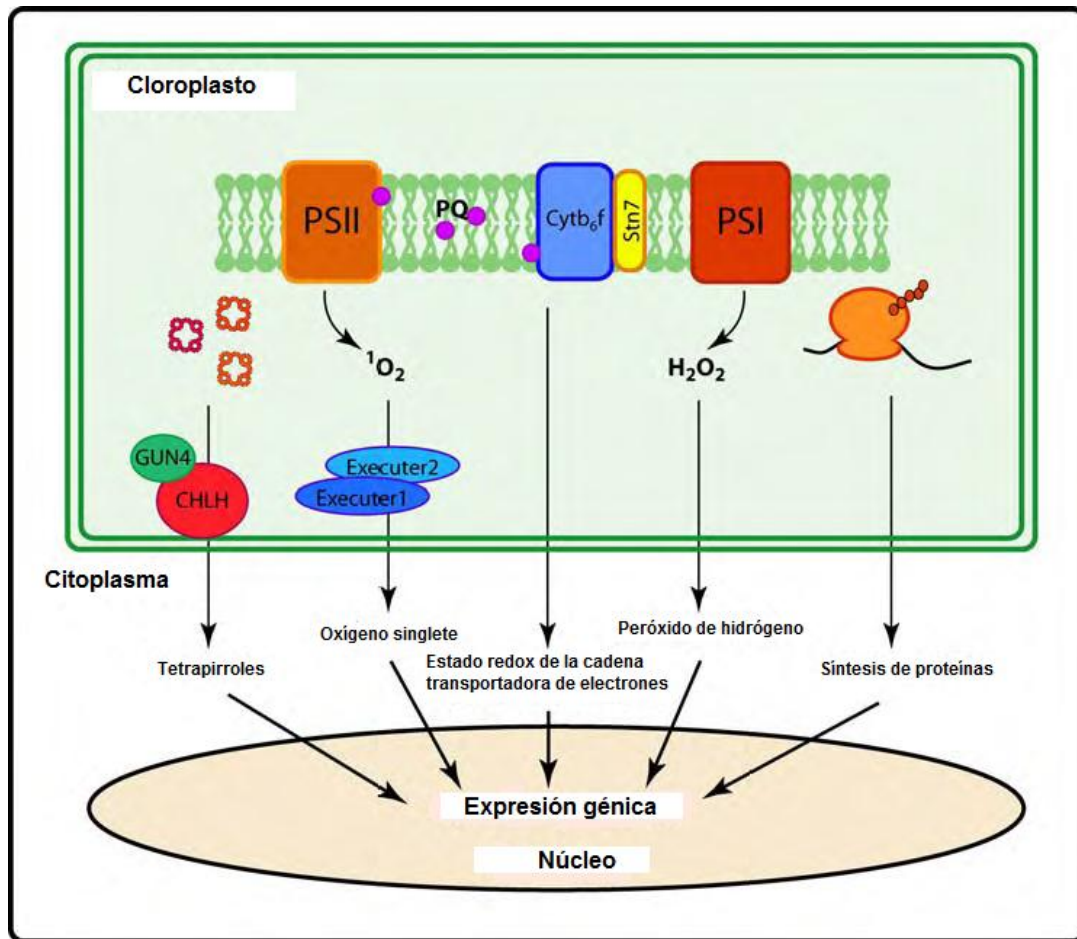
Figura 4. Esquema que muestra las diferentes vías para el desarrollo de cloroplastos y otros plastidios. Tomado de: <http://www.euita.upv.es> [Consulta: 050413].

## 2.5 Comunicación cloroplasto-núcleo

Debido a su origen endosimbionte el cloroplasto se considera un orgánulo semiautónomo. La mayoría de los complejos proteicos y las vías metabólicas de síntesis localizadas en el cloroplasto contienen componentes codificados por el genoma nuclear y por el plastoma. Por lo que, en teoría, todas las funciones cloroplásticas requieren la acción concertada de factores nucleares y plastídicos (Fig. 5). Se requieren procesos regulatorios complejos para asegurar que la expresión de genes de proteínas codificadas por el núcleo esté correctamente coordinadas con la expresión de proteínas codificadas en el plastoma, en respuesta a estímulos de desarrollo y ambientales (Mullet, 1988). La coordinación necesaria entre el núcleo y el cloroplasto se alcanza solo con el intercambio de señales entre estos dos compartimentos celulares (Jarvis, 2003).

Las señales pueden proceder del núcleo dirigidas a cloroplasto, denominado señalización anterógrada; o del cloroplasto al núcleo llamado señales retrógradas. Las señales anterógradas incluyen, principalmente, factores necesarios para la expresión de genes cloroplásticos, ya que el núcleo codifica la mayoría de los componentes de la maquinaria de transcripción y traducción y diferentes factores que son requeridos para la expresión de genes específicos del cloroplasto (León et al. 1998; Jung y Chory, 2010).

En la actualidad, se conoce que diferentes señales surgen del cloroplasto para regular la expresión de los genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas. Algunos de los procesos que conducen a estas señales han sido identificados dentro de las que destacan la síntesis de proteínas en el plastidio, la producción de peróxido de hidrógeno, la producción de oxígeno singlete, el estado redox de la cadena transportadora de electrones y la ruta de biosíntesis de compuestos tetrapirrólicos (Fig 5; Pfannschmid, 2010). Sin embargo, aún se desconoce como estas señales salen del cloroplasto y llegan a interactuar con el núcleo.



**Figura 5. Modelo representativo que muestra algunas de las moléculas que funcionan para la señalización entre el cloroplasto y el núcleo, las cuales están fuertemente influenciados por cambios en el ambiente ocasionados por diversos estreses o bien por el estado de desarrollo del plastidio. (Tomado de Ceol, 2009).**

La existencia de rutas de señalización entre el cloroplasto y el núcleo es apoyado por la observación que los genes nucleares que codifican componentes del aparato fotosintético son regulados negativamente posteriormente a la destrucción del cloroplasto por daño foto-oxidativo causado por mutaciones o por inhibidores de la síntesis de carotenoides (Nott et al. 2006). Los genes regulados negativamente son *CAB* y *RBCS*, los cuales codifican la proteína de unión de las clorofilas *a/b* en el complejo cosechador de luz del fotosistema II, y la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa, respectivamente. En 1993, Susek y colaboradores obtuvieron una serie de mutantes llamadas GUN (genomas

desacoplados) que tienen desacoplados la expresión de *CAB* y *RBCS* durante el desarrollo del cloroplasto. Los genes *GUN*, se cree, representan componentes de las rutas de señalización entre el cloroplasto y el núcleo (Fig. 5; Susek et al. 1993).

## **2.6 Biosíntesis de pigmentos fotosintéticos y ácido abscísico**

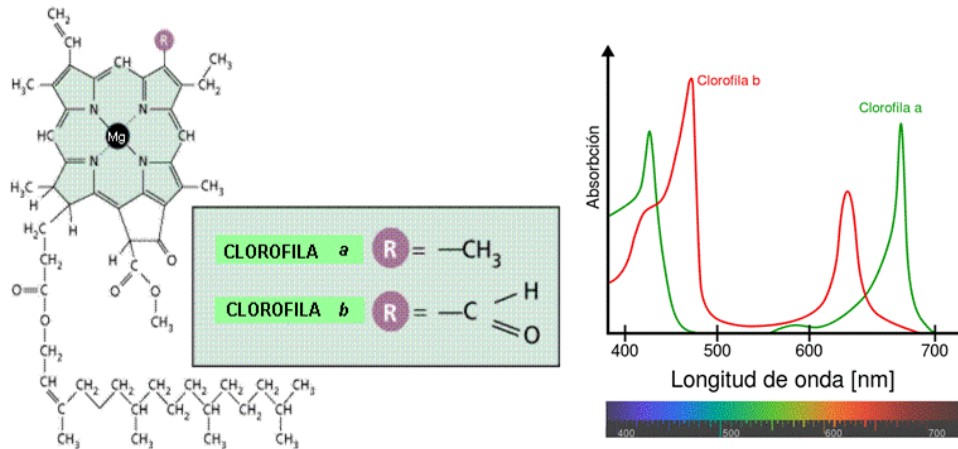
Los carotenoides y las clorofilas son las moléculas de cromóforos que tienen vital importancia en los organismos fotosintéticos. La biosíntesis de estos pigmentos, que comparten en parte los mismos precursores, requiere la actividad altamente concertada y regulada de diferentes enzimas. Los principales pasos de las respectivas rutas se describirán en las siguientes secciones.

### **2.6.1 Biosíntesis de clorofila**

Las clorofilas junto con los carotenoides se localizan en el cloroplasto y su función es la absorción de energía luminosa para la realización de la fotosíntesis. Hay dos tipos de clorofilas en las plantas superiores: la clorofila *a* y la clorofila *b*. La cantidad de éstas depende de la especie de planta, las condiciones de luz y de la disponibilidad de minerales como el magnesio. Sin embargo, el contenido normal de clorofila *a* es de 2-4 veces mayor que el de la clorofila *b*, aunque se ha encontrado que esta relación puede variar de 3:1 en *Melissa officinalis* hasta 1:1 en menta. Las plantas que crecen en oscuridad contienen menos clorofila *a* y mas clorofila *b*. El color verde en las hojas de las plantas es debido a la habilidad de la clorofila para absorber la luz en la región visible, principalmente en la región del azul (420-460 nm) y roja (650-700 nm), y reflejan la luz verde (alrededor de los 550 nm) (Nishio, 2000).

Estos pigmentos son derivados porfirínicos cuyo principal esqueleto es un arreglo de 4 anillos de pirroles que contienen un átomo de magnesio en el centro de la molécula de clorofila, el cual participa activamente en la absorción de energía luminosa. El anillo de tetrapirrol crea una estructura de dobles enlaces conjugados, el cual facilita la absorción de fotones de luz. También posee una cadena de fitol (20 carbonos) que le confiere el carácter hidrofóbico y permite anclarse en los sistemas de membranas. Hay dos tipos de clorofilas en las plantas

superiores: la clorofila *a* y la clorofila *b*. Las diferencias en la estructura entre la clorofila *a* y *b* son mínimas; solo en el grupo unido en el tercer carbono del segundo anillo tetrapirrólico. La clorofila *a* posee un grupo metilo (CH<sub>3</sub>), mientras que la clorofila *b* posee un grupo formilo (CHO) (Fig. 6).



**Figura 6. Estructura de la molécula de clorofila y su espectro de absorción. Tomado de <http://lacienciaahora-bene.blogspot.mx> [Consulta: 050413].**

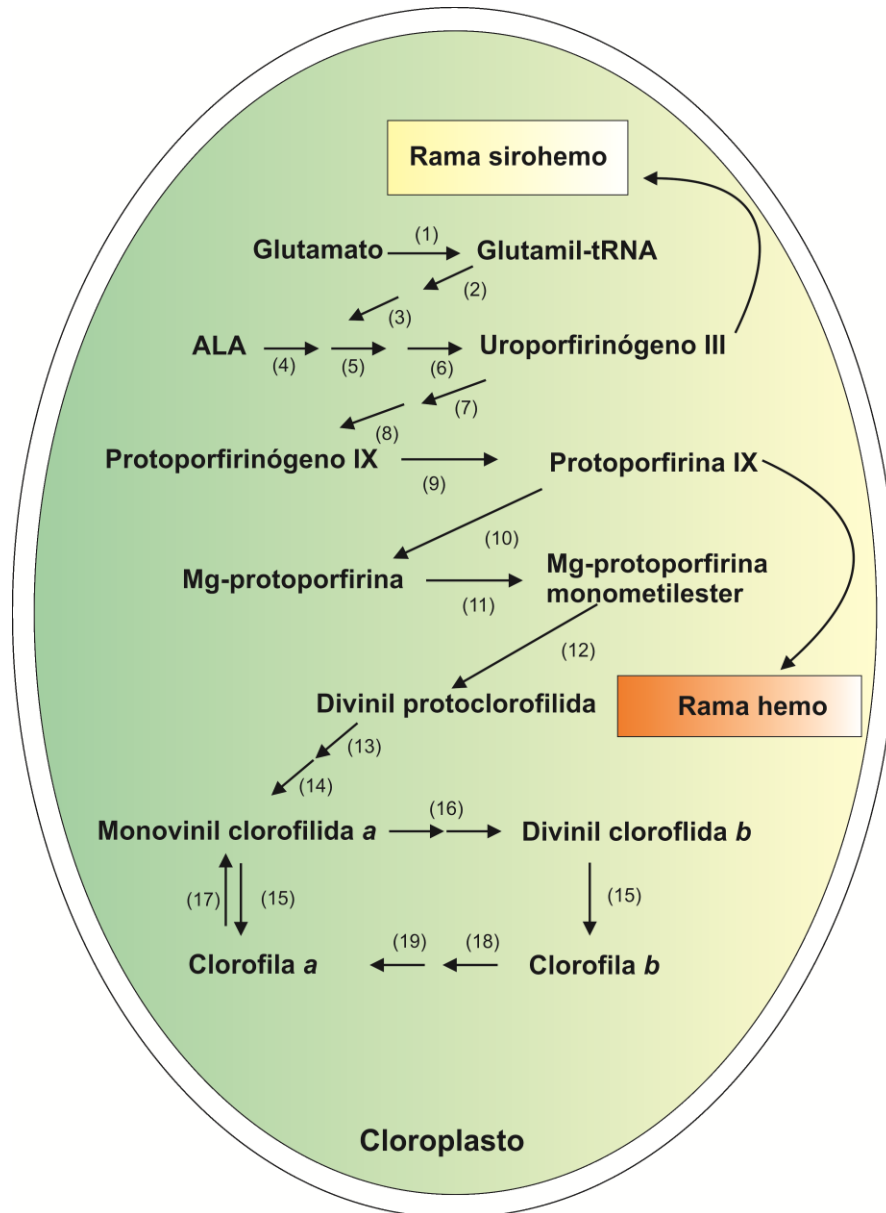
La ruta de biosíntesis de clorofila está ligada con la de otros tetrapirroles que las plantas superiores producen como los compuestos hemo, sirohemo y fitocromobilinas. El grupo hemo incluye cofactores de proteínas en diversos procesos celulares incluyendo la respiración (citocromos) y enzimas responsables del metabolismo del oxígeno (catalasa, peroxidasa y NADPH oxidasa). El grupo sirohemo es cofactor del nitrato y sulfato reductasa requeridos para la asimilación de nitrógeno y azufre del ambiente. Las fitocromobilinas forman el cromóforo del fotoreceptor del fitocromo rojo y rojo lejano el cual percibe la luz y es mediador de las señalizaciones dependientes de la luz. En plantas, algas y diferentes bacterias, todos los tetrapirroles se originan de una ruta biosintética evolutiva conservada de tetrapirroles que consiste de al menos 18 pasos enzimáticos diferentes. La mayoría de las enzimas involucradas en esta ruta son codificadas por el genoma nuclear. En la figura 7 se ilustran los principales pasos que integran la ruta de biosíntesis de la clorofila y se señalan las ramificaciones para la síntesis de los otros derivados tetrapirrólicos. El precursor de todos los tetrapirroles es el glutamilo



tRNA, el cual también está involucrado en la síntesis de proteínas en el cloroplasto. Esta molécula conecta la producción de la clorofila con la traducción de algunas de las apoproteínas que enlazan a los pigmentos fotosintéticos.

La clorofila se sintetiza dentro del cloroplasto a partir del aminoácido glutamato (Fig. 7). Las reacciones que originan a los compuestos desde el glutamato hasta el tetrapirrol protoporfirina IX, donde la ruta se ramifica entre las clorofilas y los compuestos hemo, ocurren en el estroma; ya que son catalizadas por enzimas solubles en este compartimento (Joyard et al. 2009). Los pasos posteriores en la síntesis de clorofila, que incluyen la inserción del átomo de magnesio, mediante el complejo enzimático magnesio quelatasa, el cual comprende subunidades solubles y otras hidrofóbicas unidas a las membranas del tilacoide y de la envoltura del orgánulo. De las enzimas que catalizan los pasos finales de la ruta, la clorofila sintasa se localiza en las membranas del tilacoide (Joyard et al. 2009), mientras que la clorofila *a* oxigenasa (CAO) se ha sugerido que está presente en la envoltura del cloroplasto (Eggink et al. 2004).

El penúltimo precursor de la clorofila es la protoclorofilida. El cual es reducido a clorofilida en una sola reacción que requiere luz. En angiospermas esta reacción es catalizada por la enzima dependiente de la luz protoclorofilida oxidoreductasa unida a NADPH. Los complejos clorofila-proteínas llegan a construir los bloques del aparato fotosintético. La ruta biosintética está altamente regulada en las reacciones claves que generan ácido 5-aminolevulínico, magnesio protoporfirina IX y clorofilida (Fig. 7). La expresión de genes que codifican enzimas críticas es marcadamente regulada por la luz y mediante inhibición por retroalimentación.



**Figura 7. Ilustración esquemática de la ruta de biosíntesis de clorofila. ALA: ácido 5-aminolevulínico. Los nombres de las enzimas son: (1) Glutamyl-tRNA sintetasa, (2) Glutamyl tRNA reductasa, (3) Glutamato semialdehído aminotransferasa, (4) Ácido 5-aminolevulínico deshidratasa, (5) Porfobilinógeno desaminasa, (6) Uroporfirinógeno III sintetasa, (7) Uroporfirinógeno III descarboxilasa, (8) Coproporfirinógeno III oxidasa, (9) Protoporfirinógeno IX oxidasa, (10) Magnesio quelatasa, (11) Mg-protoporfirina IX metiltransferasa, (12) Mg-protoporfirina IX metiltransferasa, (13) Protoclorofilida oxidoreductasa, (14) Divinil clorofilida reductasa, (15) Clorofila sintetasa, (16) Clorofila a oxigenasa, (17) Clorofilasa, (18) Clorofila b reductasa, (19) 7-hidroximetil clorofila a reductasa. (Dibujado de acuerdo con Tanaka y Tanaka, 2007).**

### 2.6.2 Biosíntesis de carotenoides

Los carotenoides son un grupo diverso de pigmentos encontrados en plantas, hongos y bacterias. En plantas superiores los carotenoides actúan como pigmentos accesorios en el aparato fotosintético para asistir en la captación de luz. Otra función de estas moléculas es de foto protección para prevenir el daño foto oxidativo. La ruta biosintética de los carotenoides ha sido extensamente estudiada en plantas, hongos y bacterias. La mayoría de los genes carotenogénicos han sido identificados y sus productos caracterizados; los cuales están localizados en el núcleo, pero las enzimas codificadas deben ser transportadas hacia los diferentes plastidios donde los carotenoides son sintetizados (Cunningham y Gantt, 1998).

La vía del mevalonato se asumió por mucho tiempo como la única vía para la biosíntesis de los isoprenoides. Esta visión prevaleció hasta mediados de la década de los 90 cuando se descubrió que el principal precursor de los carotenoides en las plantas, el isopentenil pirofosfato (IPP), son sintetizados por dos rutas metabólicas independientes. La primera vía ocurre en el citoplasma, a partir del ácido mevalónico, para producir compuestos como los esteroides y las citocininas.

La segunda vía es responsable de la biosíntesis de giberelinas, carotenoides, ácido abscísico y también contribuye a la biosíntesis de tocoferoles, y de las clorofilas *a* y *b*. Es una ruta que se lleva a cabo en los plastidios y se conoce como ruta del metileritritol fosfato (MEP) (Rohmer, 1999). El primer metabolito es la 1-desoxixilulosa 5-fosfato (DOXP) y tiene como precursores al piruvato y gliceraldehído-3-fosfato. El IPP formado por cualquiera de las dos vías es isomerizada por la isopentenil pirofosfato isomerasa a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) que es convertido a geranilgeranil pirofosfato (GGPP) por la adición sucesiva de tres moléculas de IPP.

El punto de partida para la biosíntesis de carotenoides es la conversión del geranilgeranil pirofosfato (GGPP) a fitoeno, reacción que es catalizada por la

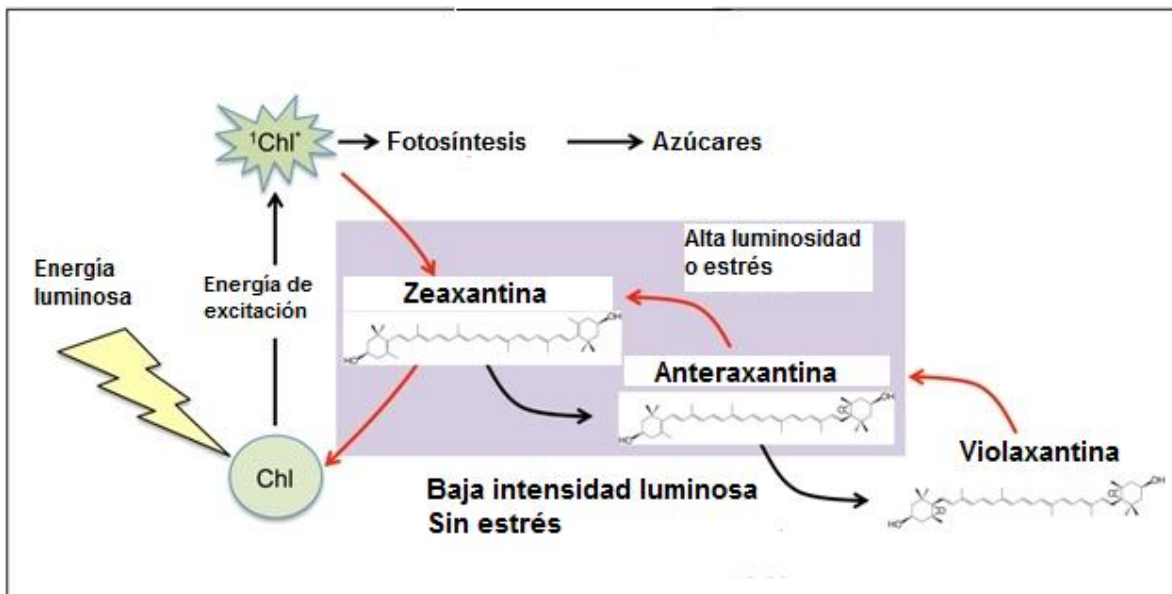
enzima fitoeno sintasa (PSY). Esta enzima toma dos unidades de GGPP de 20 carbonos y los condensa para producir el fitoeno conformado por 40 carbonos. Este paso enzimático es la limitante en diferentes especies, tejidos y estadios de desarrollo. El fitoeno no es un pigmento verdadero ya que no puede absorber la luz en la longitud de onda visible, hasta que se somete a cuatro pasos consecutivos de desaturación. En las plantas superiores este paso es realizado por dos desaturasas, una de las cuales es la fitoeno desaturasa y la otra la  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS). Estas reacciones producen el licopeno que es un pigmento rojo, el principal del jitomate. Hasta este paso el licopeno se encuentra en forma *cis*, pero la forma útil para las reacciones posteriores de la ruta requiere *trans*-licopeno, por lo que la enzima caroteno isomerasa (CRTISO) convierte el *cis*-licopeno a *trans*-licopeno (Park et al. 2002).

Los siguientes dos pasos resultan en una bifurcación de la vía, donde una ruta se relaciona con la síntesis de  $\beta$ -caroteno mediante dos reacciones consecutivas de ciclización por la enzima  $\beta$ -caroteno ciclasa (LCY-B) (Hugueney et al. 1995). La otra rama produce  $\alpha$ -caroteno a través de la acción de dos ciclasas, una de las cuales es nuevamente la LCY-B y la otra enzima es la  $\epsilon$ -caroteno ciclasa (LCY-E). Las mutantes dañadas en el paso de ciclización en el anillo- $\epsilon$  (*lut2*) acumulan altos niveles de  $\beta$ -caroteno y violaxantina (Pogson et al. 1996). El  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno solamente difieren en la posición del doble enlace en uno de los anillos terminales, además de que no todos los enlaces forman un sistema conjugado en el  $\alpha$ -caroteno, esto acarrea una pequeña, pero obvia, diferencia entre el espectro típico de tres bandas de los carotenoides.

Las xantofilas son derivados oxigenados de los carotenoides. Dos pasos de hidroxilación convierten al  $\beta$ -caroteno, primero a criptoxantina, y luego a zeaxantina por la acción de la enzima  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (BCH). Los alfa-carotenos son también dos veces hidroxilados por BCH y el anillo  $\epsilon$  por la  $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa (ECH). La mutante *lut1* (luteína deficiente) se encuentra dañada en esta última enzima y su principal característica es que sintetiza bajos niveles de luteína (Tian y DellaPenna, 2001). Los anillos beta hidroxilados de la

zeaxantina son epoxidados en dos etapas para producir primero anteraxantina y entonces violaxantina. Las mutantes del gen zeaxantina epoxidasa (zep) en *Arabidopsis* acumulan altos niveles de zeaxantina en las hojas (Rock y Zeevaart, 1991), además de poseer un fenotipo marchito debido a que no es capaz de regular la respuesta estomática causada por la deficiencia de ABA.

Durante el estrés lumínico la violaxantina puede volver a anteraxantina y zeaxantina mediante la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE). El flujo entre estos tres compuestos, influido por la intensidad luminosa, constituye el ciclo de las xantofilas (Fig. 8).



**Figura 8. Fotoprotección por disipación del exceso de energía luminosa asistido por el ciclo de las xantofilas. La xantofila violaxantina es convertida a zeaxantina (vía la intermediaria anteraxantina) mediante la enzima violaxantina de-epoxidasa cuando los cloroplastos absorben exceso de luz. La zeaxantina actúa como facilitador clave para la disipación del exceso de clorofila triplete. Contrariamente, cuando la luz no es excesiva, la zeaxantina es desacoplada de la energía disipación y regresa a violaxantina, así se retorna a una utilización eficiente de la energía luminosa en la fotosíntesis. (Tomado y modificado de Demming-Adams et al. 2012).**

Una mutante *vde* en *Arabidopsis* (*npq1*) posee baja disipación no fotoquímica de la energía y exhibe mayor fotoinhibición en las hojas que las plantas silvestres, cuando se exponen a intensidad lumínica elevada (Niyogi et al. 1998). El último de los carotenoides ubicuos en las plantas es la neoxantina, sintetizada a partir de la violaxantina por la enzima neoxantina sintasa (NXS). El gen *nxs* ha sido clonado de tomate y papa (Bouvier et al. 2000; Al-Babili et al. 2000), pero no en *A. thaliana*.

#### **2.6.2.1 Biosíntesis de ácido abscísico (ABA)**

El primer paso en la ruta de biosíntesis de ABA fue originalmente identificada por una mutación en maíz, llamada vivíparo 14 (*vp14*). Se encontró que esta mutante tenía niveles reducidos de ABA durante el desarrollo embrionario. *Vp14* es homólogo a los genes *nced* de *A. thaliana*. Esta enzima escinde las formas 9-cis-epoxi de la violaxantina y neoxantina en la posición 11 y 12 (Figura 9) para producir el precursor de ABA, la xantoxina, el cual es transportado del plastidio al citoplasma (Figura 9). Cuando el homólogo *vp14* de tomate se sobreexpresó en tabaco, el contenido de ABA incrementó hasta 10 veces, mostrando que el paso enzimático limitativo para la biosíntesis de ABA en hojas. (Thompson et al. 2000).

Los otros pasos de ruta biosintética del ABA se caracterizaron en las mutantes deficientes de ABA, *aba2* y *aba3* de *A. thaliana* (Schwartz et al. 1997). La mutante *aba2* no puede convertir xantoxina a ABA aldehído y *aba3* es incapaz de sintetizar ABA a partir de ABA aldehído en extractos libres de células obtenidas de hojas de *A. thaliana*. Se encontró que en la mutante *aba3* tenía ausente el cofactor molibdeno (MoCo) necesario para la actividad catalítica de la enzima aldehído oxidasa. La mutante *aba2* de *A. thaliana* se encuentra mutada en la secuencia que codifica la cadena corta de una deshidrogenasa/reductasa (SDR1) que es expresado constitutivamente en las raíces, tallos y hojas (Gonzalez-Guzman et al. 2002).

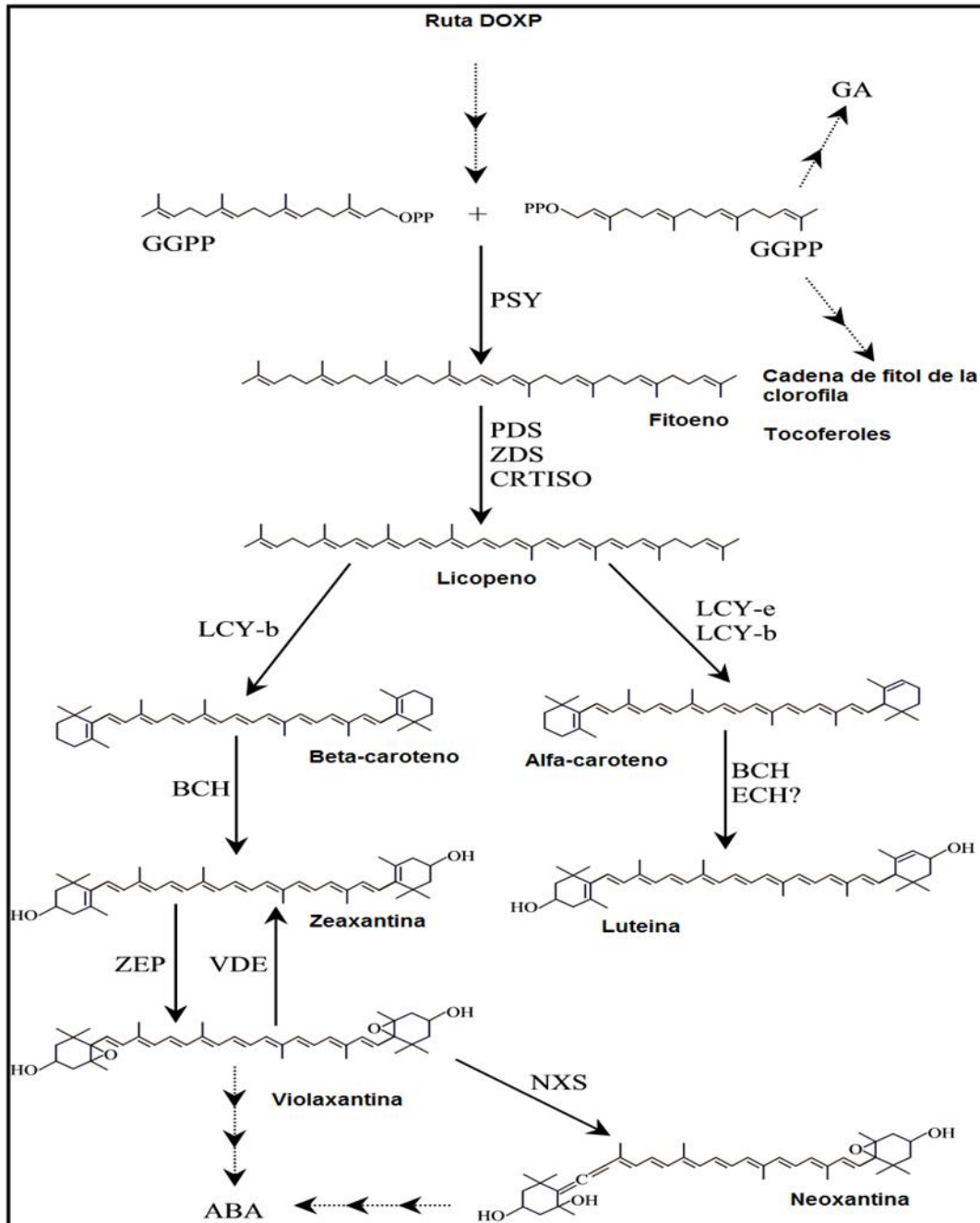


Figura 9. Vista simplificada de la ruta metabólica metileritritol fosfato donde el primer metabolito es la DOXP (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato). Geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), zeta caroteno desaturasa (ZDS), caroteno isomerasa (CRTISO), licopeno β-ciclasa (LCY-b), ε-caroteno hidroxilasa (ECH), zeaxantina epoxidasa (ZEP), violaxantina deepoxidasa (VDE), neoxantina sintasa (NXS). (Tomado y modificado de Tan et al. 2003).

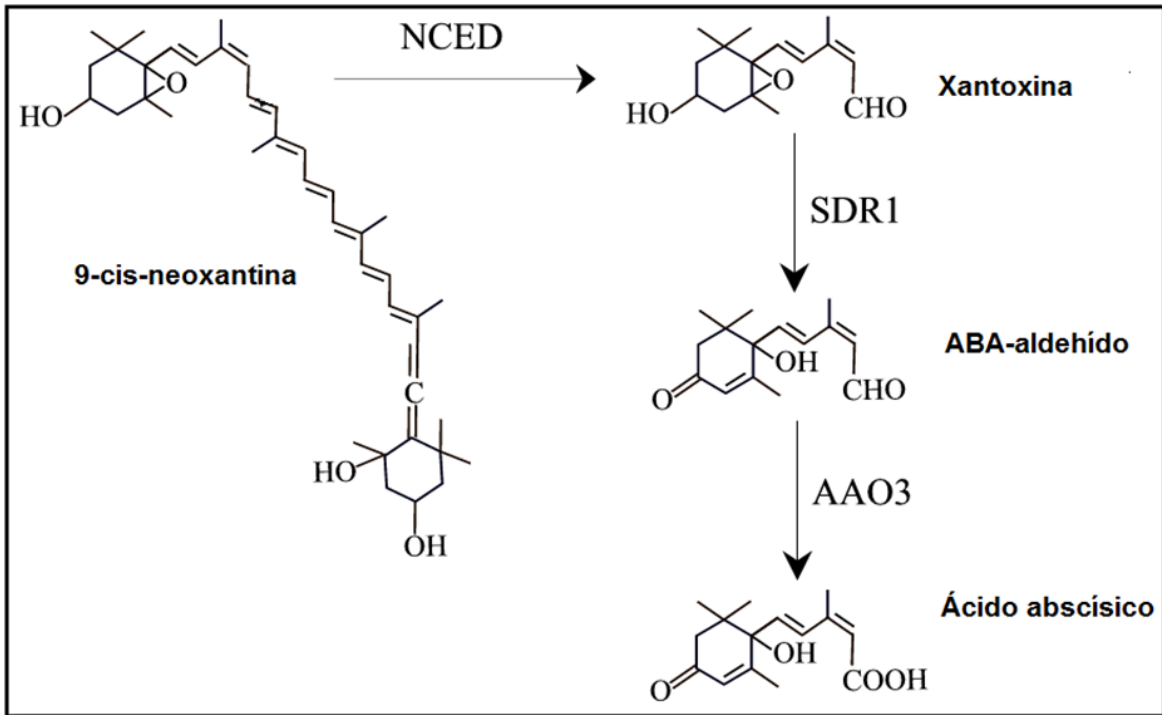


Figura 10. Ruta biosintética de ácido abscísico (ABA). Los isómeros 9-cis de la violaxantina y neoxantina son fragmentados para generar moléculas de 15 carbonos. En el último paso donde el ABA aldehído se convierte en ABA hay dos tipos de mutantes. Uno es en el gen *aao3* y el otro en la síntesis del cofactor molibdeno de esta enzima. NCED, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa; SDR1, deshidrogenasa/reductasa 1 de cadena corta; AAO3, ABA aldehído oxidasa 3. (Tomado y modificado de Tan et al. 1997).

## 2.7 Mutaciones relacionadas con la biogénesis de cloroplasto y la síntesis de clorofila

Dentro de las diversas mutaciones que ocurren en las plantas, aquellas relacionadas con la pigmentación son de las principales. Se conoce que la síntesis de clorofila y el desarrollo de los plastidios son fenómenos interdependientes, y que la pérdida de la clorofila en las mutantes podría deberse ya sea a un efecto secundario de la perturbación en la biogénesis de los cloroplastos o bien un efecto directo del bloqueo en la síntesis de clorofila con efectos en la estructura del cloroplasto. Un ejemplo ha sido descrito en la mutante *olive (oli)* de *Antirrhinum majus* (Hudson et al. 1993). El gen *OLIVE* se clonó para establecer su participación en la quelación del magnesio dentro de la ruta de biosíntesis de la



clorofila. Las mutantes *oli* tienen severos defectos en la estructura del cloroplasto, por lo que se sugirió que los niveles de clorofila podrían tener un efecto regulatorio en la síntesis y ensamblaje de ciertas proteínas cloroplásticas, las cuales podrían afectar el desarrollo del orgánulo. Por estas razones, la obtención de genes afectados es crucial para la identificación de componentes involucrados en la biosíntesis de clorofila y desarrollo del cloroplasto.

En *A. thaliana*, se han identificado alrededor de 30 genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de clorofila. Las mutaciones en estos genes son generalmente letales para las plantas. Las mutantes en la biosíntesis de clorofila son frecuentemente de color verde pálido, poseen alta sensibilidad a la luz y se caracterizan por la sobreproducción de protoclorofilida (von Wettstein, 2000). Estas mutantes son particularmente útiles para comprender la regulación de la ruta de biosíntesis de clorofila y su integración en el desarrollo y crecimiento de la planta. Por ejemplo, en maíz se describió una mutación en la enzima uriporfirinógeno III descarboxilasa, que se caracterizó por parches necróticos en las hojas debido a la acumulación de intermediarios fototóxicos (Hu et al. 1999).

En los inicios de los 90 se caracterizaron las mutantes *GUN* (*genoma desacoplado*). Esta clase de mutantes tienen desacopladas la coordinación de la expresión de genes nucleares y cloroplásticos. Se encontró que los genes *GUN2-5* participan en la biosíntesis de compuestos tetrapirrólicos en el cloroplasto (Mochizuki et al. 2001; Larkin et al. 2003). *GUN2* codifica una hemo oxigenasa y *GUN3* una fitocromobilina sintasa, ambas enzimas participantes en la síntesis de fitocromobilinas. Las mutantes defectuosas en estas enzimas en *Arabidopsis*, jitomate y chícharo producen concentraciones bajas de clorofila y acumulan precursores de estos pigmentos. Se cree que los bajos niveles de clorofila encontradas en estas mutantes se debe a la inhibición por retroalimentación de las hemo/fitocromobilinas en la ruta plastídica de los tetrapirroles, a nivel de la glutamil-tRNA reductasa. Se encontró que estas mutantes contenían concentraciones bajas de Mg-protoporfirina y Mg-protoporfirina IX monometilester (Strand et al. 2003).

En lo que se refiere a *GUN4*, se sabe que este gen codifica una proteína encontrada en el estroma, los tilacoides y la envoltura del cloroplasto; su principal función es de unión a la Protoporfirina IX y Mg-Protoporfirina IX, así como la activación de la enzima Mg-quelatasa probablemente por unión a la subunidad H (Larkin et al. 2003). Las mutantes *GUN4* desarrollan tejidos amarillos o verde pálidos dependiendo de las condiciones de crecimiento. Por su parte el gen *GUN5* codifica para la subunidad H de la enzima magnesio quelatasa (Mochizuki et al. 2001). Como efecto, las mutantes *GUN4* y *GUN5* contienen bajas cantidades de clorofila que las plantas silvestres por la actividad reducida de la enzima Mg-quelatasa.

La desregulación en la biosíntesis de tetrapirroles acarrea la acumulación excesiva de intermediarios, altamente fotoreactivos y pueden excitarse fácilmente para transferir esta energía o electrones al oxígeno. Entonces se producen las especies reactivas de oxígeno cuando existe exposición al oxígeno o la luz. En condiciones normales de crecimiento el riesgo de daño fotooxidativo por intermediarios tetrapirrólicos es bajo.

Por otro lado, a pesar del gran número de mutantes deficientes de pigmentos que están disponibles, solo unos pocos genes que afectan el desarrollo del cloroplasto han sido aislados. Entre estos se encuentran los genes *pale cress (pac)*, *cs-ch-42*, *cloroplastos alterados (cla1)* y *albino3 (alb3)* de *A. thaliana* (Reiter et al. 1994; Koncz et al. 1990; Mandel et al. 1996).

Las mutantes *pac* están afectadas tanto en la estructura cloroplasto como en el desarrollo de la hoja y los niveles de clorofila y carotenoides están severamente reducidos. Se cree que las proteínas PAC son importantes para la maduración de RNA mensajeros específicos del cloroplasto (Reiter et al. 1994; Meurer et al. 1998). Las plantas que acarrean la mutación *cs/ch-42* muestran fenotipo pálido y solo sobreviven en medio suplementado con azúcar. El gen *cs/ch-42* es regulado positivamente por la luz y es homólogo al gen *oli* de *A. majus*, lo cual sugiere que también está involucrado en la etapa de la formación del quelato de magnesio durante la biosíntesis de clorofila en *A. thaliana*. En las

plantas *cla1*, el desarrollo del cloroplasto esta arrestado en estadios muy tempranos, el gen *cla1* codifica una proteína con función desconocida, pero la secuencia es muy conservada entre bacterias y plantas (Mandel, 1996).

Otro ejemplo de mutantes descritas a la fecha son las *inmutants (im)* de *A. thaliana* que muestran fenotipo variegado con hojas compuestas por sectores blancos y verdes. Los cloroplastos en el sector verde son normales, pero el sector blanco contiene tanto cloroplastos normales como cloroplastos afectados en su estructura. Se cree que el producto del gen *im* funciona como cofactor de la desaturación del fitoeno, un precursor de los carotenoides y la interrupción del gen *im* acarrea reducción en los niveles de carotenoides, resultando en la destrucción del cloroplasto por foto-oxidación (Carol et al. 1999; Wu et al. 1999).

Las mutaciones que afectan el desarrollo de cloroplastos y la pigmentación no necesariamente provienen de daños en proteínas cloroplásticas. Por ejemplo, la mutación *chm (chloroplast mutator)*, maternalmente heredado de *A. thaliana*, acarrea un rearrreglo del genoma mitocondrial, y las mutantes muestran un fenotipo variegado lo que sugiere un efecto pleiotrópico de *chm* en la biogénesis de cloroplasto (Martinez-Zapater et al. 1992). El mismo efecto se ha observado en la mutante NCS6 (*nonchromosomal stripe*) de maíz, donde una supresión parcial de un gen mitocondrial trae como consecuencia hojas con sectores longitudinales amarillos en los cuales los cloroplastos se encuentran dañados en su estructura (Gu et al. 1993).

## 2.8 Literatura citada

**Aguado-Santacruz GA, Cabrera-Ponce JL, Olalde-Portugal V, Sánchez-González MR, Márquez-Guzmán J, Herrera-Estrella L** (2000) Tissue cultura and plant regeneration of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. In vitro Cell. Devel. Biol.-Plant 21:246-251.

**Aguado-Santacruz GA, Cabrera-Ponce JL, Ramírez-Chávez E, León-Ramírez CG, Rascón-Cruz Q, Herrera-Estrella L, Olalde-Portugal V** (2001) Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. Plant Cell Reports 20:131-136.

**Al-Babili S, Hugueney P, Schledz M, Welsch R, Frohnmeyer H, Laule O, Beyer P** (2000) Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. FEBS Lett. 485:168-172.

**Allen RD** (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiol 107:1049-1054.

**Andersson S, Zomorodipour A, Andersson J, Sicheritz-Ponten T, Alsmark U, Podowski R, Naslund A, Eriksson A, Winkler H, CG K** (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature 396:133-40.

**Ashraf M, Foolad MR** (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59:206-216.

**Block M, Douce R, Joyard J, Rolland N** (2007) Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. Photosynth Res. 92:225-44

**Bohnert H, Nelson JDE, Jensen RG** (1995) Adaptations to environmental stresses. Plant Cell 7:1099-1111.

**Bouvier F, D'harlingue A, Backhaus RA, Kumagai MH, Camara B** (2000) Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. Eur. J. Biochem. 267:6346-6352.

**Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M** (1999) Mutations in the Arabidopsis gene *IMMUTANS* cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. Plant Cell 11:57-68.

**Ceol, M.** (2009) Regulation of chlorophyll synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: the role of FLP and GUN4. Tesis Doctoral. Université de Genève. 160 pp

**Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J** (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45: 437-448.

**Cunningham FX, Gantt E** (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**:557-583.

**Dekker JP, Boekema EJ** (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants *Biochim Biophys Acta* 1706:12-39.

**Demmig-Adams B, Cohu CM, Adams III WW** (2012) Dealing with the hazards of harnessing sunlight. *Nature Education Knowledge* 4:18

**Eggink LL, LoBrutto R, Brune DC, Brusslan J, Yamasato A, Tanaka A, Hooper JK** (2004) Synthesis of chlorophyll b: localization of chlorophyllide a oxygenase and discovery of a stable radical in the catalytic subunit. *BMC Plant Biol* **4**: 5

**García-Valenzuela X, García-Moya E, Rascón-Cruz Q, Herrera-Estrella L, Aguado-Santacruz GA** (2005) Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of Plant Physiology* 162:650-661.

**Gangopadhyay G, Sangita B, Mukherjee BB, Sukumar G** (1997) Effects of salt and osmotic shocks on unadapted and adapted callus lines of tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 45-52.

**Gonzalez-Guzman M, Apostolova N, Belles JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodriguez PL** (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14:1833-1846.

**Gosz R, Gosz J** (1996) Species interactions on the biome transition zone in New Mexico: response of blue grama (*Bouteloua gracilis*) and black grama (*Bouteloua eriopoda*) to fire and herbivory. *Journal of Arid Environments* 34:101-114.

**Gould S, Waller R, McFadden G** (2008) Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* 59: 491-517.

**Gu J, Miles D, Newton KJ** (1993). Analysis of leaf sectors in the NCS6 mitochondrial mutant of maize. *Plant Cell* **5**:963-971.

**Hu Q, Andersen SB, Hansen LN** (1999): Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59:189-196.

**Hudson A, Carpenter R, Doyle S, Coen ES** (1993) *Olive*: A key gene required for chlorophyll biosynthesis in *Antirrhinum majus*. EMBO J. 12:3711-3719.

**Huguene P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M** (1995) Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. Plant Journal 8:417-424.

**Jarvis P** (2003) Intracellular signaling: the language of the chloroplast. Curr Biol 13:314-316.

**Jarvis P, Dormann P, Peto C, Benning C, Chory J** (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. PNAS 97:8175-9

**Jiang M, Zhang J** (2004) Abscisic acid and antioxidant defense in plant cells. Acta Bot Sin 46: 1-9

**Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N** (2009) Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. Mol Plant 2:1154-1180.

**Jung HS, Chory J** (2010) Signaling between chloroplasts and the nucleus, can a systems biology approach bring clarity to a complex and highly regulated pathway? Plant Physiol. 152:453–459.

**Koncz C, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Reiss B, Redei GP, Schell J** (1990) Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. EMBO J. 9:1337-1346.

**Kirkham MB** (2005) Principles of Soil and Plant Water Relations. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

**Kröel-Dulay G, Ódor P, Peters DC, Hochstrasser T** (2004) Distribution of plant species at a biome transition zone in New Mexico. Journal of Vegetation Science 15: 531-538.

**Kumar SG, Reddy AM, Sudhakar C** (2003) NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. Plant Sci. 165:1245-1251.

**Larkin RM, Alonso JM, Ecker JR, Chory J** (2003) GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. Science 299:902-906.

**Leon P, Arroyo A, Mackenzie S** (1998) Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49 453–480.

**Levitt J** (1980) Response of plants to environmental stresses. Water, Salt and other Stresses. Academic Press, NY.

**López-Juez E** (2007) Plastid biogénesis, between light and shadows. *Journal of Experimental Botany* 58:11-26.

**Lopez-Juez E, Pyke KA** (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development, *International Journal of Developmental Biology* 49:557-77.

**Margulis L** (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Bio.* 14:255-274.

**Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, Leon P** (1996) CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* 9:649-658.

**Martinez-Zapater JM, Gil P, Capel J, Somerville CR** (1992). Mutations at the *Arabidopsis CHM* locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. *Plant Cell* 4:889-899.

**Mereschkowsky C** (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralbl.* 25:593-604 [Traducción al inglés en Martin W, Kowallik KV (1999) *Eur. J. Phycol.* 34, 287-295].

**Meurer J, Greveling C, Westhoff P, Reiss B** (1998) The PAC protein affects the maturation of specific chloroplast mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 258: 342-351.

**Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A, Chory J** (2001) *Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5)* mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2053-2058.

**Moreno-Gómez B** (2009) Análisis fisiológico y proteómico de la respuesta al estrés salino en células clorofílicas en suspensión de *Bouteloua gracilis*. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Celaya. 102 pp

**Mullet JE** (1988) Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:475-502.

**Munns R** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25:239-250.

**Nayyar H (2003)** Variation in osmoregulation in differentially drought-sensitive wheat genotypes involves calcium. *Biologia Plantarum* 47:541-547.

**Neuhaus HE, Emes MJ** (2000) Nonphotosynthetic Metabolism in Plastids Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51:111-140.

**Nishio JN** (2000) Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. Plant Cell and Environment 23:539-548.

**Niyogi KK, Grossman AR, Bjorkman O** (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. Plant Cell 10:1121-1134.

**Nott A, Jung HS, Koussevitzky S, Chory J** (2006) Plastid to nucleus retrograde signal. Annu. Rev. Plant Biol. 57:739-759.

**Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA** (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature 405:299-304.

**Park H, Kreunen SS, Cuttriss AJ, DellaPenna D, Pogson BJ** (2002) Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. Plant Cell 14:321-332.

**Pfannschmidt T** (2010) Plastidial retrograde signaling a true "plastid factor" or just metabolite signatures? Trends in Plant Science 15:427-435.

**Pogson B, McDonald KA, Truong M, Britton G, DellaPenna D** (1996) Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. Plant Cell 8:1627-1639.

**Pogson BJ, Albrecht V** (2011) Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. Plant Physiology 155:1545–1551.

**Pospíšilová J** (2003) Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. Biol. Plant. 46:491-506.

**Ramanjulu S, Bartels D** (2005). Drought and salt tolerance in plants. Plant Sciences 24:23-58.

**Reiter RS, Coomber SA, Bourett TM, Bartley GE, Scolnik PA** (1994) Control of leaf and chloroplast development by the Arabidopsis gene *pale cress*. Plant Cell 6:1253-1264.

**Rock CD, Zeevaart JA** (1991). The aba mutant of Arabidopsis thaliana is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:7496-7499.

**Rohmer M** (1999) The mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis, including carotenoids Pure Appl. Chem. 71:2279-2284.



**Sato F; Satomi T, Yasuyuki Y** (1987) A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic cultured tobacco cells and seedlings *Plant Cell Reports* 6:401-404

**Schimper AFW** (1883) Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper *Bot. Zeit.* 41:105-114.

**Schubert M, Petersson UA, Haas BJ, Funk C, Schroder WP, Kieselbach T** (2002) Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277:8354-65.

**Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JA, McCarty DR** (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276:1872-1874.

**Sharp RE, Wu Y, Voetberg GS, Saab IN, LeNoble ME** (1994) Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany* 45:1743-1751.

**Solymsi K, Schoefs B** (2010) Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Photosynth Res* 105:14-166.

**Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J** (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* 412:79-83.

**Susek RE, Ausubel FM, Chory J.** (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74:787-799.

**Takeda Y, Hirokawa H, Nagata T (1992)** The replication origin of proplastid DNA in cultured cells of tobacco. *Mol. General Genet.* 232:191-198.

**Tan BC, Joseph LM, Deng WT, Liu L, Li QB, Cline K, McCarty DR** (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* 35:44-56.

**Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JA, McCarty DR (1997)** Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12235-12240.

**Tanaka R, Tanaka A** (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:321-346.

**Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, Blake PS, Burbidge A, Taylor IB** (2000) Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J.* 23:363-374.

**Tian L, DellaPenna D** (2001) Characterization of a second carotenoid beta-hydroxylase gene from Arabidopsis and its relationship to the LUT1 locus. *Plant Mol. Biol.* 47:379-388.

**Timmis JN, Aykiffe MA, Huang CY, Martin W** (2004) Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Rev. Genet.* 5:123-116.

**von Wettstein D** (2000) Chlorophyll biosynthesis I: from analysis of the mutants to the genetic engineering of the pathway. *Discoveries in Plant Biology* 3: 75–93.

**Waters M, Langdale J** (2009) The making of chloroplast. *The EMBO Journal* 28:2861-73.

**Wise RR** (2006) The diversity of plastid form and function. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer. pp. 3-26

**Wu D, Wright DA, Wetzel C, Voytas DF, Rodermeil S** (1999) The *IMMUTANS* variegation locus of Arabidopsis defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during chloroplast biogenesis. *Plant Cell* 11:43-55.

**Yamada M, Morishita H, Urano K, Shiozaki N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Yoshida Y** (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *J. Exp. Bot.* 56:1975-1981.

**Yeoman MM, Yeoman CL** (1996) Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells *New Phytologist* 134:553–569.

**Zhang J, Zhang X, Liang J** (1995) Exudation rate and hydraulic conductivity of maize roots are enhanced by soil drying and abscisic acid treatment. *New Phytologist* 132:329-336.

**Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273.

### **Capítulo III. Ultrastructural and physiological characterization of YELP, a novel, yellow, chlorophyll-deficient cell mutant line that develops etioplast-like plastids in the light**

#### Abstract

In this work, we present an ultrastructural and physiological description of a novel chlorophyll-deficient, yellow cell line of the grass *Bouteloua gracilis* that is able to develop etioplast-like plastids in presence of light (YELP). These mutant cells were then compared to the parental, wild-type, highly chlorophyllous cells, from which they were isolated. Growth analysis, based on fresh and dry weights, indicated that YELP accumulates biomass at a slower rate than the parental, green cells. YELP develops very low levels of photosynthetic pigments, reaching only 9.3% and 38.4% of the chlorophyll *a* and chlorophyll *b* levels developed by the wild-type cells, respectively. Likewise, the accessory pigments, carotens and xanthophylls, were only synthesized at 8.0% and 5.4% of the levels attained by the green cells, respectively. Electronic microscopy analysis revealed remarkable differences in plastid ultrastructure between the wild-type and the mutant cells. Plastids in YELP were heterogeneous and smaller than those found in the wild-type cells. These plastids are abnormal with poorly developed membrane systems, thus preventing the accumulation of chlorophyll and accessory pigments in the mutant cell line. We expect this novel, mutant cell line provide new tools for studying plastid development and differentiation.

#### Keywords

Cell suspension, carotenoid mutant, chloroplast biogenesis, chlorophyll biosynthesis, prolamellar body, *Bouteloua gracilis*,

## Introduction

Chlorophyll is the dominant pigment in nature and considered as one of the most abundant organic molecules on earth. Chlorophylls are involved in the absorption and transfer of energy in the process of photosynthesis. Chlorophyll deficiency in photosynthetic organisms such as cyanobacteria, algae and plants is a common consequence of nuclear or plastomic mutations, which may occur spontaneously or be artificially induced by chemical or physical agents (Yu et al. 2007). These mutations are primarily identified by abnormal pigmentation patterns in the organisms carrying these genetic alterations and can be classified into two main groups. The first group comprises homogeneous, unicolor mutants and the second one includes heterogeneous multicolor mutants. Mutants such as *albino*, *viridis* and *xantha* are included in the first group, while *zonata*, *alboviridis*, *xanthalba*, *virido-albino*, *tigrina*, *striata*, *maculata* and *alboxantha* are examples of multicolor mutants (Gustafsson, 1940).

The origins of the mutations causing chlorophyll deficiency are highly diverse, but include alterations in genes related to the biosynthetic pathways of photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids), disturbances in lipid metabolism and synthesis of proteins integrating photosynthetic membranes (Jarvis et al. 2000), deficiencies in protein transport into the chloroplast (Kessler and Schnell, 2009), and alterations in chloroplast biogenesis and differentiation (Gutierrez-Nava et al. 2004). Differentiation of mutants affected in chlorophyll biosynthesis from mutants possessing defects in other pathways, such as carotenoid biosynthesis, is complicated because the routes for chlorophyll and carotenoid biosynthesis, as well as those related to chloroplast biogenesis, are very interrelated. Thus, it is clear now that mutants unable to develop normal profiles of carotenoids can be also affected in their chlorophyll accumulation due to the instability of this pigment in the absence of the carotenoid complement, and that these failures are conducive, in turn, to developmental arrest of the chloroplast (Qin et al. 2007). On the other hand, chlorophyll accumulation abnormalities can be also related to malfunction of other organelles. For example, disruption of mitochondrial function

affects chloroplast development and results in a phenotype characterized by irregular chlorophyll accumulation (Gu et al. 1993).

The phenotypic expression of some mutants have been found to be markedly affected by the manipulation of environmental factors such as light (Biswal et al. 2012) and temperature (Du et al. 2008), while certain mutations related to chlorophyll biosynthesis can be reversed by the addition of exogenous compounds or precursors, such as the ferrous ion, amino acids, thiamine or sugars (Imsande, 1998).

In spite of these difficulties to characterize mutants with atypical production of photosynthetic pigments because of pleiotropic effects, physiological, biochemical and molecular studies have permitted to identify different genes associated with the synthesis of chlorophyll and chloroplast development. *OsCHLH* gene encodes the largest subunit of the rice Mg-chelatase, a key enzyme, crucial for the conversion of protoporphyrin-IX (ProtoIX) into Mg-protoporphyrin-IX within the chlorophyll biosynthesis pathway (Jung et al. 2003). The mutation of this gene in *Chlamydomonas reinhardtii* results in the accumulation of protoporphyrin-IX and the organisms show yellow or orange pigmentation due to disrupted chlorophyll synthesis (Chekounova et al. 2001). Cloning of the chlorophyll *a* oxygenase (*CAO*) gene allowed the identification of the key enzyme for the formation of chlorophyll *b* in *Chlamydomonas reinhardtii* (Tanaka et al. 1998). Subsequently, homologous genes in *Arabidopsis thaliana* (*AtCAO*) and *Oryza sativa* (*OsCAO1* and *OsCAO2*) were characterized (Espineda et al. 1999; Lee et al. 2005). A mutation in this enzyme causes a pale green phenotype with unstable light-harvesting complex II (LHCII) proteins.

Another important enzyme in the biosynthetic pathway of chlorophyll is chlorophyll synthase that catalyzes the esterification of chlorophyllide, the last step in the synthesis of chlorophyll. In rice, the gene *yg1* (yellow-green leaf1) was identified as encoding this enzyme. Mutation of this gene results in a yellowish green color in young leaves, decreased chlorophyll synthesis, increased levels of tetrapyrrole intermediates and arrest of chloroplast development (Wu et al. 2007).

Mutations associated with the development and differentiation of chloroplasts have been also described: For example, *dcl* (defective chloroplast leaves) is a gene involved in the morphogenesis and development of chloroplasts found within the palisade cells of tomato leaves (Keddie et al. 1996). Mutations in the *dag* (differentiation and greening) gene of *Antirrhinum majus* cause blockage in chloroplasts development, which, in turn, results in white, reversible sectors in the leaves (Chatterjee et al. 1996). The correct expression of this gene is required for expression of chloroplast-targeted nuclear genes such as genes *cab* (chlorophyll a/b-binding protein) and *rbc* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit).

Disruption of *cla-1* (chloroplasts altered) gene in *Arabidopsis thaliana* affects the expression of the other photosynthesis related genes encoded in the nucleus and in the chloroplast (Mandel et al. 1996). Plastids in *dcl*, *dag* and *cla-1* are arrested in a state of proplastid, while some plastids of an albino mutant in barley remains completely devoid of internal membrane system, except for vesicles; the vesicle formation occurs because the mutations affects the formation of thylakoids (Svensson et al. 2006; Eckardt, 2007).

Mutants altered in any step of the chlorophyll synthesis or chloroplast biogenesis represent important experimental models for studying the biochemistry, physiology and genetics of these biological processes. These mutants can be obtained spontaneously or can be induced from plant tissue or cells cultured *in vitro* (Phillips et al.1994). Unfortunately, many of the chlorophyll mutants obtained so far are lethal (for example, the albino mutants) and, consequently, they only can be studied for a brief time, *i.e.*, the early stages of development. Maintenance and reproduction of these mutants *in vitro* is only feasible under heterotrophic growing conditions.

This paper presents the physiological and ultrastructural description of a chlorophyll-deficient cell line that presents a yellow phenotype and grows under heterotrophic conditions. This mutant was obtained spontaneously from the chlorophyll cell system of blue grama grass (*Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. Ex

Griffiths), a model unique within the cereals (Aguado-Santacruz et al. 2001). Based on the results presented here, we suggest that the dual model, *i.e.*, the parental wild-type green cells and the complementary chlorophyll-deficient cell mutant system, represents an excellent resource for the study of different aspects of plant biochemistry and physiology, including the study of chlorophyll synthesis, carbohydrate metabolism, light photosynthetic reactions, and chloroplast structure and development, as well as the analysis of the chloroplast response to abiotic stress.

## **Material and methods**

The mutant yellow cell culture utilized in this study was obtained from a green cell line generated by us previously (García-Valenzuela et al. 2005). A yellowish cell clump was spontaneously formed within the green cell masses and then isolated and cultured on solid medium having the same components of then medium employed for growing the wild type, green cells (Aguado-Santacruz et al. 2001). After four months, these cells were transferred to liquid medium and subcultured every 10 d.

To characterize this mutant yellow cell line, growth kinetics were carried out for both the green, wild-type cell line and the yellow mutant cell line in batch cultures for 12 d. As starting material, cells were collected 8 d after inoculation into fresh liquid medium using a filtration system. Twenty-five Erlenmeyer flasks (125 mL capacity; 25 flasks per treatment) were filled with 24 mL of growing medium and then inoculated with 0.4 g of the cells (green or yellow). Inoculated flasks were kept on a shaker at 90 rotations per minute and incubated in a growth chamber with  $77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  under continuous light (provided by cool fluorescent lamps),  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  and 33.8% of relative humidity. During the growth kinetics five inoculated flasks were sampled at 0, 3, 6, 9 and 12 d to analyze the variables of fresh weight, dry weight, chlorophyll, and carotenoids.

### **Fresh and dry weight determinations**

Fresh weight was determined on an analytical scale, after separating the cell biomass from the liquid medium by filtration; excess medium was then removed with a paper towel. After determining the fresh weight, samples were dried in an oven for 48 h at  $60^\circ\text{C}$  and then weighed on an analytical scale to obtain the dry weight.



### **Quantification of chlorophylls**

Quantification of chlorophylls followed the Arnon (1949) protocol. Briefly, 0.04 to 0.06 g of cells previously frozen at -80°C were ground with 1 ml of acetone at 80% (v/v). Then the mixture was centrifuged at 4000g for 10 min. The supernatant was then recovered for the quantification, by spectrophotometry, of the chlorophylls. Chlorophyll *a* and *b* was quantified by absorbance at 663 nm and 645 nm respectively. Quantities of each pigment were calculated from standard curves. Standard curves were created for chlorophyll *a* (Sigma, St Louis, MO Catalog number C6144) and chlorophyll *b* (Sigma, St Louis, MO catalog number C5878) from the relationship between concentrations and absorbance recovered at 645 and 663 nm respectively.

### **Quantification of carotenoids**

Quantification of carotenoid pigments was based on the method proposed by the AOAC (1997). Briefly, from 0.1 to 0.15 g of cells previously frozen at -80 °C were ground with 4.75 ml of a solvent mixture (hexane: ethanol: acetone: toluene; 10:6:7:7 v/v). Subsequently the mixture was stirred for 3 min on a vortex and then one drop of distilled water and 0.5 ml of a 40% methanolic solution of KOH were added. The samples were stirred for 16 h at room temperature. After this time, 3.75 ml of hexane were added and the resulting mixture was allowed to stabilize in the dark for 1 h. The upper phase was subsequently recovered for the determination of the carotenoids by spectrophotometry. Carotene fraction was quantified by absorbance at 436 nm, whereas the total xanthophylls were determined at 474 nm.

### **Transmission electron microscopy**

After 8 d of growth, wild type and yellow mutant cells were fixed overnight at 4°C in 2.5% glutaraldehyde prepared with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). The samples were then washed with phosphate buffer. Post-fixation was carried out using osmium tetroxide (1%) for 2 h at room temperature. After this period, the samples

were washed twice with phosphate buffer and dehydrated in an ethanol series of 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% and 100%. Dehydrated cells were included in LR White resin (Electron Microscopy Science, Catalog 14380) and sectioned on an ultramicrotome (Ultracut, Reichert-Jung). Microscopy analysis was conducted on a transmission electron microscope (JEOL 1200 EX II) operated at 70 kV.

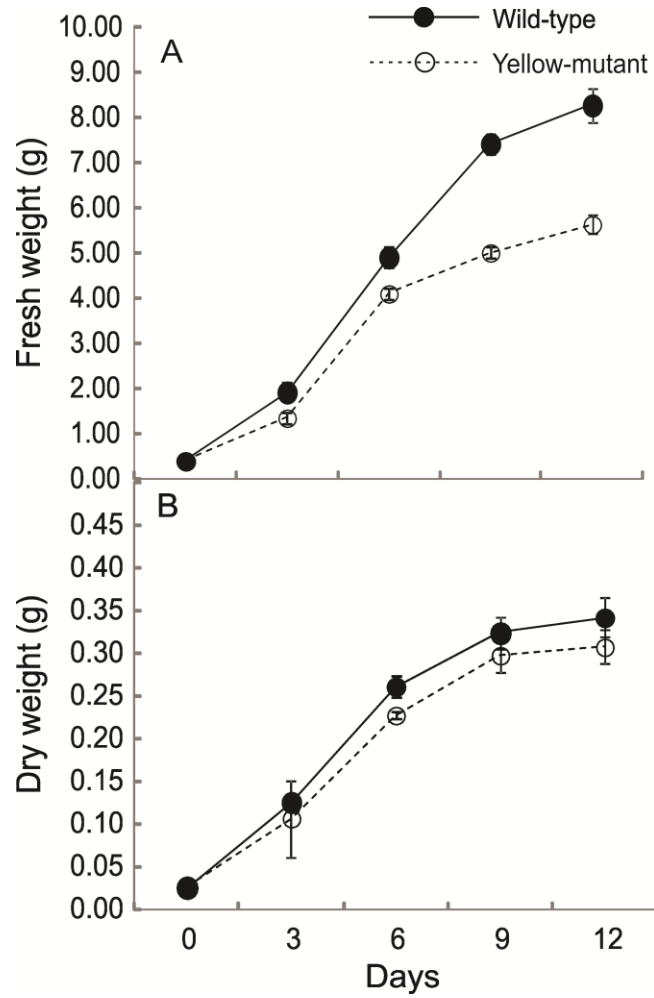
## **Results**

### Growth of the wild-type, green cells and the novel mutant, yellow cells

The novel cell line described in this paper, spontaneously appeared in the chlorophyllic cell system previously reported by us (Aguado-Santacruz et al. 2001). This mutant line exhibits a yellowish phenotype and is routinely cultured on the same media (liquid and solid) employed for growing the wild-type green cells. The cell growth kinetics conducted with the wild-type, chlorophyllic and the yellow mutant cell lines showed differences in biomass gain measured in terms of fresh and dry weights.

Throughout the cell kinetics, the fresh weight gain was higher in the chlorophyllic cell line than in the mutant line, with the largest differences found at 9 and 12 d (Fig. 1A). These data reflects a reduction in growth ranging between 16.4 and 32.4% in mutant cells relative to the wild-type cell line. The behavior of cells in terms of dry weight was quite similar to that observed for fresh weight kinetics (Fig 1B), but in this case the dry weight reduction of the yellow mutant cells ranged around 8 and 15%, indicating that water accumulation accounted for the greater differences observed in terms of fresh weight.

The values for fresh and dry weights gathered during the cell growth kinetics with both cell lines were adjusted to a logistic model for batch culture and then the doubling times were calculated. The wild-type cell line showed doubling times in biomass of 1.24 and 1.17 d for fresh and dry weight, respectively, whereas the yellow mutant cells took longer to double their biomass, showing doubling times of 1.39 and 1.22 d for fresh and dry weight respectively. Thus, it is evident that proper assemblage of photosynthetic pigments is fundamental for cell growth.

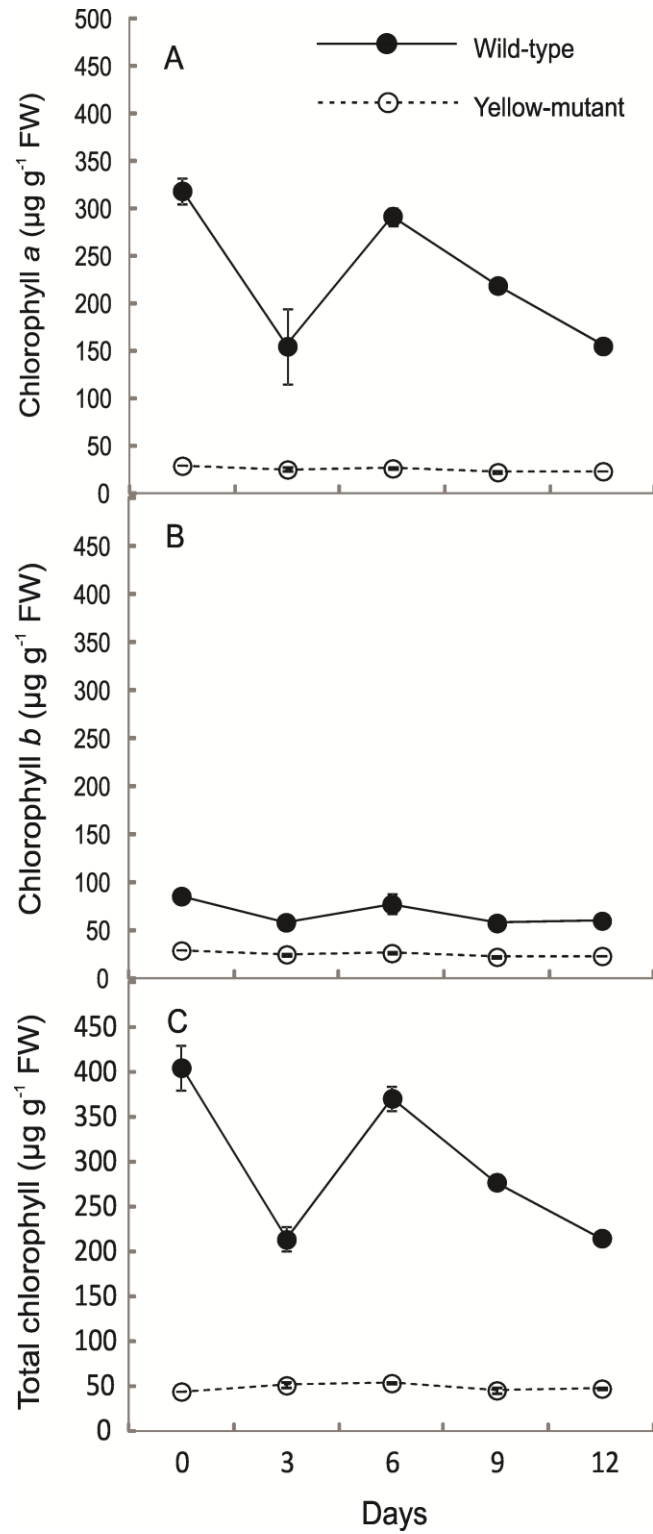


**Figure 1.** Fresh (A) and dry weight (B) kinetics in the yellow-mutant and wild-type cell lines grown in batch culture. Points represent the mean  $\pm$  Standard Error of five replicates from three independent experiments.

## Chlorophyll and carotenoides

Chlorosis is a critical and visible symptom of almost all chlorophyll-deficient mutants, which is observed in higher plants as in other photosynthetic organisms. In order to characterize the new cell line possessing a chlorophyll-deficient phenotype, we determined the chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll and carotenoid contents in both, the yellow mutant and the wild-type green cell lines.

The pigment analysis demonstrated the presence of chlorophylls *a* and *b* in the mutant cells, but at much lower levels than those found in the wild-type cells (Fig. 2). The contents of chlorophyll *a*, *b* and total in the wild-type cells were higher at the beginning of the cell growth kinetics and then decreased up to day 3. This reduction in chlorophyll concentration is strongly linked to the availability of sucrose in the culture medium (3%), since this carbohydrate (like others) inhibits the chlorophyll synthesis both in whole plants and in chlorophyllic cell systems (La Rosa et al. 1984; Hardy et al. 1987).



**Figure 2.** Chlorophyll kinetics in the yellow mutant and green wild-type cell lines. Points represent the mean  $\pm$  Standard Error of five replicates from three independent experiments.

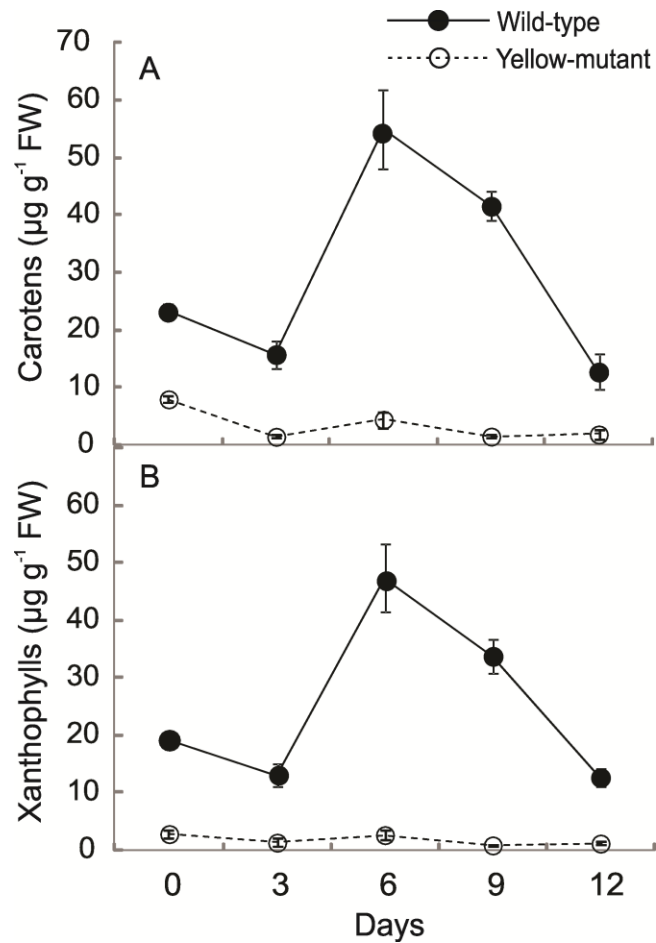
After this chlorophyll decline, sucrose consumption by the cells allowed maximum accumulation of chlorophyll (*a*, *b* and total) at day 6 of the cell kinetics at levels very similar to day zero. The wild-type green cell line accumulated up to 292.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW of chlorophyll *a*, while the mutant cell line only attained 27.1  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW; this value represents only the 9.3% of the chlorophyll synthesized by the wild-type cell line (Fig. 2A). The accumulation of chlorophyll *b* in the mutant cells seemed to be less affected than chlorophyll *a*, since the mutant cells were able to synthesize 29.9  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW whereas the chlorophyll cells accumulated 78.1  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW; this represents the 38.2% of the chlorophyll *b* produced by the wild-type green cells (Fig. 2B).

As a result of the above-mentioned differences, the total chlorophyll was almost eleven-fold higher in the wild-type cells than in the mutant cells (Fig. 2C). Following the course of the experiment, we observed a decrease in the concentration of these pigments by days 9 and 12 of the cell growth kinetics; this reduction is related to nutrient exhaustion and accumulation of toxic compounds at the final phase of senescing batch cultures.

Carotenoids are essential components of the photosynthetic machinery, and play a critical role in preventing photooxidative damage (Howitt and Pogson, 2006; Cazzonelli, 2011). Several studies have shown that deficiency of chlorophyll can be strongly related to the deficiency in the content of carotenoid pigments. Therefore, we analyzed if the low chlorophyll content found in the yellow mutant was also related to carotene and xanthophyll content in this mutant.

As anticipated, these pigments were present in the mutant cells at very small levels. Similarly to chlorophyll behavior, there was a decrease in the concentration of carotenes and xanthophylls at day 3 of the cell kinetics and reached their maximum concentration at day 6 in both the wild-type and in the yellow, mutant cell line. The maximum concentration of carotenoids in the wild-type was 54.9  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW, while in the mutant this value was only 4.4  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW (Fig. 3A). The content of carotenoids in the mutant cells represented only 8% of the amount accumulated by the green cells. On the other hand, the xanthophylls accumulated up to 47.4  $\mu\text{g g}^{-1}$

FW in the wild-type cells, whereas the yellow mutant cells only reached  $2.7 \mu\text{g g}^{-1}$  FW (Fig. 3B), which represents 5.6% of total xanthophylls accumulated by the wild-type cells.



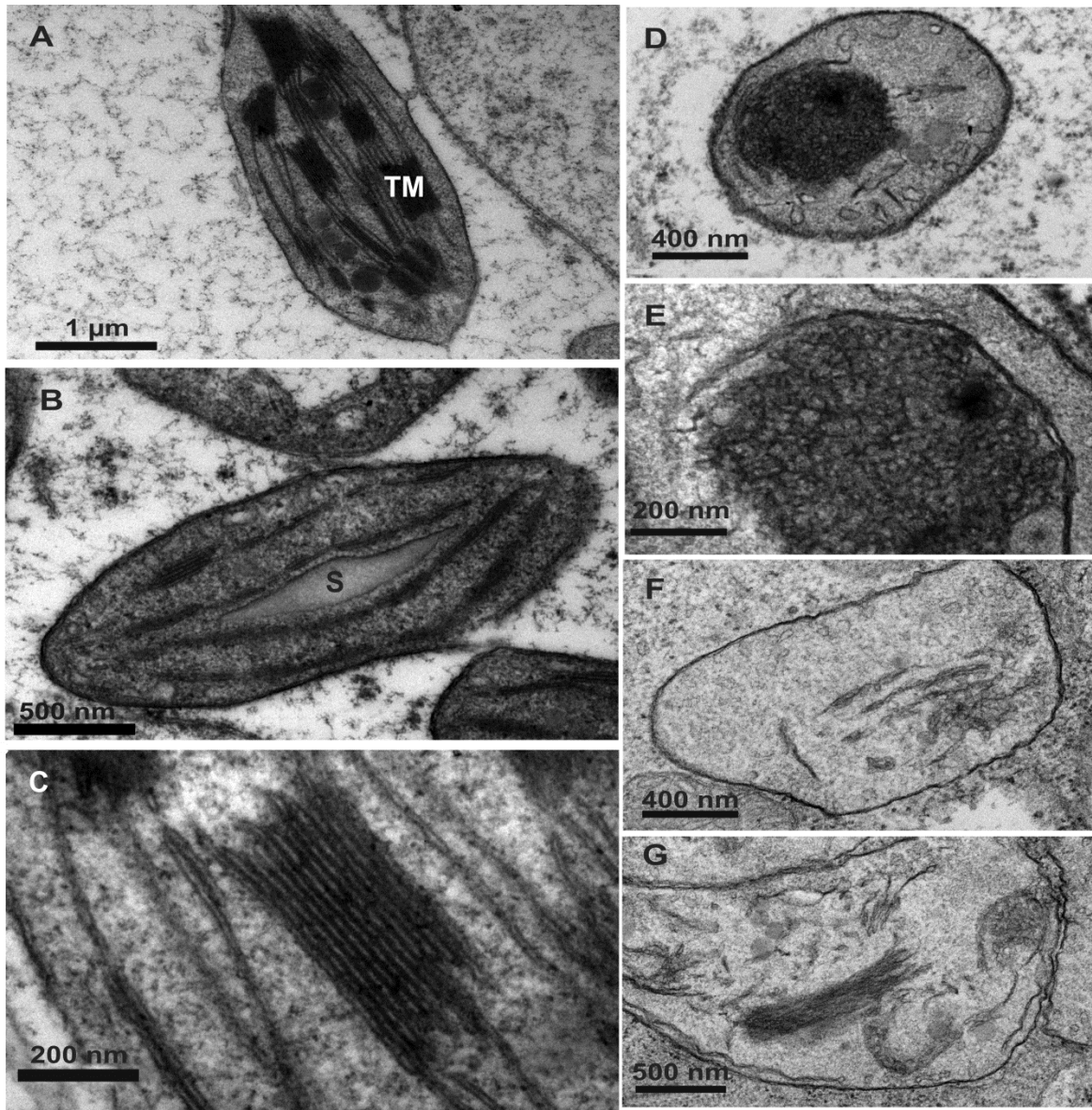
**Figure 3.** Carotens and xanthophylls kinetics in the yellow-mutant and green wild-type cell lines. Points represent the mean  $\pm$  Standard Error of five replicates from three independent experiments.

## Ultrastructural characterization

In order to analyze whether the deficiency of photosynthetic pigments showed some relationship with the organization and structure of the plastids in the mutant cell line, we studied the ultrastructure of these organelles both in the yellow mutant and in the green wild-type cell line. The electron microscopy analysis showed chloroplasts possessing a normal organization of grana thylakoids and stroma lamellae in the chlorophyllic wild-type cells (Fig. 4ABC); the observed size of the chloroplasts found in the green cells was  $3.88 \pm 0.20 \mu\text{m}$ , which is very close to chloroplast size reported for cells of mature leaves (Mullet, 1988, Lopez-Juez and Pyke, 2005).

On the contrary, the mutant cells did not develop chloroplasts. Instead, we found etioplast-like organelles with internal structure similar to a prolamellar body (Fig. 4DE). The etioplast-like plastid type we observed in our mutant are smaller than chloroplasts found in wild-type cells ( $1.76 \pm 0.32 \mu\text{m}$  *versus*  $3.88 \pm 0.20 \mu\text{m}$ ), but they are similar in size to rice etioplasts (Zychlinsky et al. 2005). Moreover, this mutant cell line also possesses other type of plastids with poorly developed membranes that in some cases form vesicular structures (Fig. 4FG). The average size of these organelles was  $2.46 \pm 0.10 \mu\text{m}$ . These results indicate that the plastids developed by the mutant cells are abnormal and severely damaged in the membrane structure and organization, thus preventing the accumulation of chlorophyll and accessory pigments.





**Figure 4.** Plastids in green wild-type cells (A-C) and yellow mutant cell line (D-G) of *B. gracilis*. Chloroplasts formed in the wild type green, green cells are around 4  $\mu\text{m}$  in major axis and 1.5  $\mu\text{m}$  in minor axis (A) and formed starch (B) and well-developed and organized thylakoidal membranes (C). Etioplast-like plastids with structure similar to a prolamellar body were formed in the mutant cells (D, E). Other type of plastids was present in the mutant line, which have poorly-developed membrane systems, possibly because of low photoprotective pigment synthesis (F-G). S, Starch; TM, Thylakoidal membrane.

## **Discussion**

### **Growth, fresh and dry weight**

In general, most mutants deficient in the production of photosynthetic pigments exhibit slow growth and low productivity. Although these mutations commonly affect the synthesis of photosynthetic machinery components, primarily chlorophylls and carotenoids, they are also involved with alterations affecting the stability of the pigment-protein complexes, the components of electron chain, and other structural components of the chloroplast.

According to our results, the cell lines studied here show very contrasting differences in structure, physiology and biochemistry. First, differences in fresh weight and dry weight gains between the yellow mutant and the wild-type cells were large during the course of the growth kinetics, particularly at day nine and 12 for fresh weight. Differences in both fresh and dry biomass accumulation between these cell lines were reflected in the doubling times; cells having well-developed chloroplasts can sustain a faster growth. Studies in our lab indicate that although the green cells are not completely photoautotrophic, their chloroplasts can apparently supply some energy and carbon skeletons for maintaining a better growth in the green cells, *i.e.*, the cells are photomixotrophic (data not shown). These cells are capable of metabolizing the reduced carbon present in the culture medium, but also have functional chloroplasts with the ability to fix carbon from air.

In contrast, a poor development of the photosynthetic machinery in the mutant yellow cells implies that they depended entirely on the carbon source supplied in the growing medium. The carbon source in the culture medium is limited, so it is rapidly consumed due to the increase of energy demand for cellular growth. However, the role of the chloroplast in the cell physiology and biochemistry is not restricted to the carbohydrate metabolism since a number of important biomolecules including amino acids, hormones, fatty acids and nucleotides are manufactured and stored in this compartment, and it is also a site of significant

uptake of elements such as sulfur (Leustek et al. 2000) and nitrogen (Sugiura et al. 2007). Chlorophyll deficiency is closely related to arrest in chloroplast development. Defective chloroplasts can result in alterations in any of these important metabolic pathways that finally affect the growth of the mutant. For example, the mutant *chd6* of *Vitis vinifera* maintained *in vitro*, attained low dry matter and carbohydrate accumulation and showed signs of blockage in CO<sub>2</sub> fixation, as well as, impaired mobilization and accumulation of soluble carbohydrates during growth and development. This mutant showed slow growth, dwarfism and small leaves during its growth cycle (Yang et al. 2012).

Contents of photosynthetic pigments: chlorophylls and carotenoides

One possibility for the low accumulation of chlorophyll in our mutant is that one of the steps of chlorophyll biosynthesis is partially blocked. It is well documented that various types of mutants are characterized by a deficient accumulation of chlorophyll caused by blockage of specific steps in the biosynthetic pathway of this pigment (Nagata et al. 2007). Several authors have emphasized two key points of control for this process.

One of them is the synthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA) in the first stage of chlorophyll formation in the plastids, which is easily broken because the biosynthetic pathway of ALA requires enzymes and substrates encoded in the nucleus and in chloroplast (von Wettstein et al. 1995). Mutations associated with this first control point have been primarily characterized in mutants with variegated green and white sectors in the leaves of *Euonymus japonicus* (Masuda et al. 1996) and albino mutant of barley (Hess et al. 1992); these mutants do not synthesize chlorophyll. In contrast, other mutants affected in the ALA biosynthesis such as *xantha-702* in cotton and *chlorine 5* in sunflower can synthesize chlorophyll at very low levels; about 3% in *xantha-702* and 50% in *chlorine-5* relative to wild-type plants (Ladygin, 2007; Rassadina et al. 2005). According to the results obtained in this work, we found that our mutant was capable of accumulating certain levels of chlorophyll, about 9% of the concentration found in the wild-type cells. Then, we believe that the yellow mutant studied here may have some damage at this point in

the chlorophyll biosynthesis pathway. However, in this study we did not determine the levels of ALA or other intermediates in the yellow mutant. Furthermore, in tissues, light is required for the continuous synthesis of ALA and our mutant cell line is able to grow under continuous light, so it is possible that it can accumulate certain levels of ALA.

The other control point during the synthesis of chlorophyll is the reduction of protochlorophyllide (Pchl<sub>id</sub>) to chlorophyllide (Thomas, 1997). This light-dependent step is catalyzed by the enzyme protochlorophyllide oxidoreductase (POR). The POR enzyme forms aggregates of ternary complexes composed of light-dependent POR bound to its substrate and cofactor, Pchl<sub>id</sub> and NADPH. These aggregates are able to photoreduce Pchl<sub>id</sub> molecules under flash illumination pulses (shorter than 2 milliseconds). POR possesses unique features such as its light-dependent catalytic activity, accumulation in plastids of dark-grown angiosperms (etioplasts) via binding its substrate, Pchl<sub>id</sub>, and the cofactor NADPH, resulting in the formation of prolamellar bodies, and rapid degradation under subsequent illumination.

Alteration in the contents of some of the components of the complex POR: Pchl<sub>id</sub>: NADPH has negative effects on the synthesis of chlorophyll. Most of these abnormalities are related to mutations that affect various steps in the pathway of tetrapyrrole compounds and not directly in the synthesis of the POR enzyme or substrate. For example, NYB (nanchong yellow barley) barley mutant affected in the import of POR into the chloroplast has limited capacity for chlorophyll synthesis due to decreased POR in the plastid. Consequently, this mutant shows yellow leaves containing arrested chloroplasts with few membrane systems (Yuan et al. 2010). Additionally, the phytochrome-deficient mutants *aurea* (*au*) and *yellow-green-2* (*yg-2*) of tomato show inhibition of Pchl<sub>id</sub> synthesis which, in turn, causes loss of the POR protein in these mutants (Terry et al. 2001). Under white light *au* and *yg-2* mature plants present a pale phenotype due to lower chlorophyll levels and reduced chloroplast development (Koorneef et al. 1985; Chory et al. 1989).

Since the prolamellar body is the main site of accumulation of Pchlide and POR complexes, it is necessary to carry out studies oriented to characterize this protein and its substrate in the new cell mutant present here, because we found plastids with prolamellar body-like structures in the yellow cells despite being grown in the light. In addition, it is important to analyze the intermediaries or precursors of the later stages of ALA synthesis, prior to the Pchlide reduction.

Carotenoids are structural and functional components of the chloroplasts, which help in light capture in the reaction centers and in light harvesting complexes, extending spectrum of light absorption into the blue and green regions (Pogson et al. 1998). There are molecular studies performed with mutants affected in different points of the carotenoid biosynthesis pathway, for example, mutants affected in the *pds3* gene encoding the enzyme phytoene desaturase in *Arabidopsis thaliana*. The *pds3* mutant showed that the mutation of this gene affects the expression of others nuclear genes encoding proteins targeted to chloroplast, mainly related to photosynthesis. These alterations coincided with chloroplasts severely retarded in development in this mutant. The mutant *psd3*, has about 20 metabolic pathways affected; some of the light dependent routes completely disrupted. Photosynthesis is not functional in this mutant because of chlorophyll loss and alterations in the Calvin cycle. Without photosynthesis, this mutant is able to survive only by the external supply of carbon in the culture medium (Qin et al. 2007).

On the other hand, the carotenoids also are involved in the photoprotection by quenching singlet oxygen and other reactive species. A reduced carotenoid synthesis is expected to cause photooxidative damage, particularly under high light conditions or extreme temperatures. However, in carotenoid-deficient plants even standard light conditions can trigger photooxidation (Carol et al. 1999).

#### Ultrastructural characterization

Different mutations resulting in chlorophyll-deficient phenotypes can be related to disorders in chlorophyll synthesis or chloroplast development and can be identified visually by abnormal coloration. This article describes a mutant isolated from a

highly chlorophyllous cell culture. This cell line is the result of a spontaneous mutation whose phenotype is yellow with very low chlorophyll content (Fig. 2ABC). Mutations that cause the deficiency or lack of chlorophyll are closely related to the disruption of chloroplast structure and consequently to the loss of most of its functions (Gabara and Kubicka, 2000; Zhang et al. 2006). In many cases, the chloroplasts are arrested at very early stages of its development, for example the proplastid state in mutants *dcl* of tomato (Keddie et al. 1996), *dag* in *Antirrhinum majus* (Chatterjee et al. 1996) and *cla1* in *Arabidopsis thaliana* (Mandel et al. 1996).

The low capacity of this yellow mutant for accumulating chlorophyll was associated with a failure in the structure and organization of the chloroplast. This new yellow mutant possesses plastids with disorganized and poorly developed membranes, and presents etioplast-like plastids with a structure similar to a prolamellar body. This disruption is not corrected by the exposure of these yellow cells to the light. It is very interesting that these organelles present in the mutant cells grown in the light, because etioplasts are plastids characteristic of plants grown in the dark.

Nevertheless, etioplasts are characterized by lacking chlorophyll and developing a unique inner membrane network, the prolamellar body; contrarily, the yellow mutant described here is able to accumulate lower amounts of chlorophyll and carotenoids.

However, another type of plastids that occur under natural conditions, named etio-chloroplasts, has been studied. Etio-chloroplasts contain chlorophylls and small prolamellar bodies interconnected with chloroplast thylakoids. Several studies review the data in favor of the involvement of etioplasts and etio-chloroplasts as intermediary stages of chloroplast formation under natural conditions (Solymosi and Schoefs, 2010).

The occurrence of the prolamellar body-like structure in the YELP mutant of *B. gracilis* is intriguing, because this mutant is commonly grown under continuous light conditions and this structure is proper of plastid development in the dark. It

has been reported that illumination of etioplasts initiates the dispersal of the prolamellar body and the formation of thylakoid membranes where the chlorophyll a/b-binding protein and chlorophyll form the pigment-protein complexes of the photosynthetic apparatus. This process of transition is very complicated because includes chloroplast development, pigment synthesis, and assemblage of the photosystems in thylakoids, all of which are accomplished by and depend on the differential expression of a large number of genes (Gutierrez-Nava, et al. 2004; Pogson and Albrecht, 2011). There is a close connection between the chloroplast development and formation thylakoidal membranes. Different mutants affected in the formation of thylakoidal structures have been described, *i.e.* *vipp1*, *mgdg1* and *Thf1*, in *Arabidopsis*. Some of the main characteristics of these mutants are the formation of plastids containing vesicular structures, disordered membranes and presence of membrane invaginations. Interruption of the *vipp1* (vesicle-inducing protein in plastids1) locus gene, results in the complete loss of thylakoid membranes (Kroll et al. 2001). The *mgdg1* mutants are arrested in formation of the enzyme monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) synthase (Kobayashi et al. 2007). These mutants produced albino seedlings in presence of sucrose and *mgdg1* plastids only has invaginations from the plastid envelope. Wang et al. (2004) described the mutant *Thf1* (Thylakoid formation1). This mutation produces dwarf-variegated plants, where green sectors contain plastids with vesicular structures and other disorganized membranes.

The blockage of the chloroplast development at the etioplast stage with persistence of the prolamellar body in light is unusual and exists very little information about this matter. Bachmann et al. (1967) reported the formation of stable prolamellar bodies in a F1 heterozygote obtained from the cross of albino and pastel mutants of maize. This maize mutant was blocked in the carotenoid biosynthesis, which resulted in the loss of the majority of chlorophyll by photooxidation. A similar phenotype was reported for wheat seedlings treated with amitrole (Burns et al. 1971), an herbicide that blocks the carotenoid synthesis in plants.

The YELP mutant described in this study was able to synthesize very low levels of carotenoids. Thus, the low quantities of these accessory pigments would also explain why the mutant has plastids with poorly developed internal membranes. However, future studies should be addressed to analyze the precursors in the biosynthesis pathway of carotenoids, as in the case of the mutant of maize and the wheat seedlings treated with amitrole, to establish if a blockage in the carotenoid pathway is a key factor inducing the yellow phenotype of the mutant cells of *B. gracilis*.

In order to test this hypothesis it would also be important to analyze the differential ability of the mutant to accumulate chlorophyll under low light intensity and high luminosity. If chlorophyll synthesis is strongly linked to photoprotection conferred by the carotenoid content, then higher chlorophyll content should be expected in cells grown under low light. According to the analysis of the content of chlorophylls and carotenoids, the persistence of low amount of chlorophyll in our mutant indicates that even with limited synthesis of carotenoids may prevent complete photooxidation of chlorophyll.



## Literature cited

**Aguado-Santacruz GA, Cabrera-Ponce JL, Ramírez-Chávez E, León-Ramírez CG, Rascón-Cruz Q, Herrera-Estrella L, Olalde-Portugal V** (2001) Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. Plant Cell Reports 20: 131-136.

**AOAC** (1997) Official method of analysis of the association of official analytical chemists AOAC Inc. Arlington.

**Arnon DI** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Plant Physiology 24: 1-15.

**Bachmann MD, Robertson DS, Bowen CC, Anderson IC** (1967) Chloroplast development in pigment deficient mutant of maize: I. Structural anomalies in plastids of allelic mutants at the w3 locus. Journal of Ultrastructure Research 21: 41-60.

**Biswal AK, Pattanayak GK, Pandey SS, Leelavathi S, Reddy VS, Govindjee, Tripathy BC** (2012) Light intensity-dependent modulation of chlorophyll b biosynthesis and photosynthesis by overexpression of chlorophyllide a oxygenase in tobacco. Plant Physiology 159: 433-449.

**Burns ER, Buchanan GA, Carter MC** (1971) Inhibition of carotenoid synthesis as a mechanism of action of amitrole dichlormate and pyriclor. Plant physiology 47: 144-148.

**Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G, Kuntz M** (1999) Mutations in the Arabidopsis gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. The Plant Cell 11: 57-68.

**Cazzonelli CI** (2011) Carotenoids in nature: insights from plant and beyond. *Functional Plant Biology* 38: 833-847.

**Chatterjee M, Sparvoli S, Edmunds C, Garosi P, Findlay K, Martin C** (1996) DAG, a gene required for chloroplast differentiation and palisade development in *Antirrhinum majus*. *EMBO Journal* 15: 4194-4207.

**ChekounovaE, Voronetskaya V, Papenbrock J, Grimm B, Beck CF** (2001) Characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in the H subunit of Mg-chelatase. *Molecular Genetics Genomics* 266: 363-373.

**Chory J, Peto C.A, Ashbaugh M, Saganich R, Pratt LH, Ausubel FM** (1989). Different roles for phytochrome in etiolated and green plants deduced from characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell* 1: 867-880.

**Du YY, Chen H, Zhong WL, Wu LY, Ye JH, Lin C, Zheng XQ, Lu JL, Liang YR** (2008) Effect of temperature on accumulation of chlorophylls and leaf ultrastructure of low temperature induced albino tea plant. *African Journal of Biotechnology* 7: 1881-1885.

**Eckardt NA** (2007) Thylakoid development from biogenesis to senescence and ruminations on regulation. *The Plant Cell* 19:1135-1138.

**Espineda CE, Linford AS, Devine D, Brusslan JA** (1999) The AtCAO gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll b synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 96: 10507-10511.

**Gabara B, Kubicka H** (2000) Comparison of lethal and semilethal chlorophyll mutants characterized by different expression of genes responsible for colour of leaves in winter rye (*Secale cereale L.*). *Caryologia* 53: 227-234.

**García-Valenzuela X, García-Moya E, Rascón-Cruz Q, Herrera-Estrella L, Aguado-Santacruz GA** (2005) Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic

stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of Plant Physiology* 162: 650-661.

**Gu J, Miles D, Newton KJ** (1993) Analysis of leaf sectors in the NCS6 mitochondrial mutant of maize. *The Plant Cell* 5: 963-971.

**Gustafsson A** (1940) The mutation system of the chlorophyll apparatus. *Kgl. Fys. Sällsk. Handl. (Lund)*. Bd. 51.

**Gutiérrez-Nava M, Gillmor CS, Jiménez LF, Guevara-García A, León P** (2004). Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant Physiology* 135: 471-482.

**Hardy T, Chaumont D, Brunel L, Gudin C** (1987) Photoautotrophic suspension cultures. I. Obtention of photoautotrophic cultures from *Euphorbia characias* L. *Journal of Plant Physiology* 128:11-19

**Hess WR, Sehendel R, Rüdiger W, Fieder B, Börner T** (1992) Components of chlorophyll biosynthesis in a barley albino mutant unable to synthesize  $\delta$ -aminolevulinic acid by utilizing the transfer RNA for glutamic acid. *Planta* 188: 19-27.

**Howitt CA, Pogson BJ** (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell and Environment* 29: 435-445.

**Imsande J** (1998). Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in plant physiology. *Physiologia Plantarum*, 103: 139-144.

**Jarvis P, Dörmann P, Peto CA, Lutes J, Benning C, Chory J** (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 97: 8175-8179.

**Jung KH, Hur J, Ryu CH, Choi Y, Chung YY, Miyao A, Hirochika H, An G** (2003) Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiology* 44: 463-472.

**Keddie JS, Carroll B, Jones JDG, Grissem W** (1996) The DCL gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *The EMBO Journal* 15: 4208-4217.

**Kessler F, Schnell D** (2009) Chloroplast biogenesis: diversity and regulation of the protein import apparatus . *Current Opinion in Cell Biology* 21: 494-500.

**Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, Nishimura M, Ohta H** (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 104: 17216-17221

**Koornneef M, Cone JW, Dekens RG, O'Herne-Robers EG, Spruit CJP, Kendrick RE** (1985) Photomorphogenic responses of long-hypocotyl mutants of tomato. *Journal of plant Physiology* 120: 153-165.

**Kroll D, Meierhoff K, Bechtold N, Kinoshita M, Westphal S, Vothknecht UC, Soll J, Westhoff P** (2001) VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98: 4238-4242.

**La Rosa PC, Hasegawa PM, Bressan RA** (1984) Photoautotrophic potato cells: transition from heterotrophic to autotrophic growth. *Physiologia Plantarum* 61: 279-286.

**Ladygin VG** (2007) Disturbed structure and function of chloroplasts during blocked biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in the light. *Biology Bulletin* 34: 248-258

**Lee S, Kim J, Yoo ES, Lee CH, Hirochika H, An G** (2005). Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice. *Plant Molecular Biology* 57. 805-818.

**Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP** (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 141-165.

**Lopez-Juez E, Pyke KA** (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *International Journal of Developmental Biology* 49: 557-577.

**Mandel MA, Feldman KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, León P** (1996) CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant Journal* 9: 649-658.

**Masuda T, Takabe K, Ohta H, Shioi Y, Takamiya K** (1996) Enzymatic activities for the synthesis of chlorophyll in pigment-deficient variegated leaves of *Euonymus japonicus*. *Plant Cell Physiology* 37: 481-487.

**Mullet JE** (1988) Chloroplast development and gene expression. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 475-502.

**Nagata N, Tanaka R, Tanaka A** (2007) The major route for chlorophyll synthesis includes [3,8-divinyl]-chlorophyllide a reduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 48: 1803-1808.

**Phillips RL, Kaeplert SM, Olhoft P** (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91: 5222-5226.

**Pogson BJ, Albrecht V** (2011) Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant Physiology* 155: 1545-1551.

**Pogson BJ, Niyogi KK, Björkman O, DellaPenna D** (1998) Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95: 13324-13329.

**Qin J, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng XW, Chen Z, Qu** (2007) Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellins biosynthesis. *Cell Research* 17: 471-482.

**Rassadina V, Usatov A, Fedorenko G, Averina N** (2005) Activity of the system for chlorophyll biosynthesis and structural and functional organization of chloroplast in a plastoma in chlorina-5 sunflower mutant. *Russian Journal of Plant Physiology* 52: 606-615.

**Sugiura M, Georgescu MN, Takahashi M** (2007) A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 48: 1022-1035.

**Svensson JT, Crosatti C, Campoli C, Bassi R, Stanca AM, Close JT, Cattivelli L** (2006) Transcriptome analysis of cold acclimation in barley albino and xantha mutants. *Plant Physiology* 141: 257-279

**Tanaka A, Ito H, Tanaka R, Tanaka NK, Yoshida K, Okada K** (1998) Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95: 12719–12723.

**Terry MJ, Raitt CE, Ryberg M, Page AM** (2001) Altered etioplast development in phytochrome chromophore-deficient mutants. *Planta* 214: 314-325.

**Thomas H** (1997) Chlorophyll: a symptom and a regulator of plastid development. *New Phytologist* 136: 163-181.

**von Wettstein D, Gough S, Gamini Kannangara C** (1995) Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1039-1057.

**Wang Q, Sullivan RW, Kight A, Henry RL, Huang J, Jones AM, Koryh K** (2004) Deletion of the chloroplast-localized thylakoid formation1 gene product in

Arabidopsis leads to deficient thylakoid formation in variegated leaves. *Plant Physiology* 136:3594-3604.

**Wu Z, Zhang X, He B, Diao L, Sheng S, Wang J, Guo X, Su N, Wang L, Jiang L, Wang C, Zhai H, Wan J** (2007) A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiology* 145: 29-40.

**Yang D, Li S, Li M, Yang X, Wang W, Cao Z, Li W** (2012). Physiological characteristics and leaf ultrastructure of a novel chlorophyll-deficient *chd6* mutant of *Vitis vinifera* cultured in vitro. *Journal of Plant Growth Regulation* 31: 124-135.

**Yu F, Fu A, Aluru M, Park S, Xu Y, Liu H, Liu X, Foudree A, Nambogga M, Rodermeil S** (2007). Variegation mutants and mechanism of chloroplast biogenesis. *Plant, Cell and Environment* 30: 350-365.

**Yuan M, Yuan S, Zhang ZW, Xu F, Chen YE, Du JB, Lin HH** (2010) Putative mutation mechanism and light response of protochlorophyllide oxidoreductase-less barley mutant NYB. *Plant Cell Physiology* 51: 1361-1371.

**Zhang H, Li J, Yoo JH, Yoo SC, Cho SH, Koh HJ, Seo HS, Paek NC** (2006) Rice Chlorina-1 and Chlorina-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development. *Plant Molecular Biology* 62: 325–337.

**Zychlinski A, Kleffmann T, Krishnamurthy N, Sjölander K, Baginsky S, Gruissem W** (2005) Proteome analysis of the rice etioplast. *Molecular and Cellular Proteomics* 4:1072-1084.

#### **Capítulo IV. A physiological approach of chloroplast participation in osmotic stress response of *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths cell suspension culture**

##### **ABSTRACT**

The chloroplasts act as sensors of environmental changes and complex networks of plastid signals, coordinate cellular activities and assist the cell during plant stress responses. Consequently, any mutation in chloroplast structure alters the main pathways of stress response. We present a physiological approach to osmotic stress response of two cell lines of *Bouteloua gracilis* contrasting in chlorophyll content and chloroplast development. The results show that presence of well developed chloroplast, has important effects in growth characteristics, cellular water relations, proline, photosynthetic pigments, chlorophyll and carotenoids and ABA content. Cell responses to osmotic stress included decreases in water potential as reported in other cell suspension systems and whole plant systems. A decline in fresh and dry weight occurred in yellow mutant cells with decreasing water potential, while dry weight gain was unaffected in the chlorophyllic cell line. Cell proline levels increase gradually to increasing levels of stress; yet green cells accumulated highest proline concentration than mutant cells. While endogenous ABA is similar between the two cell lines in control conditions, mutant cells in osmotic stress did not increase their ABA content at the same level as that observed in chlorophyllic cells. Regarding the content of photosynthetic pigments, chlorophyllic cells showed an increased in their chlorophyll and carotenoid content in proportion to the osmotic potential in the growth media. In contrast, mutant cells did not increased in carotenoid concentration. Further molecular studies are needed to explain these results, however represent the basis for the study of plant cell and chloroplast signaling in stress.

**Keywords:** chloroplast, chlorophyll mutant, retrograde signal, proline, ABA, drought stress



## Introduction

The abiotic stresses including drought, salinity, low and high temperatures cause perturbation in the cellular energy homeostasis. The chloroplast is the center of energy production in plant cells (Robinson and Walker, 1980), factor that becomes the main target of the effects of stress caused by water deficit. Because of their central role in plant metabolism and stress response, the study of the chloroplast has been of particular interest in plant physiology.

Physiological, biochemical and molecular approaches have been designed for unraveling the cascade of events involved in the activation and regulation of chloroplast response to abiotic stress. The complexity of mechanism and the interaction with other cellular compartment or metabolic pathway, make it difficult to dissect the chloroplast response based in solely one approaches. Among physiological approaches designed to study the behavior of the chloroplast under water stress, there are those who consider changes in the levels of photosynthetic pigment composition (Parida et al. 2007), structural organization (Chang et al. 1997), primary photochemistry and the CO<sub>2</sub> fixation (Quick et al. 1992). These studies were performed using as a model whole plants (Galmés et al. 2007), isolated chloroplasts (Kaiser and Heber, 1981), green algae (Demetriou et al. 2007) or plant cell suspensions (Chang et al. 1997). It is worth pointing out, that the use of cell suspensions in this type of study requires that the system possesses functional chloroplasts. So far, few higher plant cell systems that possess this characteristic have been used for this purpose, among which we can mention cell suspension from *Euphorbia characias* (Bladier et al. 1994) and *Arabidopsis thaliana* (Gonzalez-Perez et al. 2011).

The development of a chlorophyllic cell suspension of the grass *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths (Aguado-Santacruz et al. 2001), until now unique in grasses, which becomes a valuable system to study the activation of signals and responses to drought stress associated with chloroplast participation at cellular level. An interesting advantage of this cell line is that comes from plant species

highly tolerant to water deficit. The first work with the chlorophyll cell suspension showed that cells accumulated substantially greater amount of chlorophyll when they were subjected to osmotic stress (Garcia-Valenzuela et al. 2005). This phenomenon opened lines of research focused on the study of the mechanisms that promote or favor the increase of chlorophyll, which until the moment is still unknown. However, it is very likely that the increase in chlorophyll content in the chlorophyllous cells is linked to other responses to drought stress intrinsic from the chloroplast. Which, may be the synthesis of osmoprotectantes as proline or glycine betaine (Papageorgiou and Morata, 1995; Sakamoto and Murata, 2002), ABA synthesis (Perales et al. 2005), increased of antioxidants systems (Munne-Bosch and Algere, 2003) or changes in carbohydrate metabolism (Wang et al. 2000; Xue et al. 2008). These metabolic pathways in turn, are closely related to the functionality of the chloroplast.

In this way, a mutant defective in any chloroplast function would be useful to elucidate the mechanisms of response to water stress directly involving this organelle. Thus, obtaining a spontaneous mutant lacking chlorophyll, isolated from the chlorophyllous cell, comes to complement the interesting study model of *B. gracilis* cell suspension. This mutant accumulates low levels of chlorophyll and carotenoids, as a result presents yellowish phenotype. Ultrastructural analysis of this mutant showed that possess etioplasts type plastids, and other organelles seriously damaged in the membrane systems (manuscript submitted).

According to our study model, we suggest a positive role of the chloroplast in response to osmotic stress based on that the mutant cell line is affected in various chloroplast functions. In this work, we analyzed the physiological response of the highly chlorophyllous and chlorophyll-deficient mutant cell lines of *B. gracilis* to osmotic stress. Similarities and differences involving the chloroplast participation are discussed.

## Materials and methods

### Plant cell culture and growth conditions

Cell cultures of chlorophyllic cell line and yellow-mutant cell line of blue grama grass (*Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths) were used in all experiments. Stock cultures maintenance a routine transfers was performed as previously described (Aguado-Santacruz et al. 2001).

### Osmotic stress and growth kinetics

Cells at 8 d of growth were harvested by sterile collection on sintered glass filtered. 0.4 g of these cells were used then to inoculate in 125 mL culture flasks containing 25 ml of growth medium with 0%, 14% and 21% of PEG 8000 (SIGMA-Aldrich, St. Louis USA) . Suspension cells cultured in a normal growth media without PEG (0%) were used as control. The cultures were shaken on a gyratory shaker (90 rpm) at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  under continuous fluorescent light ( $77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

The cells were harvested every 3 d during 12 d after beginning treatment and water potential, osmotic potential, fresh weight and dry weight were determined. Frozen cells were used for chlorophyll, carotenoides and proline quantitation.

### Fresh and dry weight determination

Cell fresh weight was determined in analytical scale after filtering each replicates on sintered glass filtered and remove moisture excess with a paper towel. Dry weight was measured after drying the samples at  $60^\circ\text{C}$  in oven for 48 h.

### Water and osmotic potential measurements

Water potential of the cells was determined by incubating the cells in commercial chambers of thermocouple-psychrometer (C-52) and connected to a dew-point micro voltmeter (Wescor HR-33T, Inc., Utah, U.S.A); after 3 h of thermal and water vapor equilibrium the water potential ( $\Psi_w$ ) was determined. The osmotic potential ( $\Psi_\pi$ ) was determined in the same cells sample after they had been frozen in liquid nitrogen. Turgor potential ( $\Psi_T$ ) was calculated as the difference between  $\Psi_w$  and

$\Psi_{\pi}$ . Before measurements the samples were washed 3 times with distilled water for removing the rests of PEG.

#### Chlorophyll, carotenoids and proline determination

Chlorophyll was extracted from the cells with 80% acetone (v/v) and was measured spectrophotometrically according to Arnon (1949). Quantification of carotenoid pigments was based on the method proposed by the AOAC (1997). Free proline content was measured according to Bates et al. (1973). The absorbance was recorded at 520 nm using a spectrophotometer.

#### ABA quantification

Cellular ABA content was purified and quantified according to Benítez-Domínguez et al. (2011). Briefly, for extraction, 90 mg of lyophilized and pulverized samples were mixed with 4 mL of 90% aqueous acetone (v/v), then were vortexed and incubated on ice ultrasonic bath at 0°C for 12 min and then centrifuged for 5 min at 1230g. After centrifugation the supernatant was recovered and diluted to 4 mL with acetone 90%. ABA purification was carried out by thin layer chromatography on silica gel 60 F254 HPTLC plates. The plates are developed with ethyl acetate and the band corresponding to ABA was identified under UV light, taking as reference a standard ABA, scraped and extracted with 1 mL of ethyl acetate. The extract was reduced to 100  $\mu$ L with nitrogen gas. Subsequently, the volume of 100  $\mu$ L was diluted to 1 mL with methanol HPLC grade. The detection and quantification of ABA was performed by high performance liquid chromatography resolution in a chromatograph Hewlett Packard (Model 1100 brand diode array, Zorbax SB-C8) (4.6 x 250  $\text{mL}^{-1}$ ) in particle size of 5  $\mu\text{m}$ .

#### Experimental design

A completely randomized design was used to analyze differences between treatments in the evaluated variables (Steel and Torrie, 1960).

## Results

### Water relations

To compare water status of both chlorophyllic and yellow-mutant cells of *B. gracilis* under osmotic stress, changes in water relations was monitored in the course of growth kinetics. When chlorophyllic cells were exposed to osmotic stress with 14% and 21% PEG they experienced a drastic drop in water potential from day 3 of experiment and continued to decrease at day 6 up to -1.16 MPa (14% PEG) and -0.93 MPa (21% PEG), respectively. However, by day 9 of experiment a recovery in water potential in stressed cells was observed (Fig.1a).

Yellow-mutant cells had similar behavior to that observed in chlorophyllic cells, at day 3 of the experiment they showed a substantial decrease in water potential of stressed cells compared to control treatment, about -0.78 MPa in treatment with 14% PEG and -0.98 MPa in treatment with 21% PEG (Fig. 1d). Contrary to what was observed in chlorophyllic cells where the decrease water potential continued on the day 6 of the experiment, the water potential of the mutant cells did not continue to decline but remained at values near to -0.7 MPa in the treatment with 14% PEG and -0.9 MPa in treatment with 21% PEG on the time course of experiment.

Changes in water potential were related with decreased in osmotic potential with respect to control in chlorophyllic and yellow-mutant cell line. On day 6 there was the lowest value in the osmotic potential for chlorophyllic cell line (-1.93 MPa and -1.8 MPa in treatments with 14% PEG and 21% respectively) (Fig. 1b). Whereas in yellow mutant cells osmotic potential decreased to -0.99 MPa in cells exposed to 14% PEG and -1.22 MPa in treatment with 21% PEG (Fig 1e). Chlorophyllic cell showed a recovery in osmotic potential at day 9, while osmotic potential values are maintained with only minor variations during the course of experiment in yellow-mutant cells.

Maintainance of turgor pressure under conditions of external water deficit is very important for plant cell survival. The significant decrease in solute potential, which

may be due to of solute accumulation, in green and yellow-mutant cell lines was not related to maintenance of turgor pressure like a control treatment (Fig. 1c and 1f).

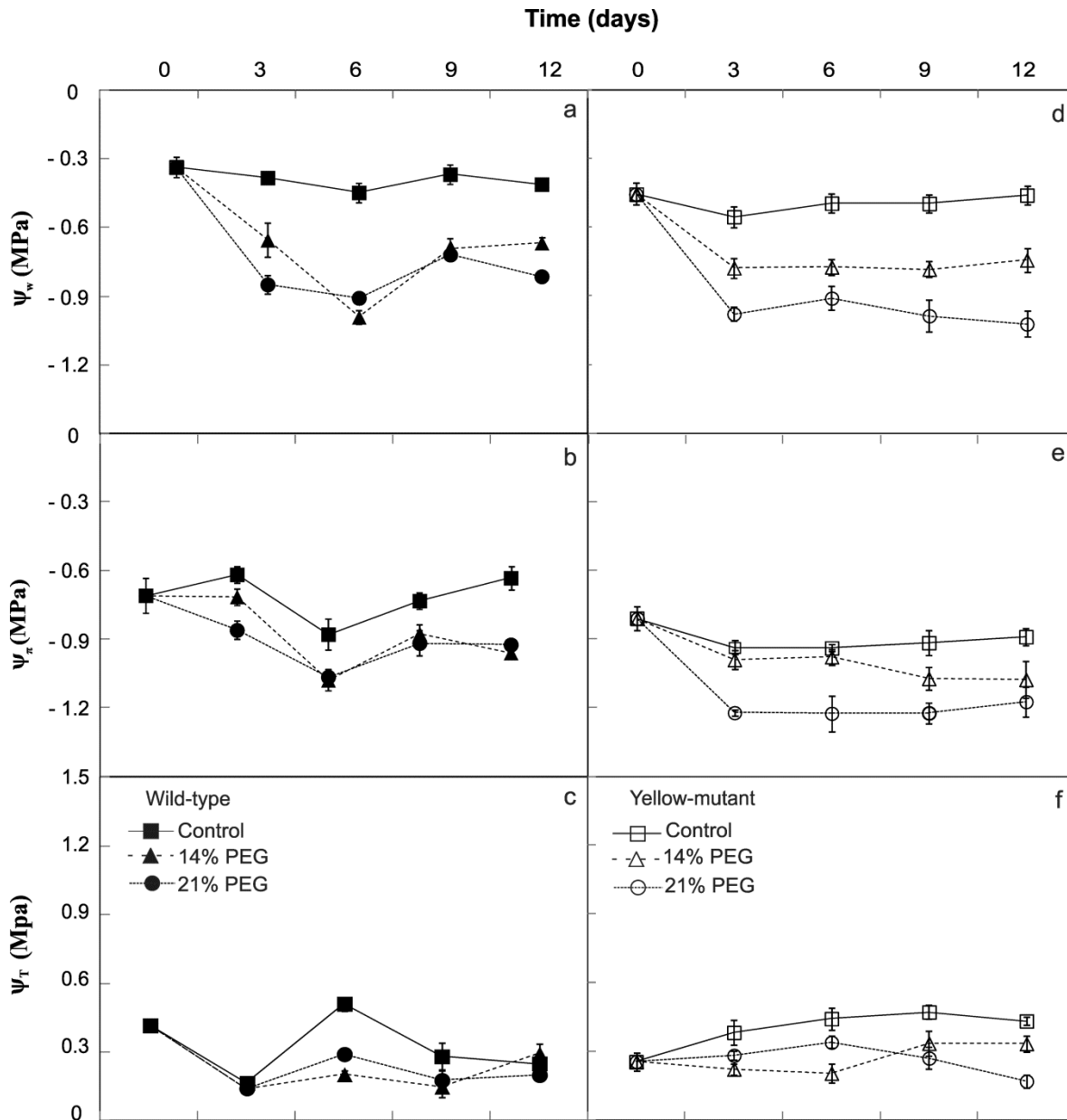
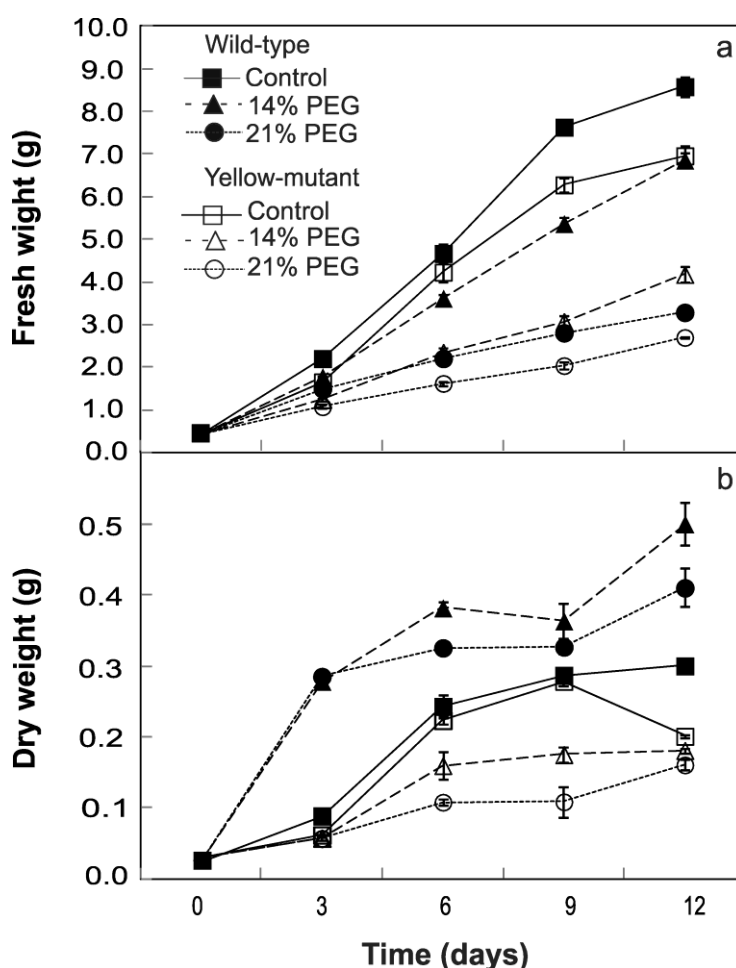


Figure 1. Water, osmotic and turgor (pressure) potentials of cells suspension of *B. gracilis*. Chlorophyllic cell line (a, c and e) and yellow-mutant cell line (b, d and f). Each point represents the mean  $\pm$  standard error of five measurements. Bars represent.

## Dry weight and fresh weight

Distinct responses of chlorophyllic and yellow-mutant cell lines to osmotic stress are illustrated by comparison of fresh and dry weights during the time course of growth kinetics in media of different PEG content (Fig. 2). Fresh weight yields declined with decreasing osmotic potential in growth media, the decline being greater in yellow-mutant cell line (Fig. 2a). On the other hand, dry weight yields were reduced only in yellow-mutant cell line, with a decrease of approximately 50% at 21% PEG (Fig. 2b). Clearly the chlorophyllic cells line has enhanced capacity for both water retention and dry weight accumulation compared to yellow-mutant cell line.



**Figure 2.** Change in fresh weight (a) and dry weight (b) in chlorophyllic and yellow-mutant cell lines of *B. gracilis* under osmotic stress. Each point represents the mean  $\pm$  standard error of five measurements.

## Proline content

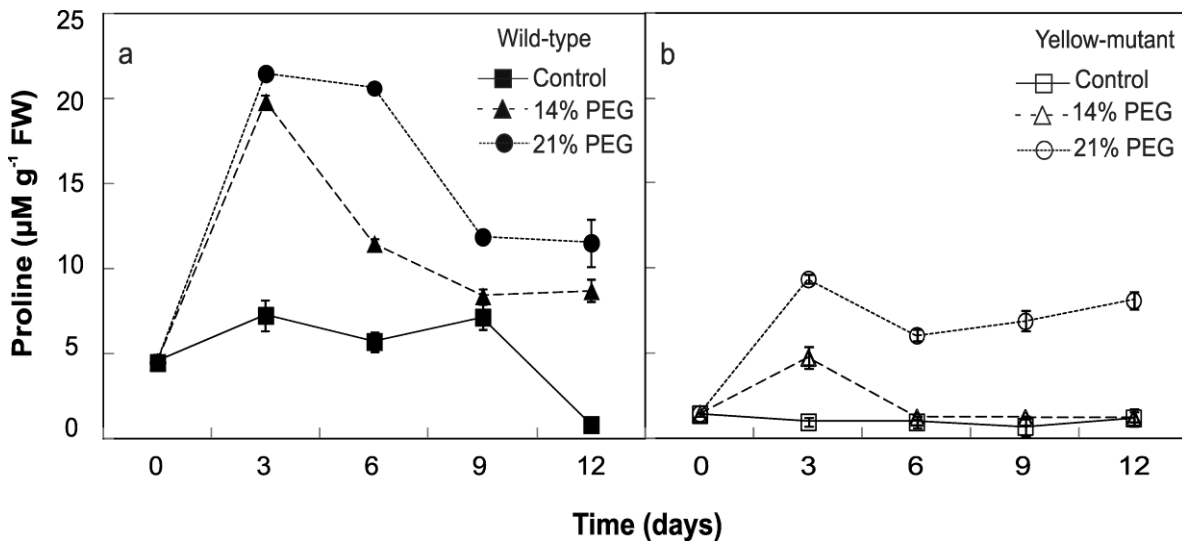
An interesting difference between chlorophyllous cells and yellow mutant was observed in control treatment; green cells synthesize more proline than yellow mutant cells, up to 7-fold (Fig. 3a). When cells were exposed to osmotic stress showed increase of this free amino acid from day 3 of the experiment, this increase was proportional to osmotic stress applied in growth media. In green cells was quantified  $19.81 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW in stressed cells with 14% PEG and  $21.46 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW at 21% PEG. Proline content did decrease at day 6 in 14% PEG treatment and from day 9 in cells exposed at 21% PEG.

A similar trend was observed in yellow mutant cells, this amino acid was accumulated mostly on day 3 of kinetics (Fig. 3b). However, proline levels were not as high as those observed in green cells. Values of  $4.78 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW (4-fold than control) in cells exposed to 14% PEG and  $9.38 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW (9-fold more than the control) in stressed cells with 21% PEG. Content of this amino acid decreased from sixth day at the end of kinetics, even stressed cells with 14% PEG showing similar values to cells in control conditions. While chlorophyll cells accumulated more proline than yellow mutant cells when they were stressed with 21% PEG ( $21.46 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW to  $9.38 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW), the yellow-mutant cells increased proline content 9-fold and chlorophyllous cells only increased 3-fold compared to the treatment without stress.

A similar trend was observed in yellow mutant cells, this amino acid was accumulated mostly on day 3 of kinetics (Fig. 3b). However, proline levels were not as high as those observed in green cells. It was quantified  $4.78 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW (4-fold than control) in cells exposed to 14% PEG and  $9.38 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW (9-fold more than the control) in stressed cells with 21% PEG. Content of this amino acid decreased from the sixth day at the end of kinetics, even stressed cells with 14% PEG showing similar values to cells in control conditions. While chlorophyll cells accumulated more proline than yellow mutant cells when they were stressed with 21% PEG ( $21.46 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW to  $9.38 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW), the yellow-mutant cells



increased proline content 9-fold and chlorophyllous cells only increased 3-fold compared to the treatment without stress.



**Figure 3.** Proline content in chlorophyllous (a) and yellow-mutant (b) cells of *B. gracilis* under different osmotic strength. Each point represents the mean  $\pm$  standard error of five measurements.

#### Photosynthetic pigment analysis

##### Chlorophyll content

Concentrations of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total chlorophyll were higher under osmotic stress than under control conditions, which agreed with previous observation (García-Valenzuela et al 2005). We found the peak in chlorophyll concentration on day 6 of the kinetics (Fig. 4). Cells exposed to 14% of PEG accumulated 518 mg g<sup>-1</sup> FW of chlorophyll *a* and 106.24 mg g<sup>-1</sup> FW of chlorophyll *b*. While concentrations reached in the stressed cells with 21% PEG were 724.58 mg g<sup>-1</sup> FW of chlorophyll *a* and 151.26 mg g<sup>-1</sup> FW of chlorophyll *b*.

Contrary to those observed in chlorophyllous cells, mutant cell line showed no significant changes in chlorophyll content in osmotic stress treatments with respect to control treatment (Fig. 4). Cells grown without stress accumulated 27.19 mg g<sup>-1</sup> FW of chlorophyll *a* and 25.8 mg g<sup>-1</sup> FW chlorophyll *b*. Similarly, the concentration of chlorophyll in cells grown in 14% PEG treatment was 27.58 mg g<sup>-1</sup> FW of

chlorophyll *a* and 26.87 mg g<sup>-1</sup> FW of chlorophyll *b*, while in the treatment with 21% chlorophyll only increased to 30 mg g<sup>-1</sup> FW and chlorophyll *b* to 29.65 mg g<sup>-1</sup> FW. One possible reason of why there were no important changes in chlorophyll content during treatment with osmotic stress could be the interruption in signaling by osmotic stress, active pathway present in the wild-type cells.

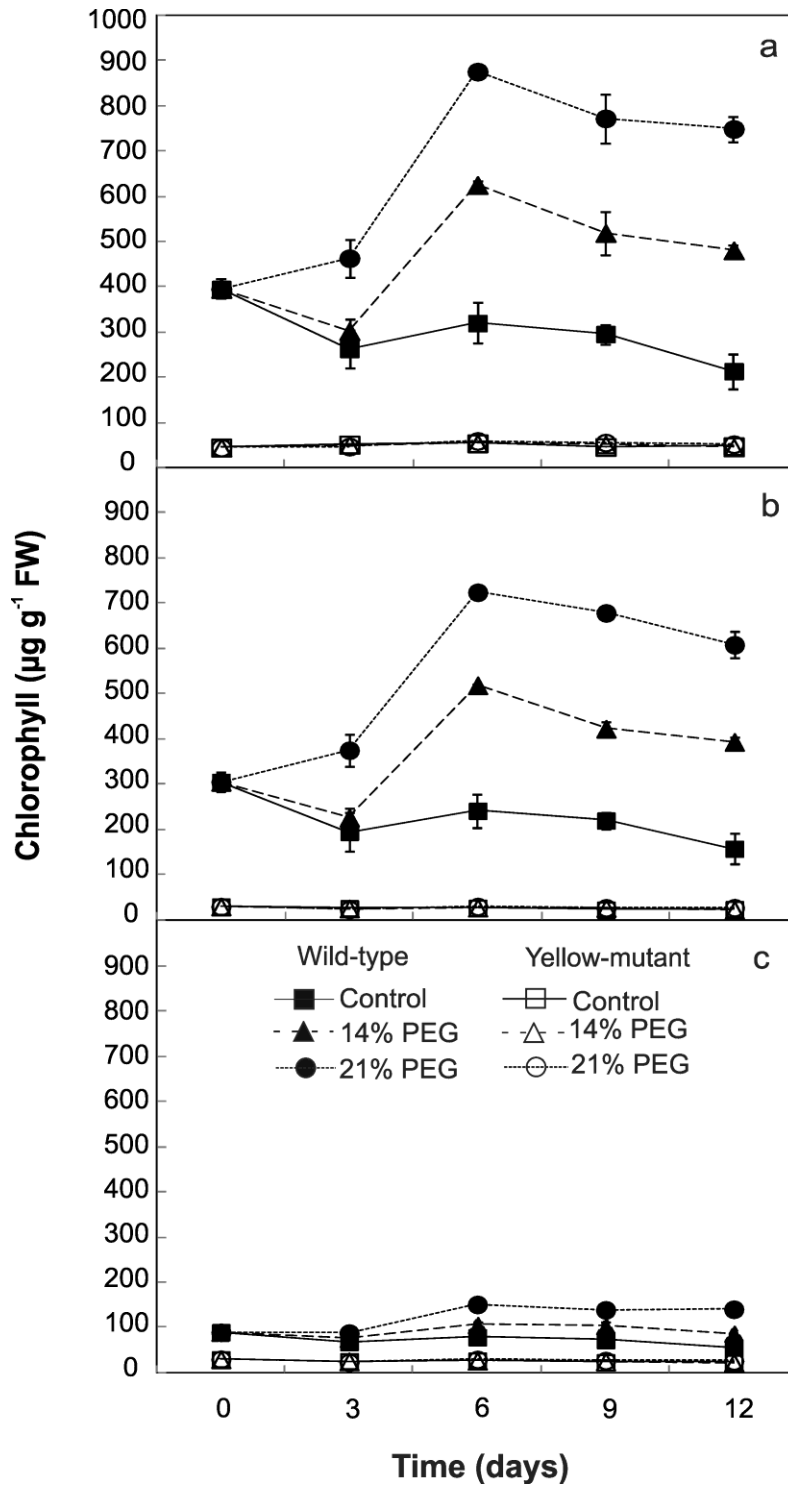


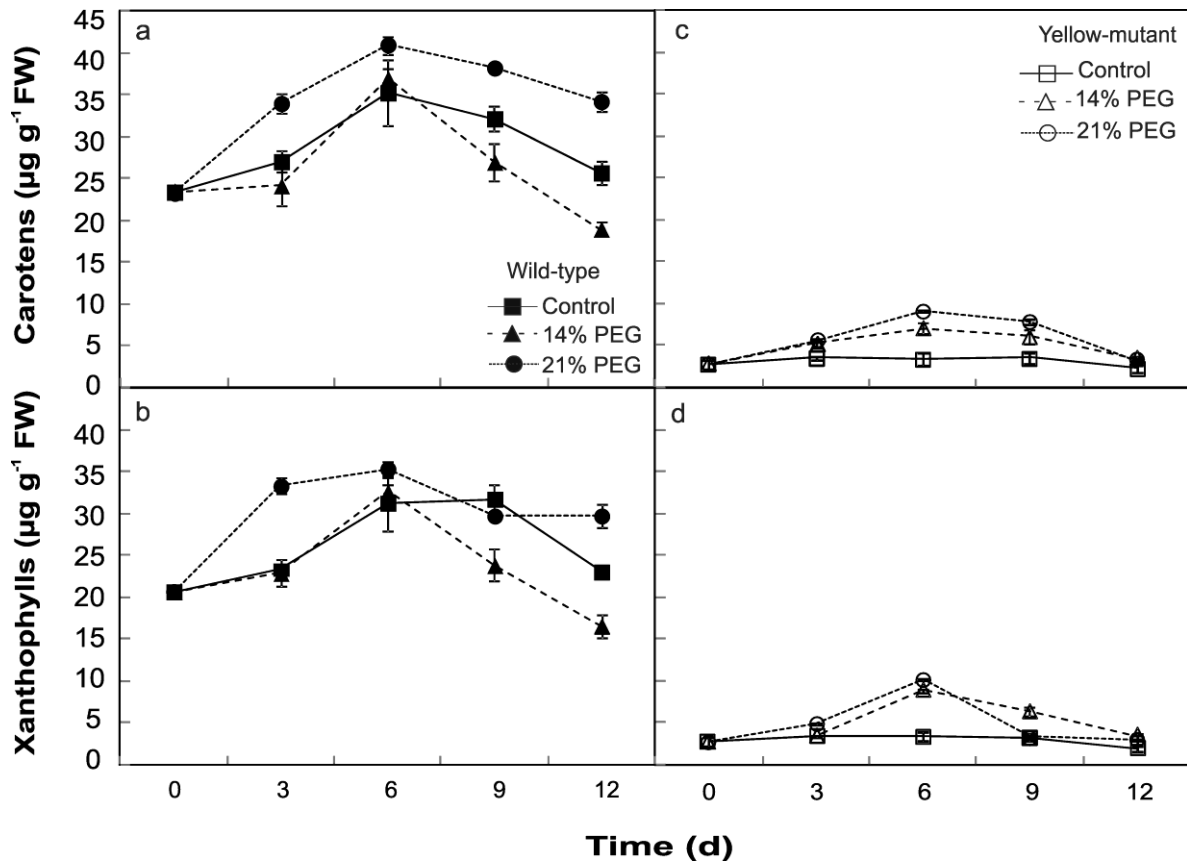
Figure 4. Total chlorophyll (a), chlorophyll a (b) and chlorophyll b (c) contents in cell suspensions of *B. gracilis* under osmotic stress. Each point represents the mean  $\pm$  standard error of five measurements.

## Carotens and xanthophylls content

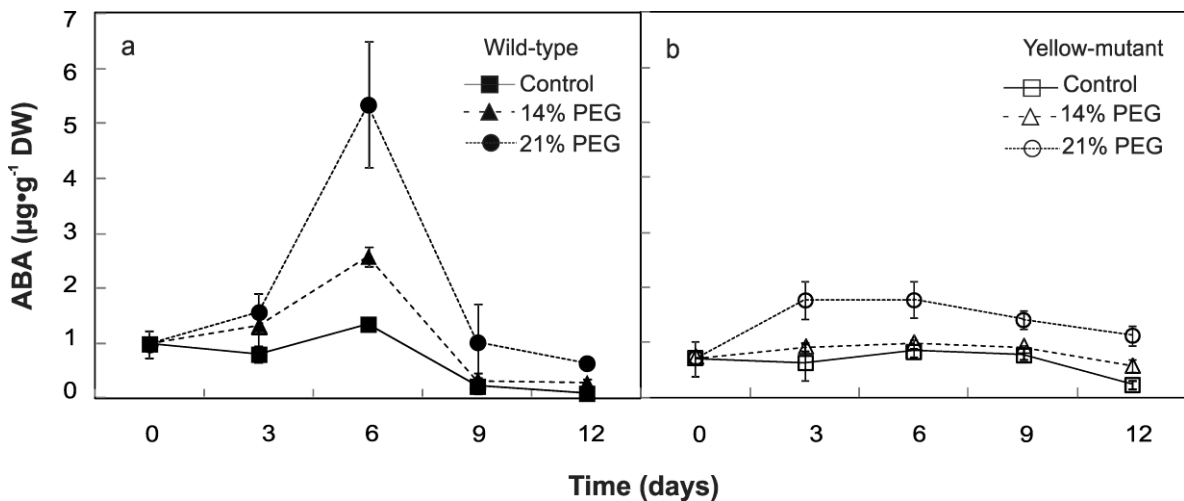
We examined the effect of the chlorophyll mutation on the pattern of carotens and xanthophylls accumulation, in the presence of 14% and 21% PEG. A typical carotens and xanthophylls accumulation curve reaching a maximum at day 6 was observed for wild-type cell line in all treatment, included the control. But treatment with 21% PEG increased significantly the content of both carotens and xanthophylls (Fig. 5a). On the other hand, the yellow mutant cell line accumulated lower levels of carotens and xanthophylls in control conditions (Fig. 5b). Nonetheless, accumulation of these pigments in osmotic stress reached a maximum at day 6 similar to the wild type cell line. In cells exposed to 14% PEG the increased was 2-fold and 2.68 fold at 21% PEG in carotens content. While the xanthophylls increased 2.65 fold in cells exposed to 14% PEG and 3.04 fold in the treatment with 21% PEG.

## ABA content

Cellular ABA level varied minimally and not significantly during the growth kinetics of both green and yellow-mutant cell lines in the control treatment. However, ABA kinetics in green cell shows an increase at day 6 and then a decrease of the content of this hormone at day 9 and 12 ( $0.22$  and  $0.09 \mu\text{g g}^{-1}$  DW respectively) (Fig. 6a). Contrary, in the yellow mutant cells this trend was not observed rather retained its ABA content at  $0.86$  and  $0.76 \text{ mg g}^{-1}$  DW. When the chlorophyllic cells was exposed to stressful media supplemented with 14% or 21% PEG, an increase in the ABA cellular level was observed, with a maximum 1.9-fold increase at 14% PEG and 3.9-fold increase at 21% PEG over the constitutive level after 6 days from inoculation (Fig 6b). After this peak, cellular ABA content declined. Contrary, in the yellow mutant cell line only high level of PEG in the medium (21%) induced a substantial increase in the ABA level, around 2-fold increase over the constitutive level during the growth kinetics.



**Figure 5** Changes in carotens and xanthophylls in chlorophyllic (a and b) and yellow-mutant (c and d) cell suspension of *B. gracilis*. Each point represents the mean  $\pm$  standard error of five measurements.



**Figure 6.** Effects of osmotic stress in endogenous ABA content of chlorophyllic (a) and yellow mutant (b) cell suspension of *B. gracilis*. Each point represents the mean  $\pm$  standard error of three measurements.

## Discussion

In this paper we analyzed the effect of osmotic stress on physiological performance of chlorophyll deficient mutant cell line of *B. gracilis* and compared with the response of its wild counterpart highly chlorophyllic. Several studies have shown that water potential gradient between cells and medium caused by PEG results in cell dehydration (Hasegawa et al. 1984). The decrease water potential of growth media cause a decrease in cell turgor pressure and consequently reduced cells growth as expressed in fresh weight. In the present work, osmotic stress treatment reduced fresh weigh in both chlorophyllic and yellow-mutant cell line (Fig. 2a). In contrast stress imposition resulted in an increase dry weight values in chlorophyllic cell line on osmotic treatment (Fig. 2b). However, reduction in plant biomass is sometimes observed under severe drought and osmotic stress and this is possibly because of the decrease in carbohydrate accumulation caused by reduction in carbon assimilation (Xu et al. 2010). An important reduction in dry weight was observed in mutant cell line growing in 14 and 21% PEG (Fig. 2b). Stress may have a negative impact on the process of carbon assimilation in mutant cells in stress condition, since they have a lack of physiologically competent like chloroplasts for photosynthesis and depend only of carbon supplied in culture medium (Wendler et al. 1990).

The accumulation of low molecular weight solutes or compatible solutes may help to maintain the relatively high water content necessary for plant growth by balancing the osmotic pressure of cytosol with that of vacuole and external environment (Burg and Ferraris, 2008). The most conspicuous of these osmolytes are amino acids in general and proline in particular. Accumulation of proline in plant tissues exposed to osmotic stress has been well established in cells and callus culture (Hasegawa et al. 1984; Handa et al. 1986). It is widely accepted that proline accumulates in cytosol where it contributes substantially in cytoplasmic osmotic adjustment in plants under drought or saline conditions (Meloni et al. 2001; Ghoulam et al. 2002). So in this way, we expected that the high proline level in the green cells (Fig. 3a) was related to the maintenance of high turgor presure, but it

was not (Fig. 1c). Thereby, it is possible that proline has other functions unrelated to the osmotic adjustment in *B. gracilis* chlorophyllous cells. Similar trend was observed in yellow-mutant cells under osmotic stress, high proline content was observed only in cells growing at 21% PEG, but turgor pressure was lower than cells in control treatment (Fig. 1f).

Osmotic adjustment has been a controversial topic since in transgenic plants that overproduce proline or other compatible solutes does not have a significant impact on water relations and show marginal improvements in osmotic stress tolerance, with probably no link with osmotic adjustment (Serraj and Sinclair, 2002). Thus, it has been suggested for proline other functions as the stabilization of proteins (Banau et al. 2009), membranes and cellular structures, maintaining the cellular redox potential and the elimination of ROS (Sharma et al. 2011). Similarly, exogenous proline improved the growth of salt-stressed tobacco cell cultures and the improvement was attributed to role of proline as an osmoprotectant for enzymes and membranes against salt inhibition rather than in osmoregulation (Hoque et al. 2007).

Nevertheless, it is also possible that proline could act as a component of signal transduction pathways that regulate stress responsive genes in addition to its previously described osmoprotective roles for example, in proline deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* it was unable to growth on saline media due to that the proline deficient mutation disrupted the perception of both ionic and osmotic stress, in addition to other aspects of stress induced signal that improving the tolerance to salt stress (Werner and Finkelstein, 1995).

On the other hand, it has been established that proline biosynthesis can be occurring in different subcellular compartments, depending on the environmental conditions (Szabados and Saviouré, 2009). Proline accumulated in response to water stress or salinity stress in plants is primarily localized in the cytosol (Verbruggen and Hermans, 2008; Stein et al. 2011). In *Pisum sativum* plants exposed to water stress was found that proline is also synthesized in chloroplast. This was verified by the significant activity of the enzyme delta (1)-pyrroline-5-carboxylate reductase in chloroplast (Rayapati et al. 1989). In this work we found

higher concentrations of proline in green cells than in yellow-mutant cells. We propose that the functional development of chloroplast, visible by increases in the amount of chlorophyll, could be involved in the increase in proline accumulation in green cells. This increase allows cells to grow better under osmotic stress.

Other molecules such as glycine betaine are also synthesized in chloroplast. In *Sauceda japonica* cells, the presence of functional chloroplasts, evidenced by chlorophyll content, allowed a better adaptation in response to salt stress conditions compared with yellow cells selected. Additionally, the activity of the enzyme betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) was high in the green cells. Enzyme activity was positively correlated with glycine betaine levels in cells that were able to grow in saline so that BADH is active in chloroplasts (Tanimoto et al. 1997).

Concentrations of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total chlorophyll in green cells were higher under osmotic stress than under control conditions (Fig. 4), which agreed with previous observation in the same chlorophyllic cell system (García-Valenzuela et al 2005). This phenomenon was observed in tobacco cells adapted to NaCl, produced a population of dark green cells and contain more chlorophyll than cells growing without NaCl (Locy et al. 1996). Apparently, stress favored chloroplast development and functionality. However, the explanation of this phenomenon still remains unknown. The maintenance of high levels of chlorophyll during water stress is a desirable characteristic particularly in plants of agricultural interest, since it is a prerequisite for maintaining photosynthesis so that the productivity is not impaired (Munné-Bosch and Algere, 2000; Almeselmani et al. 2006).

In this course, the increase in chlorophyll content may be regulated at different stages of the routes relating to either the biosynthesis or catabolism of tetrapyrroles. The proper regulation of the metabolism of porphyrins, is part of a complex defense mechanism against water stress (Gill and Tuteja, 2010; Foyer and Noctor, 2011), since the porphyrins intermediaries are highly reactive so it is



necessary to maintain low levels that do not cause oxidative damage (LaRocca et al. 2001).

It has been found that water stress adversely affects the levels of key intermediates in the biosynthetic pathway of chlorophyll such as Protoporphyrin IX, Mg-Protoporphyrin IX and protochlorophyllide. However, overexpression of certain key intermediates in the chlorophyll biosynthesis pathway as protoporphyrinogen oxidase in rice coincides with the tolerance of transgenic plants to water stress (Phung et al. 2011). This opens several questions about if the signals, mediated by tetrapyrrole intermediates, are they involved in increased chlorophyll content of green cells when they are subjected to osmotic stress? (Garcia-Valenzuela et al, 2005), this response is not observed in yellow-mutants cells. If not, it is necessary to study if there are any other signals which promotes the increase of chlorophyll levels and in which way the chloroplast functionality affects this response.

Carotenoids are known to quench ROS and minimize its formation by receiving excess energy from the excited chlorophyll (Nowicka et al. 2009; Ruban and Johnson 2010). The high content of carotenoides found in green wild type cell line, indicating a high capacity for antioxidant effects (Fig. 5a). Interestingly also the yellow-mutant cells showed increased in its carotenoids content on the day 6 of the kinetics with stress (Fig. 5b). This response was not related to the increase of chlorophyll in these cells, but possibly with other protection role against osmotic stress.

However, it has been found that carotenoids decrease when plant experiencing water stress, therefore it has been questioned the contribution of these pigments in the elimination of ROS (Du et al. 2010). But, in this study we found a relationship between increased carotenes and xanthophylls and increased in chlorophyll content in cells exposed to osmotic stress (Fig. 4 and 5a). Based in their properties, carotenoides could play a role in preventive antioxidative defense for chlorophyll protection, but more investigation is needed to verify this suggestion.

A common factor between most stresses is the active production of reactive oxygen species (ROS) (Jasper and Kangasjärvi 2010). In contrast to their presumed role as a simply damaging agents in cells, ROS act as signaling molecules in the regulation of stress adaptation but also in developmental regulation (Apel and Hirt 2004; Foyer and Noctor 2011). The photosynthetic reactions in chloroplast are a continuous source of ROS. Several different ROS are produced inside plastids as by-products of photosynthesis, imbalances electron flow due to drought stress favor production of ROS inside chloroplast (Miller et al. 2010). ROS production leads to dramatic changes in nuclear genes expression including genes encoding for photosystem subunits (Bechtold et al. 2008). The ROS generated by osmotic stress are at least in part due to the accumulation of ABA. This has been confirmed by the increase of ROS when exogenous ABA is applied (Jiang and Zhang 2001). But in this work we do not analyze the generation of ROS in cells chlorophyll and yellow mutant cells. Nevertheless, many studies of mutants affected in both chlorophyll synthesis or chloroplast biogenesis have shown that they accumulate as much oxidative stress-causing agents such free radicals from intermediaries in the biosynthetic pathways (Rosso et al. 2009). Thus, this factor could be an advantage for chlorophyll mutants at a given stress, it is even possible that chlorophyll mutants are more predisposed to stress and more likely to be able to adapt to adverse situations like osmotic stress. Several papers support this premise since as the tetrapyrrole intermediates and ROS are considered signaling molecules. (D'Autréaux and Toledano 2007; Rintamäki et al. 2009).

ABA is an important growth regulator and is involved in many aspects of plant development and controls many stress adaptation response in desiccation and osmotic imbalance. In *B. gracilis* cells the level of ABA depend both stress and the presence of green photosynthetically active chloroplasts. The blockage of greening in chlorophyll deficient mutant leads to a substantial decrease in ABA content under osmotic stress (Barrero et al. 2008). The carotenoids are the main precursors for ABA synthesis in plants (Meier et al. 2011), and then the inhibiting carotenogenesis should also prevent the synthesis of ABA in yellow-mutant cell

line. This hypothesis has been supported by the works with carotenoid deficient mutant or by blocking carotenogenesis with herbicides that do not respond to water stress by ABA accumulation (Xiong et al. 2002).

Therefore, accumulation of free proline under osmotic stress is achieved by both ABA-dependent and ABA-independent regulation (Sharma and Verslues, 2010; Fujita et al. 2011). In this work high proline level was determined at 21% PEG in both chlorophyllic and yellow-mutant cell lines at the day 3 of growth kinetics. This was not associated with increased levels of ABA in cells where chlorophyll peak was observed on the day 6 of the experiment (Fig. 3a and 4). But, in mutant cells could be observed a relationship between the increase in ABA and proline on the day 3 of the experiment at 21% PEG.

The results obtained in this research show some differences related to the loss of function of the chloroplast in the response to water deficit of cell suspensions of *B. gracilis*. It is clear that this mutation affects the chloroplast functionality with implications in the osmotic stress response. Because many of the metabolic pathways of ABA, carotenoids, chlorophyll and proline are closely interrelated and most take place in chloroplast or depend on the metabolites synthesized in this organelle. Ultimately, this interconnection determines the success or failure of adaptive responses of plants to changing environment around it. Clearly, it is still necessary to go deeper into the topic using other approaches to complement the results shown here. So, this work is the basis for future research in the field of chloroplast signaling under water stress using as a model the cell suspensions system of highly drought tolerant grass *B. gracilis*.

## References

**Aguado-Santacruz GA, Cabrera-Ponce JL, Ramírez-Chávez E, León-Ramírez CG, Rascón-Cruz Q, Herrera-Estrella L, Olalde-Portugal V** (2001) Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. *Plant Cell Reports* 20:131-136.

**Almeselmani M, Deshmukh PS, Sairam RK, Kushwaha SR, Singh TP** (2006) Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science* 171: 382-388.

**AOAC** (1997) Official method of analysis of the association of official analytical chemists AOAC Inc. Arlington.

**Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399

**Arnon DI** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiology* 24: 1-15.

**Banau ANM, Hoque MA, Watanabe-Sugimoto M, Matsuoka K, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y** (2009) Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 166: 146-156.

**Barrero JM, Rodríguez PL, Quesada V, Alabadí D, Blázquez MA, Boutin JP, Marion-Poll A, Ponce MR, Micol JL** (2008) The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 31:227-34.

**Bates LS, Waldren RP, Teare ID** (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.

**Bechtold U, Richard O, Zamboni A, Gapper C, Geisler M, Pogson B, Karpinski S, Mullineaux PM** (2008) Impact of chloroplastic-and extracellular-sourced ROS on high light-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 59:121-133.

**Benítez-Domínguez L, Gómez-Merino FC, Trejo-Téllez LI, Robledo-Paz A** (2011) Anatomy, abscisic acid and nutrient content and germination of heliconia seeds. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34:189-196.

**Bladier C, Carrier P, Chagvardieff** (1994) Light stress and oxidative cell damage in photoautotrophic cell suspension of *Euphorbia characias* L. *Plant Physiology* 106:941-947.

**Burg MB, Ferraris JD** (2008) Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem* 283:7309-7313.

**Chang C-C, Locy RD, Smeda R, Sahi SV, Singh NK** (1997) Photoautotrophic tobacco cells adapted to grow at high salinity. *Plant Cell Reports* 16:495-502.

**D'Autréaux B, Toledano MB** (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:813-824.

**Demetriou G, Neonaki C, Navakoudis E, Kotzabasis K** (2007) Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus: the protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767:272-280.

**Du H, Wang N, Cui F, Li X, Xiao J, Xiong L** (2010) Characterization of the beta-carotene hydroxylase gene DSM2 conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and abscisic acid synthesis in rice. *Plant Physiology* 3: 1304-1318.

**Foyer CH, Noctor G** (2011) Ascorbate and glutathione : the heart of the redox hub. *Plant Physiology* 155, 2-18

**Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2011) ABA-Mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res.* 124:509-525.

**Galmés J, Medrano H, Flexas J** (2005) Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytologist* 175:81-93.

**García-Valenzuela X, García-Moya E, Rascón-Cruz Q, Herrera-Estrella L, Aguado-Santacruz GA** (2005) Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of Plant Physiology* 162: 650-661.

**Ghoulam C, Ahmed F, Khalid F** (2001) Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 47:139-50

**Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930.

**González-Pérez S, Gutiérrez J, García-García F, Osuna D, Dopazo J, Lorenzo Ó, Revuelta JL, Arellano JB** (2011). Early transcriptional defense responses in

Arabidopsis cell suspension culture under high-light conditions. *Plant Physiol.* 156, 1439-1456.

**Handa S, Handa AK, Hasegawa PM, Bressan RA** (1986) Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 80:938-945.

**Hasegawa PM, RA Bressan, S Handa, AK Handa** (1984) Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *Hortscience* 19:371-377.

**Hoque MA, Okuma E, Banau MNA, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata N** (2007). Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betain by increasing antioxidants enzyme activity. *J.Plant Physiol.* 64:553-561.

**Jaspers P, Kangasjärvi J** (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum* 138:405-413.

**Jiang M, Zhang J** (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiology* 42:1265-1273.

**Kaiser WM, Heber U** (1981) Photosynthesis under osmotic stress. *Planta* 153:423-429.

**La Rocca N, Rascio N, Oster U, Rudiger W** (2001) Amitrole treatment of etiolated barley seedlings leads to deregulation of tetrapyrrole synthesis and to reduced expression of Lhc and RbcS genes. *Planta* 213:101–108.

**Locy RD, Chang CC, Nielsen B, Singh NK** (1996) Photosynthesis in salt-adapted heterotrophic tobacco cells and regenerated plants. *Plant Physiol.* 110: 321-328

**Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel ET** (2011) A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Syst Biol* 5: 77.

**Meloni DA, Oliva MA, Ruiz HA, Martinez CA** (2001) Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 24:599-612-

**Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environment* 33:453-467.

**Munné-Bosch S., Algere L** (2000) Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210:925-931.

**Nowicka B, Strzalka W, Strzalka K** (2009) New transgenic line of *Arabidopsis thaliana* with partly disabled zeaxanthin epoxidase activity displays changed carotenoid composition, xanthophyll cycle activity and non-photochemical quenching kinetics. *J Plant Physiol.* 166:1045-56.

**Papageorgiou GC, Morata N** (1995) The usually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function in the oxygen evolving photosystem-II complex. *Photosynth Research* 44:243-52.

**Parida AK, Dagaonkar VS, PhalakMS, Umalkar GV, Aurangabadkar LP** (2007) Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnol. Rep.* 1:37-48.

**Perales L, Arbona V, Gómez-Cadenas A, Cornejo M-J, Sanz A** (2005) A relationship between tolerance to dehydration of rice cell lines and ability for ABA synthesis under stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:786-792.

**Phung T, Jung H, Park J-H, Kim J-G, Back K, Jung S** (2011) Porphyrin biosynthesis control under water stress: sustained porphyrin status correlates with drought tolerance in transgenic rice. *Plant Physiology* 157: 1746-1764.

**Rayapati PJ, Stewart CR, Hack E** (1989) Pyrroline-5-carboxylate reductase is in pea (*Pisum sativum* L.) leaf chloroplasts. *Plant Physiol* 91:581-586.

**Rintamaki E, Lepisto A, Kangasjarvi S** (2009) Implication of chlorophyll biosynthesis on chloroplast-to-nucleus retrograde signaling *Plant Signal Behav.*4:545-547.

**Robinson SP, Walker DA** (1980) Distribution of metabolites between chloroplast and cytoplasm during the induction-phase of photosynthesis in leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 65: 02-905.

**Rosso D, Bode R, Li W, Krol M, Saccon D, Wang S, Schillaci L, Rodermeel SR, Maxwell DP, Hüner NPA** (2009) Photosynthetic redox imbalance governs leaf sectoring in the *Arabidopsis thaliana* variegation mutants *immutants*, *spotty*, *var1*, and *var2*. *The Plant Cell* 21:3473-3492.

**Ruban AV, Johnson MP** (2010) Xanthophylls as modulators of membrane protein function. *Arch Biochem Biophys.* 504:78-85.

**Sakamoto A, Murata N** (2002) The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell and Environment* 25:163-71.

**Serraj R, Sinclair TR** (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell and Environment* 25: 333-341.

**Sharma S, Verslues PE** (2010) Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell Environment* 33:1838-51.

**Sharma S, Villamor JG, Verslues PE** (2011) Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology* 157:292-304.

**Steel R, Torrie T** (1960) Principles and procedures of statistics: with special reference to the biological sciences. McGraw hill, New York 428 p.

**Stein H, Honig A, Miller G, Erster O, Eilenberg H, Csonka LN, Szabados L, Koncz C, Zilberstein A** (2011) Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants. *Plant Sci.* 181:140-150.

**Szabados L, Savouré A** (2009) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.

**Tanimoto S, Itoh Y, Yokoishi T** (1997) Possible involvement of greening in cell growth of *Suaeda japonica* under salt stress. *Plant Cell Physiology* 38: 129-132.

**Verbruggen N, Hermans C** (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35:753-759.

**Wang HL, Lee PD, Chen WL, Huang DJ, Su JC** (2000) Osmotic stress-induced changes of sucrose metabolism in cultured sweet potato cells. *Journal of Experimental Botany* 51:1991-1999.

**Wendler R, Veith R, Dancer J, Stitt M, Komor E** (1990) Sucrose storage in suspension cultura of *Saccharum* sp (sugarcane) is regulated by a cycle of synthesis and degradation. *Planta* 183:31-39.

**Werner JE, Finkelstein RR** (1995) Arabidopsis mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 93: 659-666.



**Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu JK** (2002) Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. *J Biol Chem.* 277:8588-96.

**Xu B, Deng X, Zhang S, Shan L** (2010) Seedling biomass partition and water use efficiency of switchgrass and milkvetch in monocultures and mixtures in response to various water availabilities. *Environmental Management* 46:599-609.

**Xue G-P, McIntyre CL, Glassop D, Shorter R** (2008) Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress *Plant Molecular Biology* 67:197-214.

## **Capítulo V. Ácido abscísico y estrés osmótico en la respuesta fisiológica de dos líneas celulares *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths contrastantes en su contenido de clorofila**

### **Introducción**

El estrés hídrico representa el principal factor que limita la distribución y productividad de las plantas, tanto en los sistemas naturales como en los agrícolas (Araya, 2007). Es disparado por cambios en el potencial de agua del medio por efectos de la sequía, salinidad, frío o temperaturas elevadas al que están expuestas las plantas durante su ciclo de vida en el medio terrestre. (Manavalan et al. 2009).

Las plantas poseen un sistema fisiológico y bioquímico complejo de censado y respuesta que les permite la adaptación y supervivencia. Los reguladores de crecimiento desempeñan papeles importantes en dicho proceso (Skirycz et al. 2011). El etileno, las giberelinas, citocininas, auxinas y ácido abscísico (ABA) son consideradas los reguladores de crecimiento clásicos. El incremento en la concentración de ABA es una de las respuestas más mencionadas en estudios relacionados con estrés hídrico. Este fenómeno se cree actúa como una señal para la iniciación de los procesos involucrados en la adaptación al estrés (Bray, 1997). Dichos procesos finalmente se ven reflejados como cambios en el desarrollo, fisiología y crecimiento de las plantas. La acción del ABA puede estar dirigido a ciertos tejidos (Seo y Koshiba, 2002) o células en particular, como son las células oclusivas del estoma (Hartung et al. 1998). Por otro lado, diversos trabajos han demostrado que la exposición de las plantas, tejidos o células a ciertas concentraciones de ABA antes de la aplicación del estrés, incrementa su tolerancia a frío (Rinne et al. 1998), calor (Abass y Rjashekar, 1993), sequía (Lu et al. 2009), anoxia (Kato-Noguchi, 2000) y metales pesados (Hsu y Kao, 2003). Por ejemplo, LaRosa et al. (1985), encontraron que el tratamiento con ABA incrementó la adaptación a la salinidad de células en suspensión de tabaco.

Los efectos de la aplicación exógena de ABA se han estudiado desde dos perspectivas; primero las respuestas fisiológicas y morfológicas, como cierre estomático, efectos en la integridad de la membrana celular, inducción de osmolitos o enzimas antioxidantes, entre otros (Jia et al. 2001; Tardieu et al. 2010). En segundo lugar se encuentran los enfoques moleculares que estudian los cambios en la expresión de genes en plantas o en cultivos celulares de plantas (Li et al. 2010); dentro de este segundo enfoque se ha encontrado que el ABA induce la síntesis de proteínas como la osmotina, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (proteína LEAs) y proteínas ricas en histidina (Hirayama y Shinozaki, 2007). El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del precultivo con ABA en las relaciones hídricas, la acumulación de prolina, ABA, carotenoides y clorofila en la respuesta al estrés osmótico de dos líneas celulares del pasto *B. gracilis* contrastantes en su contenido de clorofila.

## **Materiales y métodos**

Suspensiones celulares y condiciones de crecimiento:

Se utilizaron dos líneas celulares del zacate *B. gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths, que fueron establecidas y se mantienen de acuerdo con lo consignado por Aguado-Santacruz et al. (2001). Las líneas celulares fueron: una línea clorofílica y otra línea isogénica mutante deficiente de clorofila, con las que se realizaron cinéticas de crecimiento con duración de 12 d. Las células para iniciar el experimento (inóculo inicial) fueron cultivadas durante 8 d en medio suplementado con 0.375  $\mu\text{M}$  de ABA (SIGMA Aldrich, USA); mientras que células cultivadas en medio sin ABA se tomaron como testigo. Después de los 8 días los cultivos celulares se colectaron mediante filtración para realizar las cinéticas de crecimiento. El material que creció en el medio ABA se lavó dos veces con agua bidestilada estéril para evitar la interferencia con la posterior determinación de dicho regulador de crecimiento.

## Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento se realizaron como se describe a continuación: Del material previamente colectado se tomaron 0.4 g y fueron transferidos en matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL que contenían 25 mL de medio de cultivo con los tratamientos a estudiar. Se utilizaron dos niveles de PEG 0% (testigo) y 21% para el tratamiento con estrés. Estos tratamientos se aplicaron a las células tratadas con ABA y las que no fueron tratadas, por lo que en total se estudiaron 4 tratamientos. El experimento se mantuvo en un agitador orbital a 95 rotaciones por minuto en una cámara de crecimiento con las siguientes condiciones:  $77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica, temperatura de  $33 \pm 1^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 33.8%. Se colectaron 5 matraces por cada tratamiento cada tercer día para el análisis del potencial hídrico, osmótico, de turgencia, peso fresco y seco.

Para la medición del potencial hídrico y osmótico se utilizó un microvoltímetro Wescor HR 33T acoplado a una cámara psicrométrica de termocupla modelo C52 (Wescor, Inc., Logan, Utah, USA). El potencial de turgencia se obtuvo por diferencia de los valores del potencial hídrico y el potencial osmótico.

El peso fresco se determinó en una balanza analítica; para ello la biomasa generada se separó del medio líquido, mediante filtración y el exceso de medio de cultivo se eliminó con un papel absorbente. Después de la filtración las muestras se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$ , a partir de estas muestras se analizaron las siguientes variables: prolina por el método de Bates et al. (1973), clorofila por el método de Arnon (1949) y carotenoides por el método AOAC (1997).

## Cuantificación de ABA endógeno

Este análisis se llevó a cabo acorde con el protocolo descrito por Benítez-Domínguez et al. (2011). Para la extracción de ABA se pesaron 90 mg de material liofilizado y pulverizado. Las muestras se mezclaron con 4 ml de acetona 90% en

agua (v/v) se agitó en vórtex durante aproximadamente 2 min. Se incubó en baño helado ultrasónico a 0°C por 12 min, posteriormente se centrifugó 5 min a 1230 g. Después de la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se aforó a 4 mL. Se separó el ABA de los pigmentos que contenía la muestra mediante cromatografía de placa fina, sobre placas de sílica 60F254 HPTLC, las placas se desarrollaron con acetato de etilo, la cantidad de muestra que se utilizó fue de 300 µL. La banda correspondiente al ABA se identificó bajo luz UV, tomando como referencia un estándar de ABA, se raspó y se extrajo con 1 mL de acetato de etilo. El extracto se redujo a 100 µL con nitrógeno gaseoso. Posteriormente el volumen de 100 µL se aforó a 1 mL con metanol grado HPLC. La detección y cuantificación de ABA se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en un cromatógrafo marca Hewlet Packard modelo 1100 con arreglo de diodos, zorbax SB-C8 (4.6 x 250 mL<sup>-1</sup>) en tamaño de partícula de 5 µm.

Un diseño experimental completamente al azar se utilizó para analizar las diferencias entre tratamientos en las variables evaluadas (Steel y Torrie, 1960).

## **Resultados y discusión**

El ácido abscísico es muy importante en la adaptación de las plantas superiores a varios tipos de estrés ambiental actuando como un regulador entre los factores de estrés y las respuestas de la planta (Xiong y Zhu, 2003). En el capítulo anterior del presente trabajo se describió la respuesta al estrés osmótico de las células mutantes amarillas y se comparó con la respuesta de las células altamente clorofílicas en las mismas condiciones de estrés. En el presente capítulo se analizó el comportamiento de ambas líneas celulares cuando el inóculo inicial, se cultiva en medio suplementado con 0.375 µM de ABA antes de realizar las cinéticas aplicando estrés osmótico con 21% PEG.

Es importante mencionar que esta concentración de ABA ha sido utilizada en experimentos previos realizados en el laboratorio. En donde se estudió el efecto de diferentes concentraciones desde 0.187, 0.375, 0.406, 0.437, 0.5, 0.75, 1.125 y 1.5 µM de ABA en el contenido de clorofila y la ganancia de peso fresco de las

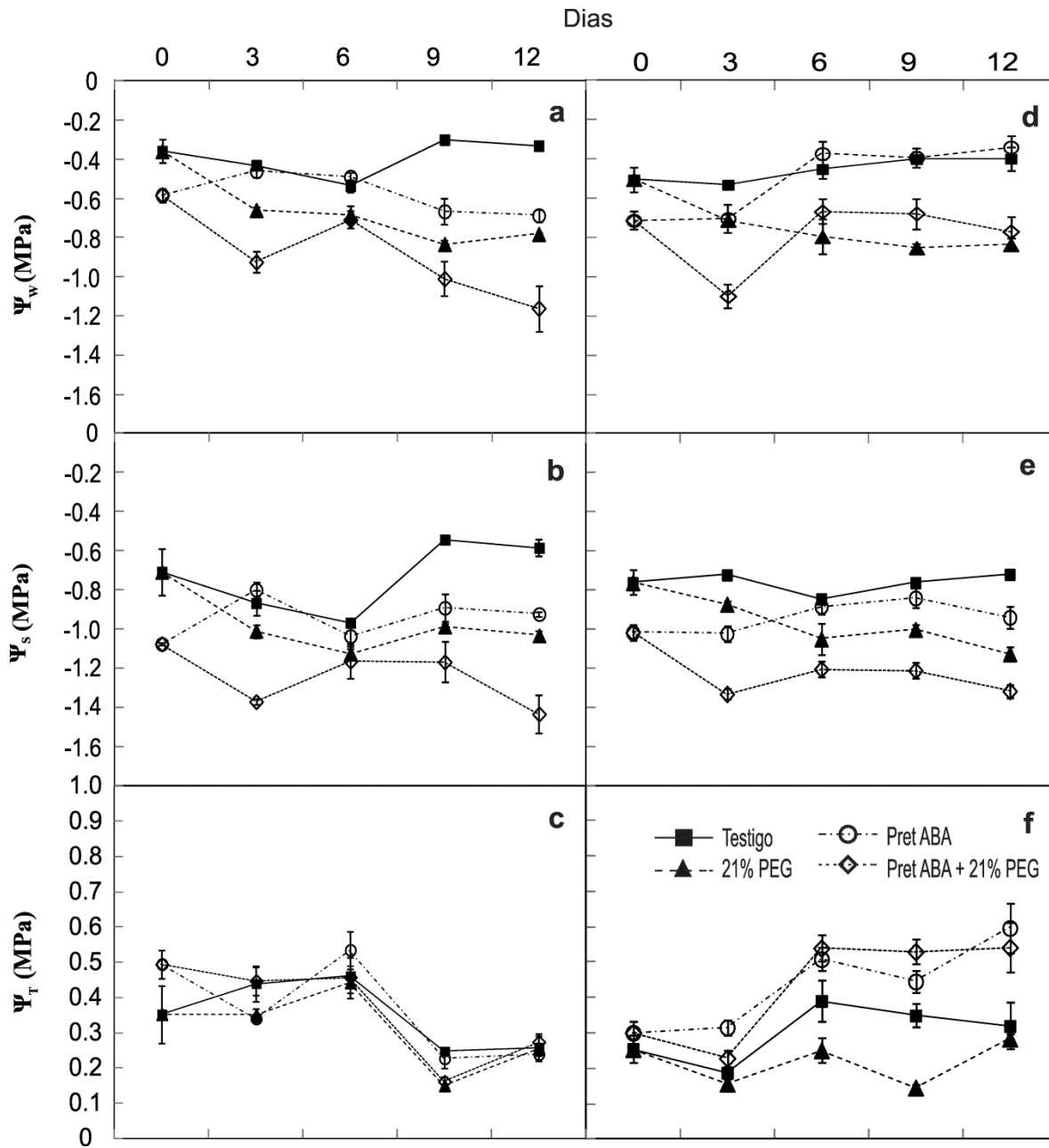
células clorofílicas; y se encontró que la concentración de 0.375 tuvo un efecto positivo en estas variables (Moreno-Gómez, 2009).

Experimentos han demostrado que una pre-exposición a niveles bajos no letales de un estrés puede incrementar la tolerancia a un subsecuente estrés más intenso (Qasim et al. 2007). El ABA exógeno puede inducir efectos similares a los que las plantas experimentan en estrés por sequía (Zhu, 2002). Esta fue la hipótesis que se planteó para estos experimentos y se utilizó el ABA ya que una de las principales respuestas de las plantas al déficit hídrico es precisamente el incremento en la concentración de este compuesto. Además, el incremento de ABA endógeno bajo estrés hídrico es acompañado por la expresión de un número de proteínas específicas en los tejidos vegetales, lo mismo se ha observado cuando el ABA se aplica de forma exógena (Bray, 2002). Así mismo, se consideró el hecho que la mutante amarilla acumula menor cantidad de ABA cuando se estresa con 21% de PEG (resultados capítulo IV), en comparación con las células clorofílicas en el mismo estrés.

### **Efectos del tratamiento con ABA en las relaciones hídricas de la línea celular clorofílica y la línea celular mutante de clorofila**

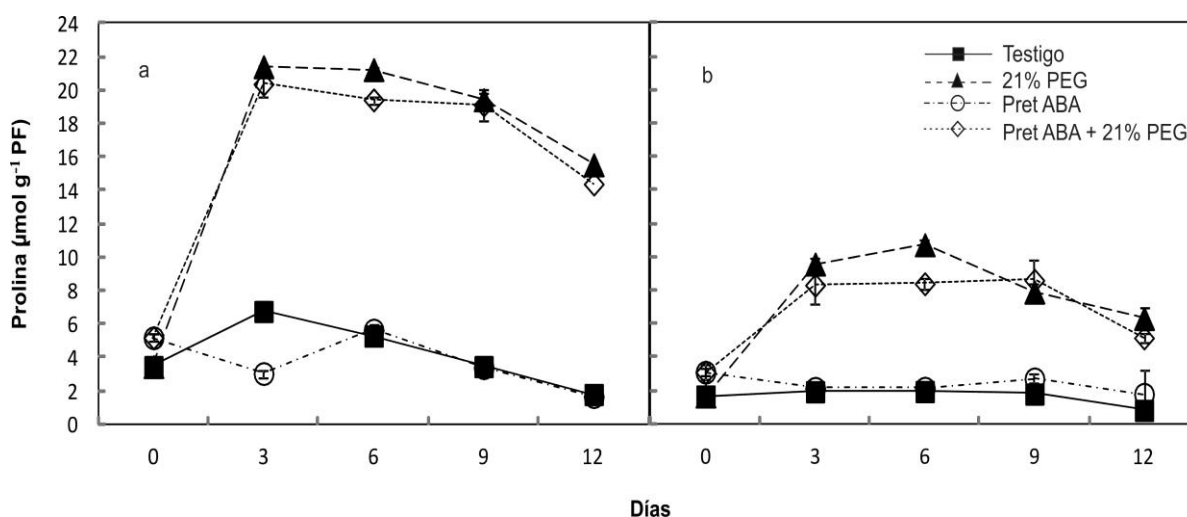
Las mediciones de potenciales al inicio del experimento, después de 8 d de cultivar las células en 0.375  $\mu$ M de ABA, mostró que el potencial hídrico y el osmótico fueron bajos en comparación con las células crecidas en medio sin ABA. Sin embargo, cuando las células que estaban en el medio con ABA se transfirieron al medio con 21% de PEG estas variables mostraron mayor disminución que en aquellas que no fueron tratadas con ABA. Contrariamente, en las células amarillas, cuando las células tratadas con ABA se pasaron a medio normal se observó recuperación del potencial hídrico, mostrando valores cercanos al de los tratamientos que no recibieron el precultivo con ABA. En cuanto al potencial de turgencia no se observó un efecto positivo en el mantenimiento de este componente en las células clorofílicas (Fig. 1c), pero sorprendentemente las células amarillas que fueron tratadas con ABA mantuvieron alto el potencial de

turgencia independientemente si las cinéticas fueron con estrés o sin estrés (Fig. 1f).



**Figura 1** Cinéticas que muestran el comportamiento de las relaciones hídricas (potencial de agua,  $\Psi_A$ : potencial osmótico,  $\Psi_S$  y potencial de turgencia,  $\Psi_T$ ) en las suspensiones celulares clorofílicas (a, b y c) y mutante amarillas (d, e y f) del pasto *B. gracilis*. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar de cinco repeticiones.

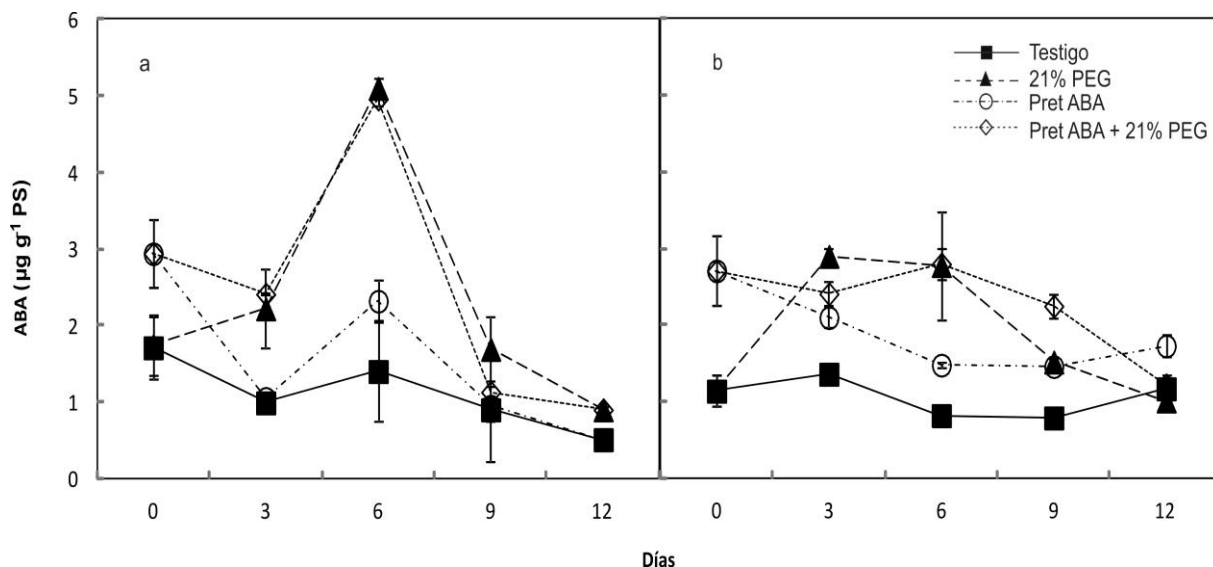
El decremento del potencial hídrico (Fig. 1b y 1e) podría estar relacionado con la acumulación de solutos en las células en respuesta al ABA aplicado, como previamente ha sido demostrado en segmentos de hoja de cebada (Pesci, 1988). En el presente trabajo solo se analizó el contenido de prolina y se encontró que el cultivo con ABA indujo la acumulación de este aminoácido, comparada con aquellas que no fueron cultivadas en el medio que contenía ABA. En las células clorofílicas se encontró  $5.18 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF en células que recibieron el precultivo; contra  $3.45 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF en células que recibieron el tratamiento. En las mutantes amarillas se encontró 3.1 contra  $1.67 \mu\text{mol g}^{-1}$  PF respectivamente. Sin embargo, cuando se transfirieron al medio con 0% (testigo) o 21% de PEG el contenido de este aminoácido se comportó similarmente a la tendencia observada en aquellas que no fueron precultivadas con ABA (Fig. 2). No obstante, es poco probable que solo la prolina acumulada por efecto del ABA aplicado sea la responsable de la disminución del potencial osmótico, ya que la célula también es capaz de acumular una amplia gama de otros solutos que tienen efecto en esta variable. Por ejemplo Wattana (2011), encontró que el ABA exógeno tiene efecto en el incremento de azúcares en plántulas de arroz.



**Figura 2.** Acumulación de prolina en las células clorofílicas (a) y en las células mutantes amarilla (b). Cada punto representa el promedio de cinco repeticiones  $\pm$  el error estándar.



Por otro lado, es importante mencionar que en varias especies vegetales el ABA no es la principal señalización para la acumulación de prolina en estrés hídrico, más bien están complementadas por las rutas regulatorias independientes de ABA. En todo caso habría que estudiar el comportamiento del contenido de prolina durante los 8 d de cultivo en el medio con ABA, el cual en el presente trabajo no se realizó.



**Figura 3.** Contenido de ABA endógeno en el transcurso de la cinética de crecimiento en las células clorofílicas (a) y las células mutantes amarilla (b) del zacate *B. gracilis*. El inóculo inicial se cultivó en medio suplementado con 0.375 µM de ABA, muestras que corresponden al inicio de las cinéticas. Cada punto representa el promedio ± el error estándar de cinco repeticiones.

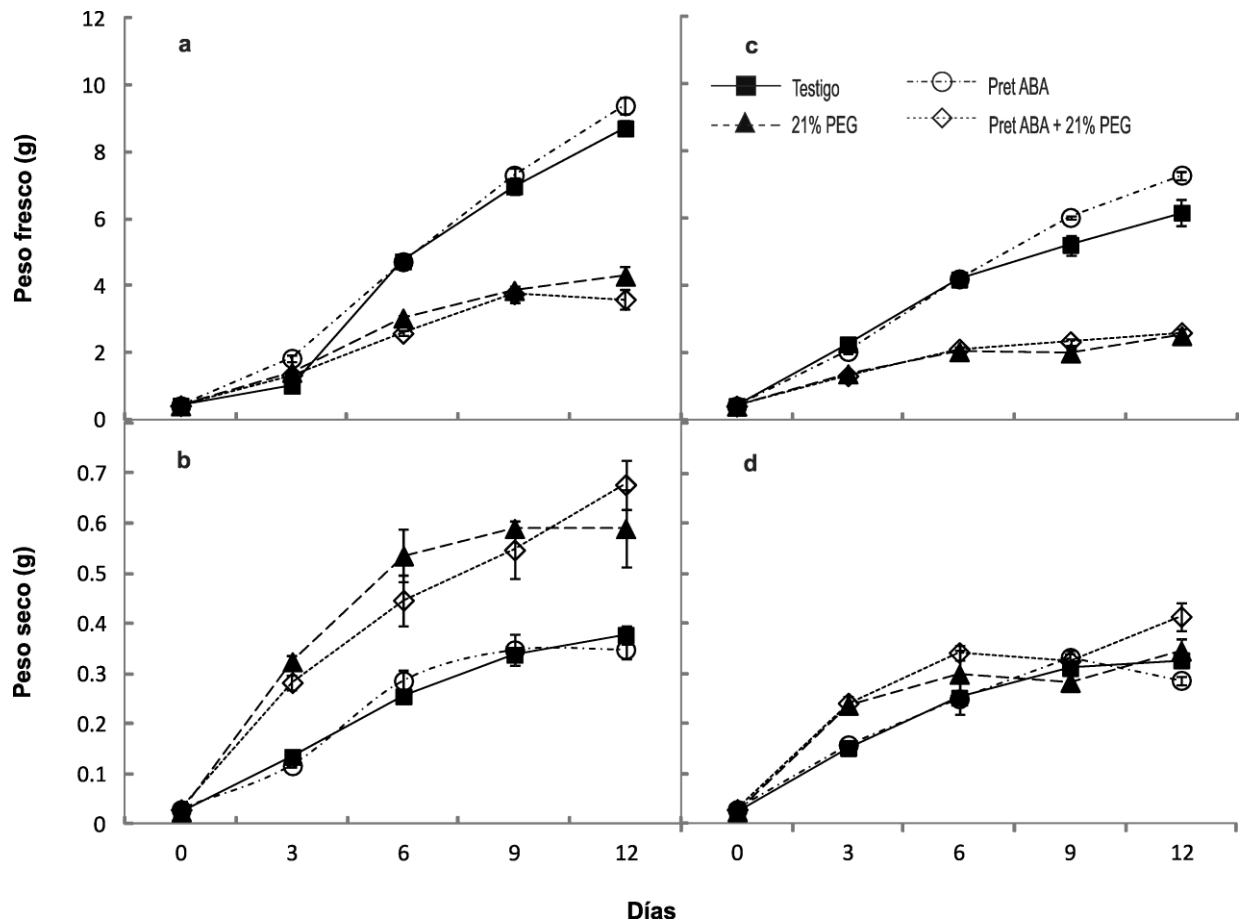
### Efectos del tratamiento con ABA en el crecimiento, contenido de clorofila y carotenoides

El precultivo con ABA no cambió significativamente la tendencia de la acumulación de biomasa en ambas líneas celulares (Fig. 2). Ciertamente el ABA es primordial en la coordinación del crecimiento cuando la disponibilidad de agua disminuye en el ambiente. Sin embargo, el efecto primario del ABA en este proceso es muy complejo y hasta ahora no se ha definido claramente (Sreenivasulu et al. 2012). Por ejemplo, en el zacate Kentucky el ABA exógeno mejoró la calidad, pero no

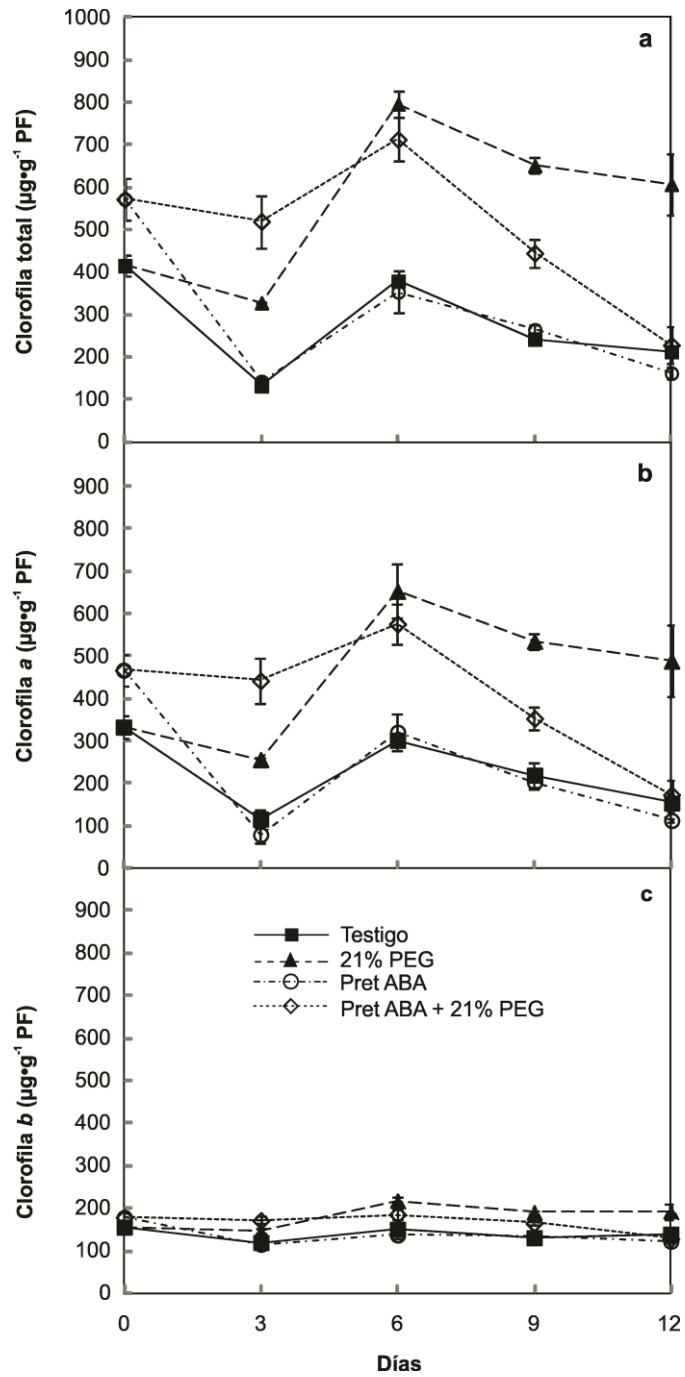
tuvo un efecto significativo en el crecimiento de brotes en estrés hídrico prolongado. Sin embargo, sí se observaron efectos benéficos en la protección del aparato fotosintético (Wang et al. 2003). Rajasekaran y Blake, (1999) encontraron que el tratamiento con ABA en plántulas de pino protege la integridad de las membranas fotosintéticas: este efecto fue asociado con la inhibición de la producción de etileno durante el proceso de estrés hídrico

Este podría ser uno de los principales papeles del ABA en la respuesta de incremento en el contenido de clorofila cuando las células clorofílicas se estresan osmóticamente. Al final del tratamiento de 8 d en el medio con ABA las células clorofílicas mostraron mayor concentración de clorofila *a*, *b* y total, comparadas con las células que crecieron en un medio sin ABA (Fig. 3). Hacia los tres días de iniciar el experimento no se observó disminución de estos pigmentos y para el sexto día fue alcanzado por el tratamiento que no tuvo precultivo con ABA.

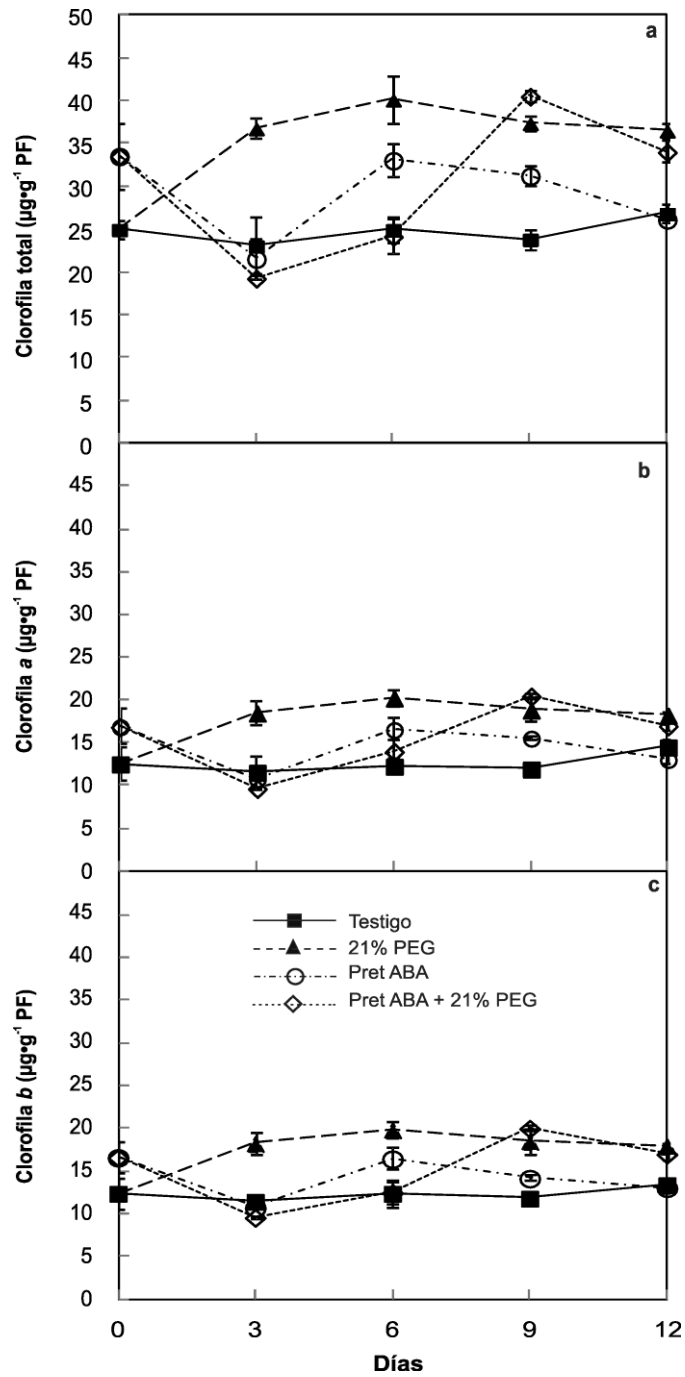
En lo que se refiere a las células mutantes, se observó similitud con respecto al incremento en la concentración de pigmentos clorofílicos cuando las células se cultivaron en el medio con ABA (Fig. 4). No obstante, al transferir las células al medio sin ABA, ya sea con o sin PEG, este efecto se vio disminuido y no se comparó con el comportamiento observado en las células que no fueron cultivadas con ABA.



**Figura 4.** Efecto del tratamiento con  $0.375 \mu\text{M}$  de ABA en las cinéticas de peso fresco y seco de la línea celular clorofílica (a y b) y la línea celular mutante amarilla (c y d). Cada valor representa el promedio  $\pm$  el error estándar de cinco repeticiones.

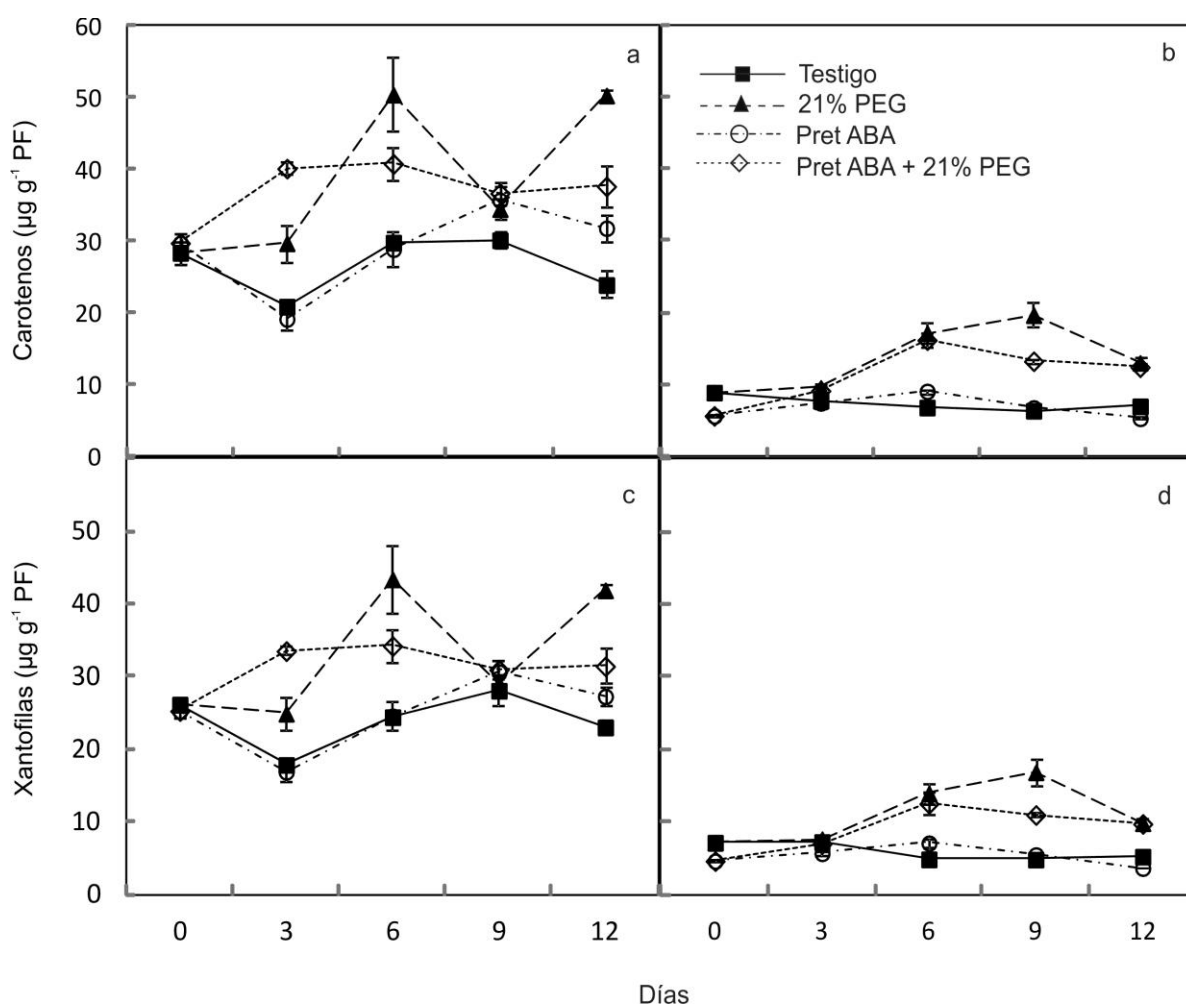


**Figura 5.** Cinética de clorofila en las células clorofílicas *B. gracilis*. (a) Clorofila total, (b) clorofila a y (c) clorofila b. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de cinco repeticiones.



**Figura 6.** Cinética de clorofila en la línea celular mutante amarilla de *B. gracilis*. (a) Clorofila total, (b) clorofila *a* y (c) clorofila *b*. Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar de cinco repeticiones.

Otra variable evaluada fue el contenido de carotenoides, los cuales son los principales precursores del ABA (Parry et al. 1990). En las células amarillas no se encontró efecto en las cinéticas de estos pigmentos (Fig. 6b y 6d). En la células clorofílicas expuestas a 21% de PEG, aquellas que fueron pre-cultivadas con ABA mostraron mayores concentraciones de carotenos y xantofilas al tercer día del experimento. Sin embargo, al sexto día fue superado por aquellas que no recibieron el pre-cultivo con ABA (Fig. 6a y 6c).



**Figura 7.** Comportamiento del contenido de carotenos y xantofilas en las línea celular clorofílica (a, c) y en la línea celular mutante amarilla (b, d). Cada punto representa el promedio  $\pm$  el error estándar de cinco repeticiones.

Como muestran los resultados el precultivo con ABA no tuvo efecto positivo en las respuestas al estrés aplicado durante las cinéticas. Al parecer la clorofila, la prolina, el ABA y los carotenoides si se vieron afectadas; sin embargo ninguno de ellas superó a las respuestas inducidas por el estrés osmótico. Podría ser el efecto de la concentración o bien de la forma en que se realizó el tratamiento con ABA; en todo caso, faltó estudiar el efecto cuando se aplica al mismo tiempo que el estrés. De esta manera corroborar si el efecto observado después de los 8 d de cultivo se complementa con el observado cuando se aplica el estrés.

## Literatura citada

**Aguado-Santacruz GA, Cabrera-Ponce JL, Ramírez-Chávez E, León-Ramírez CG, Rascón-Cruz Q, Herrera-Estrella L, Olalde-Portugal V** (2001) Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. *Plant Cell Reports* 20:131-136.

**Abass M, Rajashekar CB** (1993) Abscisic Acid Accumulation in Leaves and Cultured Cells during Heat Acclimation in Grapes. *Hort Science* 28:50-52.

**AOAC** (1997) Official method of analysis of the association of official analytical chemists AOAC Inc. Arlington.

**Araya, YN** (2007) Ecology of Water Relations in Plants. In: Not Set ed. *Encyclopaedia of life sciences* [26 vol. set]. Wiley.

**Arnon DI** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiology* 24: 1-15.

**Bates LS, Waldren RP, Teare ID** (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.

**Benítez-Domínguez L, Gómez-Merino FC, Trejo-Téllez LI, Robledo-Paz A** (2011) Anatomy, abscisic acid and nutrient content and germination of heliconia seeds. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34:189-196.

**Bray EA** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2:48–54.

**Bray EA** (2002). Abscisic acid regulation of gene expression during water deficit stress in the era of *Arabidopsis* genome. *Plant Cell and Environment* 25:153-163.

**Hartung W, Wilkinson S, Davies WJ** (1998) Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *J Exp Bot* 49: 361-367.

**Hirayama T, Shinozaki K** (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci.* 12: 343-351.

**Hsu YT, Kao CH** (2003) Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant, Cell and Environment* 26: 867-874.

**Jia W, Zhang J, Liang J** (2001) Initiation and regulation of water deficit-induced abscisic acid accumulation in maize leaves and roots: cellular volume and water relations. *Journal of experimental Botany* 52: 295-300.

**Kato-Noguchi H** (2000) Abscisic acid and hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of lettuce seedlings. *J. Exp. Bot* 51:1939-1944.



**LaRosa PC, Handa AK, Hasegawa PM, Bressan RA** (1985) Abscisic acid accelerates adaptation of tobacco cells to salt. *Plant Physiol.* 79:138-142

**Li XJ, Yang MF, Chen H, Qu LQ, Chen F, Shen SH** (2010) Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. *Biochim. Biophys. Acta* 1804:929-940

**Lu S, Su W, Li H, Guo Z** (2009) Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 132-138.

**Manavalan PL, Guttikonda SK, Tran LP, Nguyen HT** (2009) Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiology* 50: 1260–1276.

**Moreno-Gómez B** (2009) Análisis proteómico de la respuesta al estrés salino en células clorofílicas en suspensión de *Bouteloua gracilis*. Tesis Maestría. Instituto Tecnológico de Celaya.

**Parry AD, Babiano MJ, Horgan R** (1990) The role of *cis*-carotenoids in abscisic acid biosynthesis. *Planta* 182:118-128.

**Pesci P** (1988) Ion influxes and ABA-induced proline accumulation in barley leaf segments *Plant Physiol* 147:729-735.

**Qasim A, Ashraf M, Athar H (2007)** Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. *Pak. J. Bot.* 39:1133-1144.

**Rajasekaran LR, Blake TJ** (1999) New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of jack pine seedlings. *J. Plant Growth Regul.* 18:175-181.

**Rinne P, Welling A, Kaikuranta P** (1998) Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens Ehrh.*) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype. *Plant Cell Environ* 21:601-611.

**Seo M, Koshiba T** (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7: 41-48.

**Skirycz A, Claeys H, De Bodt S, Oikawa A, Shinoda S, Andriankaja M, Maleux K, Eloy NB, Coppens F, Yoo S-D, Saito K, Inze D** (2011) Pause and stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in *Arabidopsis* and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *The plant cell* 23:1876-1888.

**Sreenivasulu N, Harshavardhan VT, Govind G, Seiler C, Kohli A** (2012) Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* 506 (2012) 265–273

**Steel R, Torrie T** (1960) Principles and procedures of statistics: with special reference to the biological sciences. McGraw hill, New York 428 p.

**Tardieu F, Parent B, Simonneau T** (2010) Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? *Plant Cell Environ* 33:636-47

**Wang Z, Huang B, Xu Q** (2003) Effects of abscisic acid in drought responses of Kentucky bluegrass *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:36-41.

**Wattana P** (2011) Exogenous abscisic acid enhances sugar accumulation in rice (*Oryza sativa L.*) under drought stress. *Asian Journal of Plant Sciences*, 10: 212-219.

**Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.