



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

Descubrimiento de ferroquelatasa 1 en *Nicotiana tabacum* L.: papel en la respuesta al estrés abiótico y el desarrollo de las plantas

Patricia Ortega-Rodés ^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-1532-9231>
Bernhard Grimm ² <https://orcid.org/0000-0002-9730-1074>
Boris Hedke ² <https://orcid.org/0000-0002-1170-1246>
Eduardo Ortega Delgado ¹ <https://orcid.org/0000-0003-4176-7171>
Tingting Fan ² <https://orcid.org/0000-0002-5631-3001>
Rosa Rodés García ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6176-212X>
Mayté Pernús Álvarez ³ <https://orcid.org/0000-0003-1554-0328>
Daniel Hey ² <https://orcid.org/0000-0002-8749-8352>
Loiret Fernández García ¹ <https://orcid.org/0000-0002-2058-781X>
Lea Brings ² <https://orcid.org/0000-0001-8914-9378>
Lena Roling ² <https://orcid.org/0000-0003-4615-0963>
Florian Schnurrer ² <https://orcid.org/0000-0002-4106-2318>
Anna Meiers ² <https://orcid.org/0000-0002-1496-1393>
Ali Alawady ² <https://orcid.org/0000-0003-0643-0389>

¹ Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

² Instituto de Fisiología Vegetal, Universidad Humboldt de Berlín. Berlín, Alemania

³ Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: portega@fq.uh.cu

RESUMEN

Palabras clave

tabaco; estrés abiótico; ferroquelatasa; embriogénesis; hemo

Introducción. Cuba está amenazada por el Cambio Climático. En la fisiología de las plantas participan enzimas que actúan como escudo al estrés oxidativo, siempre asociado a la salinidad, el déficit o exceso hídrico y las temperaturas extremas; esas enzimas tienen Hemo como cofactor. Hemo es un tetrapirrol, semejante a clorofila, pero con Fe en lugar de Mg como átomo central. El objetivo fue investigar la respuesta asociada al hemo en plantas de tabaco bajo estrés salino, hídrico y de temperatura, junto a la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Se reportó, en tejidos de tabaco, por primera vez para la ciencia, la presencia, de la enzima Ferroquelatasa 1 (responsable de quelar el hierro al tetrapirrol). Las plantas tienen dos isoformas de Ferroquelatasas (FC1 y FC2). La mutación para el gen de la Ferroquelatasa 1, en la planta modelo, resultó letal para los embriones. **Métodos.** Al comparar los niveles de ARNm de FC1 y FC2 en embriones de plantas tipo salvaje, se demostró que FC1 es la isoforma predominante durante la maduración del embrión. Por lo tanto, la regulación de la expresión de FC en tiempo y espacio durante la embriogénesis, es prerequisite para el adecuado desarrollo del embrión. **Resultados.** Se concluye que el hemo producido por FC1, es esencial para la embriogénesis además de las respuestas al estrés. Líneas antisentido



para FC1 tuvieron fenotipo de floración temprana en día corto; esto hizo que por primera vez se estableciera una relación del hemo producido por FC1 con el proceso de la floración, deduciéndose así que el Hemo producido por FC1 es importante en el metabolismo reproductivo. Estos conocimientos en manos de mejoradores, pudieran servir para obtener cultivares productivos con capacidad de aclimatación a los estreses abióticos asociados al cambio climático, lo que potencialmente nos daría alguna ventaja para mitigar sus efectos. El trabajo ha estimulado el intercambio científico con Alemania. Los resultados son incluidos como técnicas pedagógicas para la enseñanza de métodos modernos de biología molecular, en la formación de alto nivel de científicos jóvenes cubanos y latinoamericanos en la UH, en las 5 ediciones del curso conjunto "Basic methods in plant molecular biology and plant physiology" con la Universidad Humboldt de Berlín.

First report of ferrochelatase 1 in *Nicotiana tabacum* L.: its role in the abiotic stress response and development of plants

ABSTRACT

Introduction. Cuba is threatened by climate change. Some enzymes act as a shield against oxidative stress, always associated with salinity, water deficit, or excess and extreme temperatures; those enzymes have Heme as a cofactor. Heme is a tetrapyrrole, similar to chlorophyll, but with Fe instead of Mg as the central atom. The response associated with Heme was investigated in tobacco plants under saline, water, and temperature stress, together with the model plant *Arabidopsis thaliana*. The presence of the enzyme Ferrochelatase 1 (responsible for chelating iron to tetrapyrrole) was reported in tobacco tissues for the first time for science. Plants have two isoforms of Ferrochelatases (FC1 and FC2). Mutating the model plant for the Ferrochelatase 1 gene was lethal for the embryos. **Methods.** By comparing FC1 and FC2 mRNA levels in wild-type plant embryos, it was demonstrated that FC1 is the predominant isoform during embryo maturation. Therefore, the regulation of FC expression in time and space during embryogenesis is a prerequisite for the proper development of the embryo. **Results.** It is concluded that the Heme produced by FC1 is essential for embryogenesis in addition to stress responses. Antisense lines for FC1 had an early flowering phenotype on short days; this made it possible for the first time to establish a relationship between the Heme produced by FC1 and the flowering process. Heme produced by the FC1 isoform is important in reproductive metabolism. This knowledge in the hands of breeders could be used to obtain productive cultivars with the capacity to acclimatize to abiotic stresses associated with climate change, which would potentially give us some advantage to mitigate its effects. This work has stimulated scientific exchange with Germany. The results are included as pedagogical techniques for the teaching of modern molecular biology methods, in the high-level training of young Cuban and Latin American scientists at the University of Havana, in the 5 editions of the joint course "Basic methods in plant molecular biology and plant physiology" with the Humboldt University of Berlin.

Keywords

tobacco; abiotic stress; ferrochelatase; embryogenesis; heme

INTRODUCCIÓN

En Cuba el 20 % de las tierras de cultivo están en peligro por salinización; las provincias donde se cultiva el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) presentan este problema. ⁽¹⁾ En suelos de la llanura sur de Pinar del Río existen factores limitantes; salinidad actual y potencial, baja capacidad de intercambio catiónico, etc., con suelos de textura ligera en la mayoría de las

áreas. ⁽²⁾ Desde la década del 50 del siglo pasado, se sabe ⁽³⁾ que en lo que hoy es el Sur de Artemisa y Mayabeque comenzó a manifestarse la intrusión marina en terrenos cultivables. A lo largo de su ciclo de vida, todas las plantas están expuestas a factores estresantes externos bióticos y abióticos. ⁽⁴⁾ Conocer la respuesta de las plantas al estrés abiótico es una línea actual de investigación en la biología de los efectos del

estrés en la agricultura. Conocer las bases de resistencia de tabaco al estrés salino, hídrico y de temperaturas extremas es de importancia para Cuba y es un problema creciente para la agricultura cubana y de otros países.

Los autores investigaron las respuestas de las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), a las condiciones de estrés salino, hídrico y de temperaturas, con atención especial al cultivo del tabaco (incluyendo la planta modelo *Arabidopsis thaliana*), sobre la influencia del hemo en la buena adaptación a las condiciones de estrés. Hemo es semejante a la clorofila, pero sin cola fitólica y con Fe en lugar de Mg como centro del tetrapirrol. ⁽⁵⁾

Hemo es uno de los productos de la biosíntesis de los tetrapirroles. La enzima ferroquelatasa (FC) cataliza la reacción final de la síntesis de hemo, quelando el hierro ferroso en el anillo de protoporfirina IX (Proto). ⁽⁶⁾ Se ha descrito que varias especies de plantas tienen 2 isoformas de la enzima FC (FC1 y FC2). Woodson, Pérez-Ruiz ⁽⁷⁾ sugirieron que ambas isoformas sintetizan pools de hemo diferentes. De esta manera cada pool de hemo supliría hemoproteínas que funcionan en las respuestas defensivas a las condiciones de estrés. En *Nicotiana tabacum* la FC2 fue descrita por Papenbrock, Mishra, ⁽⁸⁾ sin embargo la FC1 no había sido descrita para la ciencia.

Por el papel del Hemo en las enzimas del metabolismo anti-oxidativo, por la íntima asociación del estrés oxidativo a la fisiología de las plantas ante estreses abióticos, por la importancia del tabaco en la economía nacional, en este trabajo se analizaron las características de la síntesis de hemo, sus concentraciones en los tejidos, la biología molecular de su metabolismo y su distribución en diferentes órganos, tejidos y organelos celulares en plantas de tabaco afectadas o no por 3 de los principales tipos de estrés asociados al Cambio Climático.

MÉTODOS

El objetivo fue el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y se incluyó una planta modelo *Arabidopsis thaliana*, para dilucidar la función biológica de la enzima FC1 y de su producto el hemo, en condiciones de estrés abiótico. Algunos de los cultivares de tabaco utilizados fueron desarrollados en Cuba y son utilizados en la producción tabacalera y al programa de mejoramiento genético.

En condiciones a) de laboratorio, b) semi controladas en suelo, y c) hidroponía con solución Hoagland, ⁽⁹⁾ se determinó la respuesta de *Nicotiana tabacum* L en condiciones de salinidad y temperaturas extremas. *Arabidopsis thaliana* se usó en estudios de complementación en mutantes *knock-out* de ferroquelatasa 1 para dilucidar la función de FC1 durante el desarrollo.

Se utilizaron técnicas de laboratorio de espectrometría, ensayos enzimáticos ⁽¹⁰⁻¹²⁾, microscopía confocal de fluorescencia, cromatografía, etc; también técnicas moleculares de aislamiento de ADN ⁽¹³⁾, ARN, electroforesis, secuenciación de ADNc y de RT-PCR, ^(14, 15) generación y complementación de plantas transgénicas, ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ análisis molecular evolutivo utilizando MEGA software versión 5 ⁽¹⁹⁾ entre otras. La colaboración con la Universidad Humboldt de Berlín permitió desarrollar varias de estas técnicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solo una isoforma de FC ha sido reportada para animales, hongos, bacterias y algas; sin embargo, en algunas especies de plantas se ha descrito 2 isoformas de FC (FC1 y FC2). ⁽²⁰⁻²⁵⁾ En *Nicotiana tabacum* el gen que codifica para FC2 fue previamente descrito por Papenbrock, Mishra, ⁽⁸⁾ pero no el de FC1. El de ADNc de FC1 fue descrito con este trabajo y aceptado para su publicación y divulgación internacional en la base de datos de NCBI (JF428143). ⁽²⁶⁾ En esta contribución se encontró que la secuencia de ADNc de FC1 de *Nicotiana tabacum* (*NtFC1*) consiste en 1935 nucleótidos que incluyen 1464 pares de base del marco de lectura abierto, así como (168 y 303) nucleótidos de la región no codificante (5' y 3') respectivamente.

Al comparar la nueva secuencia reportada de la proteína de *NtFC1*, con las secuencias informadas en otros cultivos y disponibles también en NCBI, se pudo demostrar la similitud con las proteínas previamente reportadas en otros cultivos. Se construyó un árbol filogenético donde se deduce las relaciones evolutivas de FC1 y FC2, publicado por los autores en la revista *Biotecnología Aplicada*. ⁽²⁷⁾ Ambas isoformas de FC (1 y 2) en plantas se agrupan separadas de las secuencias de FC de otros organismos. FC1 está más relacionada con FC2 que con FC localizada en mitocondria de organismos no fotosintéticos, lo que permitió demostrar que ambos genes de FC de plantas son derivados del proceso de duplicación de genes.

Después de describir la secuencia de aminoácidos de la Ferroquelatasa se determinó el perfil de expresión, la actividad en diferentes tejidos de plantas de tabaco (*N. tabacum*), y su producto final, el hemo.

La expresión relativa de FC1 y FC2 es diferente en hojas que raíces. Los niveles de transcritos de FC2 es 2,5 veces mayor que los niveles de FC1 en hojas, mientras que en las raíces los niveles de transcritos de FC2 son 5 veces menores que FC1 (figura 1). Estos resultados están refrendados con su publicación en la revista *Plant & Cell Physiology* ⁽²⁸⁾ y en el documento de tesis de Doctorado de la autora principal. ⁽²⁹⁾

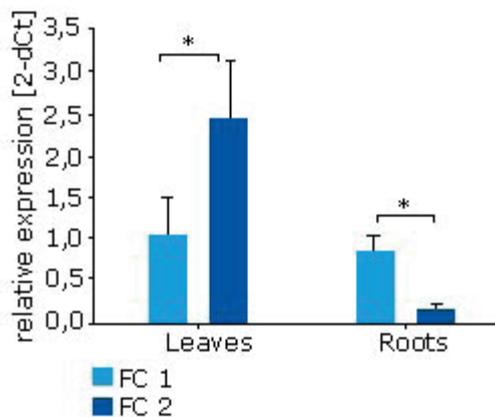


Fig. 1. Análisis cuantitativo de los transcritos de FC1 y FC2 en la hoja No. 4 y raíces. Plantas de *N. tabacum* (SNN) fueron crecidas en solución Hoagland (mitad de fuerza) por 10 d. Los niveles de expresión fueron cuantificados por PCR en tiempo real y calculado por el método $2^{-\Delta Ct}$ utilizando la expresión de UBI como estándar. Los datos de expresión muestran la media de 6 réplicas biológicas \pm SD. * Indica diferencias significativas de los pares por la prueba t indicada por los corchetes con $P < 0,05$.

Plantas mutantes de *Nicotiana tabacum*, con la expresión de FC1 disminuida, no tuvieron modificaciones en el fenotipo (figura 2). Por tal motivo se sometieron a condiciones de estrés abiótico (salinidad y bajas temperaturas) para detectar posibles cambios fenotípicos y modificaciones en el metabolismo por causa de la disminución de FC1. De esa manera se demuestra el aporte del hemo producido por FC1 en las respuestas al estrés. La salinidad disminuyó el largo del vástago, pero la disminución ocurrió de igual manera para las plantas de tipo salvaje como para las mutadas (Línea AS37). Aparecieron algunas áreas necróticas en las hojas de las líneas antisentidos, especialmente en condiciones de estrés salino.

La expresión de los genes de *ferroquelatasa 1* (FC1) y *ferroquelatasa 2* (FC2) bajo condiciones salinas no fueron afectados para ninguna línea estudiada incluyendo las antisentidos para FC1. FC1 y FC2 son diferentemente regulados en condiciones de baja temperatura, los niveles de transcritos de FC1 incrementan mientras que los niveles de FC2 disminuyen (figura 3). Cambios en el contenido de hemo pudieran

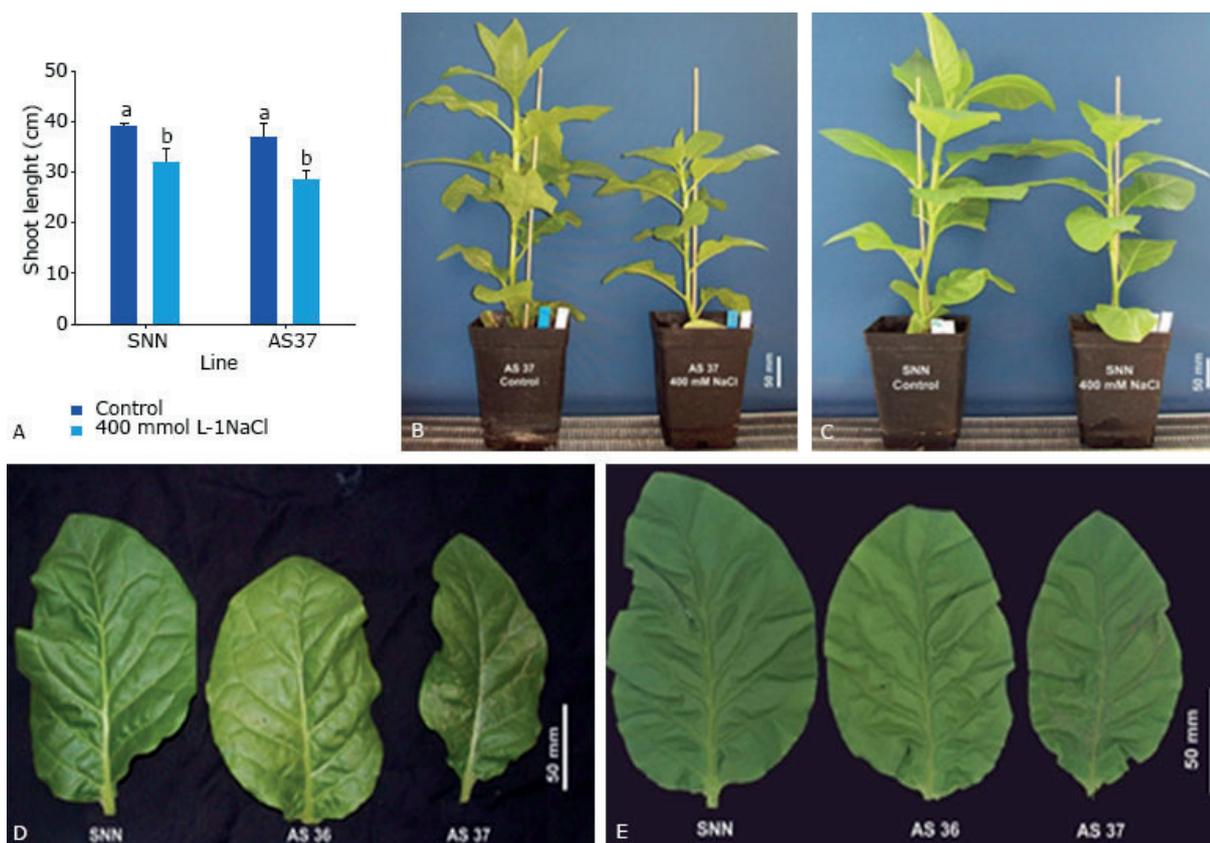
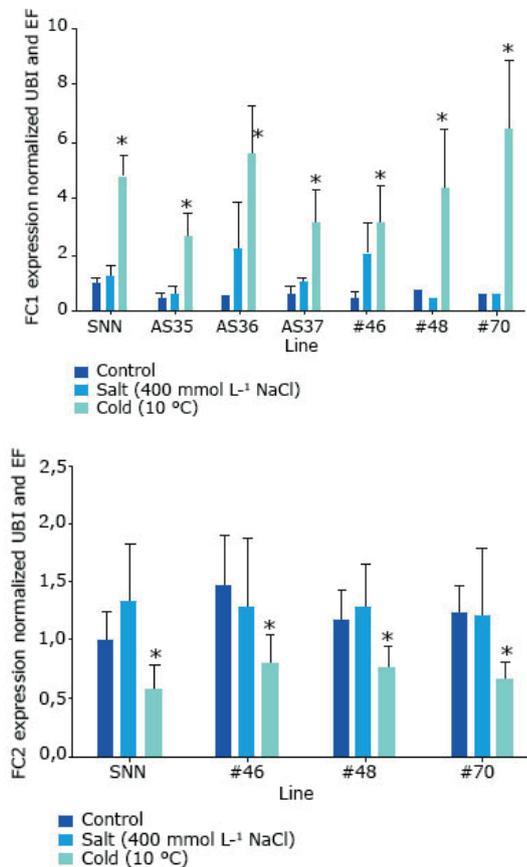


Fig. 2. Efecto de estrés abiótico (salinidad y frío) en el crecimiento y fenotipo de *N. tabacum* tipo salvajes (SNN) y líneas antisentidos *fc1* (AS36 y AS 37) durante 7 d. A) Efecto de la salinidad en el crecimiento del largo del vástago. Barras representan la media de 6 réplicas biológicas \pm SD; diferentes letras significan diferencias significativas entre muestras por el test de **Tukey**; $P < 0,05$. B) y C) Fotos de plantas pertenecientes a la línea salvaje (SNN) y la línea antisentido *fc1* (AS37) respectivamente bajo control (izquierda) y salinidad (derecha) (400 mmol L⁻¹ NaCl). D) y E) Fotos de las hojas en condiciones de estrés salino (400 mmol L⁻¹ NaCl) y de baja temperatura (10 °C) respectivamente. Barras en las imágenes indican 50 mm.

explicarse por una modificada expresión de genes FC y una alterada actividad enzimática. Aunque la contribución de FC1 en hojas al pool de hemo es menor que FC2 (figura 2), una mayor expresión de FC1 bajo condiciones de estrés de temperatura, indica una contribución mayor que FC2 al pool de hemo (figura 3).



* Indica diferencias significativas comparadas con el control según de Dunnet ($P < 0.05$).

Fig. 3. Análisis de los transcritos (qRT-PCR) de genes que codifican para enzimas de la vía de los tetrapirroles en hojas de *N. tabacum* (SNN y líneas *fc1*) después de 24 h de estrés, A) *FC1: Ferroquelatasa1* usando los cebadores qNt FC 1/2 fw y qNt FC 1/2 rev, B) *FC2: Ferroquelatasa2* usando los cebadores qNt FC 2/1 fw y qNt FC 2/1 rev. Los datos de expresión son mostrados como la media de al menos 3 réplicas biológicas \pm SD.

La ferroquelatasa es una enzima de codificación nuclear y es translocada al sitio subcelular donde realiza su función.⁽³⁰⁾ La mayoría de los reportes apuntan a que la síntesis de hemo ocurre en los plastidios. Sin embargo, hasta ahora pocas publicaciones sugieren que los últimos 2 pasos de la síntesis de hemo ocurren en paralelo en los plastidios y en mitocondrias.^(25, 31-33)

Estudios de predicción *in silico* de la localización de la proteína NtFC1 sugirieron una localización en cloroplastos

fundamentalmente; sin embargo, la localización en mitocondrias también es posible según los valores de predicción de algunos de los softwares utilizados. Para complementar el trabajo *in silico*, se utilizó la microscopia confocal para detectar la proteína FC1 fusionada con la proteína fluorescente verde (GFP) en plantas que expresaban una construcción transiente que incluía la secuencia del gen NtFC1 y la secuencia del gen de la proteína verde fluorescente GFP. La transformación transiente, utilizando biobalística, permitió revelar en hojas y pétalos de tabaco, que la fluorescencia se encontró en cloroplastos. La localización en cloroplastos es fácilmente distinguible debido a la auto-fluorescencia roja de la clorofila confinada en los cloroplastos (figura 4). Por este método no se detectó la presencia de la proteína NtFC1 en mitocondrias posiblemente debido a que la expresión de cloroplastos es mayor. Sin embargo, utilizando plantas mutantes que sobreexpresan FC1 se logró cuantificar la actividad FC en mitocondrias aisladas, indicando que esta proteína está presente en las mitocondrias también como en los cloroplastos. Este resultado se publicó en *Plant & Cell Physiology*.⁽²⁸⁾

Teniendo en cuenta que la enzima FC2 es exclusiva de plastidios⁽⁸⁾ y la presencia de actividad FC en ambos organelos aunque en menor medida en mitocondria, proponemos que FC1 sule hemo para proteínas mitocondriales, mientras que la porción localizada en plastidios sule hemo requerido para las hemoproteínas de plastidios y citosol.

Se estudió el papel del hemo producido por FC1 en diferentes fases del desarrollo de una planta. Para esto se utilizaron las plantas antisentidos para FC1 de *N. tabacum* y las knock-out para FC1 de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo.

Las líneas antisentidos de FC1 de tabaco tuvieron un fenotipo de floración temprana en comparación con las líneas salvajes. Esto implica que la ausencia en las hojas del hemo producido por FC1 desencadena el mecanismo que involucra que una señal (FT) viaje al meristemo apical y modifique la expresión de genes relacionados con el proceso de floración (figura 5) tal y como se demostró en la tesis de doctorado asociada a este trabajo.⁽²⁹⁾

Las líneas knock-out para FC1 de *Arabidopsis thaliana*, o sea que no expresa esta proteína, tienen problemas a partir de la fase de maduración de la embriogénesis. El desarrollo de los embriones es arrestado en estadio globular cuando hay ausencia de FC1. El hemo producido por FC2 en este estadio no sule las necesidades para un correcto desarrollo, siendo vital la presencia de FC1 como se demostró en este trabajo y se encuentra publicado en *Plant, Cell & Environment*.⁽³⁴⁾ Durante la fase de maduración de la embriogénesis, el embrión se convierte fotosintéticamente activo supliendo oxígeno para la respiración de la semilla.⁽³⁵⁾ El hemo producido por la FC1 durante la embriogénesis puede ser incorporado a las

hemoproteínas necesarias para la homeostasia del oxígeno, citocromos respiratorios y fotosintéticos requeridos para la transducción de la energía.

Tal y como ha sido propuesto por otros autores ⁽⁷⁾ y por los resultados obtenidos en este trabajo, ambas isoformas de FC contribuyen de manera diferente al pool de hemo en la célula;

FC2 produciendo hemo para sitios de la maquinaria fotosintética en el cloroplasto (ej. Citocromos) y FC1 es la enzima que provee hemo como cofactor a niveles basales para la célula completa y para señalización al núcleo tanto en condiciones de estrés abiótico, en fases del desarrollo, especialmente floración y durante la maduración de la embriogénesis (figura 5).

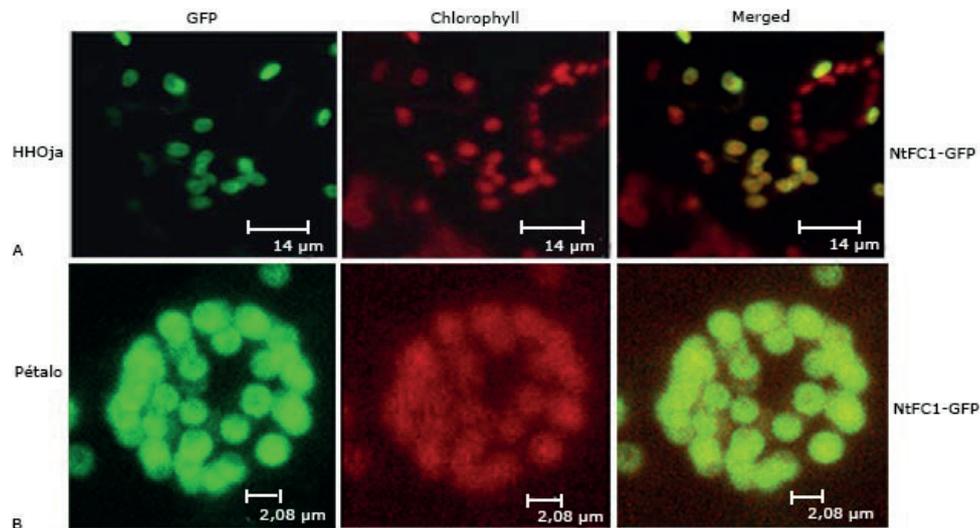


Fig. 4. Localización de la proteína fusionada NtFC1-GFP en *N. tabacum*. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de escáner confocal (CLSM). La fluorescencia GFP es representada en color verde (panel de la izquierda) autofluorescencia de la clorofila en color rojo (panel central). La superposición de las imágenes de fluorescencia verdes y rojas es mostrada en el panel de la derecha. NtFC1-GFP: construcción fusionando FC1 con GFP; A: hoja; B: pétalo

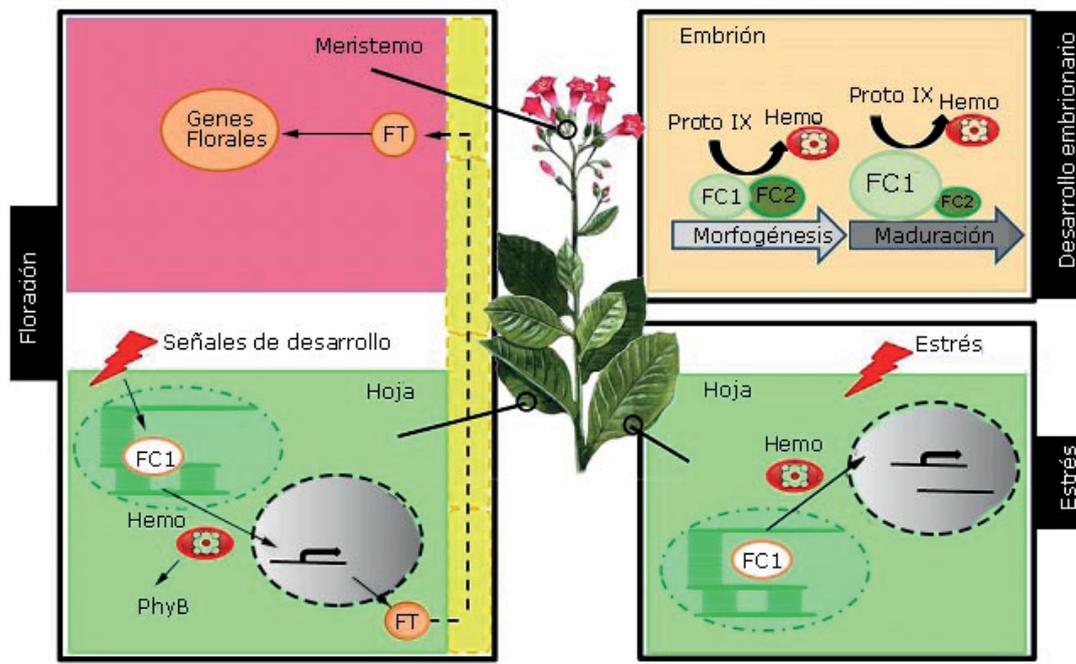


Fig. 5. Modelo de distribución funcional de FC1 y FC2 en plantas. Ambas ferroquelatasas están presente en embriones y hojas. Panel de la izquierda representa los cambios durante la floración. Las señales son percibidas en las hojas donde se sintetiza hemo y este modifica la expresión de un elemento móvil (FT) que viaja a través del floema hacia el meristemo apical donde varía la expresión de genes de proteínas responsables para la floración. Panel de la derecha arriba representa lo que ocurre durante el desarrollo embrionario en la semilla. Durante la fase de maduración, FC1 es la isoforma de ferroquelatasas predominante que suple hemo para completar la maduración del embrión. FC2 principalmente produce hemo en hojas fotosintéticamente activas. Bajo condiciones de estrés (panel derecha abajo), FC1 sintetiza hemo en plastidios, el cual genera una señal retrograda que modula la expresión de genes que codifican para enzimas que modifican el metabolismo de las plantas contribuyendo a la defensa.

En este trabajo demostramos la presencia de la isoforma 1 de la Ferroquelatasa en *Nicotiana tabacum* (NtFC1), detectando el transcrito en hojas, raíces y flores. El hemo producido por FC1 tiene un papel importante en el proceso de floración de las plantas, en la respuesta al estrés abiótico y en el desarrollo de los embriones de las plantas, pues su ausencia provoca letalidad de los mismos. El hemo producido por FC1 tanto en mitocondrias como plastidios es destinado a las proteínas que contienen hemo como cofactor y son esenciales para mantener la homeostasis celular, y además desencadena la vía de señalización al núcleo que modifica la expresión de diversas proteínas celulares. Otro resultado de alta utilidad social relacionado con este trabajo ha sido la organización e impartición de 5 ediciones del curso “*Basic methods in plant molecular biology and plant physiology*”. Estos cursos, impartidos en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de la Habana en conjunto con la Universidad Humboldt de Berlín, han aprovechado los conocimientos teóricos, prácticos y el material vegetal derivado de esta investigación. En estos cursos han participado 56 estudiantes de 15 instituciones cubanas y 2 de universidades brasileñas (Universidad Federal de Río Grande del Norte, y Universidad Federal Rural del Semiárido).

Agradecimientos

El colectivo de autores desea agradecer a la estudiante Abla Alawady por la contribución durante su estancia en la Universidad Humboldt de Berlín.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- González Núñez LM, Tóth T, García D. Integrated management for the sustainable use of salt-affected soil in Cuba. *Universidad y Ciencia*. 2004;20(40):85-102.
- García M, Díaz AL, Valdés MA. El mejoramiento de los suelos: una experiencia desde la agroecología en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “Celso Maragoto Lara”. *Revista Científica*. 2014;16(4):317-28.
- Ortega F, Obregon A, Hernández A, Borreto M, editors. Los suelos salinos y salinizados de Cuba. Resúmenes de las Actas del Primer Seminario Científico de Pedología para la región de Centroamérica y el Caribe: Suelo y Agua; 1985; La Habana.
- Roháček K, Soukupová J, Barták M. Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. In: Schoefs B, editor. *Plant Cell Compartments*. Kerala: Research Signpost; 2008;41-104p.
- Tanaka R, Tanaka A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2007;58:321-46.
- Fan T, Grimm B, Layer G. Porphyrin and heme synthesis. *Advances in Botanical Research*. 91: Elsevier Ltd; 2019;89-131p.
- Woodson JD, Perez-Ruiz JM, Chory J. Heme synthesis by plastid Ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Current Biology*. 2011;21:897-903.
- Papenbrock J, Mishra S, Mock H-P, Kruse E, Schmidt EK, Petersmann A, et al. Impaired expression of the plastidic ferrochelatase by antisense RNA synthesis leads to a necrotic phenotype of transformed tobacco plants. *The Plant Journal*. 2001;28:41-50.
- Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*. 1950;347:1-32.
- Sharma P, Bhardwaj R, Arora N, Arora HK. Effect of 28-homobrasinsinolide on growth, Zn metal uptake and antioxidative enzyme activities in *Brassica juncea* L. seedlings. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2007;19:203-10.
- Kato M, Shimizu S. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany*. 1987;65:729-35.
- Papenbrock J, Mock H-P, Kruse E, Grimm B. Expression studies in tetrapyrrole biosynthesis: inverse maxima of magnesium chelatase and ferrochelatase activity during cyclic photoperiods. *Planta*. 1999;208:264-73.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*. 1991;19(6):1349.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_t method. *Nature Protocols*. 2008;3(6):1101-8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609. Epub 2002/02/16. eng.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz SG, Rogers SG, Fraley RT. A simple and general method for transferring genes into plants. *Biological Science*. 1985:1229-31.
- Sudhir P, Murthy SDS. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*. 2004;42(4):481-6.
- Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 1998;16(6):735-43.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011;28(10):2731-9.
- Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman JL, Gribbskov M, dePamphilis C, et al. The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science*. 2011 May 20;332(6032):960-3. PubMed PMID: 21551031. Pubmed Central PMCID: 3166216. Epub 2011/05/10. eng.
- Soderlund C, Descour A, Kudrna D, Bomhoff M, Boyd L, Currie J, et al. Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs. *PLOS Genetics*. 2009;5(11).e1000740
- Schnable PS, Ware D, Furton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*. 2009 Nov 20;326(5956):1112-5. PubMed PMID: 19965430. Epub 2009/12/08. eng.
- Kang K, Lee K, Park S, Lee S, Kim YS, Back K. Overexpression of rice ferrochelatase I and II leads to increased susceptibility to oxyfluorfen herbicide in transgenic rice. *Journal Plant Biology*. 2010;53:291-6.

24. Suzuki T, Masuda T, Singh DP, Tan F-C, Tsuchiya T, Shimada H, *et al.* Two types of ferrochelatase in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues of cucumber. Their difference in phylogeny, gene expression, and localization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;227:4731-7.
25. Chow KS, Singh DP, Walker AR, Smith AG. Two different genes encode ferrochelatase in *Arabidopsis*: mapping, expression and subcellular targeting of the precursor protein. *The Plant Journal*. 1998;15:531-41.
26. *Nicotiana tabacum* ferrochelatase isoform I mRNA, complete cds; plastid [Internet]. 2016.
27. Ortega-Rodés P, Grimm B, Ortega E. Evolutionary, physiological and biotechnological aspects of ferrochelatase and heme in higher plants. *Biotecnología Aplicada*. 2014.
28. Hey D, Ortega-Rodés P, Fan T, Schnurrer F, Brings L, Hedtke B, *et al.* Transgenic tobacco lines expressing sense or antisense FERROCHELATASE 1 RNA show modified Ferrochelatase activity in roots and provide experimental evidence for dual localization of Ferrochelatase 1. *Plant and Cell Physiology*. 2016;57(12):2576-85.
29. Ortega-Rodés P. Ferrochelatase 1 and heme in *Nicotiana tabacum*: their relationship with stress physiology [PhD thesis]. La Habana: Universidad de la Habana; 2014.
30. Papenbrock J, Grimm B. Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta*. 2001;213:667-81.
31. Porra RJ, Lascelles J. Studies of ferrochelatase. The enzymatic formation of haem in proplastids, chloroplasts and plant mitochondria. *Biochemical Journal*. 1968;108:343-.
32. Smith AG, Santana MA, Wallace-Cook ADM, Roper JM, Labbe-Bois R. Isolation of a cDNA encoding chloroplast ferrochelatase from *Arabidopsis thaliana* by functional complementation of a yeast mutant. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:13405-13.
33. Chow K, Singh DP, Roper JM, Smith AG. A single precursor protein for Ferrochelatase-I from *Arabidopsis* is imported in vitro into both chloroplasts and mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(44):27565-71.
34. Fan T, Roling L, Meiers A, Brings L, Ortega-Rodés P, Hedtke B, *et al.* Complementation studies of the *Arabidopsis fc1* mutant sub-

- stantiate essential functions of ferrochelatase 1 during embryogenesis and salt stress. *Plant, Cell and Environment*. 2018:1-15.
35. Borisjuk L, Rolletschek H. The oxygen status of the developing seed. *New Phytol*. 2009;182:17-30.

Recibido: 24/08/2021

Aprobado: 05/11/2021

Conflicto de intereses

No existen conflictos de intereses entre los autores.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Patricia Ortega Rodés, Bernhard Grimm, Eduardo Ortega Delgado, Boris Hedke

Adquisición de fondos: Bernhard Grimm

Investigación: Patricia Ortega Rodés, Tingting Fan, Mayté Pernús Alvarez, Daniel Hey, Lea Brings, Lena Roling, Florian Schnurrer, Anna Meiers, Ali Alawady

Metodología: Boris Hedke, Bernhard Grimm

Administración del proyecto: Bernhard Grimm

Supervisión: Bernhard Grimm, Eduardo Ortega Delgado, Boris Hedke, Rosa Rodés García, Loiret Fernández García, Patricia Ortega-Rodés

Redacción-borrador original: Patricia Ortega Rodés, Eduardo Ortega Delgado

Redacción-revisión y edición: Patricia Ortega Rodés, Eduardo Ortega Delgado

Financiación

El trabajo fue parcialmente apoyado la Universidad Humboldt de Berlín, la Fundación de Investigación Alemana (DFG) [Research Unit 2092 Biogenesis of thylakoid membranes: (GR 936/18-1)], beca del Chinese Scholarship Council

Cómo citar este artículo

Ortega Rodés P, Grimm B, Hedke B, Ortega Delgado E *et al.* Descubrimiento de ferrochelataasa 1 en *Nicotiana tabacum L.*: papel en la respuesta al estrés abiótico y el desarrollo de las plantas. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* [internet] 2022[citado en día, mes y año];12(1): e1134. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1134>

