

UCH-FC  
Biotecnología  
U 73  
C.1



**Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias**

Director de Memoria de Título:  
Dra. Lee Meisel  
Depto. de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

**ESTUDIO DEL ROL DE BOMBAS DE  $\text{Ca}^{+2}$  Y MIOSINAS  
EN LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA DE**

***Arabidopsis thaliana***



Memoria de Título para optar al  
Título Profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Daniela Cecilia Urbina Alvear**

**Santiago de Chile, 2003**



### ACTA COMISIÓN MEMORIA DE TITULO

De acuerdo a lo indicado en el Título VI artículos 23 y 24, del Reglamento de Estudios de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, la señorita **DANIELA CECILIA URBINA ALVEAR**, ha rendido su Examen Público de Título “ **ESTUDIO DEL ROL DE BOMBAS DE  $Ca^{+2}$ , Y MIOSINAS EN LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA DE *Arabidopsis thaliana***”, bajo la dirección de la Dra. Lee Ann Meisel, académica del Laboratorio de Genética Molecular Vegetal del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

#### Directora Memoria de Título

Dra. Lee Ann Meisel

#### Comisión Examinadora

**Dr. Daniel Wolff Fernández**  
Presidente Comisión

Dra. María Luz Pérez Roepke  
Profesor corrector

Dr. Francisco Pérez Correa  
Profesor corrector

La Comisión ha calificado la presente Memoria de Título con nota

\_\_\_\_\_.

Santiago, \_\_\_\_\_ de 2003

duda, han dado un color y sabor especial a mi vida y a este largo proceso de crecimiento que es la universidad.

Un agradecimiento especial a mi amiga Marcelita que durante toda mi vida y en especial estos últimos siete años significó un pilar importantísimo en este proceso de cambios y crecimiento.

Un fraternal abrazo de agradecimiento a la Pame, con la cual nos hemos acompañado desde el colegio y ahora en la misma facultad, compartí muchas tardes y noches de estudio.

Quiero agradecer a los grandes personajes que tuve el honor de conocer en esta estadía en la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile: Marielita, por tu alegría, inocencia y tu amistad incondicional durante estos siete años. Sita Dani, por su sencillez y equilibrio. Mirni, por tu buena onda y tu templanza. Pablín, por tu paciencia y amistad. Alex, por ser mi amigo desde el primer día de clases hasta hoy. Bertsy Goic, a pesar de nuestras diferencias en algún momento de nuestros años académicos, hoy siento que somos amigas, gracias por permitirme conocerte. Chica, un gran abrazo y gracias por entregar tanta alegría cada día. Nilo, a pesar de que las circunstancias nos han alejado, sé que tengo un amigo en ti. Esparza, una persona especial, a la que quiero muchísimo y a la que agradezco su amistad.

Además no puedo dejar de agradecer a mis amigos y compañeros del Laboratorio de Genética Molecular Vegetal por su buena disposición y consejos durante toda mi estadía en el lab, en especial, a Andrea Morales, en quién encontré una gran amiga y compañera, Conchito, que al igual que Andrea, fue una gran amiga durante el tiempo que estuvo haciendo su tesis junto conmigo en el lab. A Rodrigo y Anita que fueron grandes críticos de mi trabajo y buenos amigos y las Carolinas que dejaron lindos recuerdos de amistad y compañerismo en mí.

Además quiero agradecer a los académicos Herman Silva, Ariel Orellana y Liliana Cardemil, por sus consejos y su buena disposición para aportar con críticas y comentarios hacia mi trabajo de memoria de título.

Finalmente, quiero agradecer a mi tutora, Lee Meisel, por permitirme trabajar en su grupo de laboratorio y enseñarme con dedicación desde que yo aún era una estudiante de pregrado, cuando llegué a ser una pasantía a su laboratorio, cuando este empezaba a formarse.

A cada uno de los miembros de la comisión revisora y evaluadora de mi memoria de título, Dr. Daniel Wolff, Dra Luz María Pérez y Dr. Francisco Pérez, quiero agradecer su disposición y consejos para mejorar esta memoria de título.

# INDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>III</b>
<b>INDICE GENERAL .....</b>	<b>VI</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XV</b>
<b>1 INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
1.1 PARTICIPACIÓN DE CALCIO EN LA REGULACIÓN DE MECANISMOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES EN LA CÉLULA .....	3
1.2 GRAVIPERCEPCIÓN Y RESPUESTA GRAVITRÓPICA.....	6
1.3 HIPÓTESIS .....	10
1.4 OBJETIVO GENERAL.....	10
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
2.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	12
2.1.1 CULTIVO DE ARABIDOPSIS EN CONDICIONES ESTÉRILES .....	12
2.1.2 CULTIVO DE ARABIDOPSIS Y TABACO EN TIERRA.....	13

2.2	MATERIAL MICROBIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	14
2.3	PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$ .....	15
2.4	TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$ .....	16
2.5	EXTRACCIÓN DE DNA PLASMIDIAL DESDE <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$ .....	17
2.6	ELECTROFORESIS DE GELES DE AGAROSA PARA ANÁLISIS DE DNA.....	18
2.7	CLONAMIENTO DE RECA-RFP Y RECA-YFP EN VECTOR BINARIO.....	18
2.8	PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> .....	20
2.9	TRANSFORMACIÓN DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> .....	20
2.10	INFILTRACIÓN DE HOJAS DE TABACO ( <i>NICOTIANA TABACUM</i> XANTHI NN) CON <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> .....	21
2.11	TRANSFORMACIÓN DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> A TRAVÉS DE INMERSIÓN FLORAL....	22
2.12	SELECCIÓN DE SEMILLAS TRANSFORMADAS, DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN Y DEL NÚMERO DE INSERCIONES DE T-DNA.....	23
2.13	TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE CA <sup>+2</sup> ATPASAS Y ATPASAS TIPO P SOBRE PLÁNTULAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	24
2.14	TRATAMIENTO CON UN INHIBIDOR DE MIOSINAS.....	26
2.15	TINCIÓN CON BODIPY FL THAPSIGARGINA.....	27
2.16	VISUALIZACIÓN DE AMILOPLASTOS EN CÉLULAS DE LA COLUMELLA.....	28
2.17	ANÁLISIS DE MICROSCOPIA CONFOCAL, EPIFLUORESCENTE Y NOMARSKI.....	31
2.18	ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y TRATAMIENTO DE DATOS.....	32
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
3.1	ANÁLISIS DEL EFECTO DE INHIBIDORES DE CA <sup>+2</sup> ATPASAS Y ATPASAS TIPO P SOBRE LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	33
3.2	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE THAPSIGARGINA BODIPY EN RAÍCES DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	37
3.3	EFECTO DE BTHPG SOBRE LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA Y SOBRE EL CRECIMIENTO EN RAÍCES DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	40
3.4	EFECTO DE BDM, UN INHIBIDOR DE LA ACTIVIDAD ATPÁSICA DE LAS MIOSINAS, SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA EN PLÁNTULAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	41
3.5	EFECTO DE THPG, UN INHIBIDOR DE BOMBAS DE CA <sup>+2</sup> , SOBRE LA POSICIÓN DE LOS AMILOPLASTOS EN LA CALIPTRA DE LA RAÍZ.....	44
3.5.1	VISUALIZACIÓN DE AMILOPLASTOS MEDIANTE TINCIÓN DE PAS (ÁCIDO PERYÓDICO Y REACTIVO DE SCHIFF).....	44
3.5.2	ANÁLISIS DE LA POSICIÓN DE LOS AMILOPLASTOS A TRAVÉS DE FLUORESCENCIA....	48
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
4.1	THPG AFECTA LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	59
4.2	THPG SE UNE A ESTRUCTURAS SUBCELULARES Y ACTÚA EN LOS TEJIDOS RESPONSABLES DE LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA.....	61
4.3	EL ROL DE MIOSINAS EN LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA.....	63
4.4	POSIBLES MECANISMOS EN LOS QUE PARTICIPARÍAN BOMBAS DE CA <sup>+2</sup> EN LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA.....	64

<b>5 CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>6 PROYECCIONES BIOTECNOLÓGICAS.....</b>	<b>74</b>
<b>7 REFERENCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>APÉNDICE 1.....</b>	<b>81</b>
1 PREPARACIÓN DE PROTOPLASTOS DESDE TEJIDO VEGETAL.....	81
2 TINCIÓN CON BODIPY FL THAPSIGARGINA.....	82
3 TINCIÓN CON DAPI PARA MARCACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	83
4 LOCALIZACIÓN DE LA MARCA FLUORESCENTE DE BODIPY FL THAPSIGARGINA EN DIFERENTES TEJIDOS Y ESPECIES VEGETALES.....	83
5 COLOCALIZACIÓN DE LA BTHPG CON ESTRUCTURAS SUBCELULARES.....	90

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	ESQUEMA DE LOS FACTORES QUE REGULAN LA HOMEOSTASIS DE $Ca^{+2}$ EN PLANTAS Y SU UBICACIÓN SUBCELULAR .....	5
FIGURA 2.	VECTORES UTILIZADOS PARA LA CLONACIÓN DE LA FUSIÓN RECA-RFP Y RECA-YFP EN VECTORES BINARIOS .....	19
FIGURA 3.	TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE $Ca^{+2}$ ATPASAS Y ATPASAS TIPO P.....	26
FIGURA 4	TRATAMIENTO DE PLANTAS PARA LA VISUALIZACIÓN DE AMILOPLASTOS EN CÉLULAS DE LA COLUMELLA DE LA RAÍZ EN PRESENCIA DE THPG.....	31
FIGURA 5.	BIOENSAYO DE LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA. ....	33
FIGURA 6.	EFECTO DE INHIBIDORES DE $Ca^{+2}$ ATPASAS Y ATPASAS TIPO P SOBRE LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA.....	36
FIGURA 7.	RAÍZ PRIMARIA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> DE 7 DÍAS.....	38
FIGURA 8.	LOCALIZACIÓN CELULAR DE BTHPG EN DISTINTAS ZONAS DE LA RAÍZ DE PLÁNTULAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	39
FIGURA 9.	EFECTO INHIBITORIO DE BTHPG SOBRE LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA Y SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	41
FIGURA 10.	EFECTO DE BDM 1 MM SOBRE LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA Y EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ DE PLANTAS DE <i>ARABIDOPSIS</i> .....	43
FIGURA 11.	VISUALIZACIÓN MEDIANTE TINCIÓN DE PAS DE AMILOPLASTOS EN CÉLULAS DE LA COLUMELLA DE <i>ARABIDOPSIS</i> TRATADAS CON THPG.....	46
FIGURA 12	POSICIÓN DE AMILOPLASTOS EN CÉLULAS DE LA COLUMELLA DE PLÁNTULAS TRATADAS CON THPG DESPUÉS DE 30 MIN DE SOMETIDA A UN ESTÍMULO DE GRAVEDAD A 180° .....	47
FIGURA 13.	DIGESTIONES PARA CHEQUEAR LOS VECTORES BINARIOS PDU2 Y PDU3 .....	49
FIGURA 14.	VECTORES PDU2 Y PDU3 .....	49
FIGURA 15.	INFILTRACIÓN EN HOJAS DE TABACO CON <i>AGROBACTERIUM</i> QUE LLEVAN LOS VECTORES BINARIOS PDU2 Y PDU3.....	51
FIGURA 16.	FLUORESCENCIA DE RFP ACUMULADA EN PLASTIDIOS UBICADOS EN LAS CÉLULAS DE LA CALIPTRA DE PLANTAS DE LA LÍNEA TRANSGÉNICA DU2M2 ...	53
FIGURA 17.	EFECTO DE THPG SOBRE LA POSICIÓN DE LOS AMILOPLASTOS EN CÉLULAS DE LA COLUMELLA DE RAÍCES DE PLANTAS DE LA LÍNEA TRANSGÉNICA DU2M2.....	58
FIGURA 18.	CÉLULAS DE LA COLUMELLA DE RAÍZ PRIMARIA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ...	65
FIGURA 19.	PARTICIPACIÓN DE BOMBAS DE $Ca^{+2}$ EN LA GENERACIÓN DE LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA EN CÉLULAS DE LA COLUMELLA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ..	70
FIGURA 20.	LOCALIZACIÓN DE LA MARCA FLUORESCENTE DE BTHPG Y DAPI EN PROTOPLASTOS.....	86
FIGURA 21.	EPIDERMIS DE DISTINTOS SISTEMAS VEGETALES, TEÑIDOS SIMULTÁNEAMENTE CON BTHPG Y DAPI.....	89

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	COMPUESTOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA GRAVITRÓPICA EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	25
TABLA 2.	FLUORÓFOROS Y SUS CARACTERÍSTICAS .....	28
TABLA 3.	FILTROS DE FLUORESCENCIA Y SUS CARACTERÍSTICAS .....	32
TABLA 4.	CRECIMIENTO DE LA RAÍZ POST TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE ATPASAS TIPO P .....	35
TABLA 5.	EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	54
TABLA 6.	ANÁLISIS DE LA SEGREGACIÓN DEL TRANSGEN EN LA GENERACIÓN T <sub>2</sub> .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	ácido ciclopiazónico
Amp <sup>R</sup>	resistencia a ampicilina
BDM	2,3-Butanodiona monoxina
BThpg	BODIPY FL Thapsigargina
D.O	densidad óptica
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhidrato
DMSO	dimetilsulfóxido
DU2M2	nombre de la planta transgénica T <sub>2</sub> que es usada en este estudio para el análisis de microscopía confocal de la posición de los amiloplastos de la caliptra de la raíz
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
ER-GFP	retículo endoplasmático marcado con proteína fluorescente verde
EtBr	bromuro de etidio
GFP	proteína fluorescente verde
IP	yoduro de propidio
KAc	acetato de potasio
kan <sup>R</sup>	resistencia a kanamicina
LB	Luria Broth
MES	2-(N-morfolino) ácido etanosulfónico
MS	mezcla de sales Murashige y Skoog
n	número de eventos
OVA	Ortovanadato
p	probabilidad
PAS	ácido peryódico y reactivo de Schiff
PIPES	piperazina-N,N'bis (2-ácido etanosulfónico)
PMCA	calcio ATPasas de membrana plasmática
RecA	recombinasa A
RFP	proteína fluorescente roja
SDS	sodio dodecil sulfato
SERCA	calcio ATPasa de retículo sarco y endoplasmático
TB	amortiguador para preparación de células competentes por el método Inoue
T <sub>1</sub>	primera generación de plantas transgénicas obtenidas mediante la técnica de inmersión floral
T <sub>2</sub>	segunda generación de plantas transgénicas obtenidas mediante la técnica de inmersión floral
TBE	amortiguador tris, borato y EDTA

T-DNA	DNA que se inserta en plantas mediante infección con <i>Agrobacterium</i>
TENS	amortiguador de extracción de DNA plasmidial. Tris, EDTA, hidróxido de sodio y sodio dodecil sulfóxido
Thpg	Thapsigargina
UV	ultra violeta
W5	solución de lavado para preparación de protoplastos
WT	tipo silvestre
YFP	proteína fluorescente amarilla

## RESUMEN

Gravitropismo es el proceso por el cual las plantas guían su crecimiento en función de la gravedad. En las raíces las células centrales de la caliptra (células de la Columella) son las responsables de sentir la gravedad debido a la sedimentación de amiloplastos densos que se encuentran en estos tipos celulares. En este trabajo, se estudiaron los posibles factores que estarían participando en éste proceso, tales como el ión  $\text{Ca}^{+2}$  y miosinas.

Farmacológicamente mostramos que thapsigargina (Thpg), un inhibidor específico de las bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo SERCA, altera la respuesta gravitrópica inhibiendo la curvatura de la raíz sin alterar el crecimiento de éstas. Por el contrario, el ácido ciclopiazónico (ACP), otro inhibidor específico de bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo SERCA, no afecta la curvatura de la raíz. Además, mostramos resultados preliminares que sugieren que Thpg altera la sedimentación de los amiloplastos de las células de la Columella. Para corroborar éstos resultados, construimos plantas transgénicas que acumulan la proteína fluorescente roja y amarilla en los plastidios.

Además, estudiamos la participación de las miosinas en el gravitropismo, para lo cual utilizamos un inhibidor de la actividad ATPásica de las miosinas,

BDM, el que produjo una alteración tanto de la curvatura de la raíz como del crecimiento, sugiriendo que este compuesto ejerce un efecto inespecífico sobre la planta.

Además, utilizando por primera vez en plantas Thpg unido al fluoróforo BODIPY (BThpg), vimos que este compuesto se une a los tejidos responsables de la respuesta gravitrópica como la caliptra de la raíz y la zona de elongación distal, ésta última, responsable de generar la curvatura de la raíz en el sentido del campo gravitatorio.

## ABSTRACT

Gravitropism is a process in which plant growth is guided by gravity. The central cells within the root cap are responsible to sense gravity because these cells have dense amyloplasts. This work presents an analysis of possible factors that participate in gravitropism, such as  $\text{Ca}^{2+}$  and myosins.

Pharmacologically, we show that thapsigargin (Thpg), a specific SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  pump inhibitor, alters the gravitropic response by inhibiting root curvature without altering root growth. However, cyclopiazonic acid (ACP), another  $\text{Ca}^{2+}$  pump inhibitor, does not affect gravitropic root curvature. Additionally, we present preliminary results that show that Thpg alters amyloplast sedimentation within the root cap. Transgenic plants which have red and yellow fluorescent proteins within the plastids were constructed such that the effects of Thpg on amyloplast sedimentation can be corroborated in the future.

In addition, we studied the participation of myosin in gravitropism. For this objective, we used BDM, a myosin ATPase activity inhibitor. BDM altered root gravitropic curvature and growth. This suggests that BDM has a non specific effect on the plant.

Finally, we used for the first time in plants, Thpg conjugated to the fluorophore BODIPY (BThpg). BThpg marks the tissues that are responsible for gravitropic response, such as the root cap and the distal elongation zone.

## 1 INTRODUCCION

Las plantas a diferencia de los organismos animales, que tienen la capacidad de escapar de las condiciones hostiles, no pueden moverse para evitar situaciones medioambientales adversas. Por lo tanto, en estos organismos, las adaptaciones y respuestas fisiológicas que han desarrollado para hacer frente a condiciones hostiles cobran gran importancia y son esenciales para su sobrevivencia. Frente a condiciones adversas del medio circundante como temperatura extremas, sequedad, ataque de patógenos o viento, entre otras, las células vegetales han desarrollado diversos mecanismos moleculares que les permiten tanto sentir estas agresiones como amplificar las señales y provocar o inducir una respuesta para evadir o aminorar las consecuencias negativas, que dichas condiciones ambientales podrían generarles.

Es conocido que las plantas han desarrollado mecanismos como los tropismos o "movimientos", que les permiten aprovechar ciertos estímulos medioambientales en función de su bienestar. El fototropismo, que es el movimiento de las plantas en respuesta a la luz, les permite redirigir su crecimiento frente a carencia o exceso de este estímulo. La gravedad, es otro factor que modela y dirige el crecimiento y desarrollo de las plantas. Dicho tropismo es conocido como gravipercepción o gravitropismo y permite a los organismos vegetales

aprovechar la fuerza gravitacional para guiar el crecimiento de sus raíces y órganos aéreos. El gravitropismo positivo que poseen las raíces, les permiten introducirse en el suelo y acceder a las fuentes de agua y minerales disponibles en él. En el caso de los órganos aéreos, en especial el tallo, el gravitropismo negativo que poseen les permiten mantenerse erguidos y en una buena ubicación para el intercambio gaseoso y para realizar la fotosíntesis.

Las plantas poseen diferentes mecanismos moleculares que les permiten transducir las señales ambientales y provocar síntesis de las proteínas necesarias para llevar a cabo estos tropismos. En ambos tipos de mecanismos mencionados anteriormente, se han observado que se generan pulsos de  $\text{Ca}^{+2}$  al sensar tanto la luz como la gravedad (Tlalka y Fricker 1999, Plieth y Trewavas 2002). Por otro lado, es conocido que  $\text{Ca}^{+2}$  participa activamente en otras respuesta de la planta a estímulos del medioambiente como tacto, temperatura y nodulación de raíces, entre otras (Haley y cols. 1995, Sanders y cols. 1999, Sato y cols. 2001).

A continuación se explicará en mayor detalle la participación de  $\text{Ca}^{+2}$  en la respuesta gravitrópica, y se ahondará más en los detalles moleculares de este tropismo donde veremos que aún existen grandes incógnitas y controversia respecto de cómo se genera y cuáles son los órganos que participan en esta generación a nivel de percepción y transducción.

## **1.1 Participación de calcio en la regulación de mecanismos fisiológicos y moleculares en la célula**

El calcio en las células vegetales, al igual que en las células animales, juega un rol fundamental como mensajero secundario en las cascadas de señales de transducción de muchos procesos celulares. Es conocido que los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico participan activamente frente a algunas respuestas medioambientales como la luz, la humedad, nodulación y gravedad (Sack 1991, Haley y cols. 1995, Belyvsckaya 1996, Sanders y cols. 1999, Tlalka y Fricker 1999, Sato y cols. 2001, Plieth y Trewavas 2002). Además, en algas el  $\text{Ca}^{+2}$  modula la corriente citoplasmática (Williamson y Ashley 1982, Takagi y Nagai 1986) y en algas y plantas superiores regula la actividad de ciertas proteínas motoras como miosinas (Yokota y cols. 1999a, Yokota y cols. 1999b).

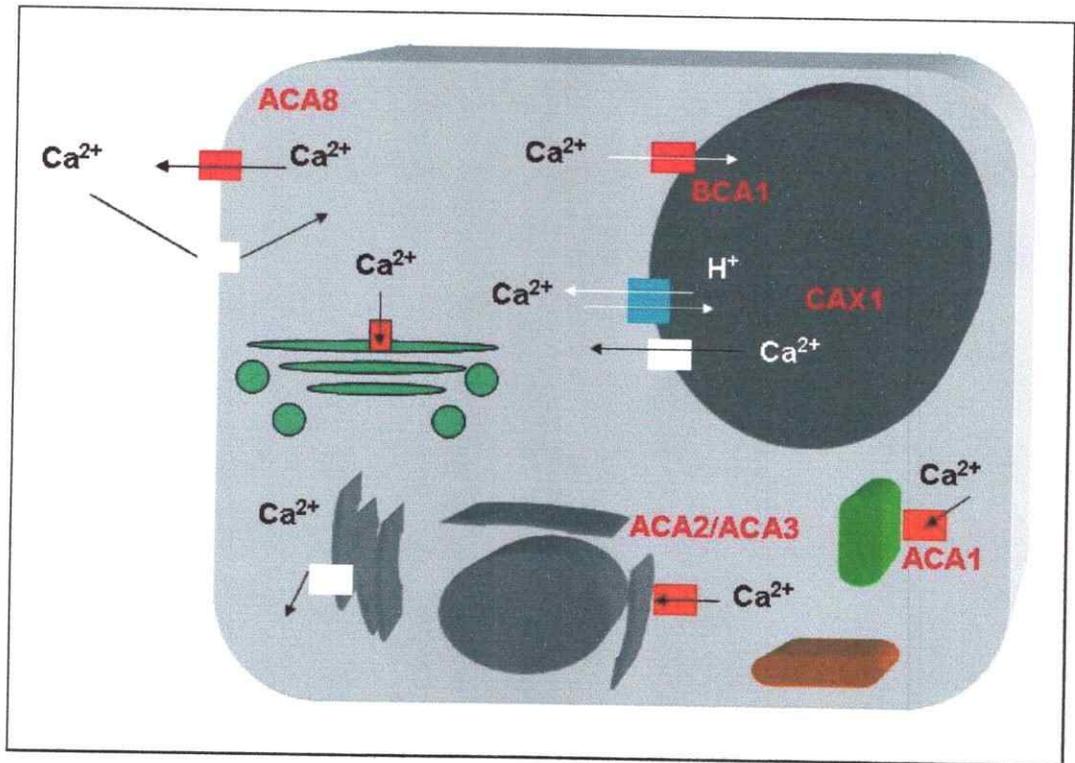
Se sabe que en células animales existen canales de  $\text{Ca}^{+2}$  ubicados tanto en la membrana plasmática como en organelos (retículo endoplasmático, Golgi, etc.), que median la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al citosol, así como bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  encargadas de reestablecer los niveles basales de  $\text{Ca}^{+2}$  (aprox.  $10^{-7}$  M), concentración crítica y necesaria para el normal funcionamiento celular (Sanders y cols. 1999).

En animales, las bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  son ATPasas tipo P, ya que poseen un estado fosforilado que media su actividad y poseen una topología de membrana conservada (10 segmentos transmembrana). Estas ATPasas se han clasificado en dos grupos,  $\text{Ca}^{+2}$  ATPasas tipo PMCA y tipo SERCA. Las primeras, se

ubican en membrana plasmática y su actividad es modulada por calmodulina. Las segundas, se ubican en el retículo sarco y endoplasmático y son sensibles específicamente a los inhibidores ácido ciclopiazónico (ACP) y a thapsigargina (Thpg) (Evans y Williams 1998).

En plantas se han caracterizado bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  ubicadas tanto en membrana plasmática y en organelos como retículo endoplasmático, núcleo, vacuola, plastidios y Golgi (Figura 1), sin embargo, su clasificación y su participación a nivel de respuestas celulares no es del todo clara (Evans y cols. 1994, Evans y Williams 1998, Geisler y cols. 2000, Sze y cols. 2000).

Para clasificar las bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  de plantas, en un principio se quiso tomar los mismo criterios de evaluación que en animales, pero se descubrió que las bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  de plantas de una misma ubicación celular, por ejemplo, retículo endoplasmático, no eran sensibles a Thpg y, además algunas de ellas tienen regulación por calmodulina, la cual es una característica de las de tipo PMCA de animales (Evans y Williams 1998). Sin embargo, recientemente Ordenes y cols (2002) han publicado la caracterización de una  $\text{Ca}^{+2}$  ATPasa de arveja (*Pisum sativum*) ubicada en el aparato de Golgi, que es inhibible tanto por ACP como por Thpg. Por otro lado, trabajos no publicados de Anthony Trewavas han mostrado que existe actividad de bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  localizada en retículo endoplasmático y en núcleo que son sensibles a Thpg.



**Figura 1. Esquema de los factores que regulan la homeostasis de  $\text{Ca}^{+2}$  en plantas y su ubicación subcelular.** En cajas blancas, canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , responsables de la entrada de ión  $\text{Ca}^{+2}$  al citoplasma. En cajas rojas, bombas de  $\text{Ca}^{+2}$ . En cajas verdes, antitransportador  $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ . Estos dos últimos participan en limpiar el ión  $\text{Ca}^{+2}$  del citoplasma.

Estudios farmacológicos, han implicado a bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  en procesos fisiológicos tales como movimiento de cloroplastos frente a estímulos luminosos en *Lemna trisulca* (planta acuática) donde se ha observado que el movimiento de cloroplastos frente a estímulos de luz azul es inhibido por Thpg (Tlaka y Fricker 1999) y en *Lepidum sativum* (berro) donde se vió inhibición de la respuesta gravitrópica usando ACP (Sievers y Busch 1992). En plantas es poco clara la participación de bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  en respuestas fisiológicas como las antes mencionadas, pero se cree que estas modularían la amplitud de las señales de  $\text{Ca}^{+2}$  generadas como respuesta a un determinado estímulo, por

apertura de ciertos canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , produciendo que los pulsos de  $\text{Ca}^{+2}$  sean localizados y específicos para cada respuesta (Sze y cols. 2000).

## **1.2 Gravipercepción y respuesta gravitrópica.**

Un proceso fisiológico esencial para la planta es la respuesta gravitrópica, la que es generada por la capacidad de la planta de sentir la gravedad y redirigir su crecimiento según esta fuerza. Este proceso le permite a la planta posicionar sus órganos aéreos (hojas, tallos e inflorescencias) para realizar una eficiente fotosíntesis e intercambio de gases, y en el caso de las raíces, permite una buena obtención de agua y nutrientes.

Mucho se ha debatido y estudiado acerca de los órganos responsables de sentir la gravedad en las raíces; dónde se encuentran y cuáles son los tipos celulares capaces de percibir la gravedad (estatocitos), y finalmente cuáles son los receptores y amplificadores de la señal producida por los sensores (Sack 1991). Clásicamente, se ha atribuido a las células centrales de la caliptra de la raíz (Columella), el rol de estatocitos, debido a su particular polaridad, que ubica al núcleo en la zona apical y a los amiloplastos en la zona basal. Otros organelos como retículo endoplasmático, se encuentran polarizadamente ubicados en la periferia, muy cerca de la pared celular. Por otra parte, a los amiloplastos presentes en este tipo celular se les ha atribuido la función de sensores de la gravedad, debido principalmente, a que estos son capaces de sedimentar por su peso frente a un estímulo gravitatorio. Son especialmente densos y constituyen

la única estructura en este tipo celular con la capacidad de moverse y reubicarse frente a un estímulo gravitacional. Sin embargo, estudios más recientes, utilizando mutantes en almacenamiento de almidón y en desarrollo de amiloplastos, han mostrado que plantas con amiloplastos con menor contenido de almidón, son capaces de responder a la gravedad, aunque en forma más lenta (Moore 1989, Kiss y cols. 1996, MacCleery y Kiss 1999). Estas evidencias han permitido postular que los plastidios son los encargados de sensar la gravedad, independiente de su densidad (Sack 1997).

Respecto de los receptores de la señal física generada por el sensor de gravedad, se cree que sería el retículo endoplasmático ubicado por debajo de los amiloplastos, que al ser aplastado por estos en la sedimentación generada por un estímulo gravitatorio, produciría señales como apertura de canales de  $Ca^{+2}$ , generando una cascada de señales de transducción que provocaría la respuesta gravitrópica (Zheng y Staehelin 2001).

Por otro lado, se ha descrito, que desde la caliptra se generan flujos diferenciales de  $Ca^{+2}$  y auxinas hacia la zona de elongación distal y elongación central, los que serían responsables indistintamente de la curvatura de la raíz, provocada por un crecimiento y elongación celular diferenciado (Sack 1991, Bennett y cols. 1996, Chen y cols. 1999)

Poco se conoce acerca de las señales de transducción que se generan a partir de la sedimentación de estatolitos y de los flujos diferenciales de  $\text{Ca}^{+2}$  y auxinas, pero se cree que en la zona de la sedimentación se generaría una cascada de señales de transducción donde participarían activamente el citoesqueleto y los cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico (Sievers y Busch 1992, Belyavskaya 1996, Chen y cols. 1999, Volkmann y cols. 1999, Plieth y Trewavas. 2002).

En algas como *Chara australis*, *Nitella flexilis* y *Vallisneria gigantea*, se ha demostrado que el citoesqueleto de actina y su proteína motora asociada, miosina, son las responsables de producir la corriente citoplasmática además del movimiento de vesículas y organelos como Golgi, retículo endoplasmático y cloroplastos (Liebe y Menzel 1995, Yamamoto y cols. 1999). Dicha corriente citoplasmática es controlada por niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular y esto puede deberse a que las actividades de algunas miosinas están reguladas por  $\text{Ca}^{+2}$  (Williamson y Ashley 1982, Takagi y Nagai 1986, Yokota y cols. 1999a, Yokota y cols. 1999b). A partir de esta evidencia se ha pensado que el complejo actina-miosina, podría ser también el responsable del movimiento vesicular y de organelos dentro de las células vegetales en plantas superiores donde se ha demostrado que vesículas de Golgi, peroxisomas y retículo endoplasmático se mueven a través de citoesqueleto de actina utilizando a las miosinas como motor molecular (Liebe y Quader 1994, Nebenführ y cols. 1999, Mathur y cols. 2002). Por otro lado, se ha mostrado experimentalmente que existe interacción física entre cloroplastos y el citoesqueleto de actina tanto *in vivo* como *in vitro*

(Kandasamy y Megher 1999, Bruno y cols. 2002), apoyando la hipótesis de que el movimiento de los cloroplastos en células vegetales es debido a esta interacción. Por esta razón, se ha extrapolado, que la actina participaría también en el movimiento de amiloplastos y su sedimentación en el proceso de gravipercepción. Evidencias experimentales de colocación de amiloplastos y actina en *Lentil culinaris* y experimentos con compuestos que desestabilizan el citoesqueleto de actina muestran que la integridad de éste es necesaria para regular la sedimentación de los amiloplastos en la caliptra de la raíz (Volkman y cols. 1999, Driss- Ecole y cols 2000, Collings y cols. 2001, Yoder y cols. 2001).

Estudios en *Lepidum sativum* (berro) demuestran que la respuesta gravitrópica puede ser inhibida a altas concentraciones de ACP, evidencia que permite conjeturar que en este proceso complejo hay bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  que juegan un rol importante. Sin embargo, no se sabe a que nivel están participando: si regulan la sedimentación de amiloplastos en la caliptra de la raíz o actúan a nivel de la zona de elongación distal. Por otro lado, se ha demostrado que en ausencia de gravedad, en las células de la Columella, se produce un aumento del  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico lo que genera una pérdida de la polaridad celular y una disminución en el contenido de almidón y del tamaño de amiloplastos en estas células (Moore y cols. 1986, Guisinger y Kiss 1999)

A partir de las evidencias mostradas aquí, se visualiza la importancia del estudio del papel de las bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  y de las miosinas en la gravipercepción. Esta

investigación nos permitirá sacar conclusiones acerca de: i) el papel de  $\text{Ca}^{+2}$  y miosinas en la generación y establecimiento de la respuesta gravitrópica y ii) en la sedimentación de los amiloplastos, determinando si este fenómeno físico genera un proceso dinámico. Para investigar estos procesos se utilizará *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

### **1.3 Hipótesis**

Postulamos que bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  y miosinas están involucradas en la respuesta a estímulos de gravedad a nivel de la sedimentación de los amiloplastos en la caliptra de la raíz, en *Arabidopsis thaliana*.

### **1.4 Objetivo General**

Determinar mediante estudios farmacológicos la participación de bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  y miosinas en la respuesta gravitrópica a nivel de la sedimentación de los amiloplastos en la caliptra de la raíz.

### **1.5 Objetivos Específicos**

- I. Analizar el efecto de inhibidores de bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  e inhibidores de miosinas sobre la respuesta gravitrópica.
- II. Analizar el efecto de thapsigargina, un inhibidor específico de  $\text{Ca}^{+2}$  ATPasas tipo SERCA, sobre la posición de los amiloplastos en la caliptra

de la raíz y desarrollar un método de visualización de plastidios en la caliptra de raíz.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para todos los experimentos realizados en este trabajo se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (WT) ecotipo Columbia y las líneas transgénicas ER-GFP generación T<sub>2</sub> (Background Columbia donadas por laboratorio del Dr. Ariel Orellana) que poseen marcación de retículo endoplasmático con proteína fluorescente verde (Haseloff y cols. 1997) y DU2M2 generación T<sub>2</sub> (background Columbia construidas en este trabajo) que poseen los plastidios marcados con la proteína fluorescente roja. Además se usaron plantas de *Nicotiana tabacum* (Xanthi NN) y cebollas (*Allium cepa*), éstas últimas obtenidas comercialmente.

#### 2.1.1 Cultivo de Arabidopsis en condiciones estériles

Las semillas fueron esterilizadas utilizando dos métodos dependiendo de la procedencia de éstas. Las semillas WT y las generaciones T<sub>2</sub> de las plantas transgénicas fueron esterilizadas en tubos de 1,5 ml con 1 ml de etanol 70 %, las que fueron agitadas manualmente por unos segundos, luego el etanol se descartó y se agregó 1 ml de cloro comercial, se agitó por unos pocos segundos luego de los cuales se descartó y finalmente las semillas fueron lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Por último, las semillas fueron suspendidas en agua estéril y plaqueadas en placas con medio ½X MS pH 5,7 (½X Murashige &

Skoog mezcla de sales, amortiguador MES 0.05 %), agar 0,9 %, suplementadas con sacarosa 1 %. Las plantas transgénicas fueron plaqueadas en medio ½X MS agar suplementadas con sacarosa 1 % y kanamicina 50 µg/ml.

Las semillas de la generación T<sub>1</sub>, fueron esterilizadas con etanol 70 % durante 1 min, luego el etanol fue descartado y se agregó 1 ml de solución de esterilización (SDS 1 %, cloro comercial 5 % en agua estéril). Las semillas fueron mantenidas en esta solución, con agitación manual constante por 20 min luego de los cuales las semillas fueron lavadas 5 veces con agua estéril. Finalmente las semillas fueron resuspendidas en agua estéril y sembradas en placas con medio ½X MS agar suplementadas con sacarosa 1 %, y kanamicina 50 µg/ml.

Las semillas plaqueadas por ambos métodos fueron incubadas por dos días en oscuridad a 4 °C y posteriormente fueron cultivadas en una cámara de cultivo de tejido estéril con condiciones de luz, temperatura y fotoperiodo controlados (23 °C, 16 h luz/8 h oscuridad)



### 2.1.2 Cultivo de Arabidopsis y tabaco en tierra

Semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia y tabaco (*Nicotiana tabacum* Xanthi NN) fueron sembradas en tierra estéril (esterilizada en autoclave por 1,5 h) en una proporción de 3:2 tierra de hoja de litre a vermiculita respectivamente y puestas en oscuridad a 4 °C por dos días cubiertas con plástico, luego de lo cual fueron puestas en cámara de crecimiento con condiciones controladas de luz,

temperatura y fotoperiodo (23 °C, 16 h luz/8 h oscuridad). Las plantas fueron regadas dos a tres veces por semana y se les suministró fertilizante (composición Potasio 19 %, Fósforo 19 %, Nitrógeno 18 %) cuando fue necesario.

## **2.2 Material microbiológico y condiciones de cultivo**

En este estudio se utilizaron las bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  y *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101

Cultivos líquidos de *E. Coli*, fueron crecidos a 37 °C con agitación constante, en medio LB (pectona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 1 % en agua destilada) por la noche. Los stocks de glicerol, minipreps, midipreps y maxipreps fueron preparados a partir de estos cultivos de noche. Los cultivos líquidos para llevar a cabo el protocolo de células competentes son detallados en 2.3. Cultivos sólidos de *E.coli* fueron crecidos en una estufa o cámara de cultivo a 37 °C durante la noche en medio LB agar (peptona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 1 %, agar seleccionado 1,5 %). Los antibióticos usados como medio de selección para bacterias transformadas con los vectores de interés fueron kanamicina 100  $\mu$ g/ml y ampicilina 200  $\mu$ g/ml. Ambos antibióticos fueron usados en medios líquidos y sólidos.

Cultivos líquidos de *Agrobacterium* fueron crecidos entre 25 y 28 °C (sobre 30 °C

*Agrobacterium* pierde el plasmidio Ti, que es el que le permite transferir su DNA a la planta, Gelvin 2000), con agitación vigorosa y constante por aproximadamente 2 días en medio LB suplementado con los antibióticos gentamicina 100 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml y rifampicina 10 µg/ml. Stocks de glicerol y preinóculos tanto para la preparación de células competentes como para la transformación de *Arabidopsis* por la metodología de inmersión floral y para la agroinfiltración de hojas de tabaco, fueron obtenidos a partir de estos medios líquidos. Los cultivos para la preparación de células competentes y transformación de *Arabidopsis* por inmersión floral, están detallados en 2.8 y 2.11 respectivamente. Cultivos sólidos de *Agrobacterium* fueron crecidos entre 25 y 28 °C en medio LB agar suplementado con los antibióticos mencionados anteriormente, por aproximadamente 2 días en estufa o cámara de cultivo.

### **2.3 Preparación de células competentes de *E. coli* DH5α**

Las células competentes de *E. coli* fueron preparadas según el protocolo descrito por Inoue y cols. (1990). Se creció un cultivo líquido de 3 ml de *E. coli* DH5α en medio LB durante la noche a 37 °C con agitación constante. Un volumen de 250 ml de medio LB fue inoculado con el cultivo anterior. Este cultivo se incubó con alta aireación a 25 °C hasta obtener una  $D.O._{600nm} = 0,6$ . Alcanzada esta densidad óptica, el cultivo se enfrió por 10 min en hielo y se traspasó a un tubo de centrifuga estéril preenfriado a -20 °C en el cual las células fueron colectadas por centrifugación a 2500xg por 10 min a 4 °C. El

sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 80 ml de amortiguador TB frío (pipes 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM), pH 6,7 ajustado con KOH 5 M. Esta suspensión fue incubada por 10 min en hielo y posteriormente las células fueron colectadas por centrifugación a 2500xg por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 20 ml de amortiguador TB preenfriado. A esta suspensión se le agregó DMSO a una concentración final de 7 % y finalmente se alicuotó la suspensión en volúmenes de 200 µl en tubos de 1,5 ml estériles preenfriados a -20 °C. Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta ser usadas.

#### **2.4 Transformación de *E. coli* DH5α**

50 µl de células competentes DH5α fueron mezcladas con 2 µl de la reacción de ligación (sección 2.7). Esta mezcla, entonces, fue incubada durante 30 min en hielo y posteriormente incubadas a 37 °C por 5 min, luego de los cuales se le agregó 1 ml de medio LB. Esta solución fue incubada por 60 min a 37 °C y finalmente las células fueron colectadas por centrifugación en una microcentrífuga a máxima velocidad (10000xg) por 30 s y resuspendidas en el sobrenadante residual (aproximadamente 20 a 50 µl) y puestas en placas LB agar con el correspondiente antibiótico para su selección (kanamicina 100 µg/ml o ampicilina 200 µg/ml).

## 2.5 Extracción de DNA plasmidial desde *E. coli* DH5 $\alpha$

La extracción de DNA plasmidial (Miniprep de 10 minutos), se llevó a cabo basado en el protocolo descrito por Zhou y cols. (1990).

Desde un cultivo de noche de *E. coli* que lleva el vector de interés, 1,5 ml de células fueron sedimentadas por centrifugación por 10 s en microcentrífuga a máxima velocidad (10000xg). El sobrenadante fue descartado dejando un volumen mínimo para resuspenderlas (50  $\mu$ l). Las células se resuspendieron totalmente e inmediatamente después se agregó 300  $\mu$ l de amortiguador TENS (TRIS pH 7,5 10 mM, EDTA pH 8,0 1 mM, NaOH 0,1 M y SDS 0,5 %) y se mezcló en vortex por 2 s. Luego se agregó 150  $\mu$ l de acetato de potasio (KAc) pH 4,7 3 M y se mezcló en vortex por 2 s. La suspensión fue centrifugada por 2 min a máxima velocidad (10000xg) en una microcentrífuga para sedimentar el DNA cromosómico y los residuos celulares. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se le agregó 900  $\mu$ l de etanol 100 % a temperatura ambiente, inmediatamente el DNA fue sedimentado en microcentrífuga a máxima velocidad (10000xg) por 2 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet se lavó dos veces con 1 ml etanol 80 % preenfriado a -20° C. Finalmente el DNA se dejó secar al aire y se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua libre de nucleasas con RNAsas 10  $\mu$ g/ml

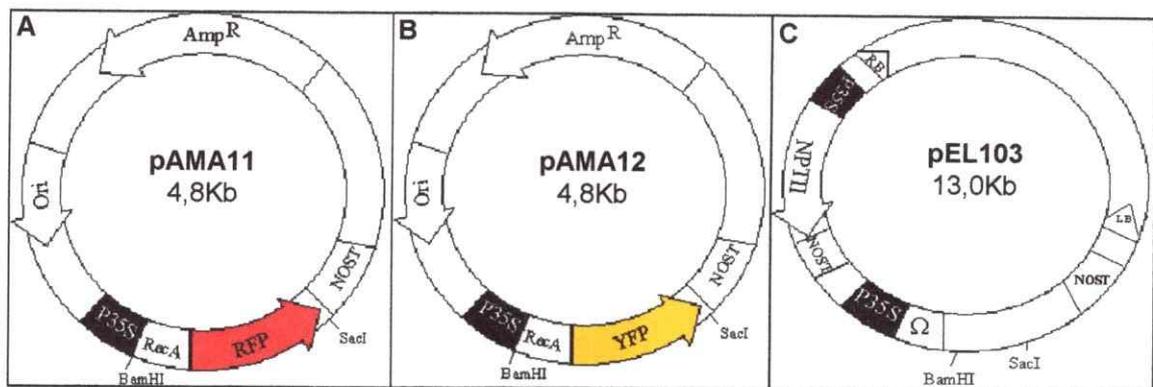
## **2.6 Electroforesis de geles de Agarosa para análisis de DNA**

Los geles de agarosa se prepararon al 0,8 % en amortiguador TBE 0,5X (Tris 45 mM, EDTA 1 mM, ácido bórico 0,2 %) con bromuro de etidio (EtBr) 0,5 µg/ml. Como marcador de peso molecular se utilizaron  $\lambda$  HindIII y escalera de 1Kb a una concentración de 100 ng/µl. Los geles fueron corridos en amortiguador TBE 0,5X a 100 V de potencia.

## **2.7 Clonamiento de RecA-RFP y RecA-YFP en vector binario**

A partir de los vectores pAMA11 y pAMA12 (disponibles en el laboratorio, Figura 2A y 2B) se obtuvieron las fusiones de la proteína fluorescente roja y amarilla con el péptido señal de la proteína Recombinasa A (RecA RFP y RecA YFP) que ha sido reportada por dirigirse y acumularse específicamente en los plastidios en células vegetales (Akashi y cols. 1998).

Para obtener grandes cantidades de estos vectores se hicieron extracciones de DNA plasmidial con MidiPrep (Promega) desde cultivos de noche inoculados a partir de stocks de glicerol de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con los vectores previamente. Estos vectores fueron posteriormente digeridos con SacI durante 4 h a 37 °C y luego con BamHI por 1 h a 37 °C. El fragmento de interés liberado por la digestión fue purificado con kit Concert (GIBCO BRL) para purificación de DNA desde geles de agarosa.



**Figura 2. Vectores utilizados para la clonación de la fusión RecA-RFP y RecA-YFP en vectores binarios.** A. pAMA 11, vector desde donde se obtuvo la fusión RecA-RFP y B. pAMA 12, vector desde donde se obtuvo la fusión RecA-YFP y, C. pEL103, vector binario donde fueron clonadas ambas fusiones. Los vectores pAMA11 y pAMA12 poseen un gen de resistencia a ampicilina y pEL103 posee el gen NPTII que confiere resistencia a kanamicina. Todos los vectores poseen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y pEL103, además posee una secuencia  $\Omega$  enhancer de la transcripción.

Paralelamente el vector binario pEL103 donado por el Dr. Eric Lam (Figura 2C), fue obtenido desde stock de glicerol de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante MaxiPrep (Promega) y fue digerido de la misma forma que los vectores pAMA11 y pAMA12.

La ligación se llevó a cabo agregando 3 veces más inserto que vector con amortiguador de ligación, ligasa T4 y 0,5  $\mu$ l de ATP 100 mM en un volumen total de 5  $\mu$ l. La ligación se realizó a 16 °C por toda la noche en un baño de agua. 2  $\mu$ l de la reacción de ligación fueron mezclados con las células competentes de *E. coli* de DH5 $\alpha$  preparadas con el método descrito por Inoue y cols. (1990), que se describe en 2.3, para llevar a cabo la transformación de éstas (sección 2.4). La transformación fue puesta en placas LB agar con kanamicina como medio de selección.

Las colonias crecidas en medio selectivo, se usaron para la determinación de clones positivos, a través de miniprep de 10 de minutos como se describe en 2.5. Los plasmidios purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI* como se describió previamente. Las digestiones fueron corridas en geles de agarosa 0.8 % (sección 2.6).

### **2.8 Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens***

Las bacterias (*Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101) fueron crecidas a 28 °C en medio líquido de LB hasta alcanzar la fase log (tiempo de duplicación de aproximadamente 2 h). 2 ml de este cultivo fueron transferidos a 50 ml de medio LB fresco y este cultivo se creció hasta obtener una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5. Posteriormente las células fueron enfriadas durante 10 min en hielo y sedimentadas a 3000xg por 5 min, luego de lo cual fueron resuspendidas en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Las células fueron alicuotadas en tubos de 1,5 ml en 200 µl y fueron almacenadas a -80 °C hasta ser utilizadas. Este protocolo se basó en la publicación de Chen y cols. (1994).

### **2.9 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens***

Al igual que el protocolo descrito en la sección 2.8, la transformación de *Agrobacterium* se realizó basada en la metodología descrita por Chen y cols. (1994). 100 µl de células competentes de *Agrobacterium* cepa GV3101 (protocolo descrito en sección 2.8) fueron mezcladas con 1 µl del vector binario de interés (a una concentración de 1 µg/µl) y dicha mezcla fue congelada con

nitrógeno líquido por 5 min, posteriormente se descongeló la mezcla a 37 °C durante 25 min. Inmediatamente se le agregó 1 ml de medio LB y se incubó por 3 h a 28 °C con agitación suave. Finalmente las células fueron colectadas en microcentrifuga por 1 min a máxima velocidad (10000xg) y el sobrenadante fue descartado dejando aproximadamente 100 µl de medio para resuspender las células, las cuales fueron puestas en medio LB agar suplementado con gentamicina 100 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml y rifampicina 10 µg/ml. Las placas fueron incubadas durante 2 días a 28 °C.

#### **2.10 Infiltración de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* Xanthi NN) con *Agrobacterium tumefaciens***

Infiltración de *Agrobacterium* se basó en el protocolo descrito por Kato y cols (2002). Se creció un cultivo líquido de *A. tumefaciens*, portador de un vector de interés (pDUA2 ó pDUA3), a 28 °C durante 36 h en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes (gentamicina 100 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml y rifampicina 10 µg/ml). 1 ml de dicho cultivo fue transferido a un tubo de 1,5 ml y las células fueron colectadas en microcentrifuga a máxima velocidad (10000xg) por 30 s y resuspendidas en 1 ml de agua destilada estéril. Con jeringas estériles de 1 ml (sin aguja) se tomaron 0,3 ml de la suspensión y se infiltraron hojas jóvenes de tabaco. 4 días después de la infiltración, las hojas fueron analizadas por microscopía epifluorescente.

### 2.11 Transformación de *Arabidopsis thaliana* a través de inmersión floral

Este protocolo fue descrito por Clough y Bent (1998), para el cual se utilizaron plantas de *Arabidopsis* WT ecotipo Columbia crecidas en tierra (descrito en 2.1.2) de aproximadamente 6 semanas con inflorescencias nuevas (aproximadamente 3 inflorescencias de 10cm de largo con flores a punto de abrir), a las cuales se les cortaron las silicuas ya producidas. Para la transformación se prepararon cultivos de *Agrobacterium* (cepa GV3101), que han sido transformados con los vectores de interés, los cuales se iniciaron a partir de un preinóculo crecido a 25 °C por 2 días en un agitador termorregulado de agua con agitación constante y buena aireación en medio LB suplementado con los antibióticos gentamicina 100 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml y rifampicina 10 µg/ml. 100 µl de este preinóculo fueron utilizados para inocular 250 ml de LB suplementado con los mismos antibióticos para generar el cultivo óptimo para la transformación, el cual se creció a una temperatura de 25 °C con agitación constante y alta aireación hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de entre 0,6 a 0,8. El cultivo no debe ser crecido sobre 30 °C, debido a que a esta temperatura *Agrobacterium* pierde el plasmidio Ti. El cultivo crecido, fue centrifugado a 6000xg por 10 min a 4 °C para precipitar las células las cuales fueron resuspendidas en 250 ml de solución de transformación (Silwett L-77 0,05 % v/v; sacarosa 3 % p/v en agua).

Las inflorescencias de las plantas (aproximadamente 20 por constructo), fueron sumergidas (invertidas) en la solución de transformación con *Agrobacterium*

durante 15 s y posteriormente fueron puestas en oscuridad en posición horizontal a temperatura ambiente por 16 h, cubiertas por plástico. Finalmente las plantas fueron transferidas a una cámara de crecimiento con condiciones constantes de luz, temperatura (23 °C) y fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, a la espera de la recolección de semillas. Durante este período las plantas fueron regadas constantemente 3 veces por semana.

### **2.12 Selección de semillas transformadas, determinación de la eficiencia de transformación y del número de inserciones de T-DNA**

Las semillas de cada planta fueron colectadas 4 a 5 semanas después de la transformación y pesadas independientemente para obtener el número total de semillas (50000 semillas por gramo). Posteriormente las semillas fueron esterilizadas como se describió en 2.1.1 y sembradas en placas MS agar suplementadas con sacarosa 1 % y kanamicina 50 µg/ml como medio de selección. Las plantas germinadas y crecidas en presencia de kanamicina (generación T<sub>1</sub>), fueron cuantificadas y posteriormente transferidas a tierra y cubiertas con plástico hermético por 1 semana para mantener la humedad alta. La cantidad de semillas germinadas procedentes de una misma planta, permite calcular la eficiencia de la transformación, la que está dada por el porcentaje de semillas germinadas que sobrevivieron en kanamicina en relación al número total de semillas sembradas en el medio de selección.

Las plantas transferidas a tierra fueron cuidadas como se describió en 2.1.2 y

sus semillas fueron colectadas y seleccionadas nuevamente en medio ½X MS agar sacarosa 1 % suplementado con kanamicina 50 µg/ml para determinar el número de inserciones de T-DNA, esto es posible, pues la resistencia a kanamicina de las plantas transgénicas es un carácter dominante por lo que al tener una sola inserción tendríamos una segregación del fenotipo de 3:1, o sea tres de cada cuatro plantas serían resistentes a kanamicina.

### **2.13 Tratamiento con inhibidores de Ca<sup>+2</sup> ATPasas y ATPasas tipo P sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana***

Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* WT ecotipo Columbia de 7 días crecidas verticalmente en placas ½X MS agar suplementadas con sacarosa 1 % como está descrito en 2.1.1. Los compuestos utilizados fueron: thapsigargina (Thpg), ácido ciclopiazónico (ACP), ortovanadato de sodio (OVA) y BODIPY FL Thapsigargina (BThpg) (Tabla 1). Las plántulas fueron infiltradas por vacío en las soluciones de estos compuestos en oscuridad durante 15 min, luego fueron puestas nuevamente en placas ½X MS agar suplementadas con sacarosa 1 % y se crecieron en oscuridad por 6 h en un ángulo de 90° respecto al vector de gravedad (Figura 3). Luego de este período se midieron los ángulos de la curvatura de la raíz y el crecimiento de la raíz (Figura 3).

Las concentraciones usadas en los experimentos para cada inhibidor se prepararon a partir de soluciones stocks diluidas en agua: Thpg: 0, 0,1, 0,5, 1 y 5 µM. ACP: 0, 0,5, 1, 5 y 20 µM. OVA: 0, 1, 5, 10 y 50 µM. Bthpg: 0 y 0,5 µM.

Como control en todos los experimentos se usaron plántulas tratadas con soluciones de los solventes a la concentración máxima usada en cada experimento (las concentraciones de los inhibidores y controles están resumidas en la tabla 1). Todos los experimentos fueron hechos en triplicado y con un n de al menos 10 plantas.

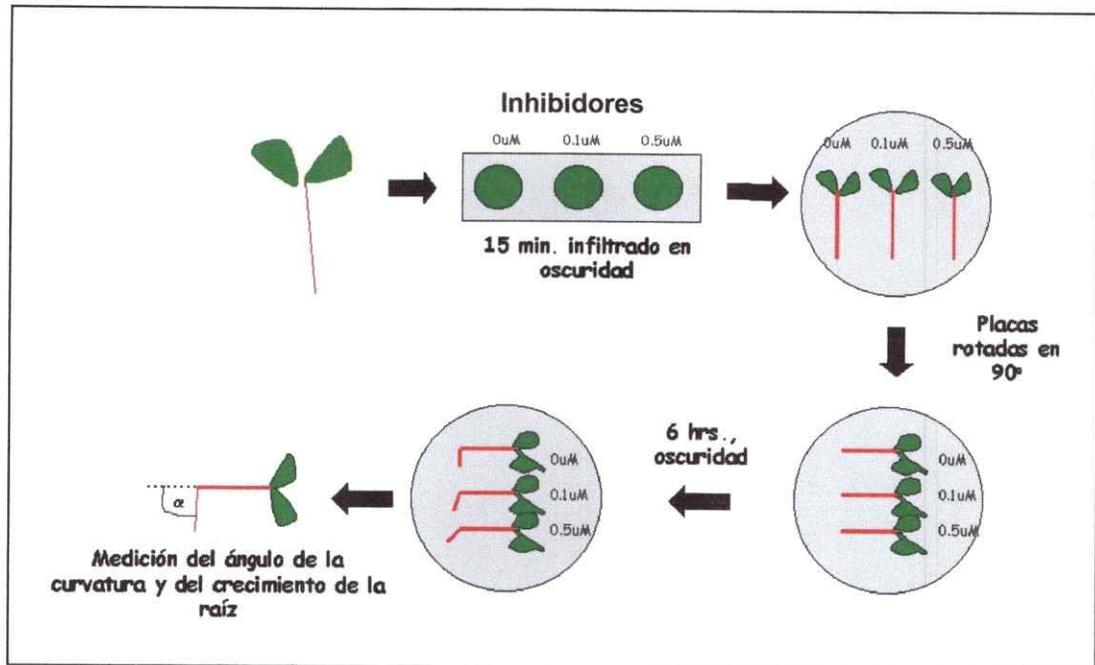
**Tabla 1. Inhibidores utilizados en el estudio de la respuesta gravitrópica en *Arabidopsis thaliana***

Reactivos	Peso molecular g/mol	Solvente	Concentraciones de reactivos utilizados ( $\mu\text{M}$ )	Control de solvente en agua
Thapsigargina (Thpg)	650,76	DMSO	0,1 <sup>a</sup> , 0,5 <sup>a,b</sup> , 1 <sup>a</sup> y 5 <sup>a</sup>	0,5 % <sup>a</sup> y 0,05 <sup>b</sup> % DMSO
Acido Ciclopiazónico (ACP)	336,4	DMSO	0,5 <sup>a</sup> , 1 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup> , 20 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup> % DMSO
Ortovanadato de Sodio (OVA)	183,9	Agua	1 <sup>a</sup> , 5 <sup>a</sup> , 10 <sup>a</sup> , 50 <sup>a</sup>	Agua <sup>a</sup>
2.3-butanodiona monoxima (BDM)	101,1	DMSO	1 <sup>c</sup>	0,03 <sup>c</sup> % DMSO
BODIPY FL Thapsigargina (BThpg)	854,76	DMSO	0,5 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup> % DMSO

<sup>a</sup>: concentraciones usadas para el ensayo descrito en la sección 2.13

<sup>b</sup>: concentraciones usadas en la sección 2.16

<sup>c</sup>: concentraciones usadas en sección 2.14



**Figura 3. Tratamiento con inhibidores de  $\text{Ca}^{+2}$  ATPasas y ATPasas tipo P.** Esquema del tratamiento a plántulas de 7 días con Thpg, BThpg, ACP u OVA a distintas concentraciones. Las plántulas fueron infiltradas por vacío en oscuridad, luego fueron puestas en placas  $\frac{1}{2}$ X MS agar suplementadas con sacarosa 1 % y éstas fueron rotadas en  $90^\circ$  y mantenidas en esta posición durante 6 h. Transcurrido este tiempo se procedió a medir el ángulo y el crecimiento de cada raíz. Estos experimentos fueron hechos en triplicado con un n de al menos 10 plantas por concentración de inhibidor.

## 2.14 Tratamiento con un inhibidor de Miosinas

Se crecieron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia en placas  $\frac{1}{2}$ X MS agar suplementadas con sacarosa 1 % en sentido vertical por 7 días. Las plantas se cambiaron a placas que contenían  $\frac{1}{2}$ X MS, agar, sacarosa 1 % y BDM a distintas concentraciones (Tabla1) y se les cambió el ángulo en  $90^\circ$  con respecto al vector de gravedad y se dejaron crecer en oscuridad por 6 h después de las cuales se midió el ángulo de la curvatura de la raíz como parámetro de la respuesta gravitrópica y el crecimiento de la raíz. Como control se utilizaron plantas cambiadas a placas con  $\frac{1}{2}$ X MS-agar suplementado con sacarosa 1 % y

DMSO 0,03 %.

### **2.15 Tinción con BODIPY FL Thapsigargina**

BODIPY Thapsigargina FL (BThpg, Tabla 2) fue disuelto en DMSO a una concentración de 1 mM y el stock se diluyó en amortiguador fosfato pH 7 0,1 mM a una concentración final de 1  $\mu$ M. Plántulas de Arabidopsis WT de 7 días fueron transferidas a la solución 1  $\mu$ M de BThpg en amortiguador fosfato 0,1 mM e incubadas por 2 h en oscuridad a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente las plántulas fueron lavadas tres veces con amortiguador fosfato pH 7 0,1 mM y montadas en portaobjeto con el mismo amortiguador para tomar imágenes de microscopía epifluorescente y transmisión con microscopía Nomarski. Como control se usaron plántulas incubadas en amortiguador fosfato 0,1 mM con DMSO 0,1 %.

**Tabla 2. Fluoróforos y sus características.**

Fluoróforos	Peso molecular g/mol	Marca	Solvente	Abs/Ex (nm)	Em (nm)
BODIPY FL Thapsigargina	855	Molecular Probes	DMSO	503	511
DsRed2 (Red Fluorecent Protein) <sup>b</sup>	NP	Clontech <sup>a</sup>	NP	558	583
EYFP (Yellow Fluorecent Protein) <sup>b</sup>	NP	Clontech <sup>a</sup>	NP	513	527
GFP5 (Green Fluorecent Protein) <sup>b</sup>	NP	Clontech <sup>a</sup>	NP	400-475 <sup>c</sup>	507

NP: no procede.

<sup>a</sup>. Clontech provee de vectores con estas proteínas

<sup>b</sup>. En este estudio se trabajó con plantas que sobreexpresan estas proteínas

<sup>c</sup>. GFP5 posee dos peaks de excitación

## 2.16 Visualización de amiloplastos en células de la Columella.

Plántulas de *Arabidopsis* ecotipo Columbia y transgénicas DU2M2, fueron cultivadas en esterilidad como se describió 2.1.1 durante 7 días para ser usadas en estos experimentos. Posteriormente fueron tratadas con Thpg 0,5  $\mu$ M como se describió en 2.13 y como control se trataron con DMSO 0,05 %. Luego fueron puestas verticalmente en placas que fueron giradas en 180° y crecidas en esta posición en oscuridad por distintos tiempos (0, 30, 60 y 120 min). Finalmente, las plántulas fueron fijadas como se describe posteriormente (Figura 4).

Las plantas transgénicas DU2M2 fueron también tratadas con Thpg y solución

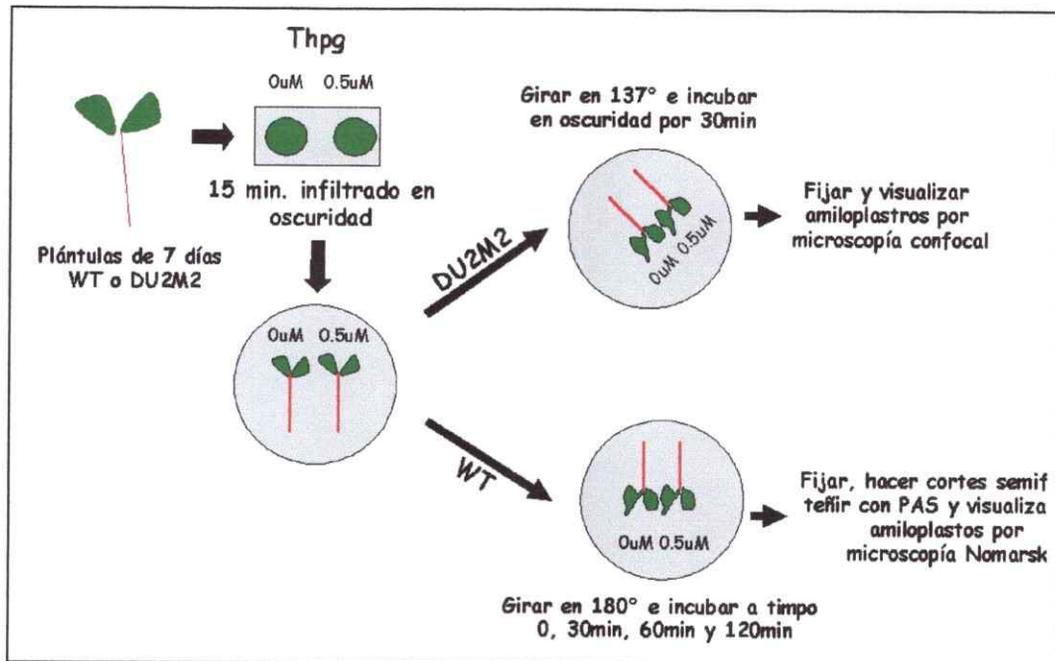
control (DMSO 0,05 %) como se describió previamente y fueron puestas verticalmente en placas las cuales fueron giradas en 137° (Plieth y Trewavas. 2002) y se crecieron en esta posición y en oscuridad por 30 min. Finalmente, las plántulas fueron fijadas como se describe posteriormente (Figura 4).

Posterior a la fijación la visualización de los amiloplastos se llevó a cabo a través de dos técnicas, PAS (ácido peryódico y reactivo de Schiff) y fluorescencia utilizando plantas transgénicas con los plastidios marcados con la proteína fluorescente roja (línea DU2M2).

Para la visualización de amiloplastos mediante tinción de PAS (esta metodología está basada en la descrita por Lillie y Fulmer, 1976) se usaron plántulas WT de 7 días sometidas al tratamiento descrito previamente en esta sección. Las plántulas fueron fijadas en paraformaldehído 4 %, glutaraldehído 3 % en amortiguador cacodilato de sodio pH 7,2 al 0,1 M, durante toda la noche a temperatura ambiente. Se lavó con amortiguador cacodilato pH 7,2 0,01 M, durante 4 h (3 cambios) y se post fijó en tetróxido de osmio al 1 % acuoso durante 30 min cada una. Las plántulas se preincluyeron en epon:acetona 1:1 durante toda la noche. Posteriormente se incluyeron en resina fresca y se dejó polimerizar a 60 °C durante 24 h. Cortes semifinos (1 µm) fueron obtenidos en ultramicrotomo Sorvall MT II-B y montados en portaobjetos con xilano. Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina (solución de tetraborato de sodio 0,5 %) para analizar su calidad, debido a que tinción permite visualizar contorno

celular. Cortes semifinos de la de la punta de la raíz fueron teñidos con PAS, que tiñe carbohidratos, lo que permite visualizar pared celular y amiloplastos. Para éste último, los cortes fueron tratados con NaOH 0,1 M por 5 min, luego de lo cual se lavaron con agua destilada. Inmediatamente, los cortes se incubaron con ácido peryódico 1,5 % por 15 min y se lavaron con agua destilada. El siguiente paso fue teñir con leucofucsina por 45 min a 30 °C y lavar con agua destilada por 20 min. Finalmente se secaron en placa calefactora a 60 °C (protocolo no publicado. Sr. Alejandro Munizaga, Servicio de Microscopía electrónica, Universidad Católica de Chile).

Plantas transgénicas de la línea DU2M2 tratadas como se describió previamente en esta sección fueron fijadas con una solución de formaldehído al 4 % en amortiguador PIPES 50 mM en la cual las plantas fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente se incubaron las plantas en PIPES 50 mM por toda la noche a 4 °C. Finalmente las plantas transgénicas fueron montadas en portaobjeto para observar su fluorescencia mediante microscopía confocal.



**Figura 4. Tratamiento de plantas para la visualización de amiloplastos en células de la Columella de la raíz en presencia de Thpg.** Plántulas de Arabidopsis WT y transgénicas DU2M2 fueron utilizadas como estrategias paralelas para la visualización de amiloplastos en la caliptra de la raíz en presencia de 0,5 μM de Thpg.

## 2.17 Análisis de microscopía confocal, epifluorescente y Nomarski

Se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus IX70 con una cámara digital SONY CXC-390 3CCD adosada. Las imágenes de transmisión fueron tomadas con Nomarski (DP20 y DP60) con un objetivo UPLAN FI 20X y un objetivo Plan 100X/1,25 oil ph 3. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con los filtros U-N3001, UN31040, UMNG2 y UMWU2. Las características generales de cada filtro y los fluoróforos y proteínas que pueden ser visualizados con éstos se detallan en la Tabla 3. Las imágenes fueron editadas con el software Photoshop 6.0.

La microscopía confocal se realizó utilizando un equipo Zeiss, modelo LSM 410 Axiovert 100, con tres LASERs de 488, 543 y 633nm, las imágenes fueron editadas con el software Lsmdummy (Servicio de Microscopía Confocal, Dr. Jorge Sanz, Universidad de Chile).

**Tabla 3. Filtros de fluorescencia y sus características**

Filtros	Excitación	Emisión	Tipos de fluoróforos observables
UN31040 <sup>a</sup>	510	560	EYFP (Yellow Fluorecent Protein)
UN3001 <sup>a</sup>	480	535	GFP5 (Green Fluorecent Protein), BODIPY FL Thapsigargina
UMNG2 <sup>a</sup>	530	570 LP <sup>c</sup>	DsRed2 (Red Fluorecent Protein)
UMWU2 <sup>b</sup>	350	400 LP <sup>c</sup>	DAPI

<sup>a</sup>: Filtros CHROMA

<sup>b</sup>: Filtro OLYMPUS

<sup>c</sup>: Filtros Long Pass, que permiten ver la luz emitida desde la longitud de onda señalada en adelante.

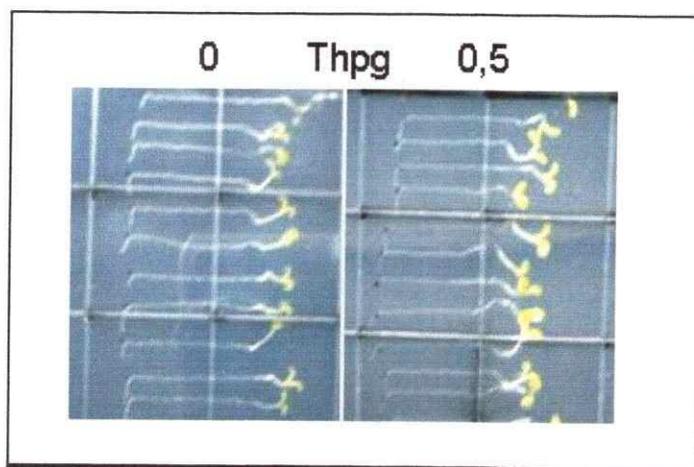
## 2.18 Análisis estadístico y tratamiento de datos

Los experimentos de respuesta gravitrópica fueron hechos en triplicado y con un n de al menos 10 plantas. El promedio de los ángulos de la curvatura de la raíz y del crecimiento fueron graficados ocupando el programa Excel de Office 97 para Windows 98. Los errores estándar fueron obtenidos dividiendo la desviación estándar de las medias por la raíz cuadrada de n (número de eventos). Los análisis estadísticos se hicieron con la prueba de t student para colas pareadas con un  $p = 0,05$  y n-1 grados de libertad (Mendenhall y Slinich, 1990).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análisis del efecto de inhibidores de $\text{Ca}^{+2}$ ATPasas y ATPasas tipo P sobre la respuesta gravitrópica en *Arabidopsis thaliana*

Para investigar el efecto de bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la respuesta gravitrópica en *Arabidopsis thaliana*, plántulas de 7 días fueron tratadas con dos inhibidores de  $\text{Ca}^{+2}$  ATPasa y un inhibidor de ATPasas tipo P, a diferentes concentraciones. 6 h después de la inducción del estímulo gravitrópico en  $90^\circ$  (Figura 5), se midió tanto el crecimiento como el ángulo de la curvatura de la raíz. El crecimiento de la raíz no se vió afectado significativamente por ninguna concentración de Thpg y ACP, pero en el caso de OVA, a  $50 \mu\text{M}$  de este inhibidor, el crecimiento de la raíz fue estadísticamente mayor que el control (Tabla 4).



**Figura 5. Bioensayo de la respuesta gravitrópica.** Curvatura de la raíz de *Arabidopsis* en presencia de Thpg y control sin inhibidor.

La respuesta gravitrópica disminuyó significativamente al incrementar la concentración de Thpg (Figura 6A) y a una concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  OVA (Figura 6C). La máxima inhibición con Thpg se observó a una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  (Figura 6A), alcanzando aproximadamente un 37 %. Interesantemente, a concentraciones sobre 1  $\mu\text{M}$  de Thpg la inhibición de la curvatura de la raíz disminuye y a 5  $\mu\text{M}$  el efecto desaparece. Por otro lado, encontramos que ACP no fue capaz de alterar significativamente la respuesta gravitrópica (Figura 6B) a pesar de los resultados mostrados por Sievers y Busch (1992) donde se mostró que ACP a concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  inhibía completamente la respuesta gravitrópica en berro (*Lepidum sativum*).

En el caso de la inhibición observada a altas concentraciones de OVA, es importante destacar que este es un inhibidor general de ATPasas tipo P, por lo tanto la inhibición de la respuesta gravitrópica podría deberse a la alteración de otros procesos celulares que requieren ATP. Por lo tanto, no refleja un efecto específico. En cambio, la inhibición de la respuesta gravitrópica generada por Thpg, sugiere que una bomba de  $\text{Ca}^{+2}$  sensible a este inhibidor, altera específicamente la gravirespuesta.

**Tabla 4. Crecimiento de la raíz post tratamiento con inhibidores de ATPasas tipo P**

	Thpg ( $\mu\text{M}$ )				
	0	0,1	0,5	1	5
Crecimiento de la raíz (mm)	$1,8 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,6$	$2,4 \pm 0,8$	$2,1 \pm 0,5$
	ACP ( $\mu\text{M}$ )				
	0	0,5	1	5	20
Crecimiento de la raíz (mm)	$1,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$
	OVA ( $\mu\text{M}$ )				
	0	1	5	10	50
Crecimiento de la raíz (mm)	$1,8 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$	$2 \pm 0$

Los valores de la tabla representan la media  $\pm$  SE, con un n de al menos 10 plantas para cada concentración probada. Thpg y ACP no muestran efectos significativos estadísticamente sobre el crecimiento. OVA provoca un aumento significativo del crecimiento a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$

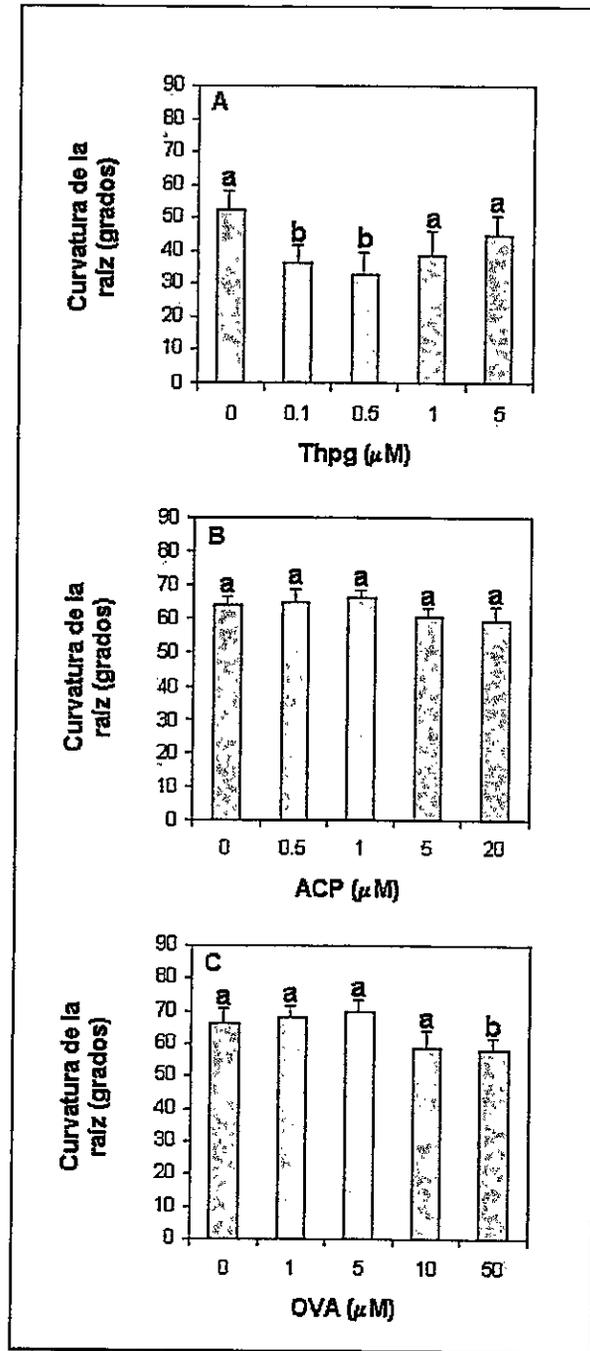


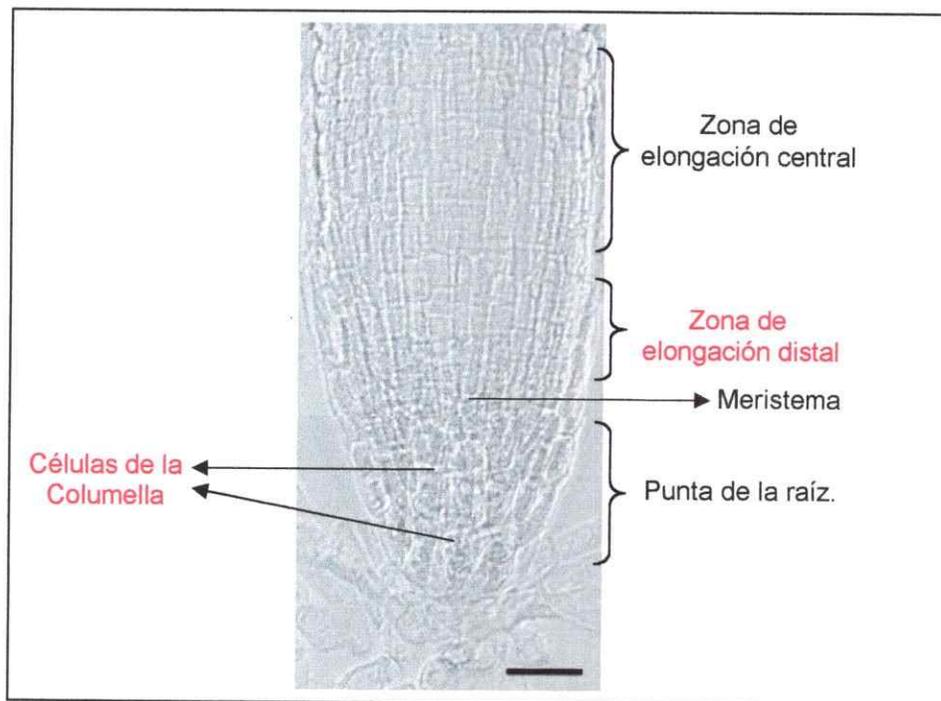
Figura 6. Efecto de inhibidores de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasas y ATPasas tipo P sobre la respuesta gravitrópica. Concentraciones crecientes de A, Thapsigargina, B, Ácido Ciclopiazónico y C, Ortovanadato de sodio. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de los datos obtenidos para cada inhibidor con un n de al menos 10 plantas por tratamiento. Estos experimentos fueron hechos en triplicado. Aquí se muestra el experimento más representativo. La diferencia estadística está descrita por las letras a y b sobre las barras, donde a representa al control y todos los valores que no difieren estadísticamente de él y b, representa los valores que son estadísticamente diferentes al control.

### 3.2 Localización subcelular de Thapsigargina BODIPY en raíces de *Arabidopsis thaliana*

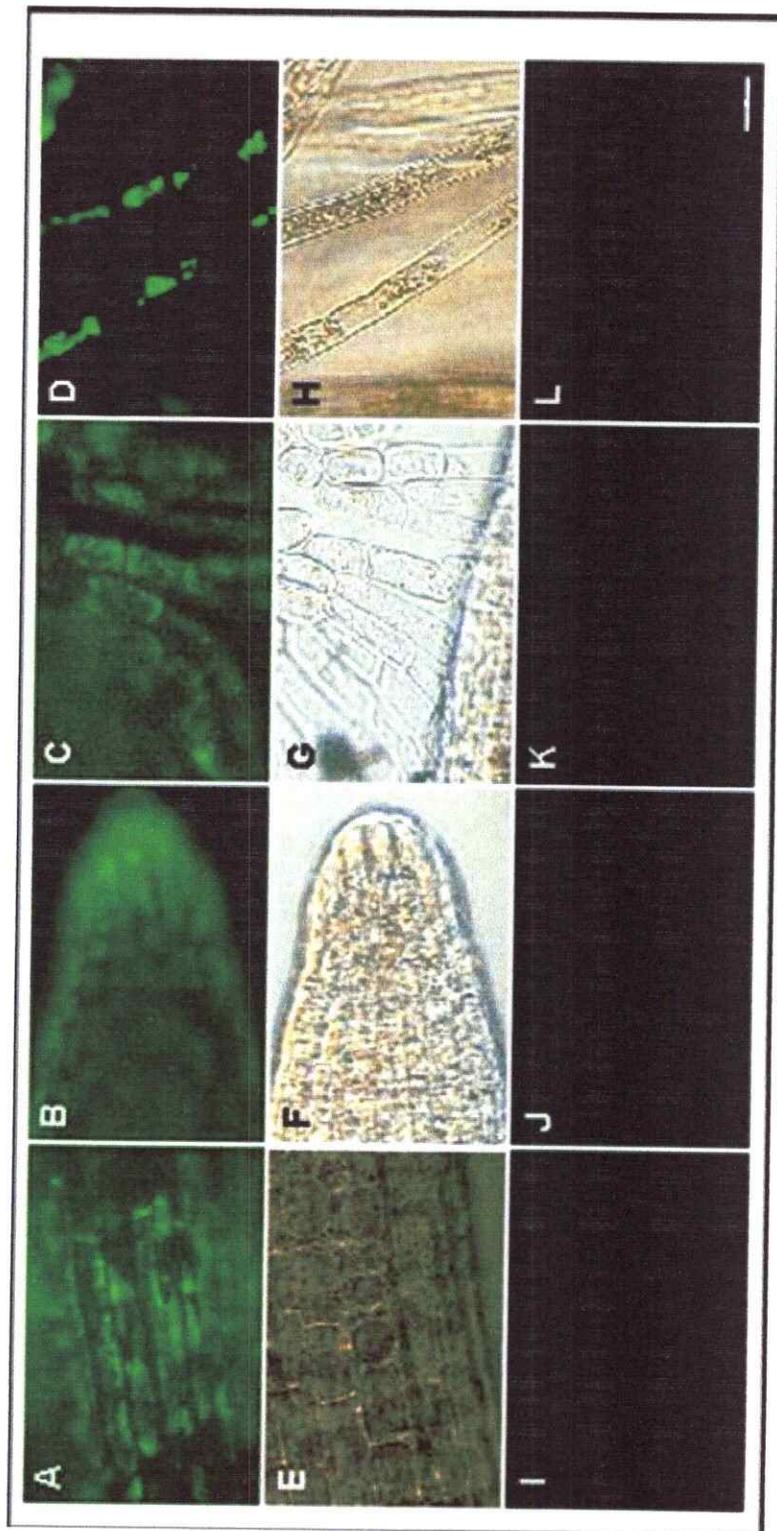
Usando el fluoróforo conjugado BThpg (Simpson y Russell. 1997), se investigó el posible sitio de localización intracelular de Thpg y si este compuesto actúa sobre los tejidos responsables de la respuesta gravitrópica como la punta de la raíz y la zona de elongación distal. En la Figura 7 se muestra una imagen de microscopía Nomarski de una raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* de 7 días, donde se detallan estas zonas que participan en la percepción y generación de la respuesta gravitrópica.

La Figura 8 muestra imágenes de distintos zonas de raíces de plántulas incubadas con BThpg 1  $\mu$ M y raíces de plántulas control tratadas con DMSO 0,1 % (Figura 8A-8D), además se muestra la correspondiente imagen de microscopía Nomarski para cada zona de la raíz observada (Figura 8E-8H). Interesantemente este fluoróforo conjugado mostró unión específica a los tejidos responsables de la generación y producción de la respuesta gravitrópica, como son las células de la Columella (Figura 7 y 8B), responsables de sentir la gravedad gracias a la sedimentación de sus amiloplastos densos (estatólitos) y a la zona de elongación distal (Figura 7 y 8A), que es la responsable de elongar diferencialmente para generar la curvatura de la raíz. Por otro lado, los blancos intracelulares que son marcados por BThpg tienen una disposición reticulada en la zona de elongación distal (Figura 8A) y una apariencia más vesiculada en las células que se escaman de la punta de la raíz y en los pelos radiculares de la

interfase entre la raíz y el hipocotilo (Figura 8C y 8D, respectivamente). En las células de la Columella, debido a la alta fluorescencia observada no es posible distinguir la forma o distribución de la marca (Figura 8B). Los tejidos observados, muestran un nivel bajo de autofluorescencia lo que indica que la fluorescencia observada corresponde al fluoróforo unido a Thpg (Figuras 8I-8L). Estos resultados nos estarían indicando preliminarmente, que Thpg parece tener como blanco intracelular al retículo endoplasmático y posiblemente a otros organelos de disposición vesiculada como aparato de Golgi, mitocondrias o plastidios.



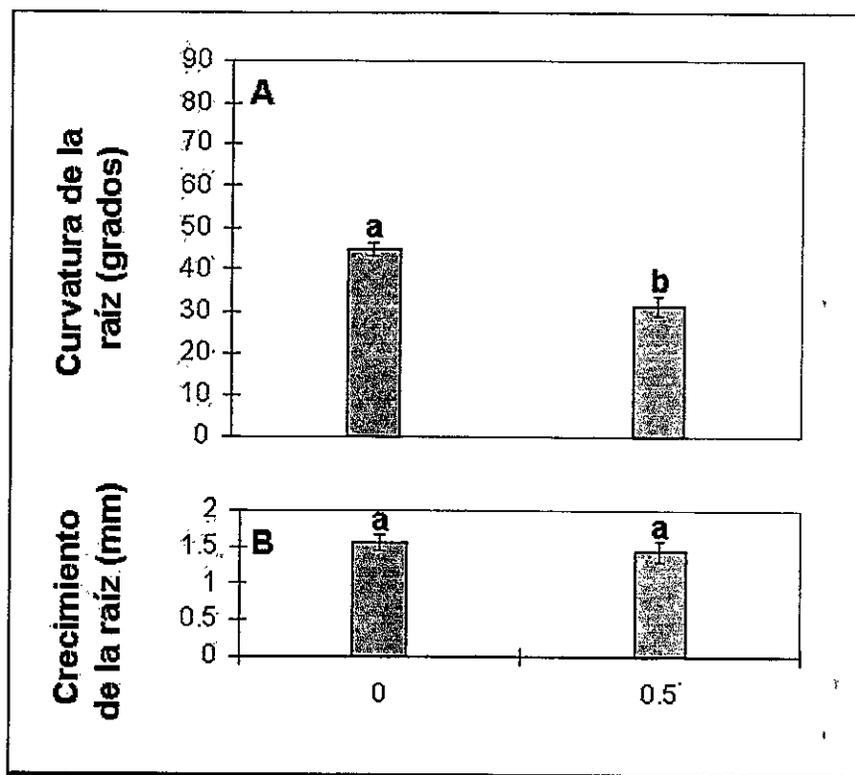
**Figura 7. Raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* de 7 días.** En la imagen se señalan las zonas de la raíz primaria y en rojo se destacan las zonas de la raíz responsables de la respuesta gravitrópica. La barra representa 25  $\mu\text{m}$



**Figura 8. Localización celular de BThpg en distintas zonas de la raíz de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.** Plántulas de *Arabidopsis* de 7 días fueron teñidas con BThpg 1  $\mu$ M en amortiguador fosfato 0,1 mM. **A, E e I,** muestran imágenes de la zona de elongación distal. **B, F y J,** muestran imágenes de la punta de la raíz. **C, G y K,** muestran imágenes de células que se escaman de la punta de la raíz. **D, H y L,** muestran imágenes de pelos radiculares de la zona de interfase entre el hipocotilo y la raíz. **A-D,** imágenes de microscopía epifluorescente de plántulas teñidas con BThpg. **E-H,** imágenes de microscopía Nomarski correspondientes a las imágenes **A** a la **D**. **I-L,** imágenes de microscopía de epifluorescencia de plántulas no teñidas (control negativo). La barra representa 25  $\mu$ m.

### **3.3 Efecto de BThpg sobre la respuesta gravitrópica y sobre el crecimiento en raíces de *Arabidopsis thaliana*.**

A partir de los resultados obtenidos previamente en 3.2 con BThpg, fue importante investigar si este compuesto era también capaz de reducir la respuesta gravitrópica en raíces de *Arabidopsis* como lo hace Thpg. La Figura 9 muestra el efecto sobre el crecimiento y el ángulo de la curvatura de raíces tratadas con 0,5  $\mu$ M de BThpg. Aquí podemos observar que el crecimiento de las raíces no fue alterado significativamente por este fluoróforo. Sin embargo, la curvatura de la raíz generada por el cambio en el vector de gravedad disminuyó significativamente en relación con el control sin tratamiento, pero esta inhibición fue menor que la observada en los resultados mostrados en Figura 6A. Posiblemente, el mayor peso molecular que presenta el BThpg respecto a Thpg, hace más difícil su penetración en el tejido.

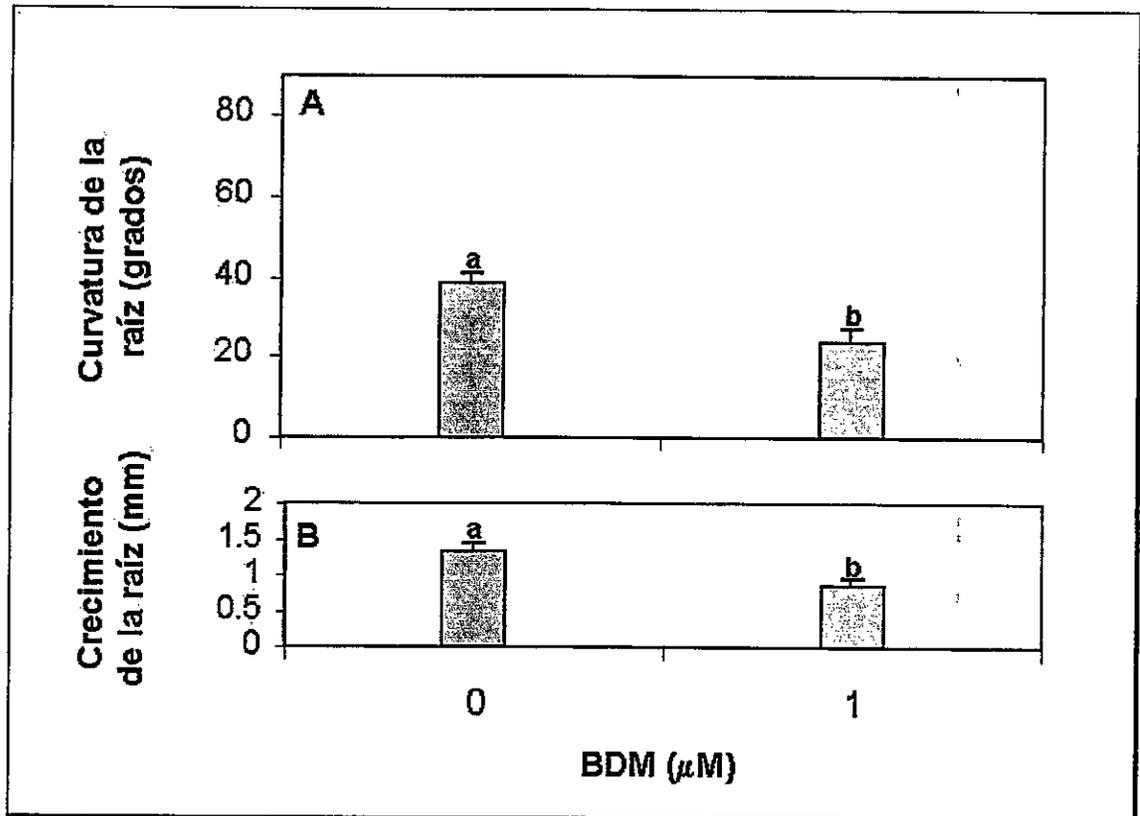


**Figura 9. Efecto inhibitorio de BThpg sobre la respuesta gravitropica y sobre el crecimiento de la raíz en *Arabidopsis thaliana*.** A. Efecto de BThpg sobre la respuesta gravitropica. B. Efecto de BThpg sobre el crecimiento de las raíces. Los experimentos fueron hechos en triplicado con un n de al menos 10 plántulas por tratamiento. La diferencia estadística está descrita por las letras a y b sobre las barras, donde a representa al control y todos los valores que no difieren estadísticamente de él y b, representa los valores que son estadísticamente diferentes al control.

### 3.4 Efecto de BDM, un inhibidor de la actividad ATPásica de las miosinas, sobre el crecimiento y la respuesta gravitropica en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Para estudiar el efecto de la BDM sobre la respuesta gravitropica y sobre el crecimiento de raíces, plántulas de *Arabidopsis* de 7 días fueron transferidas a placas con 1 mM de BDM, se les cambio el ángulo de crecimiento en 90° y se crecieron en esta posición durante 6 h, luego de las cuales se midió la respuesta gravitropica representada por el ángulo de la curvatura de la raíz. En la Figura

10A están graficadas las medias de los ángulos de la curvatura de plantas sometidas a BDM 1 mM y plantas control. Aquí podemos observar que hay un efecto inhibitorio estadísticamente significativo tanto sobre la respuesta gravitrópica (Figura 10A) como sobre el crecimiento de la raíz en presencia de BDM (Figura 10B). Estos resultados sugieren que este compuesto no está actuando exclusivamente sobre los mecanismos que regulan la respuesta gravitrópica, sino que la disminución de la gravirespuesta puede deberse a la disminución del crecimiento que es observado en la Figura 10B.



**Figura 10. Efecto de BDM 1 mM sobre la respuesta gravitrópica y el crecimiento de la raíz de plantas de Arabidopsis.** A, efecto de BDM 1 mM sobre la respuesta gravitrópica de plantas crecidas por 6 h en oscuridad a 90° respecto del vector de gravedad en este inhibidor. B, efecto de BDM 1 mM sobre el crecimiento de la raíz de Arabidopsis crecidas por 6 h en oscuridad a 90° respecto del vector de gravedad en este inhibidor. El experimento fue hecho en triplicado con un n de al menos 10 plantas por tratamiento. Aquí se presenta el experimento más representativo. La diferencia estadística está descrita por las letras **a** y **b** sobre las barras, donde **a** representa al control y todos los valores que no difieren estadísticamente de él y **b**, representa los valores que son estadísticamente diferentes al control.

### **3.5 Efecto de Thpg, un inhibidor de bombas de $\text{Ca}^{+2}$ , sobre la posición de los amiloplastos en la caliptra de la raíz.**

Para visualizar los amiloplastos en la caliptra de la raíz y el efecto de Thpg sobre la posición de estos luego de un estímulo de gravedad, se utilizaron 2 técnicas: tinción de PAS y fluorescencia.

#### **3.5.1 Visualización de amiloplastos mediante tinción de PAS (ácido peryódico y reactivo de Schiff)**

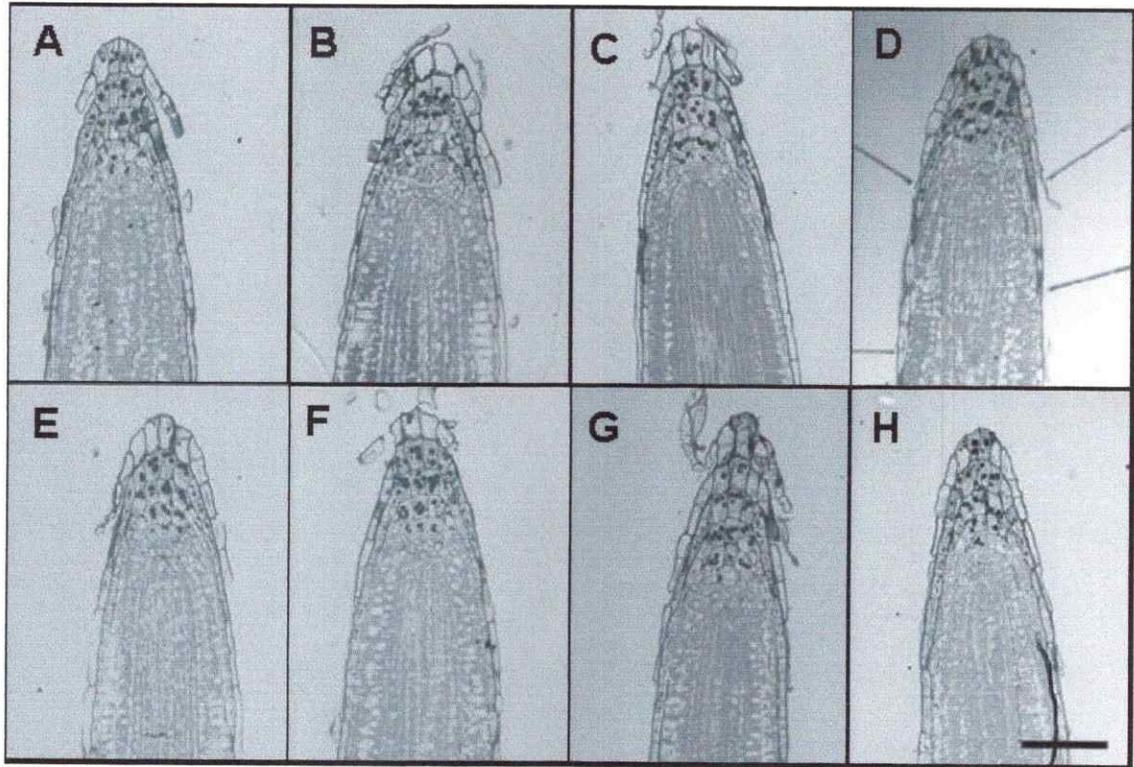
Con el fin de determinar si la posición de los amiloplastos en la caliptra de la raíz frente a un estímulo de gravedad es alterado por Thpg, se realizaron cortes semifinos de plantas previamente tratadas con este compuesto a una concentración de  $0,5 \mu\text{M}$  y puestas a crecer en oscuridad a  $180^\circ$  respecto del vector de gravedad durante diferentes tiempos post tratamiento y finalmente fijadas (Figura 4). Los corte semifinos de tejido de la punta de la raíz fueron teñidos mediante la técnica de PAS (ácido peryódico y reactivo de Schiff, tiñe de color morado los carbohidratos, por ende, permite visualizar amiloplastos y pared celular en la caliptra de la raíz). En la Figura 11 se presentan las imágenes de la caliptra de la raíz obtenidas de plántulas fijadas post tratamiento a distintos tiempos de crecimiento a  $180^\circ$  respecto del vector de gravedad. Aquí se aprecia que a 0, 60 y 120 min de crecidas a  $180^\circ$ , no se observan diferencias en la posición de los amiloplastos de las células de la Columella entre plántulas con Thpg (Figura 11A, 11C y 11D) y plántulas control (Figura 11E, 11G y 11H). Sólo a tiempo 30 min es posible ver diferencias en la posición de los amiloplastos

(Figura 11B y 11F), la que se aprecia con mayor claridad en la Figura 12 donde se muestran en detalle las imágenes B y F de la Figura 11. Aquí se observa una disposición diferente respecto al control de plantas tratadas con DMSO 0,05 %. Se puede observar que los amiloplastos de la cuarta fila de células (Figura 12B) están en una posición más apical dentro de la célula que los de esa misma fila en las plantas control (Figura 12A) y los amiloplastos de la tercera fila de células están ubicados basalmente dentro de la célula, respecto a los del control que se encuentran en una disposición azarosa en el citoplasma celular.

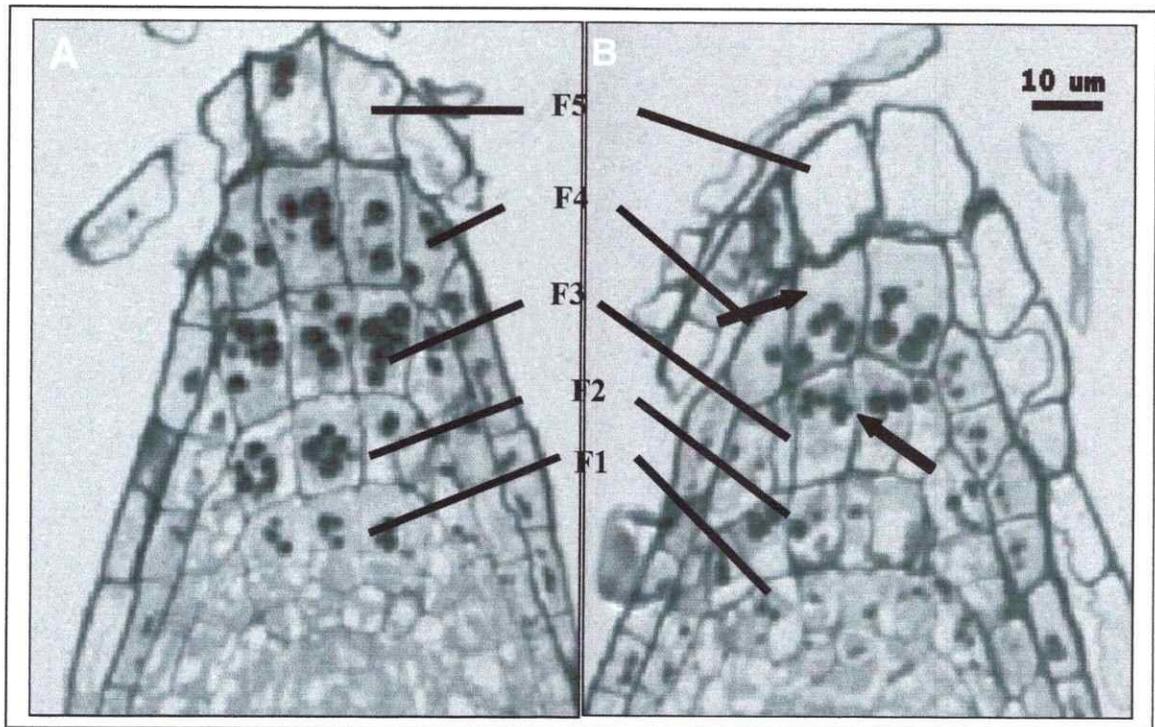
Por otro lado, para descartar un efecto metabólico de degradación de almidón debido a Thpg, que produjera la ausencia de amiloplastos en disposición azarosa dentro de la célula en presencia de Thpg, se contó el número de amiloplastos presentes en las células de la Columella tanto de plantas tratadas con Thpg y plantas control y se vió que no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa en el número de amiloplastos entre ambos tratamientos.

Es importante señalar que los resultados obtenidos son preliminares y es necesario corroborarlos. Para ello, se propuso la construcción de plantas transgénicas que permitan la visualización de amiloplastos en la caliptra de la raíz a través de fluorescencia y de esta manera hacer un análisis estadístico de la posición de los amiloplastos en presencia y ausencia de Thpg con un mayor número de muestras. En el punto 3.5.2 se detalla la construcción de estas

plantas transgénicas y como esta estrategia permitirá este análisis.



**Figura 11. Visualización mediante tinción de PAS de amiloplastos en células de la Columella de Arabidopsis tratadas con Thpg.** A-D Imágenes de microscopía Nomarski de cortes semifinos de la caliptra de plantas de Arabidopsis de 7 días tratadas con Thpg 0,5  $\mu$ M sometidas a un estímulo de gravedad a distintos tiempos y E-H con solución control de DMSO 0,05 %. A y E, 0 min, B y F 30 min, C y G, 60 min y D y H, 120 min. Experimentos hechos en duplicado. La barra de tamaño representa 50  $\mu$ m.



**Figura 12** Posición de amiloplastos en células de la Columella de plántulas tratadas con Thpg después de 30 min de sometida a un estímulo de gravedad a 180°. Imágenes de microscopía Nomarski de cortes de raíces de plántulas de *Arabidopsis* de 7 días tratadas con **A**, solución control de DMSO 0,05 % y **B**, Thpg 0,5 µM. Las flechas indican las filas de células en las cuales se ve alterada la posición de los amiloplastos respecto de A. Los experimentos fueron hechos en duplicado. La barra de tamaño representa 10 µm. F1, F2, F3, F4 y F5 representan en número de fila correspondiente en la Columella de cada corte.

### 3.5.2 Análisis de la posición de los amiloplastos a través fluorescencia.

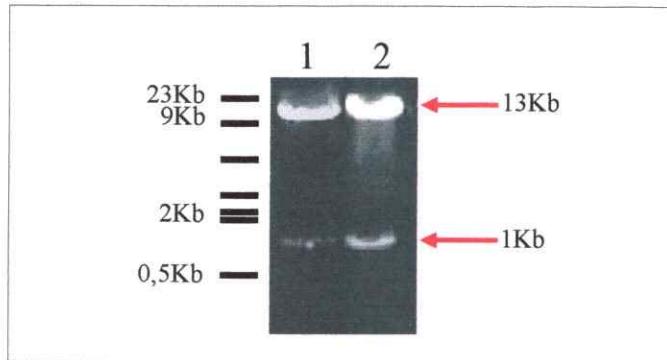
Para la visualización de amiloplastos en la caliptra de la raíz y el análisis de su posición mediante fluorescencia, se hicieron plantas transgénicas que acumulan las proteínas fluorescentes roja o amarilla en los plastidios.

Para ello, se construyeron 2 tipos de vectores, uno que permite sobreexpresar la proteína fluorescente roja (DsRed2) y otro que permite sobreexpresar la proteína fluorescente amarilla (EYFP), ambas fusionadas en marco de lectura en el amino terminal, al péptido señal de la proteína Recombinasa A (RecA), que ha sido probado previamente como señal de destinación a plastidios en *Arabidopsis thaliana* (Akashi y cols. 1998). Las fusiones fueron obtenidas desde los plasmidios de expresión en plantas pAMA11 y pAMA12 disponibles en nuestro laboratorio. Mediante digestiones con las enzimas de restricción BamHI y SacI se clonaron ambas fusiones en el vector binario de expresión en plantas pEL103. El clonamiento de ambas fusiones en el vector binario, se chequeó por digestiones con las enzimas de restricción BamHI y SacI y se obtuvieron bandas de aproximadamente 1Kb que corresponden con el tamaño esperado de las fusiones RecA-RFP y RecA-YFP y otra de aproximadamente 13Kb que corresponde con el tamaño esperado del vector binario pEL103 linealizado (Figura 13).

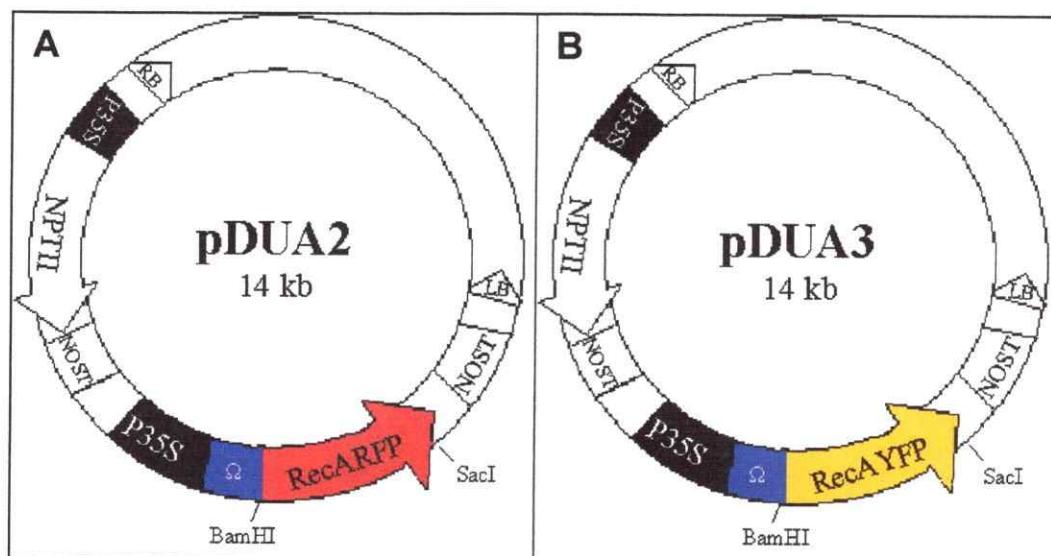
Estos vectores binarios posteriormente fueron usados para transformar *Agrobacterium* y con estos se transformó tabaco a través de infiltración y

Arabidopsis con el método de inmersión floral descrito en Materiales y Métodos.

En la Figura 14 se muestran los vectores binarios construidos y sus características generales.



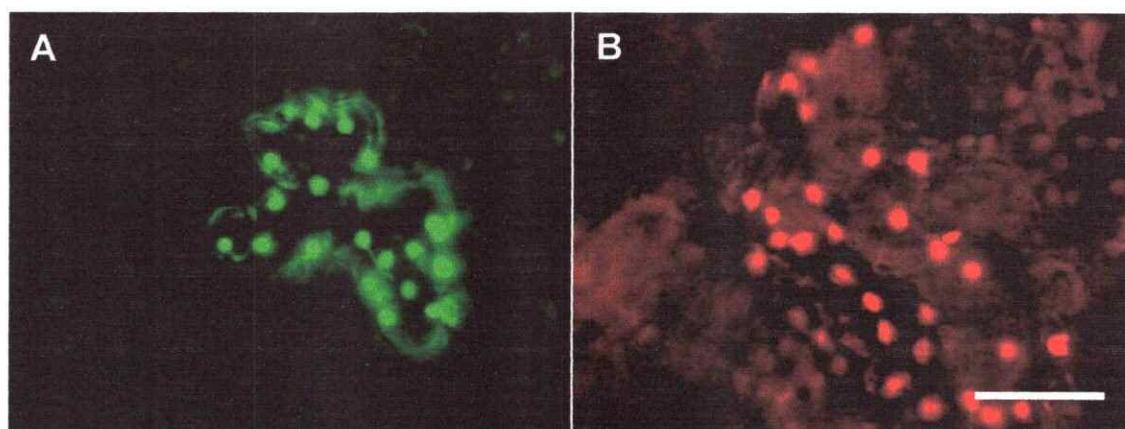
**Figura 13. Digestiones para chequear los vectores binarios pDUA2 y pDUA3.** Carril 1, vector binario pDUA2. Carril 2, vector binario pDUA3. Los vectores binarios pDUA2 y pDUA3 fueron digeridos con *SacI* y *BamHI*, liberándose dos fragmentos, uno de aproximadamente 13 Kb y otro de aproximadamente 1 Kb. Este último, corresponde a la fusión RecA-RFP (carril 1) y RecA-YFP (carril 2).



**Figura 14. Vectores pDUA2 y pDUA3.** A. Vector binario pDUA2 que lleva la fusión RecA RFP y B. Vector binario pDUA3 que lleva la fusión de RecA YFP. En ambos vectores la expresión de las fusiones está bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S y poseen el gen NPTII, que le confiere resistencia a kanamicina.

Con el propósito de chequear la capacidad de los vectores binarios (Figura 14) para marcar plastidios *in vivo*, se infiltraron hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* ecotipo Xanthi NN), como se describe en Materiales y Métodos, con las cepas de *Agrobacterium* GV3101 transformadas con los vectores pDUA2 y pDUA3 (Figura 14). Después de 4 días de la infiltración, se escindió un trozo de tejido infiltrado con cada constructo. Los tejidos fueron montados en agua para ser observados por microscopía de epifluorescencia.

En la Figura 15A se muestra tejido de epidermis de tabaco infiltrado con *Agrobacterium* que lleva el plasmidio pDUA3, donde se observan plastidios de color amarillo con forma circular y tamaño de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  y en 15B, infiltración con *Agrobacterium* que lleva el vector pDUA2, donde se observan plastidios de color rojo de forma circular y tamaño de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . En la Figura 15A, además, es posible visualizar que algunos plastidios están unidos por prolongaciones de las membranas tilacoidales, llamadas estrómulos las cuales han sido descritas por Kohler y Hanson (2000) y Kohler y cols. (1997).

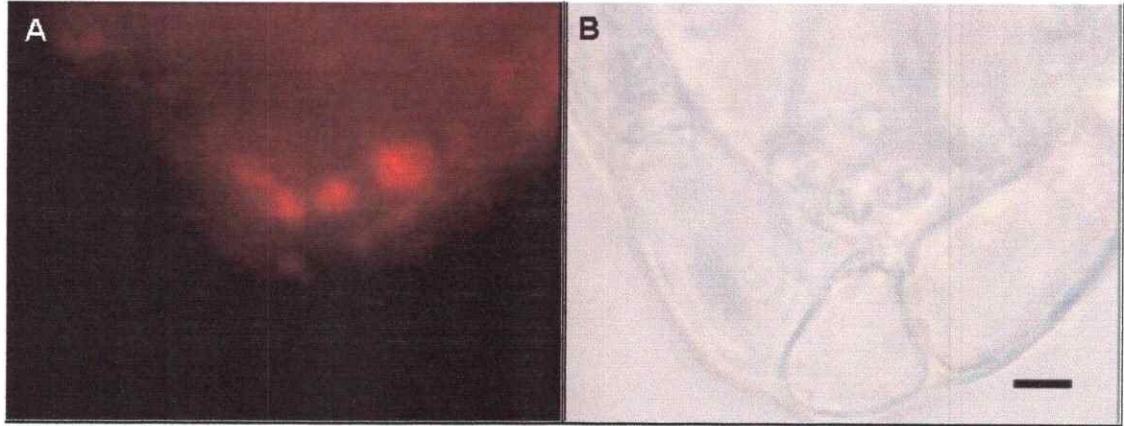


**Figura 15. Infiltración en hojas de tabaco con *Agrobacterium* que llevan los vectores binarios pDUA2 y pDUA3.** En **A**, células de la epidermis de hoja de tabaco infiltradas con el vector binario pDUA3 y en **B**, células de la epidermis de hoja de tabaco infiltradas con el vector binario pDUA2. **A** y **B** muestran imágenes de microscopía de epifluorescencia, donde es posible ver plastidios marcados con las proteínas fluorescentes amarilla (**A**) y roja (**B**). La flecha blanca indica los estrómulos, estructuras membranosas que conectan a los plastidios. La barra de tamaño representa 50  $\mu\text{m}$ .

Con los vectores pDUA2 y pDUA3 probados para marcar plastidios, se procedió a la obtención de líneas transgénicas estables de *Arabidopsis* que acumulen RFP o YFP en sus plastidios. Para ello, 14 plantas de *Arabidopsis thaliana* de 6 semanas fueron transformadas por el método floral dip con *Agrobacterium* que llevan cada vector binario (pDUA2 y pDUA3). Al cabo de, aproximadamente 1 mes, las semillas ( $T_1$ ) fueron recolectadas y se seleccionaron las transformantes mediante germinación en medio con kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . En la Tabla 5 se muestran los datos de 9 de las 24 plantas transformadas: peso de semillas recolectadas y eficiencia de transformación de las líneas que han sido seleccionadas. El resto de las semillas de las plantas transformadas no fueron analizadas. Las semillas probadas muestran una eficiencia de transformación

que fluctúa entre los 0,15 y 0,8 % (Tabla 5).

Las plántulas resistentes a kanamicina fueron trasplantadas a tierra y las semillas de éstas se recolectaron después de 5 semanas. Estas semillas ( $T_2$ ) fueron nuevamente germinadas en medio de selección. Debido a que la resistencia a kanamicina que le confiere el T-DNA a las plantas transgénicas es un alelo dominante, es posible estimar por un análisis de segregación del fenotipo de resistencia a kanamicina ( $kan^R$ ) y el número de inserciones de T-DNA. En la Tabla 6 se muestran las proporciones de segregación del fenotipo  $kan^R$  de cada una de las líneas analizadas. La línea DU2M2, que se muestra en la Figura 16, se utilizó para llevar a cabo los experimentos de visualización de la posición de los amiloplastos en las células de la Columella de la raíz, debido a que muestra una segregación de 3:1 del fenotipo de resistencia a kanamicina, indicando que posee sólo una inserción de T-DNA. Por otro lado, esta línea transgénica presenta alta fluorescencia. En la Figura 16 podemos observar que la línea DU2M2 posee los plastidios de las células de la caliptra marcados con RFP (Figura 16A) lo que se corrobora con la imagen de microscopía Nomarski (Figura 16B), donde es posible observar los plastidios que corresponden a la fluorescencia observada en la Figura 16A.



**Figura 16.** Fluorescencia de RFP acumulada en plastidios ubicados en las células de la caliptra de plantas de la línea transgénica DU2M2. Células de la caliptra de planta de la línea transgénica DU2M2. **A**, imagen de microscopía de epifluorescencia. **B**, imagen de microscopía Nomarski. La barra de tamaño representa 5 µm

**Tabla 5. Eficiencia de transformación de *Arabidopsis thaliana***

Vector	Líneas testeadas <sup>a</sup>	Semillas sembradas en medio de selección <sup>b</sup>	N° semillas resistentes	Eficiencia de transformación <sup>c</sup>
pDUA2	DU2I	750	6	0,8
pDUA2	DU2K	1300	2	0,15
pDUA2	DU2L	1250	3	0,24
pDUA2	DU2M	1450	5	0,35
pDUA2	DU2N	850	2	0,24
pDUA3	DU3A	3375	8	0,24
pDUA3	DU3I	1465	5	0,34
pDUA3	DU3J	1810	3	0,17
pDUA3	DU3M	4610	8	0,17

<sup>a</sup>: Las semillas de las plantas transformadas con el método floral dip fueron esterilizadas y sembradas en medio ½XMS kanamicina 50 µg/ml como se describió en 2.1.1.

<sup>b</sup>: La conversión de gramos de semillas a N° de semillas está explicada en 2.12.

<sup>c</sup>: Cálculo de la eficiencia de transformación está detallado en 2.12

**Tabla 6. Análisis de segregación del transgen en la generación T<sub>2</sub>**

Líneas transgénicas parentales (generación T <sub>1</sub> )	N° plantas resistentes a 50 µg/ml kanamicina	N° plantas sensibles a 50 µg/ml kanamicina	Razón resistentes/sensibles	N° de inserciones de T-DNA estimadas
DU2A3 <sup>a</sup>	17	7	2,4:1	>1
DU2A5 <sup>a</sup>	300	110	2,7:1	1
DU2K2 <sup>a</sup>	41	5	8,2:1	>1
DU2K6 <sup>a</sup>	45	16	2,9:1	1
DU2M2 <sup>a,c</sup>	159	52	3,1:1	1
DU3A3 <sup>b</sup>	32	1	32:1	>1
DU3A6 <sup>b</sup>	111	38	2,9:1	1
DU3A7 <sup>b</sup>	16	2	8,1:1	>1
DU3M1 <sup>b</sup>	63	8	7,9:1	>1
DU3M5 <sup>b</sup>	16	5	3,2:1	1

<sup>a</sup>: Plantas transgénicas con los plastidios marcados con proteína fluorescente roja.

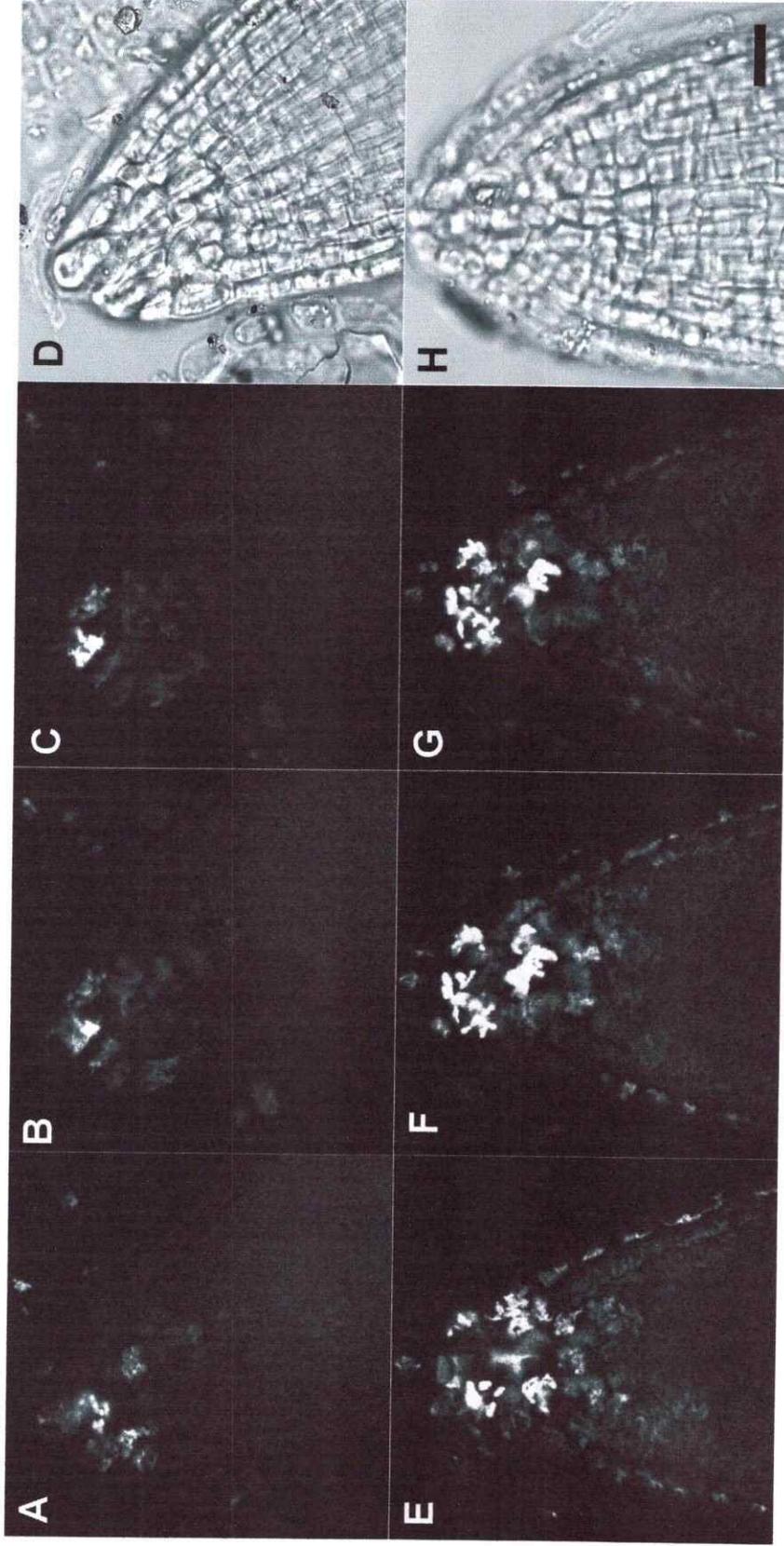
<sup>b</sup>: Plantas transgénicas con los plastidios marcados con proteína fluorescente amarilla.

<sup>c</sup>: Línea con una inserción de T-DNA que fue utilizada para estudiar posición de los amiloplastos en las células de la Columnela de la raíz.

Finalmente, con el objetivo de analizar la posición de los amiloplastos en la caliptra de la raíz, en presencia de Thpg, mediante fluorescencia, semillas de la línea transgénica DU2M2 (Figura 16, Tabla 6) fueron germinadas en medio ½X MS agar suplementado con sacarosa 1 % y kanamicina 50 µg/ml. Después de 7 días las plántulas fueron tratadas con Thpg 0,5 µM y puestas en placas de ½X MS agar suplementadas con sacarosa 1 % a 137° respecto del vector de gravedad en oscuridad por 30 min, y fijadas como se describe en Materiales y Métodos (2.18). En este experimento se utilizó un ángulo de 137° debido a que en un reciente trabajo de Plieth y Trewavas (2002), se ha mostrado que con este ángulo se obtiene una mejor respuesta gravitrópica.

Las plantas fijadas fueron observadas por microscopía confocal para visualizar los amiloplastos de la caliptra de la raíz y determinar si Thpg produce alguna alteración en la posición de estos luego de ser sometidos a un estímulo de gravedad. Estos resultados fueron contrastados con plantas tratadas con una solución de DMSO 0,05 % y fijadas 30 min post tratamiento (iguales condiciones que para plantas tratadas con Thpg). En la Figura 17 podemos observar células de la caliptra de la raíz en distintos planos ópticos de plantas con ambos tratamientos (Figura 17A-17C, 17E-17G) y su correspondiente imagen de transmisión, la que nos permite orientarnos en la posición de la raíz observada (17D y 17H). Aquí se visualiza la diferencia del nivel de fluorescencia de ambas plantas, lo que puede deberse a la falta de homocigocis de la línea transgénica, lo que no permite hacer comparaciones respecto de la posición de los

amiloplastos entre plantas tratadas con Thpg (17A-17C) y no tratadas (17D-17F). Un problema adicional que presenta la técnica es la incapacidad de ésta para permitir la visualización del contorno celular, lo que aumenta la dificultad para el análisis de la posición de plastidios. Sin embargo, estos problemas son solucionables y en el futuro, cuando contemos con líneas transgénicas homocigotas y solucionemos el problema de visualización de contorno celular con técnicas como tinción con yoduro de propidio (IP) o calcofluor, estas plantas transgénicas nos permitirán la corroboración de los resultados preliminares obtenidos con tinción de PAS a cerca de la alteración de la posición de los amiloplastos de la caliptra de la raíz en presencia de Thpg y además, serán una herramienta poderosa para el desarrollo de estudios futuros relacionados con el análisis de la sedimentación de amiloplastos *in vivo* frente a un estímulo gravitatorio.



**Figura 17. Efecto de Thpg sobre la posición de los amiloplastos en células de la Columella de raíces de plantas de la línea transgénica DU2M2.** Imágenes de microscopía confocal y de transmisión de plántulas de 7 días de la línea DU2M2 tratadas previamente con 0,5  $\mu\text{M}$  de Thpg (A-D) y con solución control DMSO 0,05 % (E-H) y crecidas a 137° durante 30 min. A-C y E-G, corresponden a cortes ópticos consecutivos de microscopía confocal. D y H, corresponden a imágenes de microscopía de transmisión de las imágenes observadas por microscopía confocal. Los experimentos fueron hechos en duplicado y la barra representa 25  $\mu\text{M}$ .

## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 Thpg afecta la respuesta gravitrópica en *Arabidopsis thaliana*

Los resultados demuestran que thapsigargina, un inhibidor específico de  $\text{Ca}^{+2}$  ATPasas tipo SERCA altera la respuesta gravitrópica en *Arabidopsis*, disminuyendo la curvatura de la raíz después de inducir un cambio en el vector de gravedad respecto al crecimiento de sus raíces. Las concentraciones usadas para estos experimentos (0,1-5  $\mu\text{M}$ ) nos permiten hipotetizar que la inhibición de la respuesta gravitrópica por Thpg es específica y estaría afectando directamente a un blanco intracelular responsable de esta respuesta. La inhibición de la gravirespuesta se genera a concentraciones de Thpg entre 0,1 y 0,5  $\mu\text{M}$ , sin embargo, a concentraciones superiores como 1 y 5  $\mu\text{M}$  este efecto tiende a desaparecer. En la literatura se ha descrito que a concentraciones superiores a 5  $\mu\text{M}$  este compuesto se une inespecíficamente a canales de  $\text{Ca}^{+2}$  (Treiman y cols. 1998)

Por otra parte, encontramos que el crecimiento de las raíces no se ve alterado por ninguna de las concentraciones probadas de Thpg, lo que indica que Thpg no ejerce un efecto tóxico sobre la raíz. Es necesario señalar que estos resultados además nos proporcionan una evidencia de la existencia de bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  en *Arabidopsis thaliana* inhibibles por Thpg que aún no se han

caracterizado, sin embargo para corroborarlo, sería necesario poder establecer que Thpg está provocando alteraciones en los niveles de  $Ca^{+2}$  citosólico en células de los tejidos responsables de la respuesta gravitrópica como la Columella y la zona de elongación distal

Por otro lado, el inhibidor ACP, otro inhibidor específico de  $Ca^{+2}$  ATPasas tipo SERCA, no tiene efecto sobre la curvatura de la raíz en Arabidopsis, incluso a concentraciones tan altas como 20  $\mu$ M. Dicha concentración fue probada anteriormente por Sievers y Busch (1992), quienes si observaron inhibición total de la curvatura de la raíz en berro. Esta diferencia entre berro y Arabidopsis, que pertenecen a la misma familia taxonómica de las *Brassicaceas*, puede deberse a las formas de crecimiento de cada tipo de especie. Por ejemplo, el berro necesita gran humedad y habitualmente es germinado en agua, características que no son necesarias en Arabidopsis

Por último, es importante señalar que los efectos gravitrópicos observados en este seminario de título, no descartan un efecto hidrotrópico sobre las raíces, ya que bajo las condiciones del bioensayo se podrían generar gradientes de agua dentro de las placas de medio y así activar los mecanismos por los cuales se genera el hidrotropismo. El hidrotropismo es otro proceso que guía y redirige el crecimiento de raíces en plantas. Se ha observado que las raíces son capaces de obviar la gravedad para acceder al agua mediante la degradación de almidón en las células de la Columella (Takahashi y cols. 2003). Experimentalmente es

difícil separa ambos tropismos, que en los sustratos o soportes donde se crecen plantas, si estos tienen humedad, siempre se generará un gradiente hídrico. Pese a esto, los efectos hidrotropicos estarían ocurriendo paralelamente tanto para plantas tratadas y no tratadas con los inhibidores, por lo que el efecto hidrotropico actuaría como una variable controlada dentro de nuestro bioensayo.

#### **4.2 Thpg se une a estructuras subcelulares y actúa en los tejidos responsables de la respuesta gravitropica**

En la literatura se ha descrito que posiblemente existen bombas  $Ca^{+2}$  en el retículo endoplasmático y en el núcleo de células vegetales, sensibles a Thpg (Trewavas y cols. Datos no publicados), además, se ha mostrado recientemente la presencia de  $Ca^{+2}$  ATPasas en aparato de Golgi, que también es sensible a Thpg (Ordenes y cols. 2002). Sin embargo, en Arabidopsis los estudios y caracterizaciones de bombas de  $Ca^{+2}$  que se han reportado sólo han mostrado inhibición por ACP (Sze y cols. 2000). Por otro lado, no es clara la participación de las bombas caracterizadas en procesos fisiológicos determinados (Geisler y cols. 2000), como en mamíferos, donde es conocido que las  $Ca^{+2}$  ATPasas presentes en el retículo sarcoplasmático del músculo son responsables de provocar la relajación de éste (Ganong 2000).

En este trabajo se analizó farmacológicamente la participación de bombas de

Ca<sup>+2</sup> en la respuesta gravitrópica. Se determinó que Thpg es capaz de inhibir la respuesta gravitrópica, además, se mostró que este compuesto se une a estructuras subcelulares, posiblemente el retículo endoplasmático y otros organelos vesiculados como aparato de Golgi, mitocondrias o plastidios de pequeño tamaño. Esto se deduce de la distribución y el tamaño de la marca fluorescente que da Thpg unido al fluoróforo BODIPY. En este trabajo, BThpg, es usado por primera vez en plantas, aunque se ha reportado su uso para determinar la localización subcelular en bombas de Ca<sup>+2</sup> de animales (Simpson y Russell. 1997). Para este trabajo es relevante que BThpg se una a los tejidos que participan en la generación y establecimiento de la respuesta gravitrópica. Estas son: la zona de elongación distal, responsable de la elongación diferencial de la raíz, que genera la curvatura de ésta en el sentido del campo gravitatorio y de la caliptra, donde se encuentran las células especializadas encargadas de sensar la gravedad por los amiloplastos. Sin embargo, también se observa marca en otros tejidos como los pelos radiculares y las células que se escaman de la punta de la raíz, las cuales no se conoce que tengan una participación en la respuesta gravitrópica.

En el apéndice 1 se detalla un análisis de la marcación de BThpg en otros tejidos de Arabidopsis y en otros sistemas vegetales como tabaco y cebolla.

### 4.3 El rol de miosinas en la respuesta gravitrópica

Cuando se usó BDM (1 mM), un inhibidor de la actividad ATPásica de las miosinas, para ver su efecto sobre la respuesta gravitrópica, se observó también una inhibición en el crecimiento de las raíces, por lo que no es posible decir con estos antecedentes que las miosinas participan en la respuesta gravitrópica ya que esta disminución en el crecimiento nos indica que posiblemente este inhibidor tiene un efecto inespecífico sobre el tejido, alterando otros procesos celulares que no conocemos. Esto puede ser debido a que el mecanismo de acción de este compuesto es inhibiendo la actividad ATPásica de las miosinas, y por esto podría tener un grado de inespecificidad, afectando otras proteínas con actividad ATPásica dentro de la célula. Sin embargo, existen reportes donde se usa este inhibidor en células vegetales a concentraciones entre 1 a 3 mM (Baskin y Bivens 1995, Volkmann y cols. 1999) y por otro lado, se ha reportado, que este inhibidor actuaría específicamente sobre miosinas del tipo V y sobre miosinas no musculares (Ostap 2002).

Otra explicación para estos resultados es que las miosinas tienen participación en muchos procesos celulares tales como movimiento de vesículas y organelos como retículo endoplasmático y Golgi (Liebe y Quader 1994, Nebenführ y cols. 1999). Específicamente, es posible pensar, que al alterar el tránsito de las vesículas de Golgi, inhibiendo la actividad ATPásica de las proteínas motoras que le permiten moverse dentro de la célula, se genere una inhibición del

crecimiento, ya que es conocido que Golgi participa activamente en la síntesis de pared celular en células en elongación (Handford y cols, 2003).

#### **4.4 Posibles mecanismos en los que participarían bombas de $\text{Ca}^{+2}$ en la respuesta gravitrópica**

Algunos estudios sobre el mecanismo de la generación y establecimiento de la respuesta gravitrópica hablan de la participación de retículo endoplasmático y específicamente de la activación de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  ubicados en el retículo que está en la zona basal de las células de la Columella (Belyvskaya 1996, Zheng y Staehelin 2001).

En la Figura 18, que corresponde a una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una célula de la Columella, se observa la polaridad de este tipo celular, donde se ve al núcleo ubicado apicalmente, los amiloplastos ubicados basalmente y el retículo endoplasmático ubicado en posición basolateral dentro de estas células. Esta disposición espacial del retículo endoplasmático sugiere que la sedimentación de los amiloplastos producto de un estímulo gravitrópico, puede aplastar al retículo y producto de esta tensión mecánica generarse apertura de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  que se ubican en éste organelo y así iniciar la cascada de señales de transducción del gravitropismo.

Plieth y Trewavas (2002) han mostrado que después de la inducción de un estímulo gravitatorio sobre la planta, en la raíz, se generan pulsos de  $\text{Ca}^{+2}$  que

posiblemente actuarían como activadores de respuestas moleculares que generarían la curvatura de la raíz.



**Figura 18.** Células de la Columella de raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) donada por Ana Mercado (2002). N, núcleo. ER, retículo endoplasmático. a, amiloplastos.

Por otro lado, existe evidencia de la participación del citoesqueleto de actina en la sedimentación de los amiloplastos, en células de la caliptra de la raíz de Maíz, donde usando citocalasina D, un desestabilizador del citoesqueleto de actina, se observó que los amiloplastos sedimentaban con mayor velocidad (Yoder y cols. 2001). Los autores de este trabajo propusieron que actina forma una malla que rodea y soporta los amiloplastos por la cual se desplazarían lentamente. Otro antecedente interesante es que en el alga *Vallisneria*, Thpg ha sido capaz de desarmar el citoesqueleto de actina en células del mesófilo (Liebe y Menzel 1995).

Con todos estos antecedentes y nuestros resultados es posible pensar que las putativas bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  de *Arabidopsis* que son inhibidas por Thpg podrían estar ubicadas en el retículo endoplasmático, debido a que los resultados presentados en este trabajo usando BThpg sugieren a éste organelo como blanco intracelular. Sin embargo, se ha reportado que en arveja existen  $\text{Ca}^{+2}$  ATPasas ubicadas en Golgi que son inhibidas por Thpg (Ordenes y cols. 2002), lo que apoyaría a este organelo como el posible lugar intracelular de ubicación de estas bombas. Pese a esto, al observar la distribución espacial de los organelos en células de la *Columella* (Figura 18), vemos que existe gran cantidad de retículo endoplasmático ubicado cerca de los amiloplastos y si pensamos que estas putativas bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  estarían modulando los pulsos de  $\text{Ca}^{+2}$  generados por el mismo retículo endoplasmático, la cercanía física de ambas proteínas, canales y bombas de  $\text{Ca}^{+2}$ , es necesaria para que esta señal de  $\text{Ca}^{+2}$  sea específica.

Dos posibles mecanismos en los que participaría las bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  inhibidas por Thpg podrían ser:

1. Se ha mostrado que Thpg es capaz de desestabilizar el citoesqueleto de actina en el alga *Chara* (Liebe y Menzel 1995), por lo que se puede pensar que en *Arabidopsis* ocurre algo similar, que Thpg desestabilice transientemente la malla de actina que soporta y hace más lenta la sedimentación de los amiloplastos. Esto es congruente con los resultados preliminares obtenidos en la visualización de amiloplastos de la caliptra de

la raíz mediante la tinción de PAS de plantas tratadas con Thpg; después de 30 min de haber inducido un estímulo de gravedad a 180°, donde se observa que a diferencia del control los amiloplastos de la cuarta fila de células de la Columella están ubicados más apicalmente dentro de la célula (Figura 12).

2. Es posible que estas bombas sean responsables de secuestrar el  $\text{Ca}^{+2}$  liberado por los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  ubicados en el retículo endoplasmático, que se activan cuando los amiloplastos, al sedimentar frente a un estímulo de gravedad, lo aplastan y la planta no sea capaz de seguir sensando la gravedad al inhibir estas bombas, debido a que se pierde la capacidad de modular la amplitud y duración de los pulsos citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{+2}$ . Esto tiene sentido por los antecedente que hablan de que en microgravedad (campo inducido artificialmente o en el espacio) las células de la Columella tiene altas concentraciones citoplasmáticas de  $\text{Ca}^{+2}$  (Moore 1986)

Es posible también, que ambas hipótesis se complementen, o sea, Thpg genere una mayor velocidad de sedimentación de amiloplastos y a su vez, el aumento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico que generaría este inhibidor, impidan a la célula ver los pulsos de  $\text{Ca}^{+2}$  que se generan con la sedimentación, lo que se traduciría en una inhibición transiente de la respuesta gravitrópica, ya que es posible que después de un tiempo otras bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  que no han sido

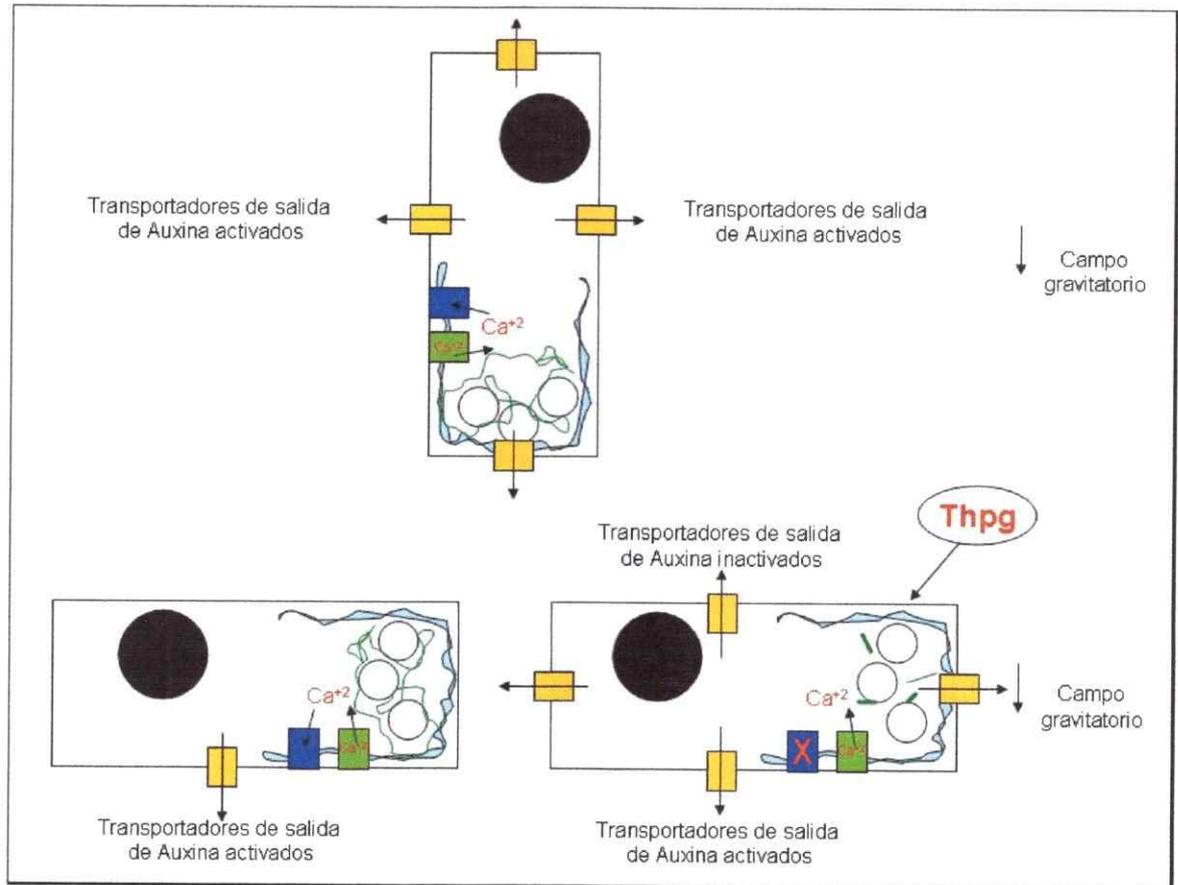
afectadas por el inhibidor o intercambiadores  $H^+$ /  $Ca^{+2}$  puedan extraer el  $Ca^{+2}$  citosólico o que se genere síntesis *de novo* de estas proteínas y entonces se reanude el proceso celular.

En síntesis, el putativo rol de la posible bomba de  $Ca^{+2}$  que es sensible a Thpg y cuya inhibición genera una disminución en la curvatura de la raíz en *Arabidopsis thaliana*, podría ser modular los pulsos de  $Ca^{+2}$  generados por el retículo endoplasmático, luego de la sedimentación de los amiloplastos. Esta señal de calcio podría estar generando activación o inhibición tanto de canales de  $Ca^{+2}$  como de transportadores de salida de auxina o activando una cascada de transducción que lleve a la síntesis de proteínas necesarias para iniciar el transporte diferencial de  $Ca^{+2}$  y auxina, los que son responsables de la generación de los flujos diferenciales de ambos compuestos hacia la zona de elongación distal, cuya función es provocar una elongación diferencial de este tejido para producir finalmente la curvatura de la raíz hacia el campo gravitatorio.

Es conocido que el transporte diferencial de auxina comienza en las células de la Columella de la raíz, mediado por transportadores de salida de auxina como PIN3, el cual es un transportador ubicado polarmente en la zona lateral de estos tipos celulares bajo un estímulo de gravedad (Friml y cols. 2002).

En la Figura 19 se muestra un esquema que muestra el posible rol de bombas de  $Ca^{+2}$  y miosinas en el proceso inicial de la generación de la respuesta

gravitrópica. En este modelo, se presenta la situación normal de una célula de la Columella adaptada a un campo gravitatorio, la situación normal de este tipo celular frente a la inducción de un estímulo de gravedad y finalmente la situación de estas células sometidas a un campo gravitacional en presencia de Thpg. Aquí se propone que Thpg estaría inactivando bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  ubicadas en el retículo endoplasmático y que esta inactivación provocaría una desestabilización del citoesqueleto de actina y a su vez impediría el inicio del flujo diferencial de auxina.



**Figura 19. Participación de bombas de  $Ca^{+2}$  en la generación de la respuesta gravitrópica en células de la Columella de *Arabidopsis thaliana*.** Círculo negro, núcleo. Círculo blanco, amiloplasto. Caja amarilla, transportadores de salida de auxina. Caja verde, canales de  $Ca^{+2}$ . Caja azul, bombas de  $Ca^{+2}$ . Líneas verdes, actina. Líneas celestes, retículo endoplasmático. Arriba se muestra un esquema de la situación citosólica de una célula de la Columella adaptada a un campo gravitatorio. Abajo se muestra como cambia la situación citosólica de una célula de la Columella frente a la inducción de un estímulo gravitatorio comparada con la situación citosólica de una célula de la Columella frente a la inducción de un estímulo gravitatorio en presencia de Thpg.

## 5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo es claro que Thpg, inhibe la respuesta gravitrópica en plantas de *Arabidopsis thaliana* a concentraciones tan bajas como 0,1 y 0,5  $\mu\text{M}$ . En contraste, ACP no es capaz de inhibir la respuesta gravitrópica incluso a concentraciones tan altas como 20  $\mu\text{M}$ .

El inhibidor de la actividad ATPásica de las miosinas, BDM, inhibe la respuesta gravitrópica, pero con una inhibición paralela del crecimiento, lo que hace pensar que el efecto sobre la respuesta gravitrópica que se observa es producto de un efecto inespecífico sobre la planta.

Por otro lado hemos mostrado preliminarmente que Thpg altera la posición de los amiloplastos en la caliptra de la raíz (Figura 12). Desgraciadamente, las plantas transgénicas construidas en este trabajo que poseen los plastidios marcados con EYFP y DsRed2, no permitieron obtener resultados concluyentes respecto del efecto de Thpg sobre la sedimentación de los amiloplastos en la caliptra de la raíz, por no contar con líneas homocigotas para el transgen, lo que hace difícil obtener resultados comparables, producto de la heterogeneidad de la fluorescencia observable. Sin embargo, estos experimentos pueden ser repetidos en el futuro, cuando se cuente con líneas homocigotas para la

marcación fluorescente. Así mismo, otro problema que presentan las plantas transgénicas, es que no se cuenta en el laboratorio con un fluoróforo o técnica disponible para observar contorno celular, ya sea pared o membrana plasmática, por lo que es importante considerar la solución de este problema antes de repetir estos experimentos. Sin embargo, intentamos marcar el contorno celular de plantas fijadas con yoduro de propidio (IP), que se sabe, marca el contorno celular en plantas vivas. Sin embargo, comprobamos que el IP entra y tiñe el citoplasma y no permite visualizar la fluorescencia de la DsRed2 en los amiloplastos de la caliptra de la raíz (datos no mostrados).

Como un punto adicional, demostramos por primera vez que Thpg posee sitios de unión subcelular en *Arabidopsis thaliana*. Además, observamos que en *Arabidopsis*, estos blancos subcelulares se ubican en los tejidos responsables de la respuesta gravitropica como son la zona de elongación distal y la punta de la raíz, además de otros tejidos como los pelos radiculares.

Finalmente, este trabajo demostró por primera vez en *Arabidopsis* que existen sitios de localización celular para Thpg, un inhibidor de  $\text{Ca}^{+2}$  ATPasas tipo SERCA y que este compuesto altera la respuesta gravitropica inhibiendo la curvatura de la raíz a concentraciones fisiológicas sin alterar el crecimiento de éstas. Además se mostró preliminarmente que Thpg es capaz de alterar la posición de los amiloplastos en la caliptra de la raíz después de someter a las plantas a un estímulo de gravedad, sugiriendo que su blanco subcelular estaría

involucrado en el mecanismo por el cual las raíces responden a la gravedad.

## 6 PROYECCIONES BIOTECNOLÓGICAS

El gravitropismo es un proceso que controla el crecimiento de las plantas. En el caso de las raíces, el gravitropismo les permite crecer dentro del suelo y así acceder a las fuentes de nutrientes, minerales y agua disponibles en él.

El conocimiento a cerca de los mecanismos que controlan o regulan el crecimiento vegetal, son la base para poder desarrollar en el futuro plantas con mejor rendimiento de producción de biomasa, en especial, es esencial avanzar en el conocimiento de procesos que faciliten a las plantas el acceso a alimento.

Por otro lado, el conocer los mecanismos por los que se regula la respuesta a la gravedad, tiene relevancia si se considera que en el futuro, en el planeta Tierra no habrá suficiente espacio para el cultivo de alimento de origen vegetal, que permita alimentar a la gran población mundial que por ese entonces habrá aumentado explosivamente y habrá ocupado las tierras cultivables para asentarse. Con esto, cobrará gran importancia el poder encontrar nuevos lugares para el cultivo de alimentos de origen vegetal y una posibilidad es la colonización de otros planetas o lunas, donde las condiciones medioambientales difieren radicalmente de las de la Tierra. Para poder en el futuro cultivar alimentos en otros planetas o lunas, es imperativo conocer bien los mecanismos

que modulan el crecimiento vegetal, en respuesta a estímulos del medio ambiente, como la luz, la temperatura, la gravedad, etc., para poder modificarlos o adaptarlos a las nuevas condiciones presentes en otros lugares del Universo.

## 7 REFERENCIAS

- Akashi K, Grandjean O y Small I. (1998). Potential dual targeting of an Arabidopsis archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplast. *FEBS Letters* 431: 39-44
- Baskin T y Bivens N. (1995). Stimulation of radial expansion in Arabidopsis roots by inhibitors of actomyosin and vesicle secretion but not by various inhibitors of metabolism. *Planta*. 197: 514-521.
- Belyvskaya N. (1996). Calcium and graviperception in plants: inhibitors analysis. *International Review of Cytology*. 168: 123-185
- Bennett M, Marchant A, Green H, May S, Ward S, Millner P, Walker A, Schulz B y Feldmann K. (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*. 273: 948-950
- Bruno C, Alvarez R, Sanchez C, Kalibus B y Meisel L. (2002). Interacción entre cloroplastos y actina es mediada por proteínas tipo actina. XVI Reunion Anual Sociedad de Biología Celular de Chile.
- Clough S y Bent A. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 16: 735-43.
- Collings D, Zsuppan G, Allen N y Blancaflor E. (2001). Demonstration of prominent actin filaments in the root Columella. *Planta*. 212: 392-403.
- Chen H, Nelson R y Sherwood J. (1994). Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotechniques*. 16: 664-8, 670.
- Chen R, Rossen E y Masson P. (1999). Gravitropism in higher plants. *Plant Physiology*. 120: 343-350.
- Driss-Ecole D, Vassy J, Rembur J, Guivarc'h A, Prouteau M, Dewitte W y Perbal G.. (2000). Immunolocalization of actin in root statocytes of *Lens culinaris* L. *Journal of Experimental Botany*. 51: 521-528.

- Evans D y Williams L. (1998). P-type calcium ATPases in higher plants-biochemical, molecular and functional properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1376: 1-25
- Evans D, Theodoulou F, Williamson I y Boyce J. (1994). The calcium pumps of plant cell membranes. *Symposium of The Society for Experimental Biology*.48: 43-59
- Friml J, Wisniewska J, Benková E, Mendgen K y Palme K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature*. 415: 806-809.
- Ganong W. (2000). Tejido excitable: músculo. *Fisiología Médica*. Sección II, capítulo 3, pp 71-92. Manual Moderno S.A.
- Geisler M, Axelsen K, Harper J y Palmgren M. (2000). Molecular aspects of higher plant P-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 52-78.
- Gelvin S. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annuals Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 223-256
- Guisinger M y Kiss J. (1999). The influence of microgravity and spaceflight on Columella cell ultrastructure in starch-deficient mutants of Arabidopsis. *American Journal of Botany*. 86(10): 1357-1366
- Haley A, Russel A, Wood N, Allan A, Knight M, Campbell A y Trewavas A. (1995). Effects of mechanical signaling on plant cell cytosolic calcium. *Proceedings of National Academy in Science*. 92: 4124-4128
- Handford MG, Baldwin TC, Goubet F, Prime TA, Miles J, Yu X y Dupree P. (2003). *Planta*. July 3
- Haseloff J, Siemering K, Prasher D, Hodge S.(1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 2122-7.
- Inoue H, Nojima H y Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96: 23-8.
- Kandasamy M y Megher R. (1999). Actin-organelle interaction: association with chloroplast in Arabidopsis leaf mesophyll cells. *Cell Motil Cytoskeleton*.44(2):110-8

- Kato N, Pontier D y Lam E. (2002). Spectral profiling for the simultaneous observation of four distinct fluorescent proteins and detection of protein-protein interaction via fluorescent resonance energy transfer in tobacco leaf nuclei. *Plant Physiology*. 129: 931-942
- Kiss J, Wright B y Caspar T. (1996). Gravitropism in root of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*. 97: 237-244
- Kohler R y Hanson M. (2000). Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated. *Journal of Cell of Science*. 113: 81-89
- Kohler R, Cao J, Zipfel W, Webb W y Hanson M. (1997). Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science*. 27: 2039-2042
- Liebe S y Quader H. (1994). Myosin in onion (*Allium cepa*) bulb scale epidermal cells: involvement in dynamics of organelles and endoplasmic reticulum. *Physiologia Plantarum*. 90: 114-124
- Liebe S y Menzel D. (1995). Actomyosin-based motility of endoplasmic reticulum and chloroplasts in *Vallisneria* mesophyll cells. *Biology of Cell*. 85: 207-222
- Lillie R y Fulmer H. (1976) Histopatologic technic and practical histochemistry. 4° ED. Mc Graw-Hill, New York
- MacCleery S y Kiss J. (1999). Plastid sedimentation kinetics in roots of wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 120: 183-192
- Mathur J, Mathur N y Hülskamp M. (2002). Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. *Plant Physiology*. 128: 1031-1045
- Mendenhall W y Sincich T. (1990) Pruebas de hipótesis. Probabilidad y Estadística para Ingeniería en Ciencias, Capítulo IX, pp 421-493. Prentice- Hall, Hispano Americana.
- Moore R, Fondren M, Koon C y Wang C. (1986). The influence of gravity on the formation of amyloplasts in *Columella* cells of *Zea mays L.* *Plant Physiology*. 82: 867-868.
- Moore R. (1989). Root graviresponsiveness and cellular differentiation in wild-type and a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*.

64: 271-277

- Nebenführ A, Gallagher L, Dunahay T, Frohlick J, Mazurkiewicz M, Meehl J y Staehelin A. (1999). Stop-and-go movements of Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiology*. 121: 1127-1141
- Oparka K y Read N. (1994). The use of fluorescent probes for studies of living plant cell. ED. By Harris N y Oparka K. *Plant cell biology a practical approach. The practical approach series.*
- Ordenes V, Reyes F, Wolff D y Orellana A. (2002). A thapsigargin-sensitive  $Ca^{2+}$  pump is present in the pea Golgi apparatus membrane. *Plant Physiology*. 129: 1820-1828.
- Ostap E. (2002). 2, 3-Butanedione Monoxime as a myosin inhibitor. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 23: 305-308
- Plieth C y Trewavas A. (2002). Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. *Plant Physiology*. 129: 786-796
- Sack F. (1991). Plant gravity sensing. *International Review of Cytology*. 127: 193-252
- Sack F. (1997). Plastids and gravitropic sensing. *Planta*. 203: S63-S68
- Sanders D, Brounlee C y Harper J. (1999). Communicating with calcium. *The Plant Cell*. 11:691-706.
- Sato Y, Wada M y Kadota A. (2001). External  $Ca^{2+}$  is essential for chloroplast movement induced by mechanical stimulation but not by light stimulation. *Plant Physiology*. 127: 497-504.
- Sievers A y Busch M. (1992). An inhibitor of the  $Ca^{2+}$ -ATPases in the sarcoplasmic and endoplasmic reticula inhibits transduction of the gravity stimulus in cress roots. *Planta*. ;188(4):619-22.
- Simpson P y Russell J. (1997). Role of sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum  $Ca^{2+}$  ATPases in mediating  $Ca^{2+}$  waves and local  $Ca^{2+}$  release microdomains in cultured glia. *Biochemical Journal*. 325: 239-247
- Sze H, Liang F, Hwang I. (2000). Diversity and regulation of plant  $Ca^{2+}$  pumps: insights from expression in yeast. *Annuals Reviews of Plant Physiology and Plant of Molecular Biology*. 51:433-462.

- Takagi S y Nagai R. (1986). Intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and cytoplasmic streaming in *Vallisneria* mesophyll cells. *Plant of Cell Physiology*. 27(6): 953-959
- Takahashi N, Yamasaki Y, Kobayashi A, Higashitani H y Takahashi H. (2003). Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of *Arabidopsis* and radish. *Plant Physiology*. 132: 805-810.
- Tlalka M y Fricker M. (1999). The role of calcium in blue-light-dependent chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *The Plant Journal*. 20(4): 461-473
- Treiman M, Caspersen C y Christensen S. (1998). A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPases. *Trends in Pharmacological Science*. 19: 131-135
- Volkman D, Baluska F, Lichtscheidl I, Driss-Ecole D y Perbal G. (1999). Statoliths motions in gravity-perceiving plants cells: does actomyosin counteract gravity. *The FASEB Journal*. 13: S143-S147.
- Williamson R y Ashley C. (1982). Free  $Ca^{2+}$  and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature*. 269: 647-651
- Yamamoto K, Hamada S y Kashiwama T. (1999). Myosins from plants. *Cellular and Molecular Life Science*. 56: 227-232.
- Yoder T, Zheng H, Todd P y Staehelin A. (2001). Amyloplast sedimentation dynamics in maize *Columella* cells support a new model for the gravity-sensing apparatus of roots. *Plant Physiology*. 125: 1045-1060.
- Yokota E, Muto S y Shimmen T. (1999a). Inhibitory regulation of higher-pant myosin by  $Ca^{2+}$  ions. *Plant Physiology*. 119: 231-239.
- Yokota E, Yukawa C, Muto S, Sobobe S y Shimmen T. (1999b). Biochemical and immunocytochemical characterization of two types of myosins in cultured tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology*. 121: 525-534.
- Zheng H y Staehelin A. (2001). Nodal endoplasmic reticulum, a specialized form of endoplasmic reticulum found in gravity-sensing root tip *Columella* cells. *Plant Physiology*. 125: 252-265.
- Zhou C, Yang Y y Jong A. (1990). Mini-prep in ten minutes *Biotechniques*. 8(2):172-173

## APÉNDICE 1

### 1 Preparación de protoplastos desde tejido vegetal

Protoplastos fueron preparados a partir de plantas de *Arabidopsis* WT y ER-GFP de 3 a 4 semanas de edad crecidas en condiciones estériles, siguiendo el protocolo descrito en el sitio web de *Arabidopsis thaliana*, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) en protocolos, al cual se accede directamente con la dirección [ftp://tairpub:tairpub@ftp.arabidopsis.org/home/tair/Protocols/compleat\\_guide/comguidePDFs/10\\_trans\\_gene\\_exp\\_protos.pdf](ftp://tairpub:tairpub@ftp.arabidopsis.org/home/tair/Protocols/compleat_guide/comguidePDFs/10_trans_gene_exp_protos.pdf) (Wenkin Wei & Keith Lindsay. Leicester Biocentre, University of Leicester).

Se tomó aproximadamente 2 g de tejido aéreo fresco y se preplasmolizó con manitol 0,5 M por 1 h en un tubo de polipropileno de 50 ml. Posteriormente se descartó el manitol y se agregó 30 ml de una solución enzimática filtrada (celulasa 1 %, pectinasa 0,25 %,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  8 mM y manitol 0,5 M), pH 5,5 con KOH 0,1 M. El tejido fue incubado a temperatura ambiente en oscuridad durante toda la noche con esta solución enzimática a agitación suave y constante. El macerado de tejido fue entonces filtrado en una doble malla de nylon de 175 y 25  $\mu\text{m}$  y el filtrado se obtuvo en un tubo de 30 ml. Este filtrado fue centrifugado a 1000xg por 5 min luego de lo cual se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 10 ml de una solución de lavado W5 estéril

(NaCl 154 mM, CaCl<sub>2</sub> 125 mM, glucosa 5 mM, manitol 0,5 M) a pH 5,8 con KOH 0,1 M y se centrifugó nuevamente a 1000xg por 5 min. Este lavado se repitió una vez más y finalmente los protoplastos limpios fueron resuspendidos en 2 ml de amortiguador Manitol /Mg<sup>+2</sup> estéril (manitol 0,4 M, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), pH 5,6 con KOH 0,1 M. La integridad y la cuantificación de los protoplastos fue chequeada por microscopía de luz en una cámara de Neubauer. Los protoplastos fueron almacenados un tiempo máximo de dos días a 4 °C.

## **2 Tinción con BODIPY FL Thapsigargina**

BODIPY Thapsigargina FL (BThpg, Tabla 2) fue disuelto en DMSO a una concentración de 1 mM y el stock se diluyó en amortiguador fosfato pH 7 0,1 mM a una concentración final de 1 µM. Epidermis de cebolla, de hojas de tabaco y de hojas de Arabidopsis fueron transferidas a la solución 1 µM de BThpg en amortiguador fosfato 0,1 mM e incubadas por 2 h en oscuridad a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente los tejidos fueron lavados tres veces con amortiguador fosfato pH 7 0,1 mM y montadas en portaobjeto con el mismo amortiguador para tomar imágenes de microscopía epifluorescente y transmisión con microscopía Nomarski. Como control se usaron plántulas incubadas en amortiguador fosfato 0,1 mM con DMSO 0,1 %.

Protoplastos preparados a partir de tejido aéreo de plantas de Arabidopsis de 3 a 4 semanas fueron incubas por 30 min con BThpg 1 µM en amortiguador Manitol/ Mg<sup>+2</sup> pH 5,6 en oscuridad con agitación constante y luego fueron

lavados 3 veces con el mismo amortiguador. Posteriormente, la solución de protoplastos fue montada en portaobjeto para ser visualizada con microscopía de epifluorescencia y microscopía Nomarski. Como control se usaron protoplastos incubados con DMSO 0,1 %.

### **3 Tinción con DAPI para marcación de ácidos nucleicos**

La tinción de tejido vegetal con DAPI se basó en la metodología descrita por Oparka y Read (1994). Plántulas de Arabidopsis de 7 días y epidermis de cebolla, tabaco y Arabidopsis fueron incubadas con DAPI (Molecular Probes) 10 µg/ml en amortiguador fosfato pH 7 0,1 mM durante 2 h en oscuridad, luego de lo cual fueron lavados 3 veces con el mismo amortiguador. Finalmente los tejidos fueron montados en portaobjetos para ser observados mediante microscopía epifluorescente y Nomarski.

Además, protoplastos de Arabidopsis WT fueron incubados por 30 min en DAPI 10 µg/ml en oscuridad y agitación constante en amortiguador Manitol/Mg<sup>+2</sup> pH 5,6 y luego fueron lavados tres veces con el mismo amortiguador. Finalmente fueron montados en portaobjeto para ser observados por microscopía de epifluorescencia y Nomarski.

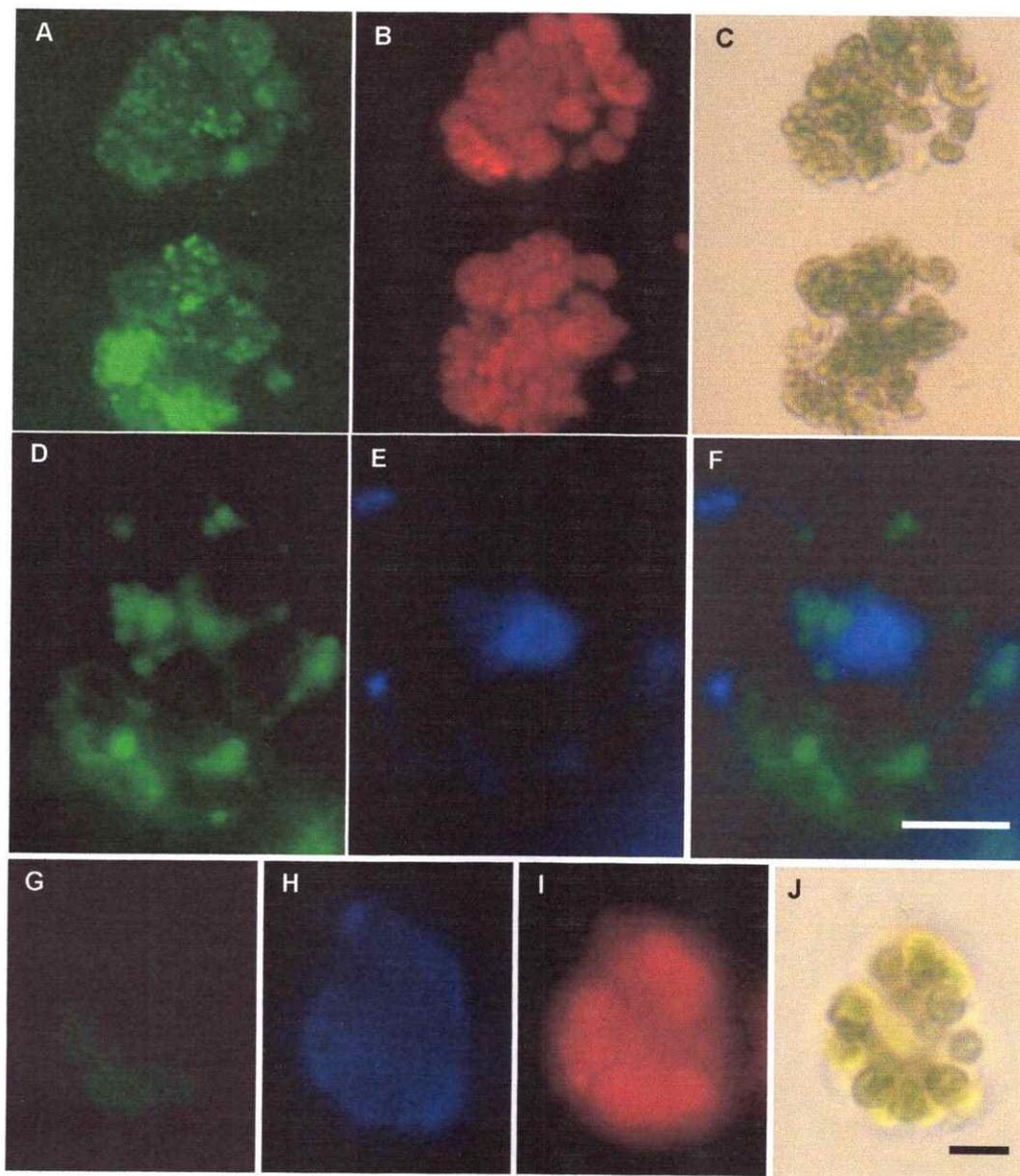
### **4 Localización de la marca fluorescente de BODIPY FL Thapsigargina en diferentes tejidos y especies vegetales.**

Con el objetivo de determinar si existen sitios de localización subcelular para

BThpg en distintos tejidos de *Arabidopsis* y en otros sistemas vegetales. Protoplastos preparados desde tejido aéreo de *Arabidopsis* y epidermis de hoja de *Arabidopsis*, tabaco y cebolla se tiñeron con BThpg 1  $\mu$ M. Por otro lado, para acercarnos a dilucidar el compartimiento subcelular donde se aloja la marca fluorescente de BThpg, se utilizaron protoplastos preparados desde plantas de *Arabidopsis thaliana* que poseen el retículo endoplasmático marcado con la proteína fluorescente verde (ER-GFP). Además, se tiñeron protoplastos y epidermis de otros sistemas vegetales con DAPI, un fluoróforo capaz de teñir ácidos nucleicos y por ende, de marcar núcleo.

Protoplastos preparados desde tejido aéreo de plantas de *Arabidopsis thaliana* WT fueron teñidos como se describe en la sección 2 con BThpg y, además, paralelamente se prepararon protoplastos desde tejido aéreo de plantas transgénicas ER-GFP de *Arabidopsis thaliana*. Ambos tipos de protoplastos fueron visualizados por microscopía epifluorescente y Nomarski (Figura 20) con el objetivo de comparar ambos patrones de marcación. En la Figura 20 se observa que los patrones fluorescentes de BThpg y de ER-GFP son diferentes, ya que en el caso de los protoplastos con BThpg, se observa una distribución de la fluorescencia que rodea los cloroplastos (Figura 20D), en cambio, protoplastos con el retículo marcado con GFP (Figura 20A) tiene una marcación que se ve incluso sobre los cloroplastos (Figura 20B) y cubre una gran parte de la célula. Por otro lado, los protoplastos fueron teñidos con BThpg y DAPI simultáneamente para observar si ambas marcas fluorescentes coincidían

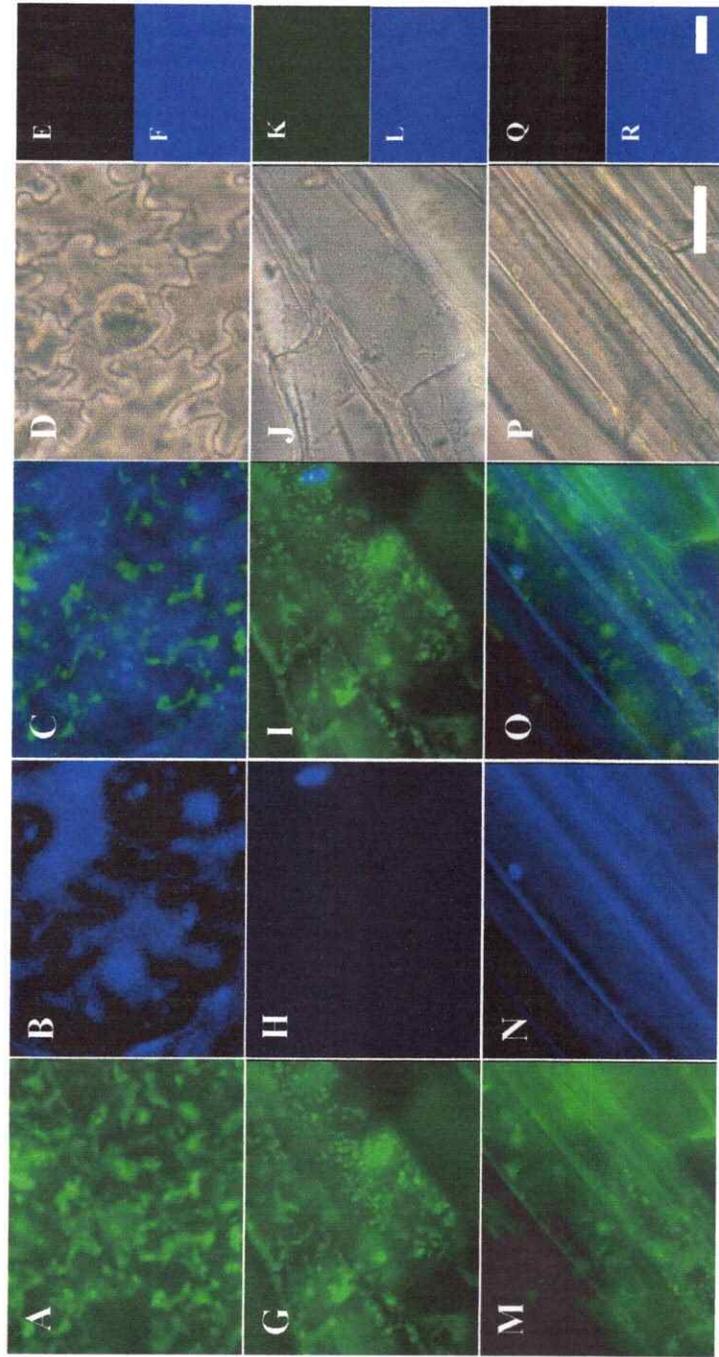
(Figura 20D y E respectivamente). Paralelamente, se tiñeron protoplastos sólo con BThpg y sólo con DAPI para estandarizar la toma de imágenes y corroborar que la fluorescencia observada no se deba a una filtración de la emisión. En Figura 20E se muestra la fluorescencia emitida por DAPI en el canal UV, donde se observa en azul, la marca fluorescente de DAPI, la cual representa al núcleo. Debido a que DAPI tiñe ácidos nucleicos, esperaríamos visualizar el DNA de mitocondrias y plastidios, sin embargo, esto no es posible y puede deberse a la pequeña cantidad de ácidos nucleicos contenidos en estos organelos. La Figura 20F muestra la sobreposición de ambas fluorescencias, donde se puede ver claramente que estas no coinciden ya que el núcleo marcado con DAPI es independiente de la marca de BThpg, o sea, no hay un solapamiento de ambas fluorescencias. Como control de la fluorescencia se observaron protoplastos sin teñir (Figura 20G-20J)



**Figura 20. Localización de la marca fluorescente de BThpg y DAPI en protoplastos.** Protoplastos fueron preparados desde tejido aéreo de plantas de *Arabidopsis* WT (D-J) y ER-GFP (A-C) de 3 a 4 semanas. **A**, imagen de fluorescencia de GFP en retículo endoplasmático. **B**, imagen de fluorescencia de la cloroplastos. **C**, imagen de microscopía Nomarski de protoplastos mostrados en A y B. **D**, imagen de fluorescencia de BThpg de protoplastos teñidos simultáneamente con BThpg y DAPI. **E**, imagen de fluorescencia de DAPI de protoplastos teñidos simultáneamente con BThpg y DAPI. **F**, sobreposición de las imágenes D y E. **G**, imagen de autofluorescencia de protoplastos en canal verde. **H**, imagen de autofluorescencia de protoplastos en canal UV. **I**, imagen de fluorescencia de clorofila. **J**, imagen de microscopía Nomarski de portoplastos mostrados en las Figuras G, H e I. Las imágenes de fluorescencia corresponden a microscopía de epifluorescencia. Las barras representan 5  $\mu$ m.

Con el fin de investigar si BThpg posee sitios de unión celular en otras especies vegetales, epidermis de Arabidopsis, cebolla y tabaco fueron teñidas con DAPI 10 µg/ml y BThpg 1 µM simultáneamente para colocalizar la marca de núcleo con la marca fluorescente de BThpg (Figura 21). Además, paralelamente se teñieron epidermis de Arabidopsis, cebolla y tabaco sólo con BThpg y sólo con DAPI, para estandarizar la toma de imágenes. Interesantemente, en cebolla y tabaco se observa una marca fluorescente de BThpg de disposición reticulada (Figura 21G y 21M respectivamente), en cambio, Arabidopsis posee una distribución vesiculada que colocaliza con la marca fluorescente de DAPI (Figura 21C), al igual que en epidermis de cebolla y tabaco (Figura 21I y 21O respectivamente), que puede deberse a que la marca de BThpg está rodeando a la marca de DAPI, y no significa necesariamente que ambos fluoróforos estén marcando el mismo organelo. Este hecho se podría clarificar utilizando microscopía confocal, ya que nos permitiría determinar si las fluorescencias colocalizan en la superficie del núcleo, en el interior o en ambas zonas. En las Figuras 21B, 21F y 21J, se muestra la fluorescencia de DAPI en el canal UV para Arabidopsis, cebolla y tabaco respectivamente, donde se aprecian núcleos en azul. Además en las Figura 21D, 21J y 21P se muestran las imágenes de microscopía Nomarski correspondientes a los tejidos observados en fluorescencia y con el objetivo de corroborar que la fluorescencia observada corresponda al fluoróforo usado y no sea autofluorescencia del tejido, se observaron epidermis de Arabidopsis, cebolla y tabaco sin teñir, con los canales UV y verde que permiten visualizar la fluorescencia de DAPI y BThpg

respectivamente (Figuras 21E, 21F, 21 K, 21L, 21Q y 21R)



**Figura 21. Epidermis de distintos sistemas vegetales teñidos simultáneamente con BThpg y DAPI.** A-D, M y N, epidermis de Arabidopsis. E-H, O y P, epidermis de cebolla. I-L, Q y R, epidermis de tabaco. A, E e I, fluorescencia de BThpg (canal verde). B, F y J, fluorescencia de DAPI (canal UV). C, G y K, superposición de imágenes de los canales verde y UV. D, H y L, imágenes de microscopía Nomarski, de los mismos tejidos presentados en las imágenes de fluorescencia. M, O y Q, imágenes de autofluorescencia del canal verde de epidermis sin teñir. N, P y R, imágenes de autofluorescencia del canal UV, en epidermis sin teñir. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas mediante microscopía de epifluorescencia. Las barras representan 25  $\mu\text{m}$

## **5 Colocalización de la BThpg con estructuras subcelulares**

En experimentos de tinción de BThpg en epidermis de cebolla y tabaco se observa que la distribución de la marca fluorescente presenta una forma reticulada que colocaliza con la marca nuclear de DAPI. Por otro lado, la distribución de BThpg en epidermis y en protoplastos de Arabidopsis no es reticulada, si no más bien vesiculada en la epidermis y en los protoplastos representa un continuo que rodea a los cloroplastos y que marca muy pocas zonas dentro de la célula. Sin embargo, esto contrasta con los resultados de la marca de BThpg en la zona de elongación distal de raíces de Arabidopsis, donde se observa una distribución reticulada. Estos resultados sugieren que pueden existir blancos intracelulares para Thpg en distintas estructuras subcelulares en diferentes tejidos (raíces y hojas) en una misma planta.

Un experimento que se realizó con resultados difíciles de analizar, fue teñir plántulas de Arabidopsis de 7 días con BThpg y mediante microscopía confocal comparar la fluorescencia con la marca de las plantas que poseen el retículo endoplasmático marcado con la proteína fluorescente verde. Esto fue engorroso debido al rápido apagamiento de la fluorescencia de BThpg.

Otro experimento a realizar es teñir con BThpg plantas transgénicas con los plastidios, mitocondrias y Golgi marcados con proteínas fluorescentes, para analizar si las estructuras que marca este compuesto corresponden o colocalizan con alguno de estos organelos. Estos experimentos se hicieron en

plantas enteras que poseen los plastidios marcados con proteína fluorescente amarilla y roja, teñidas con BThpg FL, que emite fluorescencia verde y BThpg TR-X que emite fluorescencia roja. Sin embargo, dado que el análisis se hizo por microscopía epifluorescente, la observación fue difícil ya que se ve demasiada fluorescencia y no se pudo determinar con exactitud el tamaño de las estructuras fluorescentes por el exceso de fluorescencia de fondo. Este problema, sin embargo, es solucionable observando mediante microscopía confocal dichas plantas transgénicas, sin embargo, el problema que surge es de nuevo el rápido blanqueamiento de la fluorescencia del BThpg.