



UNIVERSIDAD DE CHILE –FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

“Evaluación de la función del factor de transcripción bZIP25 en diferentes estados nutricionales en *Arabidopsis thaliana*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

DAMIÁN IGNACIO CIFUENTES AGUILAR

Director del Seminario de Título: **Dra. Lorena Norambuena Morales**

Enero 2020, Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE –FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr Damián Ignacio Cifuentes Aguilar**

“Evaluación de la función del factor de transcripción
bZIP25 en diferentes estados nutricionales en
Arabidopsis thaliana”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. Lorena Norambuena
Director Seminario de Título: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile, enero de 2020

BIOGRAFÍA



El 10 de abril de 1995 a las 7:45 AM el mundo suspiró, resignado, por la necesidad de alimentar una boca más. Nació en Rancagua, como el menor de dos hermanos, frutos de una relación de esas que hoy en día ya no se ven. Sus padres, Erika Aguilar y Flavio Cifuentes, velaron por su cuidado y el de su hermana. Dicen que hasta el día de hoy se levantan a prepararle una taza de leche o lo van a dejar a las 6 de la mañana a la estación del tren. Estudió cerca de su casa hasta los 13 años. No se consideraba el más inteligente, pero se esforzaba. Hijo de la educación pública, se graduó del Liceo Óscar Castro Zúñiga, lugar donde forjó su personalidad y carácter. Ansioso y autoexigente (¿autodestructivo, quizás?), ingresó a una Universidad muy renombrada y escogió una carrera que poco se ajustaba a los intereses de sus pares, con un nombre rimbombante, de esos nombres que luego de pronunciarlo la gente dice “debes ser muy seco”. Él nunca creyó que fuera seco (y su propia experiencia le haría notar que en verdad no lo era), pero sí era metódico, iba a todas las clases, tenía los cuadernos más ordenados y la mejor caligrafía. Tenía un reducido grupo de buenos amigos, de esos que hoy en día ya no se ven. Entró a un laboratorio que trabajaba con plantas, porque a él le gustaban mucho las plantas. En ese mismo laboratorio aprendió a bailar con el fracaso y a disfrutar más esas pequeñas victorias después de un PCR. Un día le dijeron que si quería titularse tenía que realizar su Seminario de Título, y bueno, aquí estamos.

*Al pequeño Damián de 6 años,
Que cuando grande quería ser artista,
Vendedor de helados y científico.
¡Una de tres no está mal!*

AGRADECIMIENTOS

Si hay un Dios en algún lugar y tiempo, quiero agradecerle por dejar tantos misterios en el universo para que los científicos pudiésemos matar el tiempo intentando descifrarlos. A mis padres, Erika y Flavio, por comprar cada volumen de enciclopedia que venía con el diario e incentivar, con su inmutable amor, mi amor por el conocimiento. A mi hermana Ariadna, mi guía, mi ejemplo a seguir, mi hebra templado. A mi familia de Maipú, quienes me hicieron sentir como si nunca hubiese dejado mi hogar.

A mis amigos, María José, Yoyo y Pipe, quienes fueron un excelente cohete cada vez que quise escapar. A mis compañeros, Sergio y Maximiliano, quienes me enseñaron que una agradable amistad no necesita demasiadas palabras. A Álvaro, quien sin su ayuda mis años en la carrera habrían sido muchos más. Muy especialmente a Constanza e Isadora, quienes lograron encender mi luz en la más profunda oscuridad. Y a Vicente, pues solamente con él aprendí más sobre mí mismo.

A los miembros del Centro de Biología Molecular Vegetal, en quienes siempre encontré un consejo, una conversación, una risa. A la profesora Lorena Norambuena, por recibirme en su laboratorio y creer en mí, aun cuando ni yo lo hacía. A los chicos del team LNM, a Loretto y Francisco, quienes me mostraron que lo único más difícil y gratificante que aprender ciencia, es enseñarla. Y, muy especialmente, a Francisca, mi compañera en el crimen, mi amiga, quien siempre tuvo la paciencia necesaria para lidiar conmigo y con quien generé la placentera confianza para compartir mis pensamientos, mis miedos, mis emociones y mi comida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTADO DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cambio climático y búsqueda de soluciones biotecnológicas	1
1.2. Sistema radical en <i>Arabidopsis</i> y el rol de las Raíces Laterales	3
1.3. Biodisponibilidad de nutrientes y su efecto en la arquitectura de la raíz.....	5
1.4. Regulación en la formación de raíces laterales	8
1.4.1. Desarrollo de Raíces Laterales como proceso dependiente de la endocitosis	8
1.4.2. Regulación transcripcional de la endocitosis: El Factor de Transcripción bZIP25.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo General	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizadas	15
3.2. Esterilización de semillas.....	15
3.3. Medio de cultivo y condiciones de crecimiento	16
3.4. Genotipificación de línea <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i>	16
3.4.1. Extracción y cuantificación de DNA.....	17
3.4.2. Amplificación de gDNA por PCR	17
3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa	18
3.5. Visualización de la señal de fluorescencia de GFP en plantas <i>bzip25-2/ bZIP25.2-GFP</i>	19
3.6. Estudio del tráfico endocítico.....	19
3.7. Ensayos de crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis</i> bajo diferentes condiciones nutricionales de Nitrato y Fosfato en el medio de cultivo.....	21
4. RESULTADOS	24
4.1. Caracterización la línea mutante <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i>	24
4.1.1. Estandarización de agente de selección utilizado para identificar individuos homocigotos para el transgén bZIP25.2-GFP.....	25
4.1.2. Ensayo de selección e identificación de individuos homocigotos para el transgén <i>bZIP25.2-GFP</i>	30
4.1.3. Genotipificación de la línea mutante <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i>	34
4.1.4. Evaluación de la acumulación de la proteína de fusión bZIP25.2-GFP en plantas <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i>	38

4.2.	Evaluación de la participación de la variante bZIP25.2 en el tráfico endocítico de células de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
4.2.1.	Estudio del tráfico endocítico desde la Membrana Plasmática hasta endosomas tempranos	42
4.2.2.	Estudio del tráfico endocítico desde los endosomas a la vacuola.....	44
4.3.	Estudio de la participación del factor bZIP25 en la respuesta del sistema radical frente al déficit de fosfato y nitrato.....	49
4.3.1.	Evaluación de la participación del factor bZIP25 en la modificación de la arquitectura radical frente al déficit de fosfato	53
4.3.1.1.	Modificaciones en la raíz principal frente al déficit de fosfato.....	53
4.3.1.2.	Modificaciones en las raíces laterales frente al déficit de fosfato.....	57
4.3.2.	Evaluación de la participación del factor bZIP25 en la modificación de la arquitectura radical frente al déficit de nitrato	61
4.3.2.1.	Modificaciones en la raíz principal frente al déficit de nitrato	61
4.3.2.2.	Modificaciones en las raíces laterales frente al déficit de nitrato.....	65
5.	DISCUSIÓN	68
5.1.	La línea <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> posee individuos homocigotos para el transgén bZIP25.2-GFP, el cual se expresa y distribuye en el núcleo celular.....	69
5.2.	La respuesta de las plantas frente al estrés abiótico depende de la forma en que el nutriente es entregado, así como también del periodo de limitación nutricional.....	72
5.3.	La variante bZIP25.2 participa y es suficiente para la regulación negativa del tráfico endocítico.....	74
5.4.	bZIP25.2 participa de la respuesta a déficit de P, muy probablemente, a través de la regulación del tráfico endocítico.....	76
5.5.	bZIP25 forma parte de la regulación de la respuesta frente al déficit de nitrato, pero su variante bZIP25.2 no es suficiente, por sí sola, para que esta ocurra.....	79
6.	CONCLUSIONES	83
7.	BIBLIOGRAFÍA	84
8.	ANEXO.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Partidores utilizados para reacciones de PCR en la genotipificación de las líneas de <i>Arabidopsis</i>	18
Tabla II. Concentración de sales utilizadas como fuente de fosfato y nitrato para los ensayos de deficiencia de macronutrientes.....	22
Tabla III. Porcentaje de germinación de semillas en MS sólido bajo diferentes concentraciones de higromicina.....	27
Tabla IV. Porcentaje de supervivencia de plántulas bajo diferentes concentraciones de higromicina	29
Tabla V. Porcentaje de germinación de las semillas de la progenie de cuatro individuos diferentes <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i>	31
Tabla VI. Porcentaje de supervivencia de plántulas de la progenie de cuatro individuos <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> crecidas en MS sólido con presencia de higromicina.....	33
Tabla VII. Sales utilizadas en la preparación de los medios de cultivo para los tratamientos de fosfato y nitrato.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la raíz lateral en <i>Arabidopsis</i>	5
Figura 2. La ruta endocítica está conformada por diferentes compartimentos.....	10
Figura 3. La carencia de bZIP25 acelera el tráfico endocítico.....	12
Figura 4. Los trazadores FM1-43 (verde) y FM4-64 (rojo) marcan la ruta endocítica gracias a su unión a las capas lipídicas de las membranas.....	20
Figura 5. Esquema general del ensayo de crecimiento bajo diferentes condiciones nutricionales de nitrato y fosfato.....	23
Figura 6. La concentración 30 [µg/mL] de higromicina es la mínima concentración evaluada para seleccionar organismos resistentes.....	27
Figura 7. Hallazgo de individuos T3 de la línea <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> resistentes a la acción de la higromicina.....	32
Figura 8. Fragmentos amplificados mediante PCR convencional de región conservada de genes codificantes para Actina.....	34
Figura 9. Análisis molecular que da cuenta de la presencia de la inserción de T-DNA que interrumpe el gen <i>bZIP25</i> en condición homocigota en las líneas <i>bzip25-2</i> y <i>bzip25-2/bzip25.2-GFP</i>	36
Figura 10. Amplificación de fragmentos de genes asociados a la línea transgénica <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i>	38
Figura 11. Acumulación de la proteína de fusión bZIP25.2-GFP en el núcleo de las células de la raíz de <i>A. thaliana</i>	40
Figura 12. Ruta del tráfico de trazador endocítico FM4-64 en las primeras etapas de la endocitosis	42
Figura 13. La cinética del tráfico endocítico desde la membrana plasmática a endosomas de plantas <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> es similar a plantas silvestres	43
Figura 14. La cinética del tráfico endocítico desde los endosomas a la vacuola en Plantas <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> es similar a las de plantas silvestres, mostrando desaceleración de la endocitosis respecto de plantas <i>bzip25-2</i>	45
Figura 15. La acumulación de bZIP25.2-GFP rescata el fenotipo mutante de <i>bzip25-2</i> , produciendo una desaceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola	48
Figura 16. El crecimiento de la raíz principal entre plantas silvestres, <i>bzip25-2</i> y <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> bajo condiciones nutricionales óptimas es similar.....	52
Figura 17. La carencia de fosfato genera una disminución del crecimiento de la raíz principal en plantas silvestres, <i>bzip25-2</i> y <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i>	54

Figura 18. Plantas mutantes <i>bzip25-2</i> generan respuesta en la RP ante el déficit de P. La expresión ectópica de la variante bZIP25.2-GFP también permite que dicha respuesta sea generada, de la misma forma que plantas silvestres.....	56
Figura 19. bZIP25 es necesario en la respuesta de formación de RL frente al déficit de P y, en particular, la variante bZIP25.cumple un rol en este proceso.....	59
Figura 20. Plantas silvestres, <i>bzip25-2</i> y <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> tienen similar densidad de raíces laterales cuando crecen en medio nutricionalmente óptimo.....	60
Figura 21. La carencia de nitrato no genera cambios drásticos en el crecimiento de la RP.....	62
Figura 22. bZIP25 participa en la respuesta de la RP al déficit de nitrógeno por un mecanismo que sería independiente de bZIP25.2.....	64
Figura 23. Plantas silvestres desarrollan más RL ante el déficit de NH_4NO_3 , mientras que <i>bzip25-2</i> no es capaz de responder aun cuando acumula bZIP25.2-GFP.....	67
Figura 24. Plantas <i>bzip25-2/bZIP25.1-GFP</i> rescatan el fenotipo mutante, desacelerando el tráfico endocítico.....	91
Figura 25. Todas las líneas evaluadas responden con la inhibición del crecimiento de su raíz principal ante el déficit de fosfato.....	92
Figura 26. Los tres genotipos estudiados tienen diferentes respuestas en su raíz principal frente al déficit de nitrato.....	93
Figura 27. Índice de raíces laterales 4 dpt en tratamientos de fosfato y nitrato.....	94
Figura 28. El déficit de nitrato genera un crecimiento de las RL existentes en plantas silvestres, <i>bzip25-2</i> y <i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i>	95
Figura 29. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las variantes de empalme alternativo de bZIP25.....	96

LISTADO DE ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido ribonucleico	RNA
Compartimento prevacuolar/ endosomas tardíos/ cuerpos multivesiculares	PVC/LE/MVB
Días post germinación	dpg
Días post tratamiento	dpt
DNA genómico	gDNA
Endosomas tempranos/ Red transgolgi	EE/TGN
Grados Celsius	°C
Gen codificante para resistencia a higromicina	<i>Hpt</i>
Gen codificante para resistencia a kanamicina	<i>NptII</i>
Individuo progenitor	Ind
Nitrato/ Suficiencia de nitrato/ Deficiencia de nitrato	N/ +N/ -N
Fosfato/ Suficiencia de fosfato/ Deficiencia de fosfato	P/ +P/ -P
Pares de base	pb
Raíces Laterales	RL
Raíz Principal	RP
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
RNA mensajero	mRNA

RESUMEN

Las plantas deben responder a las fluctuaciones del ambiente en el que se encuentran, y como organismos sésiles, han generado mecanismos regulatorios que les permiten enfrentarse a las restricciones ambientales en el curso de su desarrollo. La modificación de su arquitectura radical a través de la formación de raíces laterales es una de las mayores adaptaciones que poseen para responder al déficit nutricional. La formación de estos órganos ocurre de manera post embrionaria y se ha descrito a la auxina como regulador de este proceso. Nuestro laboratorio ha propuesto la existencia de una vía independiente de la señalización de auxina, para la formación de raíces laterales, la cual actúa a través del tráfico endocítico. Este estudio se realizó previamente utilizando la línea mutante *bzip25-2*, la cual carece del factor de transcripción bZIP25 y tiene el tráfico endocítico acelerado. El estudio demostró que bZIP25 es un regulador negativo de la endocitosis, sin embargo, la existencia de tres variantes de empalme alternativo de exones abrió la interrogante respecto del rol que cumpliría cada una. En esta investigación se utilizó la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, que expresa ectópicamente la variante bZIP25.2 sobre el genotipo de plantas *bzip25-2*, fusionada a la proteína GFP, para estudiar su participación en la regulación de la endocitosis, así como también un posible rol en la respuesta frente al déficit de fosfato y nitrato. El seguimiento de la ruta endocítica hacia la vacuola por medio de trazadores reveló que bZIP25.2 rescata el fenotipo mutante, demostrando que participa en la regulación negativa del tráfico endocítico. Ensayos de crecimiento en medios de cultivo deficientes en fosfato o nitrato mostraron que bZIP25.2 sería partícipe de la respuesta a déficit de fosfato, a través de la regulación de la endocitosis. Se evidenció también su participación en la respuesta frente al déficit de nitrato, pero la variante bZIP25.2 no es suficiente para que esta ocurra.

ABSTRACT

Plants must respond to the environmental constraints in which they live, and as sessile organisms, they have generated regulatory mechanisms that allow them to face environmental restrictions in the course of their development. The modification of its radical architecture through the formation of lateral roots, is one of the greatest adaptations that are specific to respond to the nutritional deficit. The formation of these organs occurs in a post embryonic manner and auxin has been described as a regulator of its organogenesis. Our laboratory has proposed the existence of an independent auxin signaling pathway, for the formation of lateral roots, which acts through endocytic trafficking. This study was previously performed using the *bzip25-2* mutant line, which lacks bZIP25 transcription factor and has accelerated endocytic trafficking. The study showed that bZIP25 is a negative regulator of endocytosis, however, the existence of three variants of alternative splicing opened the question regarding the role that each one would play. This research specifies the *bzip25-2/ bZIP25.2-GFP* line, which expresses ectopically the bZIP25.2 variant on the genotype of *bzip25-2* plants, fused to the GFP protein, to study its participation in the regulation of endocytosis, as well as a possible role in the response to phosphate and nitrate deficits. Following the endocytic route to the vacuole through the use of tracers revealed that bZIP25.2 rescues the mutant phenotype, demonstrating its participation in the negative regulation of endocytic trafficking. Growth assays in phosphate or nitrate deficient culture media showed bZIP25.2 to be participant in the phosphate deficit response, through the regulation of endocytosis. Its participation in the nitrate deficit response was also demonstrated, but its variant bZIP25.2 is not enough to trigger it.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cambio climático y búsqueda de soluciones biotecnológicas

Las plantas han constituido la base para el desarrollo y permanencia de gran parte de los organismos vivos sobre la tierra. Desde la domesticación de varias especies como el arroz (*Oryza sativa*), el tomate (*Solanum*), trigo (*Triticum*) y maíz (*Zea mays*), el cultivo de determinados tipos de plantas se volvió no solo una opción, sino una necesidad para la sobrevivencia de la vida humana. Se estima que para el año 2050, la población mundial alcance los 9.8 mil millones de habitantes (“World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100”. United Nations Department of Economic and Social Affairs, 2017), que las áreas urbanas se expandan para albergar a cerca del 70% de la población (hoy es de un 55%) (“68% of the world population projected to live in urban areas by 2050, United Nations Department of Economic and Social Affairs”, 2019) y que, por tanto, los suelos cultivables vayan en declive, acompañado del empobrecimiento nutricional de estos (Dawson, & col., 2014; Hunter, & col., 2017). Chile, en particular, ha visto disminuida la calidad de sus suelos debido a la permanente sequía y baja fertilidad, disminuyendo la productividad agrícola en un 32% en la primera década del siglo XXI (“La desertificación en Chile”, Unidad de Diagnóstico Parlamentario, 2012). Por ello, en la actualidad la agricultura se enfrenta a un desafío muy importante: por un lado, debe incrementar la producción de alimentos para cubrir las necesidades de la población, y por otro, esto debe lograrse teniendo cada vez menos espacios disponibles para el cultivo, menos suelos fértiles y condiciones climáticas cada vez menos predecibles (Dawson, & col., 2014). Con el fin de responder a este alarmante horizonte y tomando como perspectiva el mejoramiento de plantas de interés comercial, hace

décadas surgió el interés por estudiar los procesos fisiológicos y los mecanismos moleculares que regulan y dirigen el desarrollo de las plantas, especialmente aquellos implicados en modular la respuesta generada frente a factores de estrés, tanto biótico como abiótico.

De modo general, es posible dividir una planta terrestre en dos mega-estructuras distintas dependiendo de las funciones generales que cumplen, la zona aérea encargada de recibir luz y dióxido de carbono para fotosintetizar azúcares y la parte subterránea cuya función es la captación de agua y nutrientes desde el suelo. En espermatofitas, estas estructuras, tan diferentes fisiológica como estructuralmente se desarrollan a partir del embrión contenido en la semilla (Kozlowski, 1972, pp. 118–119). Este embrión está formado por cotiledones, el hipocótilo y la radícula, conjunto de órganos embrionarios a partir de los cuales la planta puede establecerse y desarrollarse como organismo autótrofo (Kozlowski, 1972, pp. 119–120). Si bien estas estructuras son necesarias para el desarrollo temprano de la planta, prontamente son modificadas o reemplazadas por órganos más complejos que cumplen sus funciones de manera más eficiente y que permiten responder de mejor manera a las condiciones del entorno (Bewley, 1997).

Debido a que las plantas son organismos sésiles, estas deben detectar constantemente las variaciones de su entorno y desplegar una respuesta que asegure no solo la sobrevivencia sino también el desarrollo adecuado de esta. Para ello, son capaces de generar nuevos órganos a partir de un proceso denominado organogénesis post-embrionaria (Malamy & Benfey 1997). Un ejemplo particular de esto son las raíces laterales (**RL**), que surgen como una modificación de la raíz principal (**RP**) a partir de meristemas ubicados a lo largo de este órgano (Malamy & Benfey 1997). Las RL son la

principal herramienta utilizada por plantas para enfrentarse al déficit de agua y nutrientes, esto debido a que su presencia aumenta la superficie efectiva de contacto con el sustrato, lo que incrementa las probabilidades de encontrar agua o un nutriente de baja disponibilidad (López-Bucio, & col., 2003). Considerando esto, y el desafío actual al que se enfrenta la agronomía, estudiar el sistema radical de las plantas puede ser una ventana hacia la generación y optimización de cultivos en terrenos nutricionalmente empobrecidos.

1.2. Sistema radical en *Arabidopsis* y el rol de las Raíces Laterales

El sistema radical de las plantas cumple un rol importante al proveer a las plantas de agua, nutrientes y soporte físico. Si bien la raíz primaria ha recibido mayor atención en estudios relacionados con el desarrollo, esta forma solo una pequeña parte del sistema radical completo (Malamy & Benfey, 1997). En plantas superiores existe una gran variabilidad respecto de la arquitectura radical. Gran parte de las dicotiledóneas, como *Arabidopsis*, poseen una RP capaz de ramificarse originando RL, las que a su vez son capaces de generar más raíces y así expandir el área de alcance de agua y nutrientes (Péret & col., 2009). Plantas de interés comercial, como el arroz y el maíz disponen de un sistema radicular más sencillo estructuralmente hablando, compuesto principalmente de raíces adventicias que se originan a partir del tallo de la planta (Péret & col., 2009). Sin embargo, estudios genéticos han mostrado la existencia de muchos genes comunes entre RL y adventicias (Hochholdinger & Zimmermann, 2008), lo cual convierte a las RL en un interesante foco de estudio.

A primera vista, podría parecer que la arquitectura radical no posee mayor organización más que por la aparición de RL que emergen desde regiones aleatorias de la RP, sin embargo, el desarrollo de RL ocurre de manera regulada, tanto espacial como temporalmente. La posición que adquiere cada una es bastante específica: estas se originan exclusivamente a partir de células fundadoras del periciclo (capa interna de células adyacentes a la vasculatura), ubicadas opuestas a los polos del xilema (Péret & col., 2009), para lo cual dependen de la acumulación localizada de la fitohormona auxina (Sección 1.4.1.) (De Smet, & col., 2015). Durante la iniciación del proceso, una o un par de células fundadoras pasan por un programa de proliferación celular controlada, a través de sucesivas divisiones anticlinales hasta crear una capa de células de igual longitud, las que luego comienzan a dividirse de manera periclinal formando una capa interior y otra exterior (Figura 1) (Péret & col., 2009). Es entonces cuando se forma una estructura semejante a un domo conocido como primordio, el cual continúa desarrollándose hasta emerger eventualmente desde la raíz principal. A partir de ese momento dicha estructura toma el nombre de raíz lateral emergida. En segundo lugar, el surgimiento de una raíz lateral no está predeterminado, pero es fuertemente influenciado por las condiciones ambientales (Malamy & Benfey 1997). La formación de RL está vinculada a las necesidades hídricas y nutricionales del organismo, gatillando la iniciación del proceso cuando la planta así lo requiera. El principal atributo de las RL es, sin duda, la plasticidad que le otorgan al sistema radical, permitiendo modificar a través del tiempo su arquitectura característica para adecuarse a los requerimientos del ambiente en un momento dado (Gruber & col, 2013).

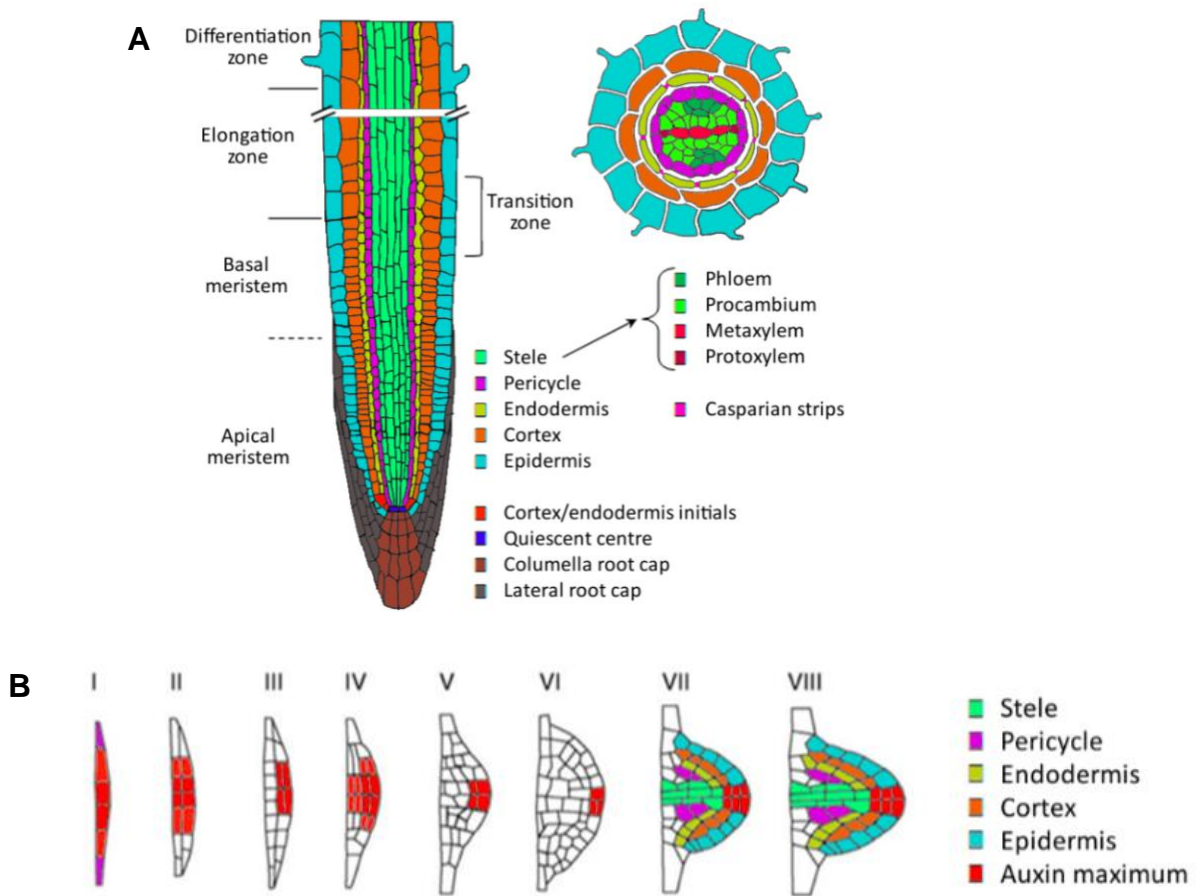


Figura 1. de la raíz lateral en *Arabidopsis*. **(A)** Izquierda: diferentes tipos celulares (coloreados distintamente) componen capas concéntricas organizadas que rodean la vasculatura. Diferentes zonas de desarrollo se establecen a lo largo de la raíz mientras esta crece. Derecha: sección transversal que muestra el orden radial de las capas, destacando el periciclo (rosado) desde el cual se originan las RL. **(B)** Sucesión de etapas en el desarrollo del primordio hasta formar una raíz lateral. Modificado desde De Smet & col., 2015.

1.3. Biodisponibilidad de nutrientes y su efecto en la arquitectura de la raíz

Como organismos autótrofos, las plantas pueden sintetizar las azúcares necesarias a partir de dióxido de carbono, agua y luz solar, lo cual las provee de la mayor parte de sus recursos energéticos (Blankenship, 2014). No obstante, junto con el agua, también requieren una serie de micro y macronutrientes que solo pueden obtener desde el suelo en el que se encuentran. Debido a que son organismos sésiles, las plantas

dependen completamente de su habilidad para explorar el suelo en busca de estos recursos. Así, el crecimiento y la arquitectura de la raíz determina fuertemente el volumen de suelo que es capaz de abarcar (Gruber, & col., 2013). La estructura radical que posee una planta es dependiente de los factores genéticos que la regulan, así como también de los factores ambientales a los que se ve enfrentada (Gruber, & col., 2013). Considerando este último punto, modificar el arreglo de raíces es crucial para adaptarse a los constantes cambios del sustrato y la capacidad de sensar los nutrientes es el principal determinante de esta plasticidad orgánica (López-Bucio, & col., 2003).

El suelo contiene una serie muy diversa de elementos y compuestos en cantidades diferentes y repartidos de manera heterogénea en toda su extensión (Caldwell & Pearcy, 2012). La distribución de nutrientes puede ser muy irregular y su presencia o biodisponibilidad (iones que pueden ser tomados y absorbidos por las raíces para ser utilizados en procesos biológicos) puede ser muy reducida (Barber, 1995). Ante esto, la disponibilidad de nutrientes provoca un impacto en la arquitectura radical, pudiendo alterar el número, longitud, ángulo y diámetro tanto de raíces como de pelos radicales (Gruber, & col., 2013).

Las plantas deben contar con nutrientes esenciales que les permitan cubrir sus necesidades metabólicas. Si bien aún es materia de debate, es posible establecer un grupo de, al menos, 17 elementos que serían esenciales para el desarrollo y crecimiento de plantas (Welch & Shuman, 1995). De ellos, 9 corresponden a macronutrientes, que representan el 0,1% del peso seco de la planta (Welch & Shuman, 1995). Particularmente, debido a su estatus de macronutrientes, nitrógeno y fósforo son

elementos que han recibido amplia atención. El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes sobre la tierra (López-Bucio, & col., 2003), sin embargo, se halla principalmente en formas orgánicas, y solo cerca del 2% se encuentra formas inorgánicas como amonio o nitrato, siendo este último la principal forma en que las plantas pueden absorberlo (Xu & col., 2012). El N es altamente soluble en el suelo y su rápido escurrimiento lo deja fuera del alcance de las plantas (López-Bucio & col., 2003). Por su parte, el fósforo también es adquirido por las plantas en forma de iones que conforman sales inorgánicas, comúnmente sales de fosfato (Smith, 2002). Al igual que el nitrógeno, la disponibilidad de fósforo es muy limitada, principalmente debido a la escasa movilidad del nutriente (Raghothama, 2005). Esto ocasiona que las plantas deban luchar constantemente contra un pronunciado gradiente de concentración externo e interno de fósforo, cercano a una diferencia de tres órdenes de magnitud (Raghothama, 2005).

La relevancia del fósforo y el nitrógeno queda reflejada en el impacto que pueden generar en la arquitectura radical ante su déficit. En muchos ecosistemas naturales y agrícolas las plantas se enfrentan a condiciones donde la disponibilidad o movilidad de nutrientes es extremadamente baja. Para ello, estos organismos han desarrollado mecanismos muy controlados para mantener el balance en la adquisición de fósforo y nitrógeno, lo que incluye una adecuada captación desde el suelo, almacenaje y removilización, así como también su óptimo consumo en los procesos metabólicos que dependen o utilizan cada nutriente. Algunas de las modificaciones de la arquitectura radical producto de las limitaciones de fósforo y/o nitrógeno pueden ser desde inhibición del crecimiento de la RP, crecimiento de esta, aumento o inhibición del crecimiento de RL y/o pelos radicales (Gruber, & col., 2013; Linkohr, & col., 2002; López-Bucio, & col.,

2003). Por estas razones, estudiar el impacto de estos nutrientes en el sistema radical continúa siendo un importante foco de estudio.

1.4. Regulación en la formación de raíces laterales

Las RL cumplen una tarea fundamental al captar el agua y los nutrientes. Al formar parte de una respuesta que supone alta plasticidad y que está sujeta a modificaciones dependiendo de las condiciones del sustrato o situaciones que signifiquen un estrés para el organismo, no es sorprendente esperar que el proceso de formación de RL esté fuertemente regulado. Diversos estudios han señalado a la hormona auxina como principal responsable en la regulación de la formación de RL (Malamy & Benfey 1997; Paciorek, 2006; Leyser, 2017), sin embargo, nuestro grupo de investigación ha propuesto la existencia de una vía alternativa independiente de auxina que sería capaz de iniciar la organogénesis de las RL, por medio de un mecanismo dependiente de la endocitosis (Pérez-Henríquez & col., 2012).

1.4.1. Desarrollo de Raíces Laterales como proceso dependiente de la endocitosis

Como muchos otros procesos, la formación de RL depende de una regulación hormonal que permita el adecuado desarrollo del organismo. Las auxinas están implicadas en prácticamente todos los aspectos del crecimiento de las plantas. La formación de RL es uno de los procesos comandados por auxina y, de hecho, su rol ha sido descrito como necesario para los eventos de pre y post formación del órgano (Péret & col., 2009). La iniciación de un primordio de raíz lateral depende del flujo de auxina

proveniente desde el meristema apical de la raíz (Casimiro & col., 2001) por lo que el balance del influjo es indispensable para un correcto desarrollo organogénico. Por otro lado, nuestra línea de investigación, enfocada en estudios de tráfico endocítico, ha llevado a encontrar un vínculo entre este proceso fisiológico y el desarrollo post embrionario de RL.

La endocitosis es la principal ruta a través de la cual las células internalizan membrana plasmática, proteínas, lípidos y material extracelular (Fan & col., 2015). Durante este proceso, el cargo es llevado al interior de la célula por medio de vesículas que son transportadas a diferentes compartimentos dependiendo del lugar de destino que existe para cada cargo (Fan & col., 2015). En plantas, ha sido descrita la participación de la endocitosis en procesos cruciales como la absorción de nutrientes, la transducción de señales, el almacenaje de proteínas (Fan & col., 2015) y la detoxificación de sustancias nocivas como metales pesados (Eisenach & col., 2015). A su vez, procesos como el crecimiento en pelos radicales y el tubo polínico dependen del balance endocítico que existe en las células de estos tejidos ya que esto permite, entre otras cosas, regular la cantidad de membrana plasmática en el ápice de las células y así mantener el crecimiento altamente polarizado que requieren (Šamaj & col., 2005).

En plantas superiores, la maquinaria endocítica está bien conservada tanto en sus componentes moleculares (proteínas participantes del proceso) como estructurales (compartimentos membranosos que conforman la red) (Šamaj & col., 2005). A nivel estructural, el proceso comienza en la membrana plasmática, lugar de formación de las vesículas, las cuales llegan a compartimentos endosomales tempranos que en el caso de plantas corresponde a la red transgolgi (**EE/TGN**) (Viotti & col., 2010), lugar en el cual

pueden ser redirigidos a la membrana plasmática en la ruta de los endosomas de reciclaje (Šamaj & col., 2005) o bien traficar hacia compartimentos tardíos como endosomas tardíos/compartimentos prevacuolares/ cuerpos multivesiculares, estructuras que en su lumen contienen múltiples endosomas, para finalmente ser enviados a la Vacuola (Šamaj & col., 2005) (Figura 2).

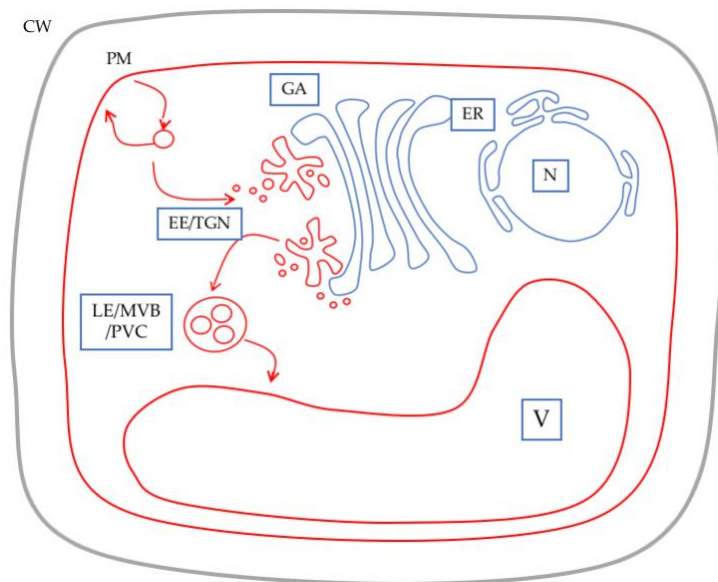


Figura 2. La ruta endocítica está conformada por diferentes compartimentos. En rojo se resaltan los distintos compartimentos involucrados en la endocitosis. El proceso comienza en la membrana plasmática (**PM**), desde donde las vesículas formadas transitan hacia la red transgolgi (**EE/TGN**) para luego constituirse como endosomas tardíos en cuerpos multivesiculares y compartimentos prevacuolares (**LE/MVB/PVC**). El destino final de la ruta endocítica es la vacuola (**V**). **CW**: Pared celular, **GA**: Aparato de Golgi, **ER**: Retículo endoplásmico, **N**: Núcleo. Modificado de Osorio-Navarro, 2016.

1.4.2. Regulación transcripcional de la endocitosis: El Factor de Transcripción bZIP25

La endocitosis es un proceso altamente regulado (Fan & col., 2015) en el cual la interacción, localización y modificación de los componentes de la maquinaria endocítica es modulada, en algunos casos, a nivel transcripcional (Pizarro, 2015). Lorena Pizarro, como parte de su tesis doctoral, realizó una búsqueda de factores de transcripción asociados a la regulación del tráfico de proteínas, descubriendo que el factor de transcripción bZIP25 (At3G54620) participa del proceso endocítico al regularlo de manera negativa (Pizarro, 2015). Esta evidencia fue obtenida utilizando la planta mutante insercional de la línea *bzip25-2* (Figura 3A), que corresponde a la **pérdida de función de bZIP25**. Plantas de esta línea tienen disminuido en un 90% los niveles de transcrito de *bZIP25* y muestran una aceleración del tráfico endocítico (Figura 3B), observándose un alargamiento de la raíz principal y un mayor desarrollo de RL (Pizarro, 2015).

El factor bZIP25 es uno de los 75 miembros perteneciente a la gran familia de factores bZIP (basic leucine zipper) que han sido descritos en *Arabidopsis* (Jakoby & col., 2002). Estos factores se caracterizan por poseer un dominio bZIP, compuesto de una región básica, rica en residuos de arginina y/o lisina y una región hidrofóbica rica en residuos de leucina, isoleucina, valina o fenilalanina, formando así una hélice anfipática (Jakoby & col., 2002). Estos factores dimerizan y se unen a la doble hebra de DNA a través de su región básica. La dimerización ocurre por medio de la interacción de las regiones hidrofóbicas, las que forman una hélice superenrollada, conocida como cierre de leucina (Jakoby & col., 2002). Dentro de esta familia, bZIP25 es un integrante del grupo C, clasificado de acuerdo a semejanzas en la estructura de su dominio bZIP (Jakoby & col., 2002) con otros miembros. Se ha descrito que el grupo C de la familia bZIP posee similitud con proteínas bZIP codificadas en el locus *Opaque 2* en maíz (Jakoby & col.,

2002) por lo que sus funciones podrían estar asociadas a la regulación de la producción de proteínas de almacenaje (Jakoby & col., 2002; Schmidt & col., 1990) y la interacción planta-patógeno (Jakoby & col., 2002). En nuestro laboratorio, el trabajo de la tesis doctoral de Lorena Pizarro apuntó a evaluar la regulación de la endocitosis como una nueva función de la cual bZIP25 participa.

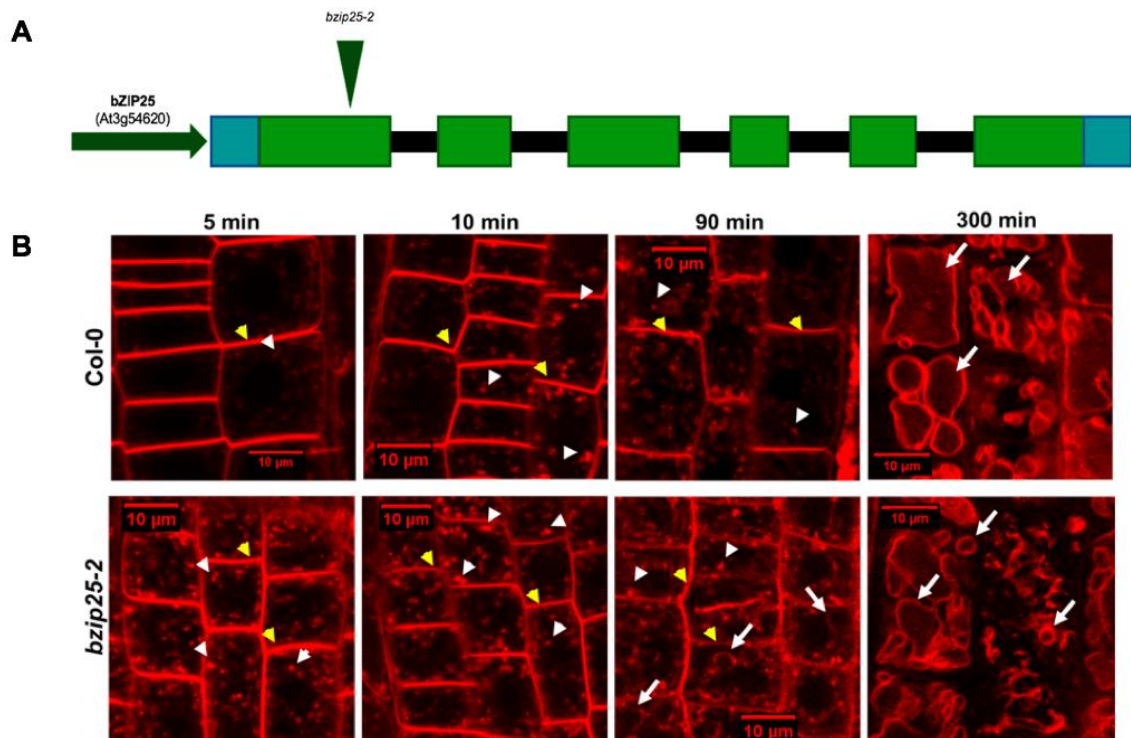


Figura 3. La carencia de bZIP25 acelera el tráfico endocítico. (A) Modelo génico del factor de transcripción *bZIP25*. Las cajas verdes indican los exones del gen mientras que las franjas negras señalan la presencia de intrones. Las cajas azules muestran las regiones 5' y 3' UTR. Se señala con un triángulo la inserción de T-DNA que interrumpe el primer exón, afectando la correcta transcripción del gen *bZIP25* y generando la pérdida de función del gen. **(B)** Estudio de la dinámica de internalización de la membrana plasmática mediante marcaje con el trazador FM4-64 en plantas silvestres (Col-0) y *bzip25-2* durante 300 minutos. A lo largo de todo el proceso se observa una aceleración en la internalización de la sonda a los endosomas en plantas con pérdida de función de *bZIP25* respecto de plantas silvestres. Puntas de flechas amarillas señalan la membrana plasmática, puntas de flechas blancas los endosomas y flechas blancas compartimentos vacuolares. **B** fue tomado desde Pizarro, 2015.

La base de datos de TAIR muestra que el gen codificante para bZIP25 posee tres variantes de mRNA distintas, generadas por el empalme alternativo de sus exones. El

presente trabajo se enfoca en el estudio de la variante At3G54620.2 (*bZIP25.2*). La base de datos UNIPROT indicó que la traducción de la variante *bZIP25.2* generaría una proteína de 295 residuos.

Si bien *bZIP25* participa de la regulación negativa de la endocitosis, la existencia de tres variantes de mRNA generadas de la transcripción del gen *bZIP25* hace necesario profundizar el estudio para dilucidar si existe una función particular asociada a cada una de ellas. Durante el seminario de título de Claudio Osorio para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, se evaluó la variante *bZIP25.1*, expresando el gen correspondiente para la acumulación de la proteína de fusión *bZIP25.1-GFP* en la mutante *bzip25-2 (bzip25-2/bZIP25.1-GFP)*. De esta investigación, se encontró que la proteína *bZIP25.1-GFP* es capaz de restaurar el fenotipo silvestre de endocitosis en la mutante, mostrando que la endocitosis en plantas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* ocurre en una escala temporal similar a la de plantas silvestres, así como también un sistema radical más parecido al de estas mismas. (Osorio-Navarro, 2016).

Con todo lo anterior, es necesario dilucidar si la variante *bZIP25.2* tiene una función asociada a la endocitosis. De ser así, hay que estudiar si esto tiene repercusión en el desarrollo de RL. Considerando la respuesta fisiológica que tienen las plantas de modificar su arquitectura radical como respuesta al estrés nutricional, es interesante evaluar si existe vinculación entre la expresión de *bZIP25*, los procesos que este factor regularía y la respuesta a déficit nutricional que esto genera.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la participación de la variante de mRNA bZIP25.2 en la regulación de la endocitosis y en la respuesta de plantas de *Arabidopsis thaliana* al déficit nutricional de nitrato y fosfato.

2.2. Objetivos Específicos

1. Identificar plantas que presenten el inserto de T-DNA que contiene el alelo *bZIP25.2-GFP* en condiciones de homocigosis en la línea mutante *bzip25-2* de *Arabidopsis thaliana*.
2. Determinar la participación del producto génico bZIP25.2 en el tráfico endocítico en plantas de *Arabidopsis thaliana*.
3. Evaluar, a nivel de la arquitectura radical, la participación del producto génico bZIP25.2 en la respuesta de plantas de *Arabidopsis thaliana* al déficit nutricional de fosfato y nitrato.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas

El presente estudio se realizó utilizando cuatro líneas de *Arabidopsis*. La línea silvestre corresponde al ecotipo Columbia-0 (Col-0). Las líneas mutantes para el gen codificante de bZIP25 provienen de la colección SALK_148423C, caracterizada por poseer una inserción de T-DNA en el locus At3g54620, específicamente en el primer exón del gen, generando así la línea pérdida de función *bzip25-2*. Esta línea, además posee como marcador de selección el gen *NptII*, cuya expresión otorga a las plantas resistencia al antibiótico kanamicina. Las otras dos líneas, generadas en nuestro laboratorio en el genotipo mutante *bzip25-2*, fueron transformadas con el vector binario pGWB5 que contiene un T-DNA con el gen *Hph*, cuya expresión le otorga a los individuos resistencia al antibiótico higromicina. Además, el T-DNA incluye las secuencias codificantes para las variantes de mRNA bZIP25.1 o bZIP25.2 en marco de lectura con la secuencia que codifica para la proteína GFP bajo el promotor 35S. Este vector permite, entonces, la acumulación de las proteínas de fusión bZIP25.1-GFP o bZIP25.2-GFP de manera constitutiva y ectópica, generando las líneas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, respectivamente.

3.2. Esterilización de semillas

Grupos de 30 a 40 semillas de cada línea fueron dispuestas en tubos de 2 mL y tratadas con etanol 95% durante 5 minutos, manteniendo agitación constante. Se descartó la solución y se agregó una solución que contiene etanol 70% y Tritón X-100 0,1%, incubando durante 15 minutos en agitación. Finalmente, esta solución fue descartada y se realizaron 4 lavados de 30 segundos cada uno con 1 mL de agua estéril,

con el fin disminuir los remanentes de la solución de etanol y detergente utilizado en el paso anterior. Por último, las semillas se resuspendieron en 1 mL de agua estéril y fueron almacenadas en oscuridad a 4°C durante 48 horas para su estratificación.

3.3. Medio de cultivo y condiciones de crecimiento

Para los ensayos de crecimiento se utilizó medio de cultivo estéril (MS sólido), compuesto de medio Murashige & Skoog (MS) 0,5X, mioinositol 0,01% p/v, MES [ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico monohidrato] 0,05% y sacarosa 2% p/v. El medio fue ajustado a pH 5,7 utilizando soluciones de KOH 3 M y 0,1 M y posterior a ello fue añadido fitoagar (A296, Phyto Technologies) al 0,7% p/v. Los ensayos que requirieron el uso de medio de cultivo líquido (MS líquido), fueron preparados de igual manera que el MS sólido salvo que este no contiene fitoagar.

Al comienzo de cada ensayo se sembraron dos filas de semillas cuyo número varía de acuerdo al ensayo realizado. Se dejó un espacio aproximado de 5 cm entre las filas para otorgar el espacio suficiente para el crecimiento óptimo de la raíz principal. Las semillas se sembraron sobre placas cuadradas (120 mm X 120 mm X 17 mm) y se dejaron creciendo de manera vertical durante diez días, excepto cuando se especifique, en incubador con fotoperiodos de 16 horas de luz 8 (a 22°C) y 8 horas de oscuridad (a 18°C).

3.4. Genotipificación de línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*

3.4.1. Extracción y cuantificación de DNA

Para la genotipificación de la línea mutante se extrajo el DNA genómico (gDNA) desde hojas de plantas de 14 días de crecimiento. Para ello, el tejido fue molido utilizando un micropistilo en 200 µL de buffer de extracción (Tris-HCl 0,2 M. pH 8; NaCl 0,25 M; EDTA 25 mM; SDS 0,5%). Se sometió a una fuerte agitación utilizando vórtex y se centrifugó la suspensión por 5 minutos a 14.000 rpm. Se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó 300 µL de isopropanol y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm. Se conservó el precipitado y eliminó el sobrenadante. El precipitado fue lavado con 500 µL de etanol 70% para después centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos. Otra vez, se conservó el precipitado y el sobrenadante fue eliminado. Finalmente, se esperó por 1 hora hasta la evaporación total del etanol y las muestras fueron resuspendidas en 100 µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1mM). La concentración del gDNA y su pureza se determinó mediante espectrofotometría utilizando el GE NanoVue™.

3.4.2. Amplificación de gDNA por PCR

La genotipificación se realizó mediante PCR convencional utilizando la enzima DNA polimerasa paq5000 (ThermoFisher), según las instrucciones del fabricante. El PCR consistió en un primer paso de 5 minutos a 94°C para la denaturación del gDNA seguidos por 30 ciclos donde cada uno se componía de 30 segundos a 94°C para la denaturación, 30 segundos a 55°C para el alineamiento de partidores y 1 minuto a 72°C para la extensión, para finalizar con una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los partidores utilizados se detallan en la Tabla I.

Tabla I. Partidores utilizados para reacciones de PCR en la genotipificación de las líneas de *Arabidopsis*.

Gen	Partidor Forward (5')	Partidor reverse (3')
<i>Actina</i>	CACACTTTCTACAATGAGCT	GCAGTGATCTCTTTGCTCAT
<i>Hph</i> (Higromicina_R)	TTTGTGTACGCCCGACAGT	AAGACCTGCCTGAAACCGA
<i>NptII</i> (Kanamicina_R)	CAAGATGGATTGCACGCA	CTATGTCCTGATAGCGGT
<i>GFP</i>	CGTAAACGGCCACAAGTTCA	TTCTGCTTGTGCGCCATGAT
<i>bZIP25</i>	TGCTCAGCTATGCTAGTAG	ATCTAAGAGACGTACACGAC
<i>LBb1.3</i>	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	

3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos obtenidos de cada reacción de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% p/v en TAE 1X (Tris base pH 8, 40 mM, ácido acético 19 mM y EDTA 1 mM pH 8). Desde cada reacción de PCR de 20 µL, se tomaron 8,5 µL y se mezclaron con 1,5 µL de buffer de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol 0,25% p/v, ficol 30% p/v). Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa a 85 mV durante 45 minutos. Se utilizaron dos diferentes marcadores de peso molecular, dependiendo del tamaño esperado de las bandas (SM0311/2/3 y SM1331/2/3, Fermentas), con una concentración inicial de 50 ng/µL. Terminada la electroforesis, el gel fue incubado en solución de bromuro de etidio 2 mg/L durante 15 minutos con el fin de permitir la unión de este compuesto al DNA y así poder observar

las bandas obtenidas. La visualización del DNA se realizó mediante la exposición del gel a luz UV proveniente desde un equipo transiluminador. Las imágenes del gel fueron recogidas utilizando el fotodocumentador SYNGENE y su software.

3.5. Visualización de la señal de fluorescencia de GFP en plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*

Para evaluar la localización subcelular y acumulación de la proteína de fusión con GFP, plántulas de 10 días crecidas sobre medio MS sólido fueron analizadas bajo microscopía confocal (LSM Zeiss 710) con el fin de detectar la emisión de la proteína fluorescente verde (GFP). La señal de emisión se buscó en células de la epidermis en la zona de elongación de la raíz. La recolección de imágenes se realizó utilizando rangos de longitud de onda de 493-547 nm.

3.6. Estudio del tráfico endocítico

El estudio de endocitosis se realizó observando en diferentes intervalos de tiempo la localización de trazadores fluorescentes de endocitosis FM1-43 (T35356, ThermoFisher) y FM4-64 (T13320, ThermoFisher) capaces de ser internalizados por las células, siguiendo ruta desde la membrana plasmática hasta la vacuola en la dimensión espacio-temporal (Amaral & col., 2010). Para ello, plántulas *de las líneas bzip25-2 y bzip25-2/bZIP25.2-GFP* crecidas en MS sólido fueron incubadas en 3 mL de MS líquido con FM1-43 5 μ M, por 10 minutos, en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente las plántulas fueron lavadas con MS líquido para remover el FM1-43 libre. Dos a tres horas más tarde, una vez que el FM1-43 ha alcanzado la vacuola cada conjunto de

plántulas fue incubado con FM4-64 5 μM en 3 mL de medio MS líquido con sacarosa 2% p/v. La incubación se realizó durante 5 minutos, en oscuridad y a 4°C para que se uniera el trazador a la membrana plasmática, finalmente las plantas fueron nuevamente lavadas con MS líquido (Figura 4).

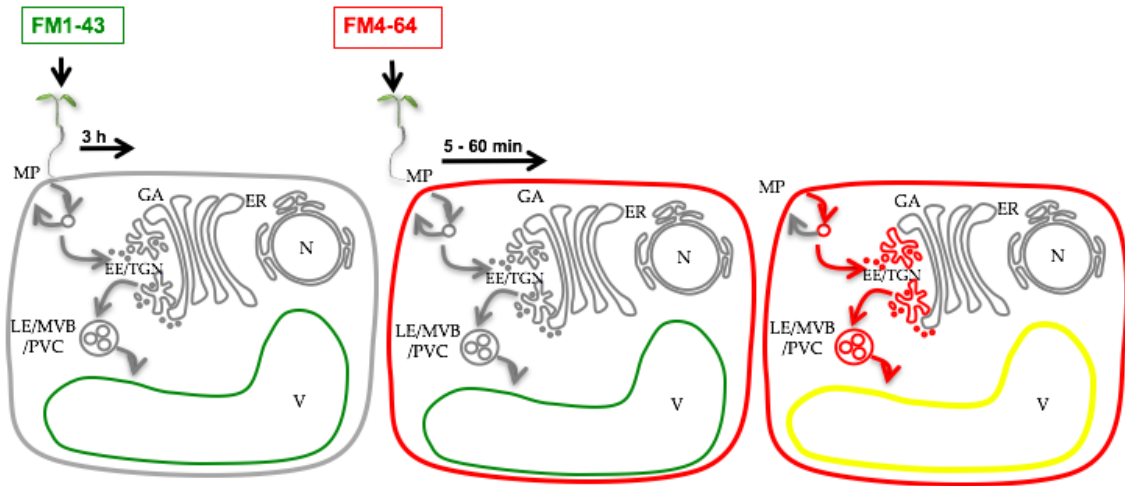


Figura 4. Los trazadores FM1-43 (verde) y FM4-64 (rojo) marcan la ruta endocítica gracias a su unión a las capas lipídicas de las membranas. Ambos siguen las mismas vías y codistribuyen en la vacuola al final de la ruta endocítica. La incubación de los trazadores en diferentes tiempos permite distinguir las distintas etapas del proceso endocítico, las que aparecen indicadas a través de las flechas. **MP:** Membrana plasmática, **GA:** Aparato de Golgi, **EE/TGN:** Endosomas tempranos/Red Transgolgi, **LE/MVB/PVC:** Endosomas tardíos/Cuerpos multivesiculares/Compartimentos prevacuolares, **V:** Vacuola, **N:** Núcleo, **ER:** Retículo endoplásmico. (Modificado de Tejos & col., 2018).

La endocitosis se analizó en las células de la epidermis en la zona de elongación en la punta de la raíz. Se evaluó la localización de los trazadores en diferentes intervalos de tiempo; a los 5 minutos luego de haber retirado las plantas de la incubación con FM4-64, luego a los 60 minutos y finalmente a los 90 minutos post-incubación. Utilizando microscopía confocal (LSM Zeiss 710) se capturaron imágenes mediante el programa LSM Image Browser, las cuales fueron analizadas bajo la extensión LSM reader del

programa ImageJ. Las imágenes fueron recogidas utilizando rangos de longitud de onda entre 533 y 586 nm para la señal FM1-43 y entre 664 y 758 para la señal FM4-64.

3.7. Ensayos de crecimiento de plantas de *Arabidopsis* bajo diferentes condiciones nutricionales de Nitrato y Fosfato en el medio de cultivo.

Se estudió la modificación de la arquitectura radical en plantas en la respuesta al déficit de los macronutrientes fósforo y nitrógeno. Para ello, plantas de 7 días de crecimiento bajo en MS sólido bajo régimen normal de nutrientes (sección 3.3.) fueron traspasadas a diferentes tratamientos con condiciones de suficiencia o deficiencia de un determinado nutriente durante 6 días. Cada tratamiento conlleva la preparación *de novo* de medio de cultivo a través del aditamento de un *stock* común de sales (Tabla VII, Anexo) y la adición de una fuente fósforo o nitrógeno en una concentración particular, por lo tanto, no se utilizó el MS comercial. El fitoagar utilizado en este conjunto de experimentos tiene solo trazas de fosfato y nitrato siendo el utilizado en estudios de este tipo (Duchefa, P1003). También se realizó un tratamiento control con MS reconstituido, el cual consiste en un medio de cultivo generado a partir del mismo *stock* común de sales utilizadas para los tratamientos de fosfato y nitrato, salvo que este contiene cantidades suficientes de ambos macronutrientes, de forma que se asemeja al MS sólido con fitoagar comercial utilizado normalmente (Sección 3.3.). El resto de los componentes del medio y su forma de preparación fueron idénticos al presentado en la sección 3.3. Dos tipos de fuentes de fosfato y nitrato fueron utilizadas para el estudio de cada macronutriente. El estudio de deficiencia de fosfato se llevó a cabo utilizando como fuentes del nutriente las sales Na_2HPO_4 y K_2HPO_4 , mientras que para estudiar la

deficiencia de nitrato se utilizaron las sales KNO_3 y NH_4NO_3 . Las concentraciones de las sales, que determinaron el carácter de suficiencia o deficiencia para cada tratamiento se detallan en la Tabla II.

Tabla II. Concentración de sales utilizadas como fuente de fosfato y nitrato para los ensayos de deficiencia de macronutrientes. Los signos “+” y “-” indican suficiencia y deficiencia del nutriente, respectivamente

Nutriente	Fuente	Concentración [mM]			
		-P	0,001	+P	1,25
Fósforo	Na_2HPO_4	-P	0,001	+P	1,25
	K_2HPO_4	-P	0,001	+P	1,25
Nitrógeno	KNO_3	-N	0,5	+N	10
	NH_4NO_3	-N	0,5	+N	10

Plántulas de 7 días fueron traspasadas a los diferentes tratamientos. Se realizó un marcaje que permitiera conocer la posición de la punta de la raíz primaria al momento de realizar el traspaso con el fin de estimar la variación en la longitud de esta luego del traspaso. Se evaluó la respuesta al déficit nutricional luego de cuatro o seis días de tratamiento (11 o 13 días post germinación), enfocándose en la modificación de la arquitectura radical de las plantas. Para ello, las placas donde crecieron las plantas fueron escaneadas (escáner EPSON Perfection V600 Photo). Usando las imágenes obtenidas y mediante el software ImageJ se cuantificó el **largo de la raíz principal**, se estimó la **variación de su crecimiento durante el tratamiento** (qué tanto creció la raíz durante el tratamiento) y se registró el número de raíces laterales emergidas con el fin de obtener el **índice de raíces laterales** (Figura 5).

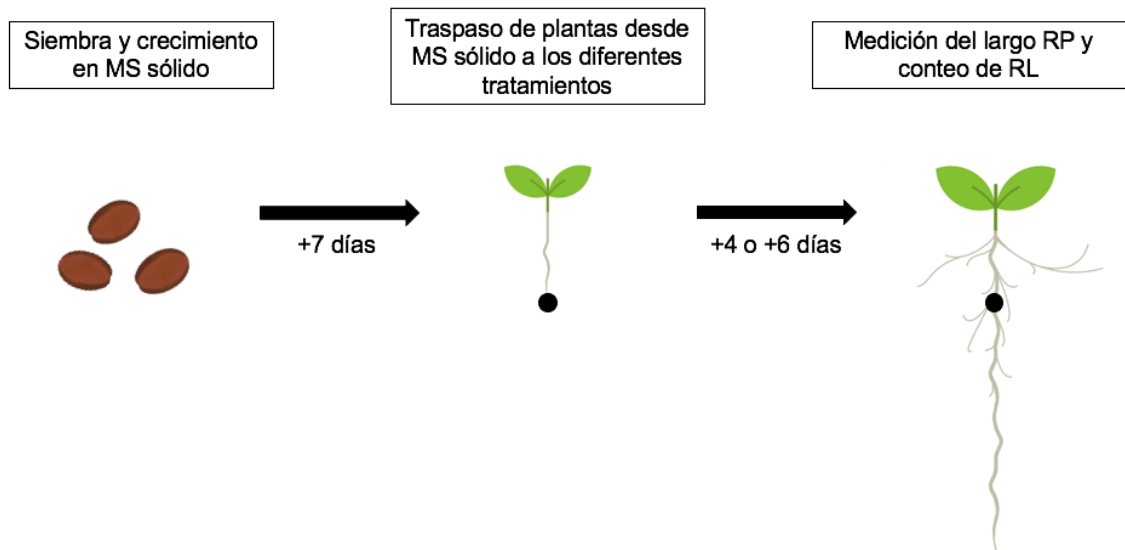


Figura 5. Esquema general del ensayo de crecimiento bajo diferentes condiciones nutricionales de nitrato y fosfato. Semillas estériles son sembradas bajo régimen normal de nutrientes; al cabo de 7 días las plántulas son trasplantadas a diferentes medios según el tratamiento asignado (ver Tabla II). Las plantas se mantienen en el tratamiento por un periodo de 4 o 6 días, completando las plantas 11 o 13 días de crecimiento desde la siembra de sus semillas, respectivamente. Posterior a ello las placas donde crecieron las plantas son escaneadas y las imágenes se analizan enfocándose en el largo de la raíz principal y el número de raíces laterales emergidas.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización la línea mutante *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*

La línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* fue generada previamente en nuestro laboratorio dentro del trabajo de tesis doctoral de Lorena Pizarro (Pizarro, 2015). Se clonó la secuencia codificante de la versión bZIP25.2 en marco de lectura con la secuencia de GFP contenida en el vector binario pGWB5. Este vector fue generado por Arantazú Bidegain bajo la tutela de Lorena Pizarro y permite expresar la versión de la proteína de fusión bZIP25.2-GFP bajo el promotor de plantas 35S: 35S::bZIP25.2-GFP. Plantas de la línea *bzip25-2* fueron transformadas con este vector mediante infiltración de *A. tumefaciens*. El vector de clonamiento contiene el gen *Hph*, codificante para la enzima higromicina B fosfotransferasa, la cual fosforila la higromicina e inactiva su acción antibiótica, otorgándole así a los individuos que expresen este gen resistencia a este antibiótico (Blochliger & Diggelmann, 1984). La progenie de la transformación (T1) fue utilizada para la selección de individuos transformantes mediante el crecimiento sobre medio de cultivo en presencia del antibiótico higromicina. Posteriormente, se identificaron individuos resistentes al antibiótico en la progenie de los individuos T1 y la generación T2. Este trabajo fue realizado por Claudio Osorio en nuestro laboratorio.

Semillas de la generación T3 de parentales T2 transformantes fueron recibidas para llevar a cabo los experimentos realizados durante este seminario de título, sin embargo, además de su resistencia al antibiótico higromicina, ningún otro estudio había sido realizado hasta la fecha para corroborar la correcta identidad de la línea *bzip25-*

2/*bZIP25.2-GFP*, así como tampoco el estado cigótico de esta. *Arabidopsis* es un género diploide, por lo tanto, contar con individuos homocigóticos es importante dado que solo así se descartan los posibles efectos ligados a la presencia/ausencia de un alelo modificado y/o silvestre, como podría ocurrir en individuos heterocigotos. Además, en nuestro laboratorio constantemente se busca amplificar el banco de semillas de una línea en particular por medio de la producción de nuevas generaciones transformantes, razón por la cual se pretende que el genotipo se perpetúe, lo cual solo se consigue manteniendo copias idénticas del material genético.

4.1.1. Estandarización de agente de selección utilizado para identificar individuos homocigotos para el transgén *bZIP25.2-GFP*

La línea mutante *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* contiene el vector pGWB5 que porta un elemento de T-DNA con la secuencia de mRNA codificante para la variante *bZIP25.2* del factor *bZIP25* fusionada a la secuencia codificante para la proteína GFP, además del gen *Hph*. Si bien se recibieron semillas pertenecientes a la T3 de plantas transformantes, es decir, que portan el T-DNA, es importante verificar que los individuos de esta generación poseyeran las características de la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, que, además de la presencia del transgén *bZIP25.2-GFP* y el gen *Hph*, incluyen el ser individuos cuyos progenitores pertenecían a la línea *bzip25-2* (con inserto de T-DNA que interrumpe el gen *bZIP25*) previo a la transformación y que poseen el gen *NptII*, cuya expresión genera la proteína neomicina fosfotransferasa, que mediante fosforilación inactiva el antibiótico kanamicina (Reynaerts & col., 1989).

Para corroborar el estado homocigótico del inserto codificante para bZIP25.2-GFP en los individuos transformados, se planteó realizar un ensayo de crecimiento sobre medio de cultivo en presencia del marcador de selección higromicina. Las plantas T2 de la línea bZIP25.2-GFP que son resistentes a higromicina, pueden ser heterocigotas para la inserción de T-DNA que porta el gen *Hph* u homocigotas para este. La manera de corroborar la cigosidad de los individuos es evaluar la progenie T3 de estos: si el 100% de la progenie T3 de un parental es resistente al antibiótico, significa que el parental era homocigoto para esta inserción. Por ello el ensayo de sensibilidad al antibiótico fue utilizado para la identificación de los individuos de interés en este trabajo.

Primero y con el fin de comprobar la mínima concentración efectiva del antibiótico para la selección, se evaluó el crecimiento de plantas resistentes y de plantas sensibles al antibiótico que teníamos en nuestro laboratorio en distintas concentraciones del antibiótico en el medio de cultivo. Se utilizaron la línea silvestre (Col-0), *bzip25-2* que son sensibles a higromicina y la línea *bZIP25-2/bZIP25.1-GFP* que es resistente al antibiótico, desarrollada en el seminario de título de Claudio Osorio (Osorio-Navarro, 2016) por lo que aquí es utilizada como control positivo del ensayo. Las semillas se dispusieron sobre MS sólido que contenía distintas concentraciones de higromicina y las plántulas fueron crecidas durante dos semanas para evaluar la capacidad de crecimiento (Figura 6). Se ha descrito que el antibiótico genera retardo en la germinación de semillas de plantas sensibles, afectando también la estructura de los cotiledones (Duang & Ding, 2011), e impidiendo el desarrollo de hojas, RP y la formación de RL (Duang & Ding, 2007), en cambio semillas resistentes no presentan retraso en la germinación, a la vez que logran un desarrollo normal (Nakazawa & Matsui, 2003).

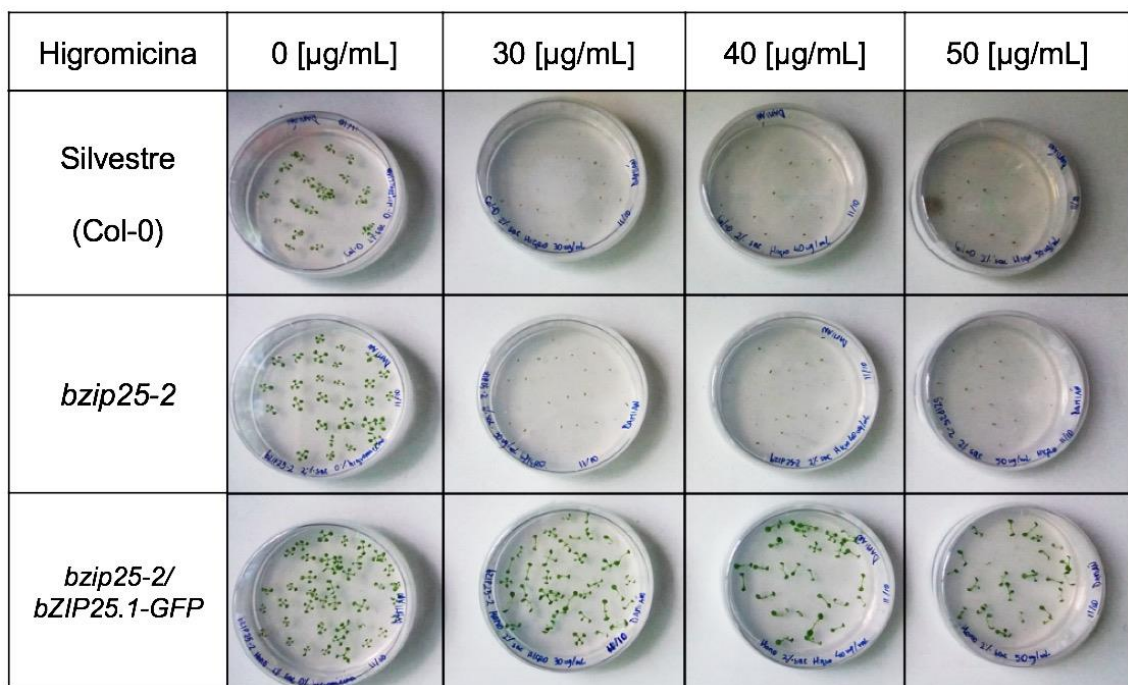


Figura 6. La concentración 30 [µg/mL] de higromicina es la mínima concentración evaluada para seleccionar organismos resistentes. Semillas fueron sembradas en diferentes concentraciones de higromicina en MS sólido. Tanto plantas silvestres como *bzip25-2* ven afectada su capacidad de germinación aun con la menor concentración de higromicina utilizada, así como también se ve disminuido el desarrollo de plántulas mientras que semillas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* logran germinar y desarrollar plántulas incluso a altas concentraciones de antibiótico. n=35 semillas por placa.

A partir de los resultados obtenidos, se calculó el porcentaje de germinación de las semillas evaluadas para cada condición. Los resultados se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Porcentaje de germinación de semillas en MS sólido bajo diferentes concentraciones de higromicina (n=35 semillas por condición)

Higromicina [µg/mL]	0	30	40	50
Silvestre (Col-0)	80,1%	62,5%	53,3%	46,7%
<i>bzip25-2</i>	93,3%	63,3%	50%	45,5%
<i>bzip25-2/bZIP25.1-GFP</i>	94,7%	88,7%	81,8%	76,7%

Luego de dos semanas, se evaluó la germinación y el crecimiento de las plántulas. Se encontró que en condiciones controles, el porcentaje de germinación es superior al 80% tanto en plantas silvestres, *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* (Tabla III). Asimismo, de la totalidad de las semillas germinadas en ausencia de antibiótico, la gran mayoría de estas llegó a generar una plántula que se desarrolló normalmente al cabo de las dos semanas de evaluación (Tabla IV). Ante la presencia del antibiótico en el medio de cultivo a una concentración de 30 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], la germinación en plantas silvestres y *bzip25-2* disminuye casi en un 30%, mientras que en plantas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* la disminución es solo de un 6% (Tabla III). El aumento de la concentración de antibiótico en el medio de cultivo provoca una clara tendencia a la disminución en la germinación de las semillas, lo cual ocurre de manera transversal a todas las líneas utilizadas (Tabla III), sin embargo, es importante notar el porcentaje en el cual la tasa de germinación se reduce para cada línea en particular. Plantas silvestres ven disminuida su capacidad de germinación casi en un 50% al utilizar 50 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de higromicina en el medio, situación muy similar al de plantas *bzip25-2*, donde la tasa de germinación disminuye desde un 93,3% a un 45,5%. Semillas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* ven reducida su capacidad de germinar en un 23% si se compara la ausencia de higromicina en el medio y la mayor concentración de antibiótico utilizado (Tabla III).

Por otro lado, hay que señalar que la capacidad de las semillas de desarrollar plántulas que sobrevivan se ve severamente afectada por la presencia de higromicina, siendo este el parámetro más relevante al momento de evaluar la sensibilidad/resistencia de los individuos al antibiótico. Tras dos semanas, aquellas semillas de plantas silvestres y *bzip25-2* que lograron germinar en presencia de higromicina presentaron un evidente retraso en el desarrollo de las plántulas, en comparación a las de la línea *bzip25-*

2/*bZIP25.1-GFP*, afectando el crecimiento tanto de la raíz como de los cotiledones, donde estos últimos se observaban cloróticos y pequeños. Independiente de la concentración del antibiótico, ninguna de las plántulas silvestres o *bzip25-2* sobrevivió tras las dos semanas de evaluación (Tabla IV), en contraste con plántulas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP*, las cuales germinaron y crecieron con normalidad incluso con la mayor concentración de antibiótico utilizado (Tabla IV). Cualitativamente, no se observaron diferencias entre plantas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* crecidas en las diferentes concentraciones de higromicina y la condición control (Figura 6), dando cuenta de que el fenotipo del organismo no se vio afectado por la presencia del antibiótico.

Tabla IV. Porcentaje de supervivencia de plántulas bajo diferentes concentraciones de higromicina (n=35 semillas por condición)

Higromicina [$\mu\text{g/mL}$]	0	30	40	50
Silvestre (Col-0)	100%	0%	0%	0%
<i>bzip25-2</i>	100%	0%	0%	0%
<i>bzip25-2/bZIP25.1-GFP</i>	100%	93%	74%	63%

Los resultados obtenidos permitieron definir que una concentración de antibiótico de 30 $\mu\text{g/mL}$ es suficiente para realizar una adecuada selección de individuos transformantes que sean resistentes al antibiótico y que porten el inserto de T-DNA que contiene el ORF *bZIP25.1-GFP*. Se decidió, por lo tanto, utilizar esta concentración de antibiótico para realizar la selección de plantas transformantes de la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*.

4.1.2. Ensayo de selección e identificación de individuos homocigotos para el transgén *bZIP25.2-GFP*

Durante la investigación para este seminario de título se trabajó con individuos de la generación T3 de plantas transformadas con el T-DNA que contiene el transgén codificante para *bZIP25.2-GFP*. Tomando en cuenta que *Arabidopsis thaliana* es una especie diploide, si los progenitores de la generación T3 fuesen heterocigotos, la población sembrada habría presentado la clásica segregación de alelos con porcentajes de: 25% homocigoto, es decir, ambas copias del genoma poseerían el transgén (que es la característica buscada), mientras un 50% hubiese sido heterocigoto (con solo una copia del transgén) y un 25% no hubiese presentado copia alguna del transgén. A nivel fenotípico, esto se traduce, en un 75% de la población resistente al antibiótico. Por otro lado, si el progenitor de la generación T3 es homocigoto para el transgén, se espera que, en teoría, el 100% de las semillas sea capaz de germinar y las plántulas crecer en presencia del marcador de selección, como ocurrió con plántulas de la línea *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* (sección 4.1.1)

Para dilucidar esto, la progenie (generación T3) de cuatro individuos (Ind) de la generación T2 de plantas transformantes *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* fue analizada de acuerdo con su sensibilidad al antibiótico higromicina. Se evaluaron aproximadamente 150 individuos T3 a fin de contar con un número suficiente cuya población permitiera constatar su condición de cigosis, utilizando el marcador de selección como reportero de esta condición. Tras un periodo de dos semanas, la germinación de las semillas y supervivencia de las plantas fue analizada.

En ausencia de antibiótico, se observó que un alto porcentaje de las semillas evaluadas germinan (Tabla V), siendo en todos los casos superior al 70%. La progenie de los cuatro individuos evaluados logra desarrollar plántulas (Tabla VI) que, a nivel fenotípico, son indistinguibles de plántulas silvestres, así como también de plántulas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* (Figura 7A-7F). En presencia del antibiótico en el medio de cultivo, se obtuvo que solo la progenie de los individuos *bzip25-2/bZIP25.2-GFP.1* y la de dos individuos *bzip25-2/bZIP25.2-GFP.2* es resistente a higromicina, con porcentajes de germinación de 95% y 85% (Tabla V). Las plántulas desarrolladas en la progenie de individuos T2 (Figura 7G y 7H) son comparables cualitativamente al de plántulas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* (Figura 7L). En contraste, dos de los individuos evaluados a través de su progenie mostraron ser sensibles a la acción antibiótica (Figura 7I y 7J). Es importante destacar que, tras la germinación de las semillas de los individuos T2 Ind3 e Ind4 no se observó desarrollo de las plántulas generadas (Tabla VI), situación idéntica a la condición silvestre al estar expuestas a la higromicina (Figura 7K).

Tabla V. Porcentaje de germinación de las semillas de la progenie de cuatro individuos diferentes *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*

Higromicina [$\mu\text{g/mL}$]	0	30
Silvestre (Col-0)	73%	23%
<i>bzip25-2/bZIP25.1-GFP</i>	86%	84%
<i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> Ind 1	100%	95%
<i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> Ind 2	77%	85%
<i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> Ind 3	97%	43%
<i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> Ind 4	77%	39%

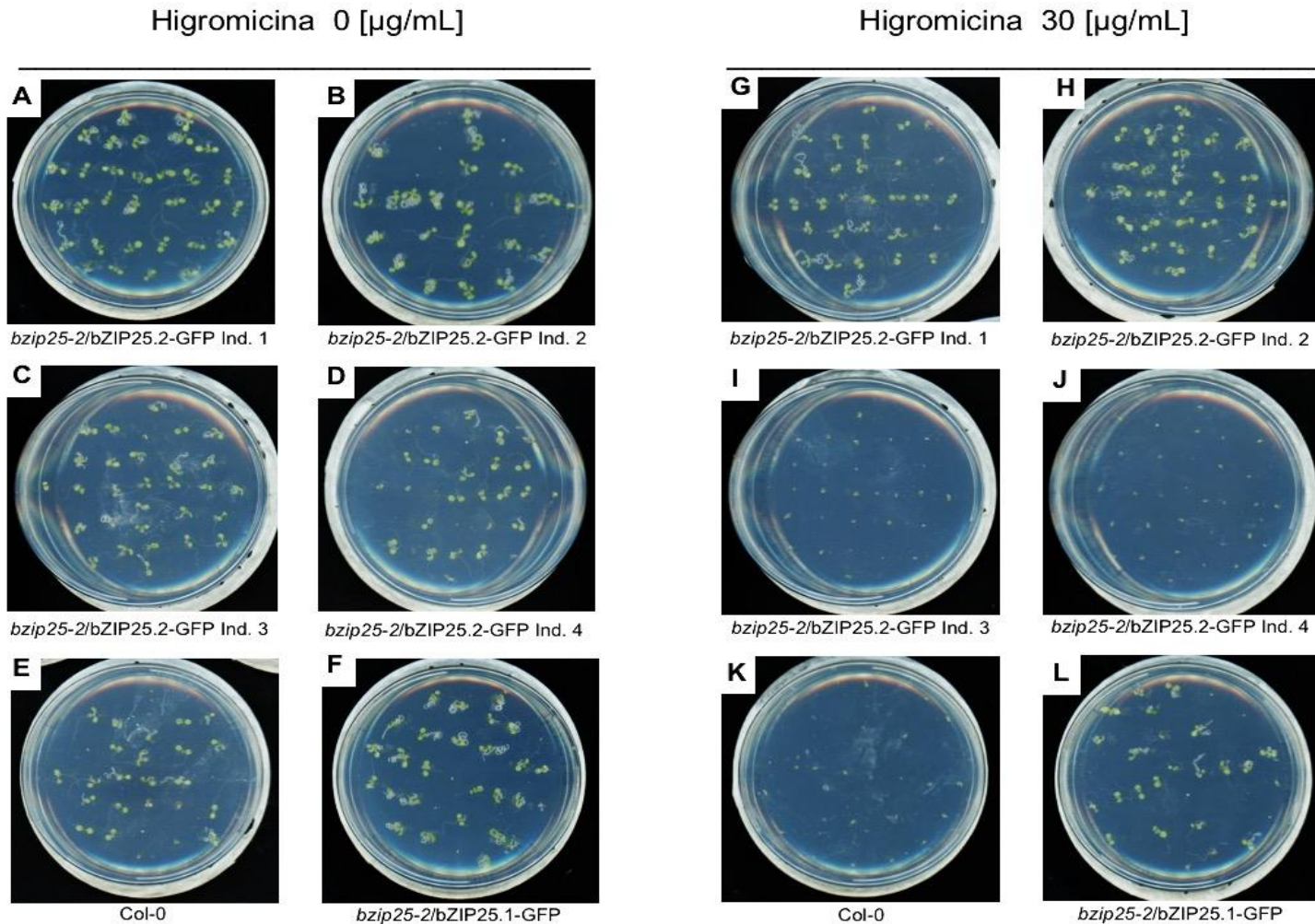


Figura 7. Hallazgo de individuos T3 de la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* resistentes a la acción de la higromicina. La progenie de 4 individuos (Ind1, Ind2, Ind3, Ind4) distintos de la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* fue evaluada de acuerdo con su sensibilidad al antibiótico (G, H, I, J). Semillas Col-0 y *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* fueron utilizadas como control negativo y positivo de selección (E, F, K, L). Semillas sembradas sobre MS sólido sin antibiótico (A-F) mostraron altas tasas de germinación, originando plantas que logran crecer. En presencia de higromicina, la progenie de los individuos Ind1 e Ind2 germinó (G y H) y dio lugar a plántulas que lograron desarrollarse completamente, de manera similar a plántulas de la línea *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* (L). La progenie de otros dos individuos Ind3 e Ind4 fue sensible al antibiótico (I y J), al igual que semillas silvestres (K).

Tabla VI. Porcentaje de supervivencia de plántulas de la progenie de cuatro individuos *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* crecidas en MS sólido con presencia de higromicina. n = 150 semillas por parental. n = 30 semillas por controles positivo (*bzip25-2/bZIP25.1-GFP*) y negativo (Silvestre Col-0)

Higromicina [$\mu\text{g/mL}$]	0	30
Silvestre (Col-0)	100%	0%
<i>bzip25-2/bZIP25.1-GFP</i>	96%	100%
<i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> Ind 1	100%	100%
<i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> Ind 2	100%	100%
<i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> Ind 3	100%	0%
<i>bzip25-2/bZIP25.2-GFP</i> Ind 4	100%	0%

Los resultados obtenidos muestran que individuos de la generación T3 de progenitores T2 de la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* son capaces de germinar y desarrollar plántulas bajo condiciones normales de crecimiento, al igual que semillas silvestres y plantas que poseen el transgén codificante para *bZIP25.1-GFP*. La presencia de antibiótico evidenció la existencia de individuos resistentes al marcador de selección, con un 100% de supervivencia de las plántulas en el caso del Ind1 e Ind2. Esto sugiere fuertemente que Ind 1 e Ind 2 fueron individuos que contaban con el transgén *Hph* en homocigosis, el cual fue heredado a su respectiva progenie. Considerando que la secuencia del gen del marcador de selección está en el mismo T-DNA del transgén codificante para la variante *bZIP25.2-GFP*, es altamente probable que los individuos sean homocigotos para este transgén también. Por otro lado, las bajas tasas de germinación y crecimiento de las plántulas de las progenies de los Ind3 e Ind4 sugiere que la generación T3 de estos individuos no expresa la enzima higromicina b fosfotransferasa y probablemente los parentales no sean individuos homocigotos. Se escogió, de manera arbitraria, la progenie del parental Ind1 para los experimentos realizados en adelante.

4.1.3. Genotipificación de la línea mutante *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*

Sabiendo que los individuos T3 Ind1 y Ind2 de la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* tienen el inserto del T-DNA de manera homocigota, se realizó una genotipificación de las plantas con el fin de confirmar la presencia del transgén *bZIP25.2-GFP* y el T-DNA que interfiere en el locus de *bZIP25*. Para lograr este objetivo se extrajo el gDNA (Sección 3.4.1.) de plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, plantas silvestres Col-0 y plantas *bzip25-2*. Con el fin de corroborar la calidad del gDNA obtenido se amplificó un fragmento de la región conservada de los genes codificantes para la proteína actina mediante PCR (Sección 3.4.2.). Los productos obtenidos fueron evaluados según su peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa (Sección 3.4.3.).

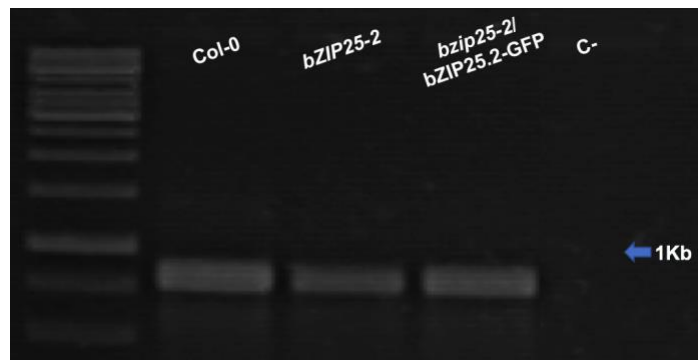


Figura 8. Fragmentos amplificados mediante PCR convencional de región conservada de genes codificantes para Actina. Electroforesis en gel de agarosa, 1,5% p/v. Todas las muestras generaron un fragmento de igual tamaño, siendo este de 849 pb. C- corresponde al control negativo de la reacción de PCR.

De acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 8) se observó la amplificación de un fragmento de tamaño de 849 pb que coincide con el esperado en los gDNA de todas las plantas analizadas. La presencia de una banda única y del tamaño esperado para las muestras evaluadas permite corroborar que el gDNA aislado cumple con el criterio de calidad para proseguir con la genotipificación de las líneas.

Como su nombre lo indica, la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* proviene de la transformación de plantas *bzip25-2* con el vector de clonación que porta la secuencia 35S::bZIP25.2-GFP. Considerando esto, a nivel fenotípico, plantas de esta nueva línea comparten algunas características con la línea pérdida de función de bZIP25. En primer lugar, ambas líneas presentan el inserto de T-DNA que interrumpe la secuencia de *bZIP25* (Sección 1.4.3. y Figura 9A). La presencia de este inserto puede ser evaluada mediante PCR, al utilizar partidores que hibriden con dicha secuencia. Para ello, se utilizó el partidador *LBb1.3*, el cual hibrida en una región río arriba del inserto de T-DNA y el partidador 206, que hibrida en el tercer exón de *bZIP25* (Figura 9A) y que generan un fragmento de 440 pb. Por otro lado, el alelo silvestre de *bZIP25* se evaluó mediante la amplificación por PCR utilizando los partidores 205 y 206, que hibridan en la región UTR5' y en el tercer exón del gen (Figura 9A). Estimando un tamaño aproximado de 6 Kb del T-DNA, se consideró que al utilizar estos partidores en plantas que poseen el inserto en la región del loci *bZIP25*, no habrá amplificación debido a la capacidad de la polimerasa utilizada de 3 Kb aproximadamente como máximo. Con ello, entonces, solo se obtendría un producto de PCR utilizando gDNA de plantas silvestres.

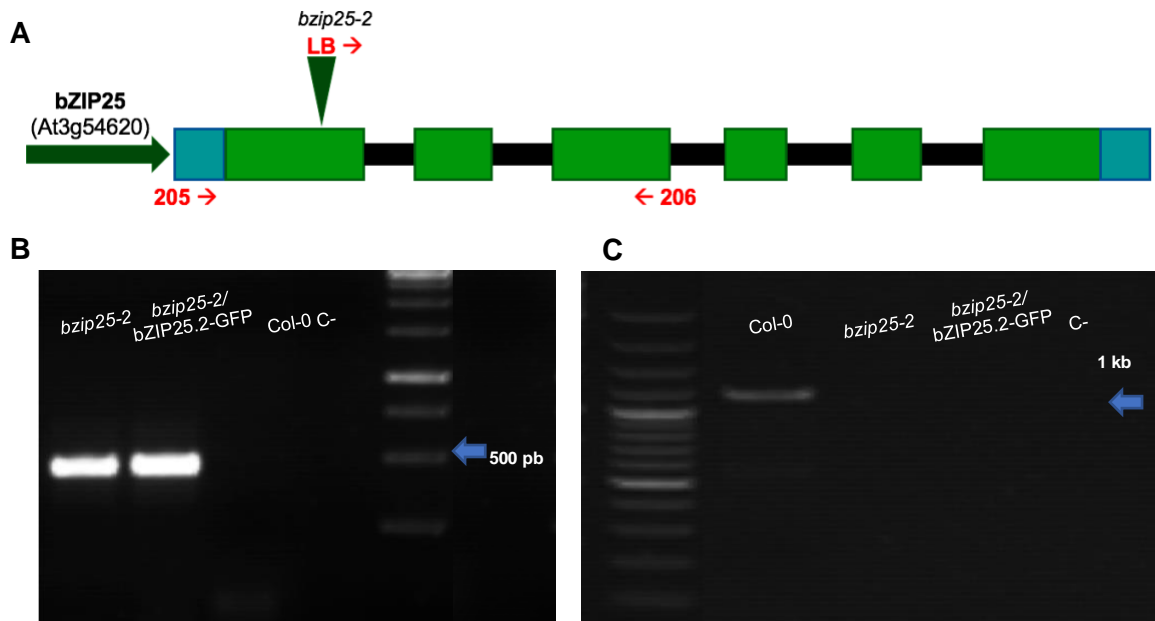


Figura 9. Análisis molecular que da cuenta de la presencia de la inserción de T-DNA que interrumpe el gen *bZIP25* en condición homocigota en las líneas *bzip25-2* y *bzip25-2/bzip25.2-GFP*. Arriba (A) Modelo génico del factor *bZIP25*, donde se señala la inserción del T-DNA en el primer exón y las regiones donde hibridan los partidores utilizados. Abajo: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% p/v que muestra los fragmentos obtenidos de la amplificación de regiones del inserto de T-DNA en plantas *bzip25-2* y *bzip25-2/bzip25.2-GFP* en (B). En contraste, la amplificación de un fragmento de *bZIP25* solo se obtuvo en plantas silvestres Col-0 (C).

Como se observa en la Figura 9B, se obtuvo productos de PCR en las reacciones donde se utilizó partidores que hibridaban con la secuencia LB del inserto de T-DNA. El tamaño de la banda obtenida, cercano a los 450 pb, es similar al esperado (440 pb) lo que permite asegurar que tanto la línea *bzip25-2* como la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* poseen interrumpido el primer exón codificante para el factor de transcripción. A su vez, esto es respaldado por la reacción de PCR que utilizaba partidores que hibridan con la región promotora y el tercer exón del alelo silvestre del gen. Debido al tamaño de la secuencia que queda limitada por los partidores, en plantas mutantes con el T-DNA insertado era muy poco probable que se generara un producto de la reacción. En plantas

silvestres, que no poseen interrumpido el gen *bZIP25*, ese fragmento sí logra ser amplificado con un tamaño esperado de 1200 pb, tal como se obtuvo (Figura 9C).

Por último, se buscó mediante PCR la presencia de los otros marcadores asociados a la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, lo que incluye la presencia de los genes de selección a antibiótico *Hph* y *NptII* (este último proveniente de la generación de plantas *bzip25-2*) y el gen codificante para la proteína GFP. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de fragmentos amplificados para el gen *NptII*, el cual está presente en plantas *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* (Figura 10A). De forma similar, fragmentos del gen *Hph* se observaron como producto del PCR al evaluar plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Este marcador de selección está presente en el vector de clonación pGWB5 con el que se transformaron plantas *bzip25-2* para generar la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, por lo tanto, plantas *bzip25-2* no poseen este gen, el cual no mostró amplificado en el PCR, tal como era esperado (Figura 10B). Finalmente, se obtuvieron fragmentos amplificados del gen codificante para GFP, el cual es parte del constructo *bZIP25.2-GFP* insertado en el genoma de plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Efectivamente, solo el gDNA de estas plantas poseen este transgén (Figura 10C).

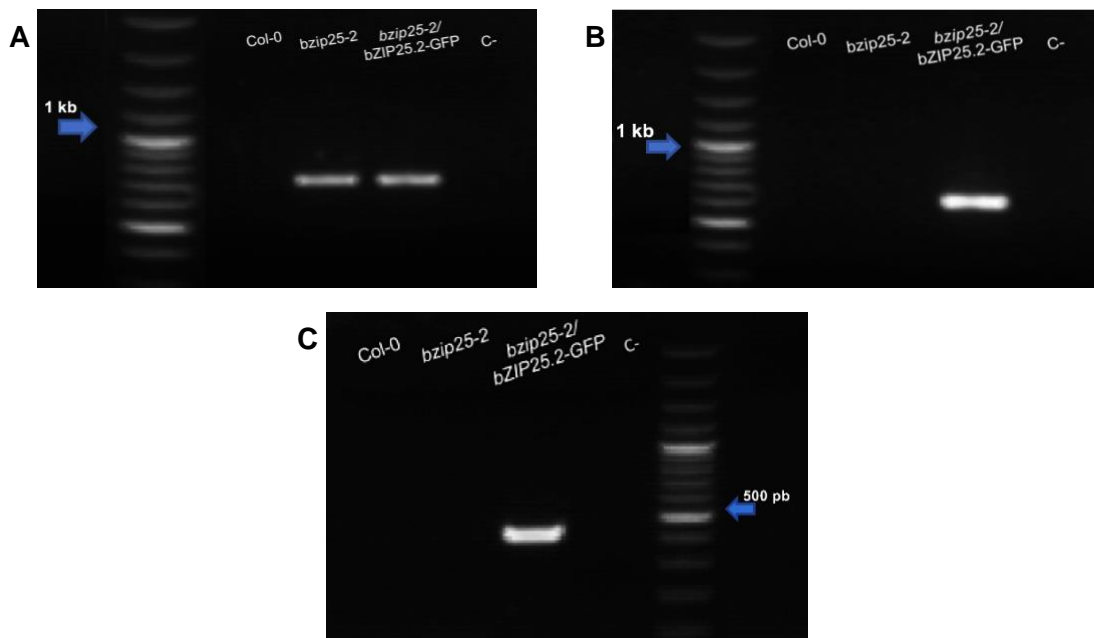


Figura 10. Amplificación de fragmentos de genes asociados a la línea transgénica *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% p/v. **Arriba:** Amplificación de fragmentos de los genes *NptII* (**A**) y *Hph* (**B**), ambos marcadores de selección presentes en plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Plantas *bzip25-2* solo poseen el inserto que contiene el gen *NptII*. **Abajo:** Fragmentos amplificados del gen codificante para la proteína GFP (**C**). C- corresponde al control negativo de la reacción de PCR.

Los resultados obtenidos indican que plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* poseen los insertos *NptII* y *Hph*, así como la secuencia codificante para la proteína de fusión *bZIP25.2-GFP*, sugiriendo fuertemente que la transformación de las plantas se realizó correctamente y constatando el genotipo de esta línea mutante.

4.1.4. Evaluación de la acumulación de la proteína de fusión *bZIP25.2-GFP* en plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*

La genotipificación realizada permitió corroborar la presencia de los insertos asociados a la mutante *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, sin embargo, esto no da cuenta de la expresión de los genes. Particularmente, nos interesa constatar la expresión del constructo *bZIP25.2-GFP*, con el fin de poder estudiar los procesos de los cuales la

variante bZIP25.2 pudiese formar parte. Además de confirmar la acumulación de la proteína de fusión, es interesante conocer el lugar donde esta se localiza a nivel celular. Para responder estas preguntas, se utilizó microscopía confocal, de modo que la expresión del transgén fuese verificada a través de la señal de fluorescencia de GFP y a la vez esta señal sirviera para conocer la localización subcelular de la proteína de fusión. Para lograr esto, se evaluaron plántulas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* de diez días de edad. En paralelo, se observaron plántulas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* de la misma edad, considerándoles como control positivo de acumulación y visualización de la proteína GFP, la cual ya ha sido determinada en nuestro laboratorio.

Los resultados obtenidos mostraron que plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* acumulan la proteína GFP en células de la raíz de las plantas (Figura 11C y 11D). La vista en campo claro permite apreciar de mejor manera que la proteína de fusión se localiza en una región única en cada célula (Figura 11A y 11B). La proteína GFP se distribuye en el citoplasma celular y en el núcleo en células vegetales (Leffel & col., 1997). Sin embargo, en este caso esta solo fue localizada en un cuerpo central, patrón característico del núcleo. De hecho, la localización de bZIP25.2-GFP genera patrones similares a los de la proteína bZIP25.1-GFP en plantas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP*. En dicha línea, ya se constató que la proteína de fusión se acumula en el núcleo celular realizando la codistribución con una tinción nuclear (Osorio-Navarro, 2016). Considerando esto, se estaría generando la proteína de fusión bZIP25.2-GFP, la cual posee una localización nuclear.

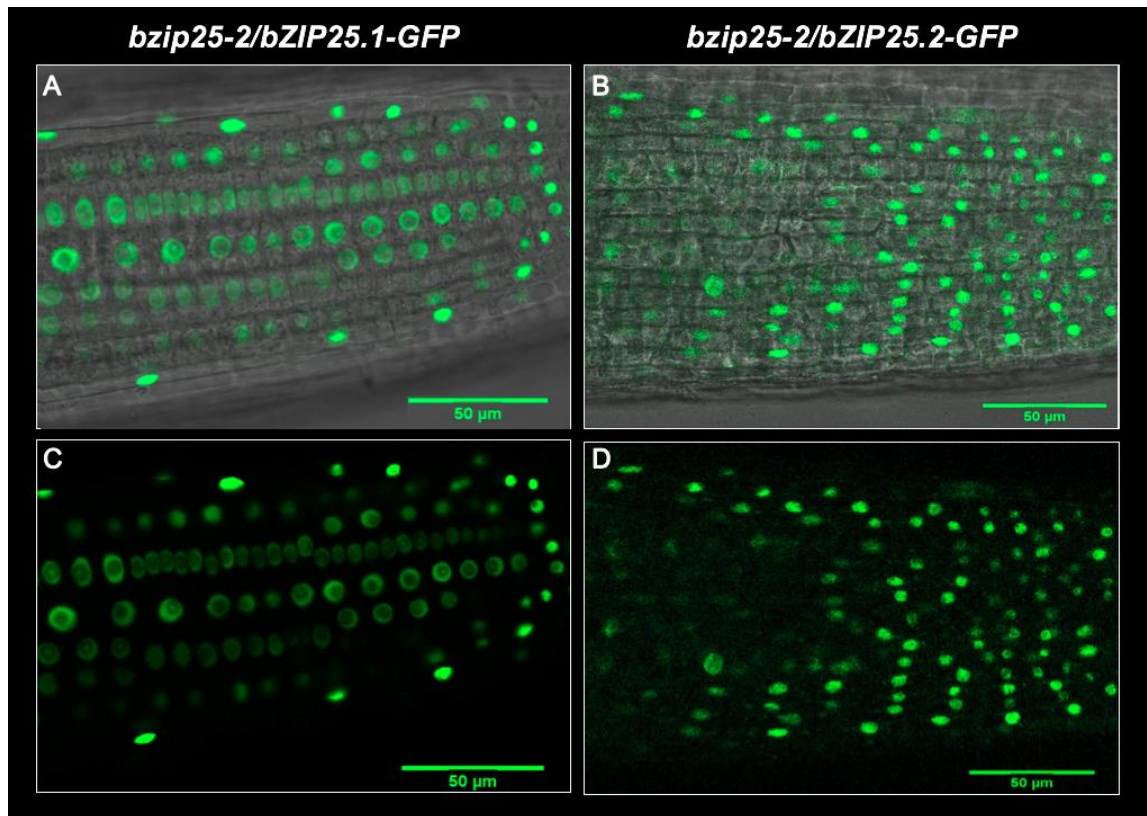


Figura 11. Acumulación de la proteína de fusión bZIP25.2-GFP en el núcleo de las células de la raíz de *A. thaliana*. Vista longitudinal de la punta de la raíz en plantas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* (A y C) y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* (B y D) de 10 días, crecidas en MS sólido. Las plantas fueron evaluadas mediante microscopía confocal, detectándose la señal de GFP en el núcleo de las células en ambas líneas. Imágenes de microscopía confocal. La barra de tamaño corresponde a 50 µm.

4.2. Evaluación de la participación de la variante bZIP25.2 en el tráfico endocítico de células de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

Según los antecedentes de nuestro laboratorio, el factor bZIP25 tiene una función ligada al tráfico endocítico y su pérdida de función genera una aceleración del proceso en células de la epidermis de la raíz de plantas de *Arabidopsis* (Pizarro, 2015; Osorio-Navarro, 2016). En otras palabras, esto implica que, comparada con el comportamiento de una planta silvestre, la internalización de membrana plasmática en plantas *bzip25-2*

ocurre a una tasa superior al evaluarla en un mismo periodo de tiempo (Figura 3B). La isoforma bZIP25.1 expresada en plantas *bzip25-2* es capaz de revertir el fenotipo de la mutante, desacelerando la endocitosis (Osorio-Navarro, 2016). La pregunta que queremos responder en este trabajo es si la isoforma bZIP25.2 es también capaz de revertir también este fenotipo. Para ello, se realizaron ensayos de evaluación del tráfico endocítico utilizando plantas de diez días de edad crecidas sobre MS sólido de las líneas silvestre (Col-0), *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, por medio del uso de los trazadores fluorescentes FM1-43 y FM4-64. Ambos trazadores son compuestos derivados del estirilo, lipofílicos y no tóxicos, capaces de unirse a la membrana plasmática, convirtiéndolos en excelentes herramientas para el estudio del mecanismo de endocitosis, formación de vesículas, y dinámica de organelos (Šamaj & col., 2005). La visualización del proceso se realizó mediante microscopía confocal en diferentes dimensiones espacio-temporales

Para facilitar el análisis de los resultados, se evaluó el estudio del tráfico endocítico en dos partes; primero se evaluó la internalización de la membrana plasmática y visualización de endosomas tempranos, para lo cual solamente se utilizó el trazador FM4-64. Posteriormente, se estudió la llegada de los endosomas hasta la vacuola, para lo cual ambas estructuras deben estar marcadas, por lo que se utilizaron ambos trazadores en esta etapa. Es importante recalcar que ambas partes conforman, en conjunto, un mismo proceso celular.

4.2.1. Estudio del tráfico endocítico desde la Membrana Plasmática hasta endosomas tempranos

En primer lugar, se observó si existen cambios en los estadios más tempranos del proceso endocítico, esto es, el punto en el cual porciones de la membrana plasmática son internalizadas mediante vesículas hasta los endosomas tempranos y la red transgolgi (EE/TGN), los cuales inician su recorrido a través de la ruta endocítica. Con el diseño experimental propuesto, este fenómeno puede apreciarse mediante la visualización de los endosomas que han sido marcados con el trazador FM4-64, tal como se muestra en la Figura 12.

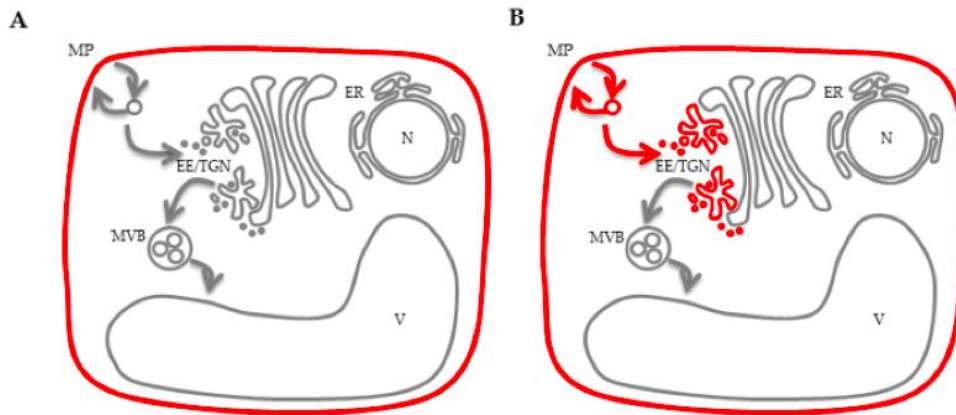


Figura 12. Ruta del tráfico de trazador endocítico FM4-64 en las primeras etapas de la endocitosis. En (A) el trazador se une a la membrana plasmática (MP) desde donde es internalizado (B) hasta los endosomas tempranos y la red transgolgi (EE/TGN). (MVB=cuerpos multivesiculares, V=Vacuola, N=Núcleo, ER= Reticulo endoplásmico). (Modificado desde Tejos & col., 2018).

El marcaje de la membrana plasmática con el trazador FM4-64 indicó que, al cabo de 5 minutos, en plantas silvestres no se observó la presencia de endosomas marcados, indicando que para ese intervalo de tiempo no ha ocurrido aún internalización de la membrana plasmática (Figura 13A). Por su parte, plantas *bzip25-2* muestran que para el mismo tiempo de evaluación ya existe una abundante cantidad de endosomas

marcados, dando cuenta de una internalización de la membrana plasmática mucho más rápida que en la línea silvestre (Figura 13B), concordando con lo ya reportado previamente (Pizarro, 2015; Osorio-Navarro, 2016). Mutantes *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* presentaron un comportamiento similar al de las plantas silvestres, en el cual el trazador FM4-64 se mantiene unido a la membrana plasmática y no se visualizan endosomas a ese tiempo de la cinética (Figura 13C).

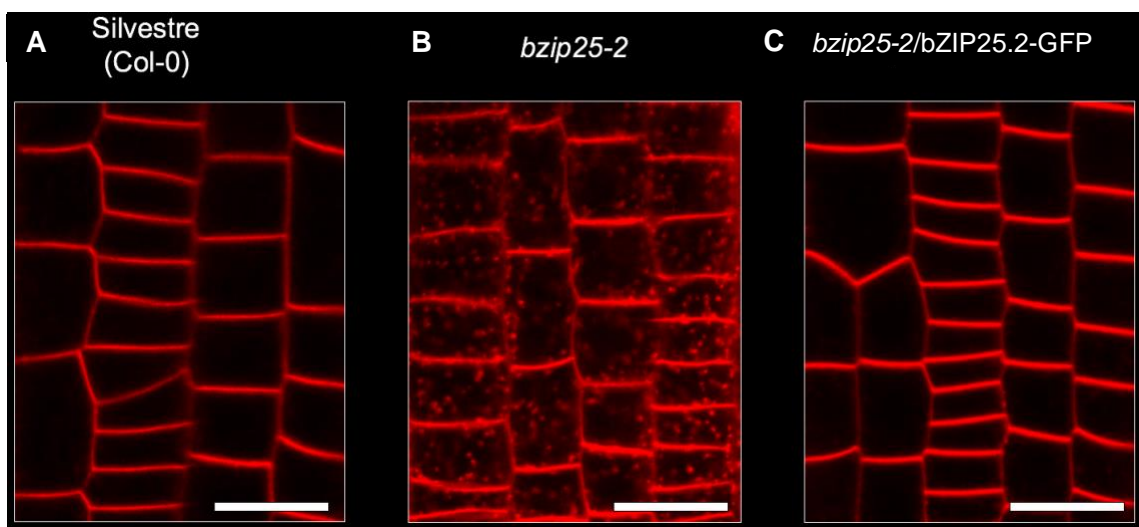


Figura 13. La cinética del tráfico endocítico desde la membrana plasmática a endosomas de plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* es similar a plantas silvestres. Plantas de diez días fueron incubadas en MS líquido con FM4-64, 5 minutos después de la incubación, se visualizó la internalización de la membrana plasmática en células de la epidermis de plantas silvestres Col-0 (A), *bzip25-2* (B) y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* (C). En plantas *bzip25-2* se observó gran cantidad de endosomas, mientras que en plantas silvestres y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* el trazador sigue marcando solamente la membrana plasmática. Imágenes recogidas mediante microscopía confocal. La barra de tamaño representa 20 μm .

A partir de los resultados obtenidos, fue posible constatar lo observado anteriormente, observando la aceleración de la endocitosis en mutantes *bzip25-2* respecto de plantas silvestres, y que, por lo tanto, el factor de transcripción bZIP25 participa de la modulación negativa del proceso (Pizarro, 2015; Osorio-Navarro, 2016). En tanto, el comportamiento de plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* es muy semejante al de plantas silvestres, donde la

endocitosis no se ve acelerada, lo que permite sugerir que la expresión de la isoforma bZIP25.2 rescata el fenotipo causado por la pérdida de función de bZIP25.

4.2.2. Estudio del tráfico endocítico desde los endosomas a la vacuola

La segunda parte del estudio de tráfico endocítico se enfoca en las etapas más tardías de la endocitosis, en la cual los endosomas llegan hasta la vacuola. Para ello, se observó el tráfico endocítico luego de 60 minutos desde la incubación con el trazador FM4-64 en condiciones en que la vacuola estaba premarcada con FM1-43.

La evaluación del tráfico a los 60 minutos desde la incubación con el fluoróforo FM4-64 mostró que para ese momento se visualizan innumerables endosomas en las células de las raíces de todas las plantas (Figura 14). Debido a que la incubación con FM1-43 fue realizada con 3 horas de anterioridad respecto de la incubación con FM4-64 (Figura 4), en todas las plantas se puede ver que FM1-43 está presente en la membrana de las vacuolas, mientras que no se observan endosomas que continúen siendo marcados por este trazador, indicando que para este momento el trazador ha completado la ruta endocítica (Figura 14).

Interesantemente, existe presencia del trazador FM4-64 en cuerpos con características de vacuola en mutantes *bzip25-2* (Figura 14B), mientras que en plantas silvestres y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* en la misma temporalidad el trazador solo está marcando endosomas (Figura 14A y 14C). Esto ratifica que en plantas *bzip25-2* la endocitosis ocurrió a una tasa mucho más acelerada que en las otras plantas, puesto que los endosomas ya han llegado a su destino en la vacuola. En tanto, se advierte que en plantas silvestres y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* existen mucho menos vacuolas marcadas

por el fluoróforo FM4-64, lo que sería indicativo de que el trazador no alcanza este organelo con la misma rapidez que en las plantas *bzip25-2*.

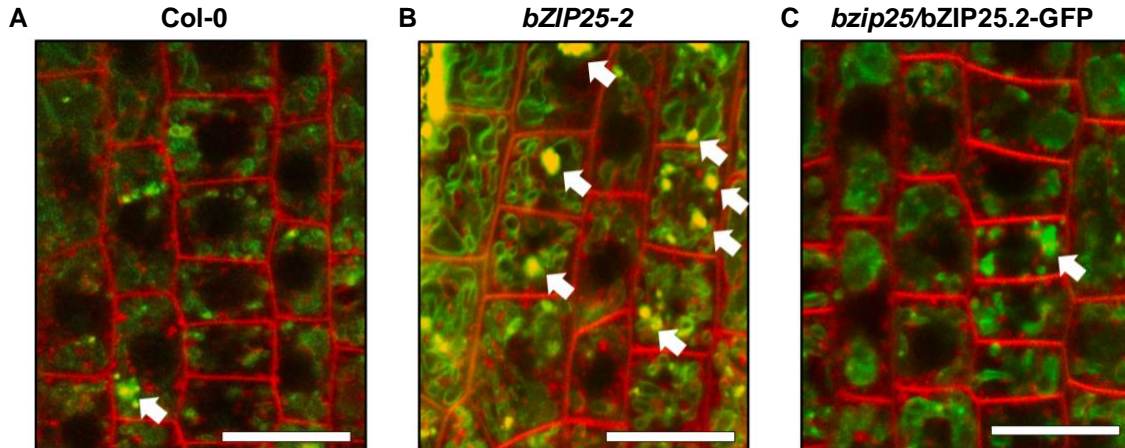


Figura 14. La cinética del tráfico endocítico desde los endosomas a la vacuola en plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* es similar a las de plantas silvestres, mostrando desaceleración de la endocitosis respecto de plantas *bzip25-2*. Plantas silvestres Col-0 (A), *bzip25-2* (B) y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* (C) fueron incubadas por 5 minutos en MS líquido con FM1-43. Tres horas después fueron incubadas en MS líquido con FM4-64 comenzando la cinética de tráfico endocítico. Luego de 60 minutos se evaluó la distribución de ambos marcadores. Las flechas indican estructuras de tipo vacuolar donde existe codistribución de los fluoróforos. La barra de tamaño representa 20 μm . Imágenes recogidas mediante microscopía confocal, en donde la señal de FM1-43 está en verde y la de FM4-64 en rojo.

La Figura 14 muestra la distribución de la señal de ambos trazadores endocíticos realizada en dos canales distintos: la señal coloreada en rojo muestra la señal de FM4-64 y la señal coloreada en verde muestra la señal de FM1-43 en cada imagen. Los cuerpos en amarillo denotan la codistribución de ambos marcadores. Esta imagen está compuesta de píxeles en los que se puede evaluar la presencia de cada una de las señales. La codistribución de píxeles de ambos canales muestra que se genera una distribución homogénea de los píxeles cuanto más codistribuidos están los trazadores en la imagen (mayor cantidad de cuerpos amarillos indica mayor codistribución de píxeles). Por otro lado, si existe menor cantidad de señal de los trazadores ubicada en un mismo sitio (menor cantidad de cuerpos amarillos), la codistribución de píxeles será

menor y en el gráfico las señales recogidas por cada canal estarán separadas. Otra manera de observar la codistribución de los trazadores es mediante un **mapa de colocalización**. Este mapa muestra a través de una escala de intensidad de color las zonas de codistribución de ambos trazadores a nivel celular. Estas formas de análisis resultan útiles ya que otorgan mayor seguridad respecto de la colocalización de los trazadores, y sabiendo eso, es posible determinar, si existe o no, aceleración del tráfico endocítico a la vacuola.

Considerando lo anterior, se realizó el análisis de codistribución de píxeles en los tres tipos de plantas, analizando el tráfico endocítico del FM4-64 luego de 60 minutos. Los resultados obtenidos señalan que en plantas *bzip25-2* existe colocalización de los trazadores (Figura 15A y 15B). El gráfico de codistribución indicó que en las plantas *bzip25-2* los píxeles de las imágenes de ambos trazadores codistribuyen en la vacuola (Figura 15C). A nivel celular, esto indica que el trazador FM4-64 había alcanzado el compartimento marcado con FM1-43, la vacuola. Por otro lado, en plantas silvestres es posible notar una codistribución diferenciada de los píxeles de las imágenes recogidas por cada canal, es decir, hay menos regiones representadas por la presencia de los dos trazadores en un mismo espacio (Figura 15C). A nivel celular, es posible afirmar entonces que, si la mayor parte del trazador FM1-43 se encuentra marcando la membrana de las vacuolas, existe una menor cantidad de trazador FM4-64 marcando ese mismo sitio, lo que indicaría que el fluoróforo aún no alcanza esa etapa del proceso endocítico, hallándose la mayor cantidad de este marcando todavía la membrana de los endosomas. Por último, el análisis de plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* genera un mapa de codistribución semejante al de una planta silvestre (Figura 15C), en donde la mayor

cantidad de ambos trazadores marca sitios diferentes al interior de la célula, estando el FM1-43 mayoritariamente presente en la vacuola, mientras el FM4-64 en los endosomas.

El mapa de colocación señala que plantas silvestres exhiben algunos focos donde ambos trazadores están presentes, indicando que parte del fluoróforo FM4-64 ha llegado hasta la vacuola (Figura 15D). En comparación con estas, plantas *bzip25-2* muestran focos de un tamaño mucho mayor, siendo también mayor su intensidad, lo cual se traduce en una mayor cantidad de FM4-64 que ha hecho contacto con la membrana de la vacuola, lugar donde se encuentra en mayor abundancia el trazador FM1-43. Continuando este símil, plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* tampoco muestran demasiados focos de colocación, señalando que el fluoróforo FM4-64 aún no alcanza el punto final del tráfico en la membrana de la vacuola.

Los resultados presentados corroboran que plantas *bzip25-2* tienen el tráfico acelerado a lo largo de toda la ruta endocítica, desde la membrana plasmática hasta la vacuola. Esto puede advertirse mejor al compararlas con plantas silvestres en donde el trazador FM4-64 está ausente en la vacuola. Asimismo, los resultados sugieren fuertemente que plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* no poseen el tráfico acelerado, prueba de ello es la baja colocación de los trazadores, mostrando un comportamiento similar al de plantas silvestres, donde para un mismo tiempo de evaluación, el trazador FM4-64 aún no llega a la vacuola, a diferencia de plantas *bzip25-2*. Adicionalmente, las plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* presentan un comportamiento muy similar al de plantas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* (Figura 24, Anexo), de la cual ya se ha descrito que rescata el fenotipo mutante (Osorio-Navarro, 2016), sugiriendo entonces que la variante *bZIP25.2* sería un modulador negativo del tráfico endocítico.

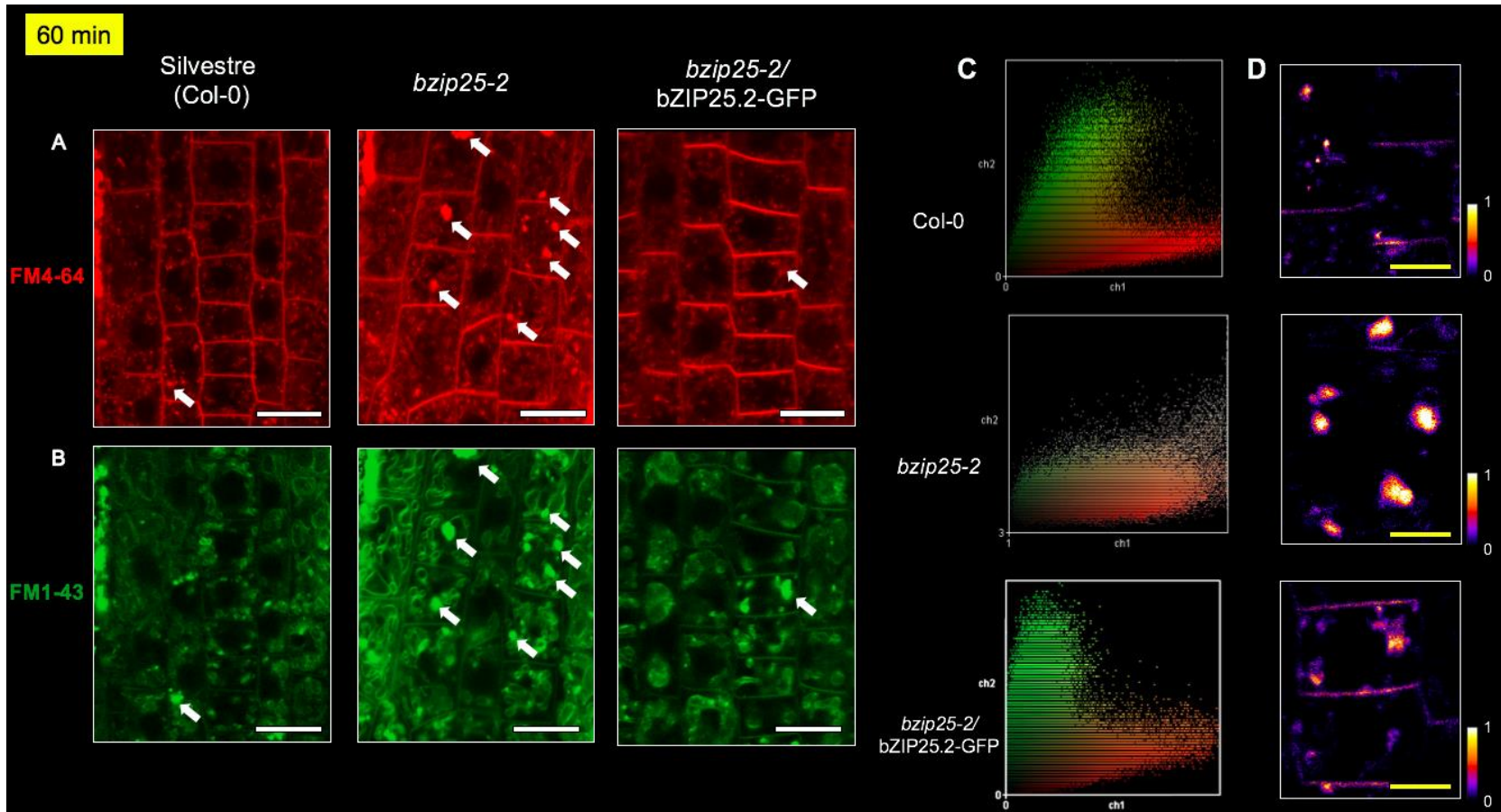


Figura 15. La acumulación de bZIP25.2-GFP rescata el fenotipo mutante de *bzip25-2*, produciendo una desaceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola. (A) y (B) son imágenes obtenidas de los canales que recogen la señal de fluorescencia de los trazadores FM1-43 y FM4-64, respectivamente, 60 minutos después de la incubación con FM4-64 y 3 horas tras la incubación con FM1-43. Las flechas indican estructuras de tipo vacuolar donde hay colocalización de los fluoróforos. Se aprecian abundantes focos de colocalización en plantas *bzip25-2*. En plantas silvestres y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* estos son más pequeños y menos abundantes. La barra blanca de tamaño representa 20 μm . Imágenes recogidas mediante microscopía confocal, donde se visualiza la señal de FM1-43 y de FM4-64, en células de la epidermis en plantas de 10 días. (C) Codistribución de píxeles, que muestra gráficamente la representación de ambos trazadores en cada píxel. La dispersión más homogénea indica mayor codistribución, como la observada en plantas *bzip25-2*, no así en plantas silvestres ni *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. (D) Mapa de colocalización de los trazadores. La escala de color indica el grado de colocalización, de menor (negro) a mayor intensidad (blanco). Se indican zonas representativas de las tres líneas de plantas evaluadas. La barra de tamaño en (D) representa 10 μm .

4.3. Estudio de la participación del factor bZIP25 en la respuesta del sistema radical frente al déficit de fosfato y nitrato

El sistema radical compone un sistema dinámico cuyo desarrollo y modificación están mediados por los requerimientos de la planta y la disponibilidad de nutrientes. Si bien los estímulos abióticos son el factor preponderante al promover que estas modificaciones ocurran, las plantas deben obedecer a un estricto control molecular que permita la generación de estos cambios. Nuestro laboratorio ha descrito una correlación positiva entre la aceleración de la **endocitosis** y el **desarrollo de RL** cuando las plantas son estimuladas con el compuesto Sortin2 (Pérez-Henríquez & cols. 2012). A su vez, los nutrientes, particularmente el **déficit nutricional**, ejerce un fuerte impacto en la estructura del sistema radical. En el marco de estudio de este seminario de título, nos interesa evaluar si existe un vínculo entre estas tres aristas, concretamente buscando si bZIP25 está involucrado en la respuesta a nivel radical frente al déficit nutricional.

Fósforo y nitrógeno son dos macronutrientes indispensables en el desarrollo vegetal. La forma más común de absorción de fósforo y nitrógeno es a través de sales de fosfato (P) y nitrato (N), que contienen los aniones PO_{43+} y NO_{3-} , respectivamente (López-Bucio & cols, 2003). En concentraciones limitantes (menos de 100 μ M), se ha descrito que la falta de P en plantas silvestres genera una reducción en el crecimiento de la RP, así como también un aumento en la densidad de RL desarrolladas (Al-Ghazi & col., 2003), las que en número pueden llegar a ser cinco veces más que en una planta crecida en condiciones óptimas del nutriente (1 mM) (López-Bucio & cols, 2003). Por su parte, frente a la carencia de N se ha reportado que en plantas silvestres la longitud de la RP se mantiene estable al crecer a una deficiencia moderada del nutriente (275-500 μ M), cuyo

crecimiento disminuye ante deficiencia severa (110 μM) (Gruber & col., 2013). También se ha observado un incremento en la longitud de las RL, pero no un incremento en la formación de estas (Gruber & col., 2013). Estas modificaciones tan particulares en la arquitectura radical sugieren que existe una regulación específica a nivel celular y molecular detrás de ellas, tomando en cuenta que nutrientes distintos generan respuestas diferentes en el mismo sistema. Debido a esto, nos pareció interesante estudiar los efectos generados en la arquitectura radical frente a la falta de estos macronutrientes en el contexto de la evaluación del factor bZIP25, puesto que, a la fecha, no se ha descrito una función para bZIP25 en la respuesta a déficit nutricional, por lo que se desconoce si la carencia de este factor de transcripción podría afectar la modificación del sistema radical ante la deficiencia nutricional. En el supuesto de que la ausencia de bZIP25 altere el comportamiento de las plantas ante este estímulo, es interesante saber si la expresión ectópica de la variante bZIP25.2 es capaz de revertir el fenotipo observado en la mutante.

Para evaluar los efectos producidos por el déficit de P, los compuestos Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 fueron escogidos como fuentes del nutriente, mientras que para N se utilizaron KNO_3 y Na_2HPO_4 . Para cada una de las sales se estableció una cantidad de suficiencia y deficiencia y se generaron diferentes medios de cultivo que variaban tanto el tipo de fuente como la concentración del macronutriente. Para ello, semillas de las líneas Col-0, *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* fueron germinadas y las plántulas crecidas en MS sólido durante siete días. Posteriormente, fueron traspasadas a condiciones de déficit nutricional de P o N durante 4 o 6 días. También se realizó una condición control en la cual plantas se traspasaron a medio MS reconstituido, el cual fue generado en el laboratorio a partir de las mismas sales contenidas en los medios de cultivo para los

tratamientos de P y N, salvo que este contiene ambos macronutrientes en concentraciones óptimas (1,25 mM de P y 10 mM de N en el medio). Posterior al crecimiento de las plantas, se tomó registro fotográfico del crecimiento de estas y se evaluaron los parámetros de crecimiento total de la RP y número total de RL desarrolladas tras 11 o 13 días posterior a la germinación (dpg). Adicionalmente, se estimó la “variación de crecimiento de la raíz principal”, que corresponde a la diferencia entre la longitud total de una raíz (11 o 13 dpg) y la longitud que esta tenía antes del trasplante, desarrollada en los siete días de crecimiento en medio de cultivo MS sólido (Figura 5), de esta forma es posible conocer qué tanto creció la RP desde el comienzo hasta el final de cada tratamiento.

Tras 7 días de crecimiento en MS completo, un grupo de plántulas fue trasplanteado a tratamientos control con MS reconstituido. Cuatro o seis días posterior al tratamiento (dpt) el largo de su RP fue nuevamente estimado con el fin de observar el comportamiento de las plantas bajo condiciones nutricionales óptimas. Los resultados obtenidos señalan que, tras 7 días de crecimiento, plántulas silvestres generan una RP que alcanza los $2 \pm 0,04$ cm de longitud (Figura 16). Mutantes *bzip25-2* elongan su raíz una longitud muy similar, alrededor de $1,8 \pm 0,05$ cm, por lo tanto, en condiciones normales la carencia de *bZIP25* no causa un retraso en el desarrollo de la raíz. Finalmente, la raíz de plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* presenta raíces de $1,9 \pm 0,04$ cm de longitud (Figura 16). Los resultados de este experimento control muestran que las raíces de las plántulas mutantes se desarrollaron normalmente, llegando todas con un crecimiento similar de la RP al comienzo de cada tratamiento.

Luego de 4 dpt, ninguna diferencia significativa se encontró al comparar el crecimiento de la raíz de plantas Col-0, *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* bajo tratamientos con MS reconstituido. Misma situación fue evidenciada tras 6 dpt con el mismo medio (Figura 16). Los resultados indican que, bajo condiciones nutricionales óptimas, e independiente del momento de evaluación, plantas *bzip25-2* alcanzan valores similares en el largo de su RP ($5,2 \pm 0,3$ cm) al compararlas con plantas silvestres ($5,6 \pm 0,2$ cm), situación similar al comparar estas últimas con plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* ($5,5 \pm 0,3$ cm), permitiendo concluir que ni la interrupción del gen *bZIP25*, así como tampoco la sobre expresión del transgén codificante para *bZIP25.2-GFP* interfieren con el desarrollo normal de la RP de las plantas al encontrarse en condiciones de suficiencia nutricional.

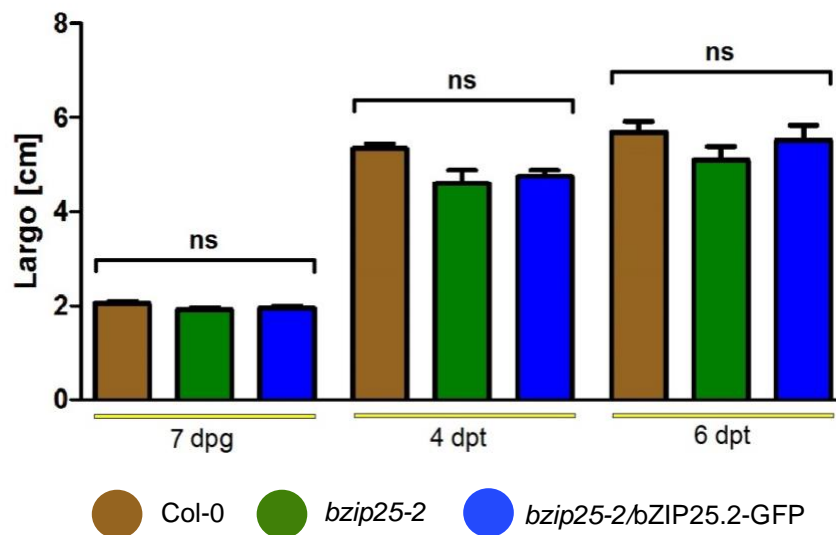


Figura 16. El crecimiento de la raíz principal entre plantas silvestres, *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* bajo condiciones nutricionales óptimas es similar. Largo de la RP de las tres líneas de plantas al crecer sobre MS sólido 7 días y luego de 4 o 6 días de tratamiento (dpt) sobre MS reconstituido. Luego de 7 dpg el largo de las raíces es similar. Se observa también que el crecimiento de las raíces en las tres líneas es semejante 4 dpt y 6 dpt. Los resultados corresponden a 3 réplicas biológicas; $n > 10$ por cada condición. Las barras de error representan el error estándar asociado. *ns*= no significativo.

4.3.1. Evaluación de la participación del factor bZIP25 en la modificación de la arquitectura radical frente al déficit de fosfato

4.3.1.1. Modificaciones en la raíz principal frente al déficit de fosfato

Plántulas de 7 días se traspasaron a diferentes tratamientos nutricionales con Na_2HPO_4 o KH_2PO_4 para evaluar su respuesta a nivel radical. Se utilizó como estado de carencia de nutriente una concentración de P de $1 \mu\text{M}$ en el medio de cultivo (abreviada como -P, en adelante), mientras que la concentración de suficiencia es de $1,25 \text{ mM}$ de P en el medio (abreviada como +P, en adelante).

Bajo ambas fuentes de P utilizadas, 4 dpt, las plantas silvestres tuvieron una variación del crecimiento de su RP cercana a $1 \pm 0,2 \text{ cm}$ al comparar el largo de esta en condiciones de suficiencia y deficiencia de P, alcanzando un mayor tamaño en condiciones de +P. Este comportamiento es esperado, de acuerdo con lo visto en la literatura (Gruber & col., 2013) (Figura 25, Anexo). Plantas *bzip25-2* también mostraron una variación similar en el largo de su raíz ante el déficit de P, sugiriendo que la ausencia de *bZIP25* no impide a las plantas responder a su déficit, al menos en periodos cortos de deficiencia. Plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* generaron la misma respuesta a la falta de P, mostrando inhibición del crecimiento de su RP.

Tras 6 dpt, las diferencias en el crecimiento de la raíz ante el déficit nutricional se hacen más evidentes (Figura 17), manteniendo el mismo comportamiento observado 4 dpt. En plantas silvestres, al comparar el largo de la RP entre las condiciones +P y -P se estimó una inhibición del crecimiento de la RP, con una diferencia de $1,5 \pm 0,2 \text{ cm}$ entre plantas

que crecieron en condición +P y -P cuya fuente era Na_2HPO_4 (Figura 18A). Con la misma fuente de P, plantas *bzip25-2* inhibieron también el crecimiento de su RP alrededor de $1 \pm 0,2$ cm menos en condición -P. Plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* se comportaron de la misma forma, generando una variación de $1,6 \pm 0,4$ cm (Figura 18A). En tratamientos con Na_2HPO_4 durante 6 días, plantas mutantes mantienen el mismo comportamiento que plantas silvestres, inhibiendo el crecimiento de su RP y que, a su vez, la expresión de la variante bZIP25.2 no modifica la forma en que las plantas responden a la carencia de P, mostrando incluso una magnitud en la variación del largo de la raíz muy similar al de plantas silvestres (Figura 18A). Estos comportamientos también se ven reflejados al comparar el crecimiento total de la RP (Figura 18B).

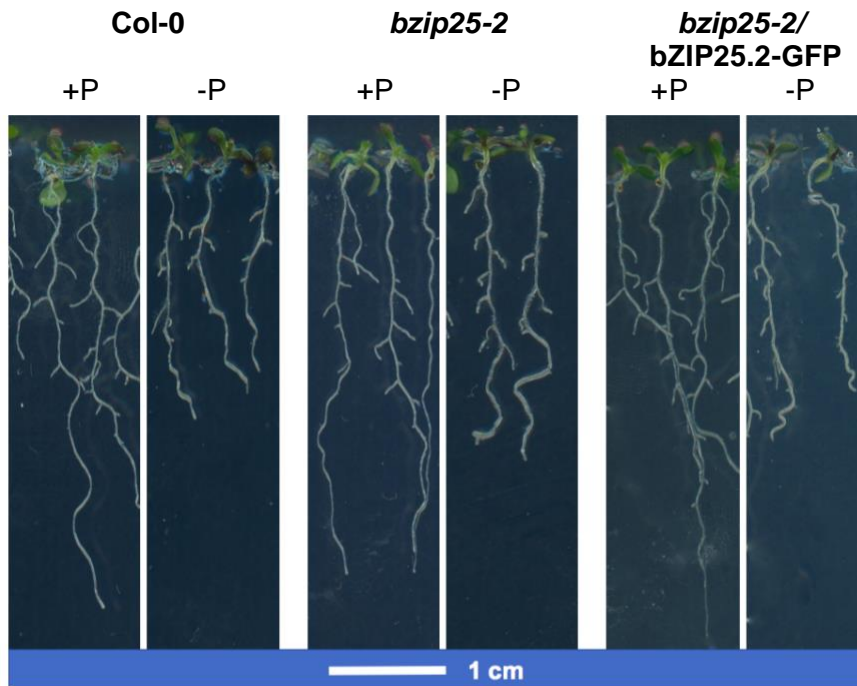


Figura 17. La carencia de fosfato genera una disminución del crecimiento de la raíz principal en plantas silvestres, *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Plantas de los tres genotipos ante la deficiencia de P en el medio de cultivo después de 6 dpt. La fotografía muestra individuos representativos cuando la fuente de P es Na_2HPO_4 en el medio de cultivo.

En tratamientos con KH_2PO_4 se observó que plantas silvestres promediaron $5 \pm 0,2$ cm de largo en su RP en condición +P, con una variación del crecimiento de $1,5 \pm 0,2$ cm, mientras que en plantas *bzip25-2* el promedio de largo de la raíz fue de $4,4 \pm 0,2$ cm para la condición +P (Figura 18D). Este menor crecimiento de las mutantes en condición +P, sin embargo, no presenta diferencias estadísticamente significativas al comparar su crecimiento con el de mutantes que crecieron en condición -P (solo hubo variación de $0,4 \pm 0,2$ cm), observándose así un comportamiento diferente en plantas *bzip25-2* en comparación a plantas silvestres (Figura 18C y 18D). Plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* siguieron un comportamiento similar al de plantas silvestres, alcanzando su RP un tamaño de $4,9 \pm 0,2$ cm. La variación de crecimiento generado al comparar condiciones +P y -P en plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* fue también de una magnitud similar al de las plantas silvestres ($1,1 \pm 0,3$ cm) (Figura 18C).

Resumiendo, tratamientos con Na_2HPO_4 en la RP en plantas *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* ante el déficit de P es el mismo que en plantas silvestres, comprobando que la ausencia de *bZIP25* no impide a las plantas responder a este estímulo. Considerando esto, no es de sorprender tampoco que plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* respondan de la misma manera, generando un fenotipo similar. Por otro lado, tratamientos con KH_2PO_4 mostraron que plantas *bzip25-2* tienen un menor crecimiento de su RP en condición +P, siendo este similar al de plantas que crecieron en -P. Interesantemente, plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* tienen el mismo comportamiento que plantas silvestres, hallándose la misma respuesta a nivel radical, independiente de la fuente de P utilizada.

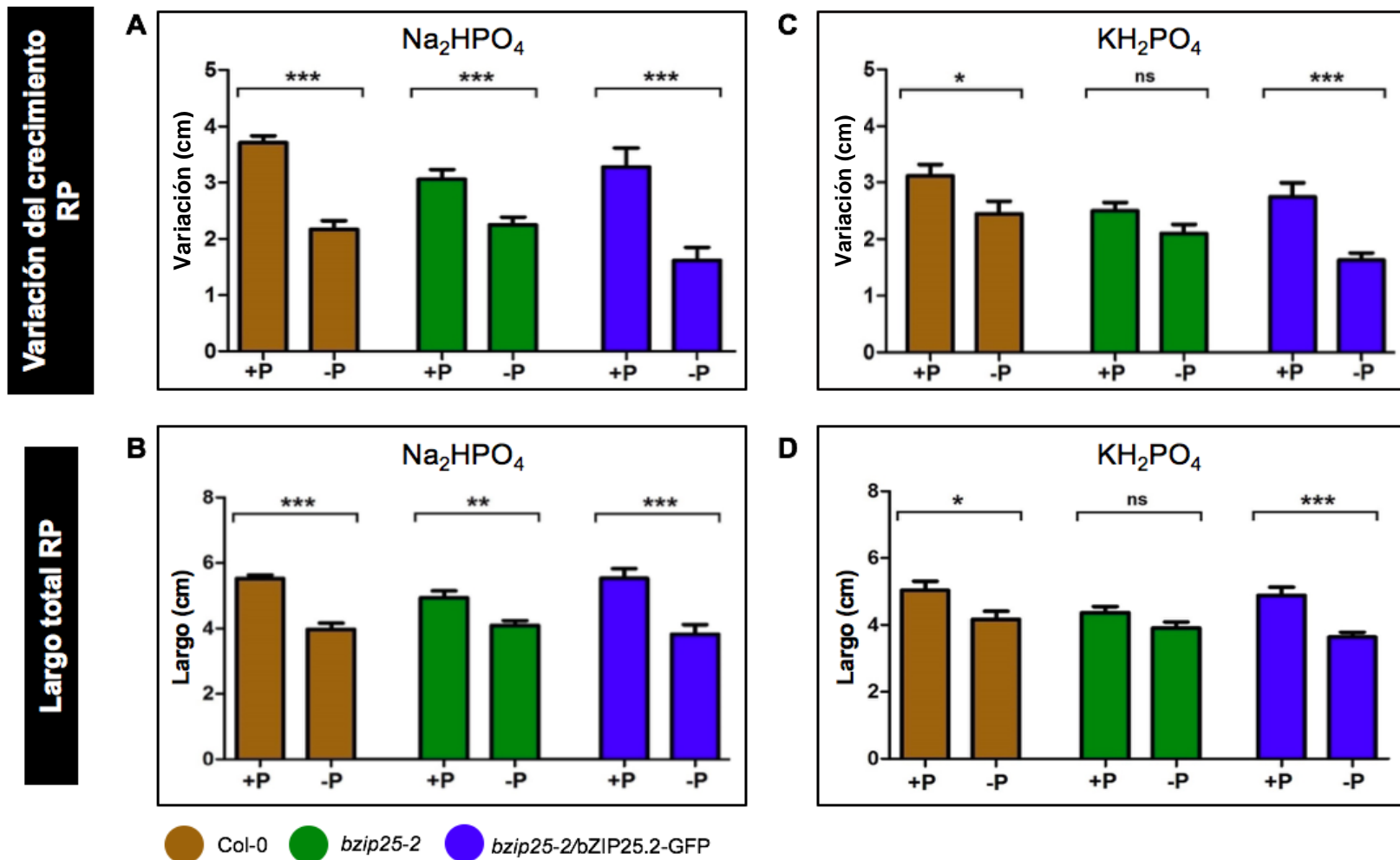


Figura 18. Plantas mutantes *bzip25-2* generan respuesta en la RP ante el déficit de P. La expresión ectópica de la variante *bZIP25.2-GFP* también permite que dicha respuesta sea generada, de la misma forma que plantas silvestres. Crecimiento de la RP en diferentes condiciones nutricionales de P, 6 dpt. Se muestra la variación del crecimiento de la raíz durante los días de exposición a la carencia de P suplementado como Na₂HPO₄ (A) y KH₂PO₄ (C) y el crecimiento total de la RP cuando la fuente era Na₂HPO₄ (B) y KH₂PO₄ (D). Plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* responden igual que plantas silvestres ante la carencia de P en ambas fuentes del nutriente, inhibiendo el crecimiento de la RP. Plantas *bzip25-2* solo responden de esta forma en tratamientos con Na₂HPO₄. Los resultados corresponden a tres réplicas biológicas; n > 25 por cada condición. Las barras de error representan el error estándar asociado. *=*p* < 0,01; **=*p* < 0,005; ***=*p* < 0,0005; ns= no significativo.

4.3.1.2. Modificaciones en las raíces laterales frente al déficit de fosfato

En las plantas evaluadas en la selección anterior se evaluó el **índice de raíces laterales**, que corresponde a la razón entre el número de RL emergidas y la longitud total de la RP.

Los resultados 4 dpt mostraron que, tanto para tratamientos con Na_2HPO_4 como con KH_2PO_4 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo de RL entre condiciones de +P y -P en plantas silvestres (Figura 27A y 27B, Anexo). Plantas mutantes *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* mostraron una tendencia a la disminución y aumento de RL, respectivamente, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 27A y 27B, Anexo). Independiente de la fuente de P utilizada, 4 dpt de deficiencia no se encuentran diferencias estadísticas en el índice de RL al comparar condiciones +P y -P en plantas silvestres, *bzip25-2* ni *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Estos resultados, especialmente respaldados por la falta de respuesta de plantas silvestres, podría tener relación con el período relativamente corto en que las plantas estuvieron expuestas al déficit nutricional, el cual no fue suficiente como para gatillar la respuesta esperada y/o para observar RL emergidas.

Tratamientos sobre MS reconstituido no mostraron diferencias significativas entre las plantas evaluadas, con valores que fluctuaron entre $0,9 \pm 0,2$ [rl/cm] y $1,3 \pm 0,1$ [rl/cm], señalando que en condiciones óptimas de nutrientes plantas silvestres, mutantes y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* desarrollan similar densidad de RL (Figura 19A).

Tratamientos de 6 dpt mostraron que cuando la fuente de P es Na_2HPO_4 , las plantas silvestres tuvieron un aumento del índice de RL, alcanzando casi el doble al compararlas aquellas que crecieron en condiciones de +P y -P (Figura 19), aumentando en un 75%, con valores de $1,6 \pm 0,2$ [rl/cm] y $2,8 \pm 0,5$ [rl/cm], respectivamente. Este comportamiento concuerda con lo reportado en la literatura (Gruber & col., 2013). Al analizar el fenotipo de plantas *bzip25-2* se observó que el índice de RL en condición de -P alcanzó un valor de $1,8 \pm 0,2$ [rl/cm], similar al obtenido para las mismas plantas que crecieron en condición +P de $1,4 \pm 0,2$ [rl/cm] (Figura 19), comportamiento que no llevó a una diferencia estadística según el test realizado (t-student) entre ambos grupos de resultados (Figura 19). Los datos obtenidos indican un fenotipo distinto al silvestre para plantas *bzip25-2* ante el déficit de P, cuya causa puede ser debido a una falta en la percepción del estímulo o bien a la incapacidad de responder a dicho estímulo de la forma en que lo hace una planta silvestre. Sorprendentemente, plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, llegaron a duplicar su índice de RL emergidas bajo déficit nutricional de P en un rango de valores muy similar al de plantas silvestres, teniendo un índice de RL de $1,2 \pm 0,2$ [rl/cm] en condición +P y $2,5 \pm 0,4$ [rl/cm] en condición -P (Figura 19). Este comportamiento, respaldado por el hecho de que plantas *bzip25-2* no generaron una respuesta, muestra que la expresión de la variante bZIP25.2 logra revertir el fenotipo observado en la mutante, asemejándose a una planta silvestre.

El mismo análisis hecho bajo tratamientos con KH_2PO_4 a 6 dpt no arrojó diferencias significativas en el índice de RL al comparar las condiciones de +P y -P en plantas silvestres, con valores de $1,5 \pm 0,2$ [rl/cm] y $1,6 \pm 0,2$ [rl/cm], respectivamente (Figura 19). Asimismo, plantas *bzip25-2* tampoco mostraron diferencias en el índice de RL asociadas a la carencia de P ($1,1 \pm 0,2$ [rl/cm] en +P y $1,4 \pm 0,2$ [rl/cm] en -P). Por último, plantas

bzip25-2/bZIP25.2-GFP mostraron el mismo fenotipo que plantas silvestres y mutantes, donde en condición +P y -P el índice fue de $1,3 \pm 0,3$ [rl/cm] y de $1,3 \pm 0,4$ [rl/cm], respectivamente. Para las tres líneas de plantas analizadas se obtuvo que bajo condiciones de -P las plantas no responden ante el déficit de P, siendo los valores de índice de RL muy similares a los obtenidos cuando crecen en condición de +P. Este comportamiento, especialmente el de plantas silvestres se contradice con lo obtenido en tratamientos con Na_2HPO_4 , así como también a lo reportado en la literatura (Gruber & col., 2013). El fenotipo observado, transversal a todas las líneas de plantas analizadas, permite sugerir que la ausencia de respuesta a la carencia de P estaría asociada más bien a la fuente de nutriente utilizada.

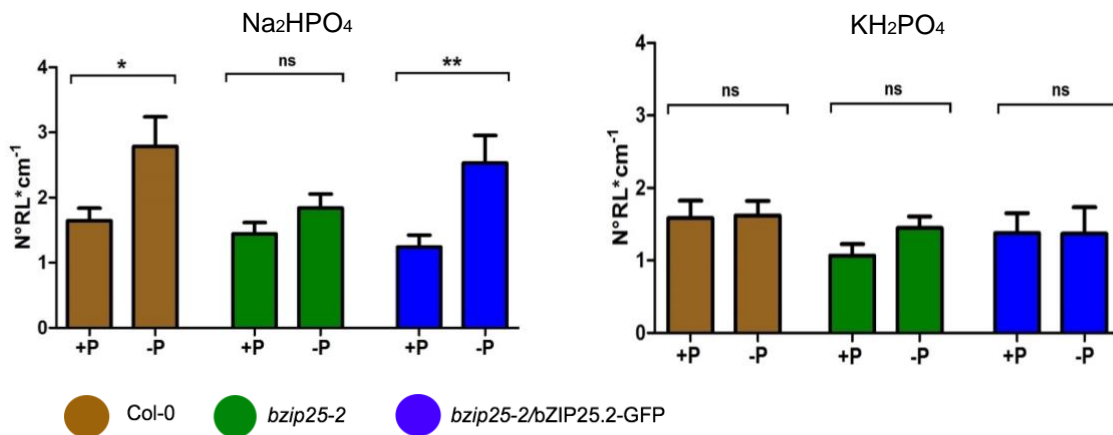


Figura 19. bZIP25 es necesario en la respuesta de formación de RL frente al déficit de P y, en particular, la variante bZIP25.cumple un rol en este proceso. Utilizando Na_2HPO_4 como fuente de P, el índice de RL aumentó en plantas silvestres ante el déficit de este, no así en plantas *bzip25-2*. Plantas *bzip25-2/bZIP25-GFP* se comportan de manera similar a plantas silvestres. Cuando la disponibilidad de P proviene de KH_2PO_4 las plantas silvestres no presentan cambios en el índice de RL ante el déficit de P. Los resultados corresponden a tres réplicas biológicas; $n > 25$ por cada condición. Las barras de error representan el error estándar asociado. $*=p < 0,01$; $**=p < 0,005$; $***=p < 0,0005$; $ns=$ no significativo.

Plantas crecidas en condiciones control (MS reconstituido), después de 6 dpt presentan índices de RL que fluctúan entre $1,7 \pm 0,3$ y $2,1 \pm 0,2$ [rl/cm] en las tres líneas de plantas evaluadas, no observándose diferencias significativas entre ellas. Esto evidencia que en condiciones nutricionales óptimas de presencia de fósforo tanto plantas silvestres como mutantes y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* desarrollan similar densidad de RL (Figura 20).

En resumen, las plantas silvestres responden generando más RL ante la deficiencia cuando la fuente de P es Na_2HPO_4 . Sin embargo, las plantas *bzip25-2* no respondieron en esta condición. La acumulación de bZIP25.2-GFP en la mutante (plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*) es suficiente para que logren responder. Por ello, se puede concluir que, bajo tratamientos con Na_2HPO_4 , bZIP25 participa de la respuesta frente al déficit nutricional de P a nivel del desarrollo de nuevos órganos.

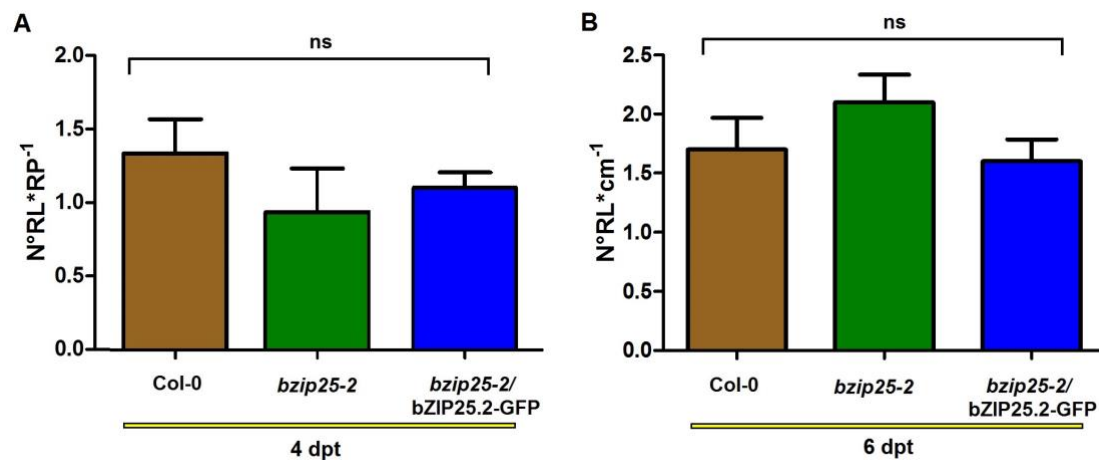


Figura 20. Plantas silvestres, *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* tienen similar densidad de RL cuando crecen en condición nutricional óptima. Tratamiento de 4 (A) o 6 días (B) con MS reconstituido, que contiene todas las fuentes de nutrientes utilizadas en concentraciones de suficiencia. Los resultados corresponden a tres réplicas biológicas; $n > 25$ por cada condición. Las barras de error representan el error estándar asociado. $*=p < 0,01$; $**=p < 0,005$; $***=p < 0,0005$; $ns=$ no significativo.

4.3.2. Evaluación de la participación del factor bZIP25 en la modificación de la arquitectura radical frente al déficit de nitrato

4.3.2.1. Modificaciones en la raíz principal frente al déficit de nitrato

La evaluación de la estructura radical frente al déficit de N se realizó utilizando como fuente del nutriente KNO_3 y NH_4NO_3 . Las concentraciones de suficiencia (+N) y deficiencia (-N) se establecieron en 10 mM y 0,5 mM, respectivamente. Considerando que los tratamientos con MS reconstituido corresponden a un control de crecimiento que incluye todas las fuentes de nutrientes aquí evaluadas, aquellos resultados reportados en la Figura 16 y Figura 20 sirven también como comparación para los resultados reportados en esta sección referente al largo de RP e índice de RL, respectivamente.

Tratamientos de 4 días con KNO_3 mostraron alta variabilidad en el crecimiento de la RP en las tres líneas de plantas analizadas (Figura 2, Anexo). Plantas silvestres no muestran cambios significativos en el largo total de su RP con esta fuente de N. *bzip25-2* tiene un aumento significativo en el crecimiento de la raíz en condición -N al utilizar KNO_3 . Contrariamente, plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* disminuyen el crecimiento de su RP ante la carencia de N (Figura 26, Anexo). Tratamientos con NH_4NO_3 también reportan diferentes respuestas. Aquí, plantas silvestres crecieron más su RP, al igual que plantas *bzip25-2*. Ninguna diferencia estadística significativa se halló en plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* luego de 4 dpt (Figura 26, Anexo). La variación en el crecimiento de la RP en los 4 dpt no mostró diferencias estadísticas al comparar las situaciones +N y -N en ninguna de las tres líneas de plantas evaluadas cuando la fuente es KNO_3 . Solo

plantas silvestres mostraron un aumento en el crecimiento de la raíz 4 dpt en condición -N cuando la fuente de N provenía de NH_4NO_3 (Figura 21).

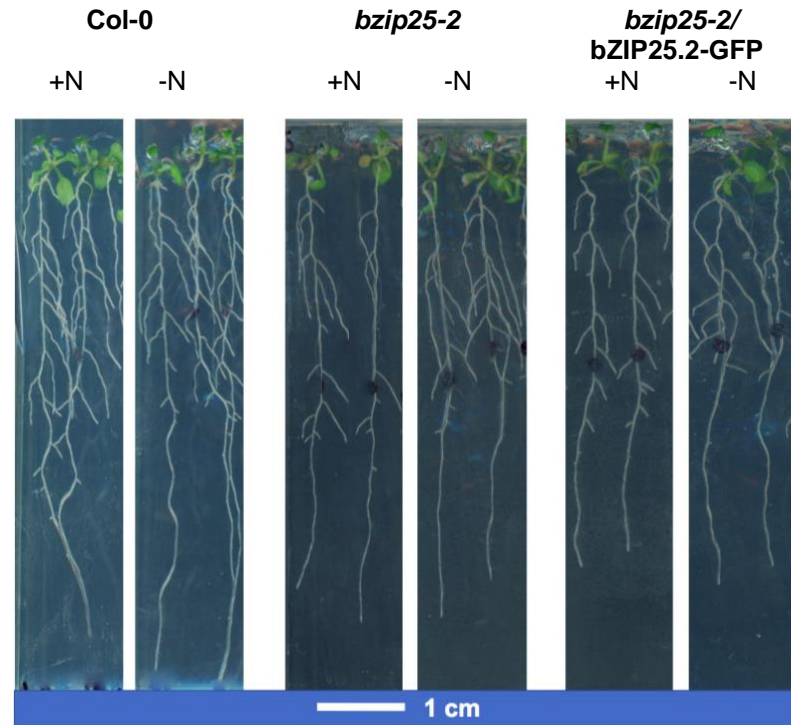


Figura 21. La carencia de nitrato no genera cambios drásticos en el crecimiento de la RP. Variación del crecimiento de la raíz en plantas ante la deficiencia de N tras 4 dpt. La fotografía muestra individuos representativos en tratamientos con suficiencia y deficiencia de N cuando el nutriente es suministrado en forma de NH_4NO_3 .

En tratamientos de 6 días, al utilizar KNO_3 como fuente de N se observó que en plantas silvestres la RP alcanza en promedio una longitud promedio de $5,4 \pm 0,3$ cm en condiciones de +N, el cual aumenta a $6 \pm 0,2$ cm en condiciones de -N. (Figura 22B). En plantas mutantes, bajo condición de +N la RP alcanza $5,1 \pm 0,2$ cm, muy similar a las plantas silvestres, pero en condiciones de -N no se observó diferencia estadística al compararla con la condición de suficiencia, alcanzando $5,1 \pm 0,2$ cm. En tanto, plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* presentan una RP de $4,9 \pm 0,4$ cm de largo total de la raíz en

condición +N en tratamientos con KNO_3 . Interesantemente, en las mismas plantas, en carencia del nutriente el largo total de la RP fue de $5,2 \pm 0,3$ cm. Al estudiar la variación del crecimiento durante los 6 días tratados, plantas silvestres crecieron su RP $3,5 \pm 0,2$ cm en condiciones +N, mientras que en condición -N la variación fue de $4,2 \pm 0,2$ cm, existiendo mayor variación bajo condición de déficit de N. (Figura 22A). Este comportamiento también se reportó en las plantas silvestres bajo tratamientos con NH_4NO_3 (Figura 22C). El aumento en el crecimiento de la RP en condiciones de déficit de N solo se observó en plantas silvestres. En plantas mutantes no se halló una diferencia significativa en el crecimiento total de la RP en ninguna de las dos fuentes utilizadas, con promedios cercanos a $5 \pm 0,2$ cm y $5,1 \pm 0,2$ cm en condiciones de +N y -N, respectivamente (en tratamientos con KNO_3), ni tampoco se observaron diferencias significativas en la variación del crecimiento de la RP durante los 6 dpt (Figura 22A y 22C). De manera similar, plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* tampoco mostraron diferencias significativas en el largo total de la RP con ninguna de las dos fuentes, con promedios de $4,9 \pm 0,4$ cm y $5,2 \pm 0,2$ cm en condiciones de +N y -N, respectivamente (en tratamientos con KNO_3), así como tampoco una diferencia significativa al comparar la variación del crecimiento del mismo órgano (Figura 22).

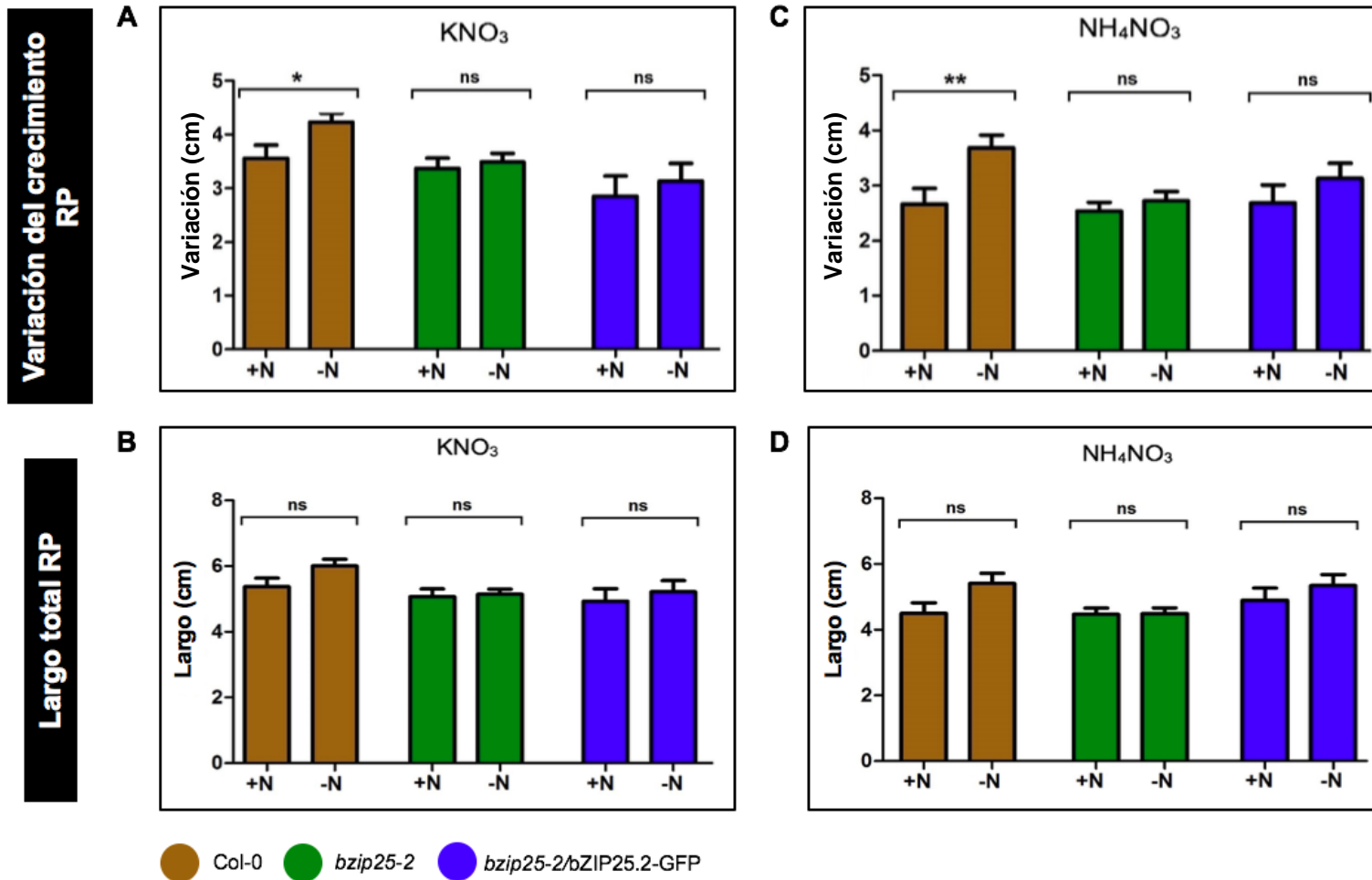


Figura 22. bZIP25 participa en la respuesta de la RP al déficit de nitrógeno por un mecanismo que sería independiente de bZIP25.2. Variación del crecimiento de la RP y largo total de la RP, 6 dpt en medio de cultivo con fuentes de N de KNO_3 (A y B) y NH_4NO_3 (C y D) y crecimiento total de la raíz en tratamientos con KNO_3 (B) y NH_4NO_3 (D) como fuentes de N. Solo plantas silvestres responden con un mayor crecimiento de su RP ante el déficit de N. Mutantes *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* no generaron respuesta alguna bajo ningún tratamiento. Los resultados corresponden a tres réplicas biológicas; $n > 25$ por cada condición. Las barras de error representan el error estándar asociado. *= $p < 0,01$; **= $p < 0,005$; ***= $p < 0,0005$; ns= no significativo.

Solo plantas silvestres mostraron un aumento del crecimiento de la RP durante los días de tratamiento (Figura 22A y 22C), sin embargo, esto no generó diferencia estadística en el largo total de la raíz principal (Figura 22B y 22D). No obstante, el comportamiento de las plantas sigue la misma tendencia al comparar los parámetros de variación del crecimiento y largo total, por lo que un análisis con mayor cantidad de datos podría mostrar una diferencia estadística semejante. Por otro lado, plantas *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* no mostraron diferencias significativas en el crecimiento de la raíz al comparar las condiciones de suficiencia y déficit de N, así como tampoco diferencias al comparar qué tanto creció la RP durante los días de tratamiento (variación del crecimiento de la RP) con ninguna de las dos fuentes estudiadas. La ausencia de N no produjo un aumento o arresto del crecimiento durante el tratamiento de déficit de N en plantas *bzip25-2* ni *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, mostrando que ambas tienen un mismo comportamiento, el cual difiere de plantas silvestres.

Tomando en cuenta los resultados, el comportamiento de las mutantes *bzip25-2* muestra que, a diferencia de las plantas silvestres, estas plantas no responden ante la carencia de N. Asimismo, la acumulación de *bZIP25.2-GFP* no rescata el fenotipo mutante sugiriendo que *bZIP25* sería partícipe de la respuesta a déficit de N, sin embargo, la variante *bZIP25.2* no sería, al menos por sí sola, suficiente para generar dicha respuesta.

4.3.2.2. Modificaciones en las raíces laterales frente al déficit de nitrato

Respecto de las modificaciones en la formación de RL en condiciones de suficiencia de N y déficit del mismo, con las fuentes de KNO_3 y NH_4NO_3 , el análisis de índice de RL reveló que para tratamientos de 4 días solo se observó un aumento de este parámetro en las plantas mutantes *bzip25-2* al estar en condición de $-\text{N}$ con la fuente

KNO₃, mientras que plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* aumentan este índice al crecer en condición de -N con la fuente NH₄NO₃ (Figura 27C y 27D, Anexo). En tanto, en plantas silvestres no hay cambios en el índice de RL (tanto en condiciones +N como -N) cuando la fuente de N es NH₄NO₃ (Figura 27C y 27D, Anexo).

Luego de 6 dpt, si la fuente de N es KNO₃, no existe diferencia significativa en el índice de RL en plantas silvestres (Figura 23). Al comparar las condiciones de +N y -N en estas plantas, los índices alcanzan valores de $1,4 \pm 0,3$ [rl/cm] y $1,5 \pm 0,1$ [rl/cm], respectivamente. Bajo tratamientos con NH₄NO₃ las mismas plantas mostraron un aumento de este parámetro al enfrentar carencia de N, teniendo, en promedio, $1,3 \pm 0,1$ [rl/cm] en condición +N y $1,9 \pm 0,2$ [rl/cm] en condición -N. Interesantemente, no se observó diferencia significativa al analizar las plantas mutantes y las plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, con ninguna de las dos fuentes de N utilizadas. En KNO₃, plantas *bzip25-2* desarrollan índices de $1,4 \pm 0,1$ [rl/cm] para ambas condiciones, de suficiencia y déficit. Por su parte, plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* tienen un índice promedio de $1,8 \pm 0,3$ [rl/cm] en ambas condiciones (Figura 23). Estos valores son muy semejantes a los obtenidos cuando las plantas son crecidas en tratamientos control con MS reconstituido, el cual contiene completa suficiencia nutricional (Figura 20B).

En general, no se observaron cambios en la formación de RL, pero sí un alargamiento de estas (Figura 28, Anexo). Este comportamiento, cualitativamente es concordante con lo reportado en la literatura (Gruber & col., 2013).

Los resultados obtenidos muestran que plantas *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* no responden de igual manera ante el déficit de N en comparación con plantas silvestres, analizando los tratamientos con NH_4NO_3 , sugiriendo que *bZIP25* participa de esta respuesta, en la cual la variante *bZIP25.2* no es suficiente para rescatar el fenotipo mutante. No obstante, todas las plantas mantienen el mismo comportamiento cuando la fuente de N es KNO_3 . Debido a que la respuesta a déficit de N es muy variable, dependiendo del nivel de nitrógeno presente en el medio, así como también del período por el cual la limitación del nutriente se mantenga (Gruber & col., 2013), más estudios al respecto deben realizarse.

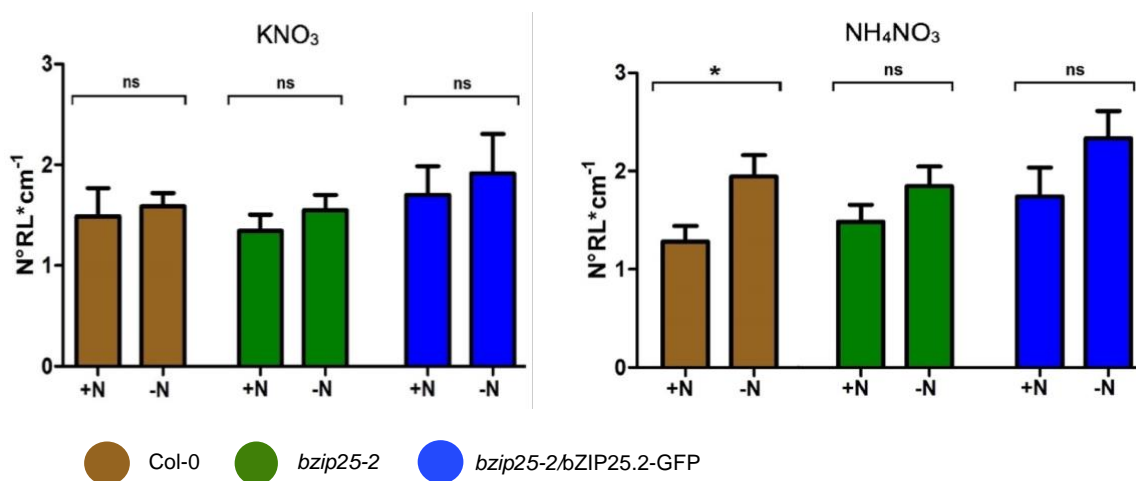


Figura 23. Plantas silvestres desarrollan más RL ante el déficit de NH_4NO_3 , mientras que *bzip25-2* no es capaz de responder aun cuando acumula *bZIP25.2-GFP*. Índice de RL ante diferentes condiciones de N cuando la fuente del nutriente es KNO_3 o NH_4NO_3 en tratamientos de 6 días. Tres o más réplicas biológicas fueron generadas para el análisis estadístico, con un $n > 25$ por cada condición. Las barras de error representan el error estándar asociado. *= $p < 0,01$; **= $p < 0,005$; ***= $p < 0,0005$; ns= no significativo.

5. DISCUSIÓN

Una de las razones del éxito evolutivo de las plantas radica en la facultad que tienen para responder efectivamente a las condiciones adversas de su entorno. La diversidad morfológica de sus órganos y las modificaciones post-embrionarias, particularmente el desarrollo de RL permite a las plantas sobrevivir y prosperar en suelos escasos en nutrientes. Esto es de gran relevancia, considerando que se predice que el cambio climático tendrá un fuerte impacto en la fertilidad del suelo, el metabolismo fisiológico de las plantas, su crecimiento y, por tanto, la producción final de alimento (Dhankher & Foyer, 2018). Por ello, es necesario entender los mecanismos celulares y moleculares que comandan estas respuestas, a fin de poder generar nuevas estrategias para el desarrollo de cultivos resistentes que aseguren la producción alimentaria.

El presente seminario de título se enfocó en estudiar la participación del factor de transcripción bZIP25 en el contexto de la regulación del tráfico endocítico, así como también en buscar un vínculo entre este factor y la respuesta a nivel radical frente al déficit de P y N. Nuestro objeto de estudio es el sistema radical de *Arabidopsis thaliana*, sin embargo, es importante rescatar que la expresión de bZIP25 no está limitada a este tejido en las plantas. Su actividad ha sido reportada en polen, hipocotilo, hojas senescentes, botones florales (Weltmeier, & col., 2008). La base de datos de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org) señala que también tiene altos niveles de expresión a lo largo del desarrollo del embrión, lo cual se asocia a su función descrita en el almacenaje de proteínas en ese estadio (Jakoby & col., 2002), así como también en la silicua (Weltmeier, & col., 2008) y peciolos de hojas senescentes.

El estudio realizado buscó estudiar si existe un rol asociado a la variante de mRNA bZIP25.2 en el proceso de endocitosis. Si bien nuestro laboratorio ya ha mostrado que el factor de transcripción bZIP25 modula negativamente la endocitosis, la existencia de variantes de empalme alternativo abre la interrogante respecto de cuál(es) variante(s) sería(n) responsable(s) de esta regulación. Por otro lado, nuestro laboratorio ha propuesto que bZIP25 está implicado en el desarrollo de RL a través de una ruta alternativa, independiente del complejo SCF_{TIR} (Pizarro, 2015). Debido a esta potencial función, resultó interesante estudiar si bZIP25 está implicado en otros procesos que involucren la modificación de la arquitectura radical, particularmente, la respuesta a estrés por déficit nutricional.

5.1. La línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* posee individuos homocigotos para el transgén bZIP25.2-GFP, el cual se expresa y distribuye en el núcleo celular

El estudio de la variante bZIP25.2 se llevó a cabo utilizando la línea *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, la cual sobre expresa ectópicamente la variante bZIP25.2 fusionada a la proteína GFP. Esta línea, generada en nuestro laboratorio no había sido previamente utilizada en ningún estudio, por lo cual se desconocía el estado cigótico del transgén de interés. La presencia del gen *Hph* en el vector de clonación, cuya expresión otorga resistencia a higromicina fue clave en la selección de organismos cuya resistencia al antibiótico permitiera inferir el estado homocigótico de los parentales evaluados. La selección de transformantes resistentes constituye un método indirecto para determinar si la progenie de las plantas transformadas poseerá un gen en estado homocigótico. Si bien fue posible observar germinación de las semillas en todas las líneas en presencia del antibiótico, los porcentajes de germinación de semillas provenientes de individuos no

transformantes fueron considerablemente bajos, esto a pesar de que la acción de la higromicina ocurre principalmente post-germinación, a través de la inhibición de la síntesis de proteínas producto de una lectura errónea del mRNA (Brodersen & col., 2000). Respecto de la supervivencia de las plántulas, las diferencias entre individuos transformantes (85%) y no transformantes (0%) fue evidente. En teoría, y considerando que las semillas con las que se trabajó correspondían a la generación T3, se espera que todas las plantas presenten el gen *Hph* y, por tanto, sobrevivan a la acción antibiótica. En la práctica, la constante acción de la higromicina afecta de igual manera a plantas transformantes, lo cual puede agudizarse a mayores concentraciones del compuesto. Debido a esto, es importante que en los ensayos de crecimiento se estandarice tanto la concentración del antibiótico como la duración del ensayo. Los resultados obtenidos permitieron sugerir fuertemente que los individuos 1 y 2 de *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* correspondían a organismos homocigotos para el gen *Hph* y, consecuentemente, para el transgén codificante para *bZIP25.2-GFP*. Por su parte, los individuos 3 y 4 no expresaron la enzima higromicina b fosfotransferasa. Esto podría ser consecuencia de problemas en la expresión del gen, la traducción de la proteína, o bien, que los individuos no hayan heredado el transgén en primer lugar debido a que los progenitores, en estado heterocigótico para este transgén, traspasaron a la siguiente generación el alelo que no posee dicha secuencia. Otra posibilidad es que los progenitores no contaran con ninguna copia del transgén en su genoma. Ante cualquier escenario, la T3 de estos individuos fue 100% sensible a higromicina, existiendo una alta posibilidad de que no posean y/o expresen el transgén, situación que se extrapola al inserto codificante para *bZIP25.2-GFP*. Contar con organismos homocigotos para un gen de interés cobra relevancia pues contar con esta característica otorga mayor seguridad respecto del comportamiento observado, que puede asociarse a la presencia o ausencia de un gen en particular. La

presencia de un alelo silvestre puede enmascarar los efectos esperados por la mutación del alelo mutado en el genoma de un mismo organismo. La presencia de una sola copia del transgén de interés da lugar a un organismo heterocigoto para ese gen, el cual al segregarse en la siguiente generación dará origen a individuos que no porten dicho gen, causando la pérdida de individuos transformantes en generaciones posteriores.

La detección de señal de GFP permitió confirmar la correcta expresión y traducción de *GFP* en células de la epidermis de la raíz, la cual, al estar fusionada a la variante *bZIP25.2* permite sugerir fuertemente que esta última también se expresa y traduce correctamente. En plantas transformadas, la acumulación de GFP por sí sola ocurre tanto en el citoplasma como en el núcleo celular (Leffel & col., 1997). Los resultados mostraron patrones de distribución muy semejantes al núcleo, ausentes en el citoplasma celular. Esto da cuenta de que existe un mecanismo que dirige GFP al núcleo, muy probablemente debido a una secuencia de localización nuclear presente en la variante *bZIP25.2*, respaldando la idea de la correcta expresión, traducción y acumulación de *bZIP25.2* en el núcleo celular.

Los resultados obtenidos, en conjunto con lo reportado previamente en nuestro laboratorio (Pizarro, 2015; Osorio-Navarro, 2016) y lo publicado en la base de datos de *Arabidopsis* para el gen *bZIP25* (www.arabidopsis.org) lo posicionan como un fuerte candidato a ser un factor de transcripción. La distribución de la proteína de fusión *bZIP25.2-GFP* en el núcleo refuerza esta idea. La presente investigación determinó que la variante de empalme alternativo, *bZIP25.2*, está involucrada en la regulación negativa de la endocitosis. A su vez, los estudios realizados en torno al déficit de P mostraron, de manera inédita, que *bZIP25* participa de la respuesta frente a la carencia del nutriente, probablemente a través de su rol de modulador del tráfico endocítico, permitiendo el

desarrollo de RL. En tanto, los ensayos de N mostraron que bZIP25 sería partícipe de la respuesta frente el déficit de N, sin embargo, la expresión y acumulación de su variante bZIP25.2 no sería suficiente para gatillarla.

5.2. La respuesta de las plantas frente al estrés abiótico depende de la forma en que el nutriente es entregado, así como también del periodo de limitación nutricional.

Los análisis realizados revelaron que seis dpt son generadas respuestas tanto a nivel de la RP como de las RL, las cuales son concordantes con lo visto en la literatura, como lo son el arresto del crecimiento de la RP y el mayor desarrollo de RL bajo déficit de P. Si bien los tratamientos cuatro dpt mostraron que, en déficit de P, se produce un arresto del crecimiento de la RP, tanto en plantas silvestres como *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, al estudiar el desarrollo de RL no se encontraron diferencias significativas bajo ninguno de los tratamientos y en ninguna de las líneas estudiadas, inclusive plantas silvestres. Debido a esto, se consideró más relevante generar una discusión y establecer conclusiones respecto de lo observado seis dpt (Sección 5.4. y 5.5.). Una posible razón para no haber observado cambios significativos cuatro dpt es la duración del tratamiento realizado. En primer lugar, hay que considerar que los primeros siete días del ensayo las plantas cuentan con un suministro adecuado de nutrientes, comenzando recién el séptimo día la privación de P o N. Debido a esto, las plantas aprovechan completamente los nutrientes absorbidos antes de gatillar la respuesta a déficit nutricional. Una vez desencadenada esta respuesta, en *Arabidopsis*, se ha reportado que el desarrollo completo de un primordio desde el estado I hasta que este emerge (estado VIII) tarda alrededor de 48 horas en completarse (Laskowski &

col.,1995). Por lo tanto, es muy probable que para el momento en que las plantas fueron analizadas, las modificaciones en el sistema radical estén en proceso recientemente y, con ello, aún no hayan alcanzado la emergencia.

Las diferencias en el comportamiento de las plantas entre los tratamientos con KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 fueron inesperadas. El estudio de desarrollo de RL en medios de cultivo con deficiencia de P mostró que plantas silvestres no aumentan su índice de RL cuando el P es suministrado como KH_2PO_4 , lo cual no concuerda con lo reportado en la literatura (Gruber & col., 2013). Considerando esto, difícilmente es posible concluir algo respecto del comportamiento de plantas *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Esto no necesariamente implica que KH_2PO_4 suponga una fuente menos favorable para el desarrollo óptimo de las plantas. Por el contrario, esta sal es ampliamente utilizada como fertilizante debido a su rápida asimilación, lo cual haría menos necesario que las plantas desarrollen RL. Existen también transportadores de alta afinidad que se expresan bajo condiciones de déficit severo de P (Bayle & col., 2011), lo cual es probable que genere un efecto amortiguador al momento de responder frente a esta deficiencia. Na_2HPO_4 supone también una buena fuente de P, pero es probable que, producto de la forma en que la sal es sensedada o asimilada, haga que sea necesario para las plantas desarrollar más RL, lo cual se refleja en que en los tratamientos realizados se observara mayor diferencia estadística. Si bien la interrogante respecto a este tema escapa de los márgenes de este seminario de título, sin duda es una pregunta interesante de responder en futuras investigaciones.

5.3. La variante bZIP25.2 participa en la regulación negativa del tráfico endocítico

Los resultados mostraron una desaceleración de la endocitosis hacia la vacuola en células de plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*, asemejándose al comportamiento de plantas silvestres. Mutantes *bzip25-2* tienen acelerado el tráfico endocítico hacia este organelo. Esta evidencia sugiere fuertemente que la expresión de la variante bZIP25.2 en plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* participa de la modulación negativa de la endocitosis. El estudio de la dinámica del tráfico endocítico desde la membrana plasmática hasta los EE/TGN en plantas *bzip25-2* que expresan la proteína de fusión bZIP25.2-GFP mostró que bZIP25.2 actúa en estadios tempranos del proceso. Lorena Pizarro reportó en plantas *bzip25-2* el aumento de los niveles de transcrito de genes asociados a las etapas tempranas del tráfico endocítico, como *ARA6*, *CLC2* y *SYP122* (Pizarro, 2015), por lo que sería interesante estudiar los niveles de expresión de estos mismos genes en plantas que expresan bZIP25.2. Si la variante es un regulador negativo en etapas tempranas, los niveles de expresión de dichos genes debieran ser similares a los de una planta silvestre.

Claudio Osorio mostró que la variante bZIP25.1 es también un regulador negativo de la endocitosis, lo cual fue corroborado en el presente trabajo (Figura 24, Anexo). La herramienta BLAST mostró una similitud de 69% en su secuencia aminoacídica. La base de datos UNIPROT evidenció que ambas isoformas mantienen la misma secuencia de localización nuclear, así como también la misma identidad de la región básica del dominio bZIP, pero encontrándose diferencias en la región del cierre de leucina. La

misma base de datos señala como sitio de unión preferente para el factor de transcripción bZIP25 la secuencia 5'-ACGT-3', presente en motivos de caja A (TACGTA), caja G (GACGTC) y caja C (CACGTG) (Wang & col., 2018). Considerando que ambas isoformas poseen la misma región de interacción a DNA, es altamente probable que compartan los mismos sitios de unión. Debido al empalme alternativo de exones, la variante *bZIP25.1* genera una proteína de 403 aminoácidos, mientras que *bZIP25.2* una proteína de 295 aminoácidos. A pesar de sus diferencias estructurales, ambas variantes parecen compartir una misma función. Este resultado, sin duda, plantea otras interesantes preguntas. Por ejemplo, el estudio aquí llevado a cabo se realizó evaluando el tráfico endocítico en las células de la epidermis en la punta de la raíz de plantas de *Arabidopsis thaliana*, sin embargo, se desconoce si estas variantes tendrán una función tejido específica, especialmente considerando que bZIP25 se expresa en la mayoría de los tejidos de la planta (Weltmeier, & col., 2008). Asimismo, se desconoce si en condiciones fisiológicas normales la expresión de las ambas variantes cambie a lo largo del desarrollo del organismo. Los miembros de la familia de factores bZIP se caracterizan por actuar bajo la conformación de heterodímeros. En *Arabidopsis*, la familia de factores bZIP posee 75 miembros descritos (Jakoby & col., 2002) distribuida en 10 grupos clasificados de acuerdo con su estructura y función, donde bZIP25 pertenece junto a bZIP9, bZIP10 y bZIP63 al grupo C. Este grupo de factores tiene afinidad específica con miembros del grupo S1 (bZIP1, 2, 11, 44, 53) (Weltmeier, & col., 2008); una posibilidad es que las variantes de bZIP25 interactúen de manera preferente con alguno de estos miembros para desempeñar su función. En nuestro laboratorio, el trabajo con dobles o triples mutantes de estos factores como *bzip1/bzip53*, *bzip10/bzip53*, *bzip10/bzip25/bzip53* ha mostrado que el tráfico endocítico también se ve acelerado, mostrando que existen funciones compartidas por ambos grupos.

La función de bZIP25.1 y bZIP25.2 en la regulación del tráfico endocítico es redundante. Este resultado permite descartar la posibilidad de que ambas proteínas sean necesarias para concertar la correcta regulación del tráfico endocítico. A su vez, el hecho de que la cinética endocítica sea idéntica en plantas que expresan bZIP25.1 o bZIP25.2 respalda la posibilidad de que ambas variantes del factor de transcripción tengan los mismos genes blanco.

Pérez-Henríquez y col. (2012) mostraron la existencia de una vía alternativa, independiente del receptor de auxina SCF_{TIR}, para la formación de RL, la cual ocurriría a través del tráfico endocítico de proteínas clave para este proceso. La evidencia que sitúa a bZIP25 como regulador del tráfico endocítico (Pizarro, 2015) compromete, a su vez, su participación en el desarrollo de RL. Considerando que el estrés por déficit nutricional es uno de los principales estímulos que gatillan la respuesta de formación de RL, no sería sorprendente que bZIP25 sea partícipe de ella.

5.4. bZIP25.2 participa de la respuesta a déficit de P, muy probablemente, a través de la regulación del tráfico endocítico

Si bien las vías de respuesta a estrés por déficit de P no están completamente dilucidadas, varios mecanismos han sido propuestos para entender cómo esta es gatillada (Rouached & col., 2010). A nivel de RP, la limitación de P provoca una reducción de la elongación celular, así como también de la actividad mitótica del meristema apical (Rouached & col., 2010). PDR2 (Phosphate Deficiency Response 2 gene) ha sido propuesto como sensor de P inorgánico ambiental, manteniendo la

actividad meristemática (Rouached & col., 2010). En años recientes, el factor de transcripción PHR1 (Phosphate Starvation Response 1) ha sido señalado como potencial regulador de la respuesta a déficit de P, el cual regula la expresión de genes de respuesta a bajo P, principalmente promoviendo la actividad de los transportadores de P PHT1 (Puga & col., 2017). Así también, la homeostasis del P es mantenida por la regulación negativa de esta. Entre los principales actores de la modulación negativa están miembros de la familia de proteínas SPX, que compiten por el sitio de unión de PHR1 (Puga & col., 2017), así como también las proteínas PHO2 y NLA, que al asociarse forman un complejo ubiquitín-ligasa que etiqueta los transportadores PHT1 para su degradación (Puga & col., 2017). ALIX es una proteína identificada recientemente involucrada en la selección del transportador PHT1 para su degradación **a través del tráfico endocítico hacia la vacuola** (Puga & col., 2017), asociándose a MVB (Cardona-López & col., 2015). Nos parece interesante resaltar esta ruta de degradación, considerando que bZIP25 es un modulador negativo de la endocitosis. La búsqueda bibliográfica realizada no mostró miembros de la familia bZIP asociados directamente a la respuesta a estrés por déficit de P, pero los resultados señalan que bZIP25 participa de este proceso.

Los resultados obtenidos 6 dpt mostraron que bajo tratamientos con Na_2HPO_4 mutantes *bzip25-2* responden igual que plantas silvestres respecto de la inhibición de su RP ante la falta de P, y lo mismo ocurre cuando es devuelta la variante bZIP25.2. La estadística realizada arrojó un comportamiento similar de las plantas cuando se comparan las tres líneas evaluadas. bZIP25 no es, por ende, necesario para generar una respuesta frente al déficit del nutriente y la expresión única de la variante bZIP25.2 tampoco tiene un efecto distinto en ella. A la fecha, no se conoce que procesos ligados al tráfico endocítico

formen parte del mecanismo de esta respuesta. En esta respuesta están implicadas hormonas como auxinas, giberelinas, brasinosteroides y etileno, y es mediada por la acumulación del ion Fe_{3+} y ROS, lo que determina la inmovilidad de SHR, regulador maestro del mantenimiento del meristema (Desnos, 2007; Puga & col., 2017) y reducción de la actividad mitótica (Rouached & col., 2010), inhibiendo el crecimiento de la RP. Ante esto, es poco probable, entonces, que bZIP25 sea partícipe de este mecanismo de respuesta.

Bajo tratamientos con Na_2HPO_4 , mutantes *bzip25-2* no generan más RL ante el déficit de P, al contrario de las plantas silvestres. Este comportamiento podría ser debido a que son incapaces de sentir la falta de P o bien porque no pueden generar esta respuesta. Cardona-López & col. (2015) reportan que una de las vías existentes en la regulación negativa de la absorción de P es la degradación de los transportadores PHT1 a través de la ruta endocítica. Si bien bZIP25 no ha sido asociado como regulador de la vía de respuesta a déficit nutricional, su rol de modulador de tráfico endocítico lo posicionaría como un partícipe de esta vía, lo cual se relaciona con el hecho de que la endocitosis es necesaria para la correcta degradación de PHT1. La degradación de PHT1 ocurre cuando niveles adecuados de P son sentidos (Cardona-López & col., 2015), por lo que la aceleración de la endocitosis intervendría en la correcta degradación del transportador, causando un fenotipo que no genera RL frente al déficit, sin embargo, ningún estudio que relacione ambos eventos ha sido realizado a la fecha. bZIP25 sería, por lo tanto, necesario para la formación de RL como parte de la respuesta al déficit de P. Esta idea es respaldada por el hecho de que plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* mostraron un aumento del índice de RL frente al déficit nutricional, al igual que plantas silvestres, pues la acumulación de bZIP25.2-GFP rescata el fenotipo mutante, mostrando

incluso que la variante bZIP25.2 no solo es partícipe, sino que además suficiente para gatillarla.

5.5. bZIP25 forma parte de la regulación de la respuesta frente al déficit de nitrato, pero su variante bZIP25.2 no es suficiente, por sí sola, para que esta ocurra.

La limitación de nitrógeno tiene efectos sistémicos en plantas. Además de ser un elemento clave en la estructura de aminoácidos y el genoma, el nitrógeno cumple un rol clave en la señalización de rutas que controlan la expresión génica (Neill & col., 2003), incluso en la respuesta a déficit del mismo nutriente, particularmente interviniendo en la expresión de genes de transportadores de N y enzimas como la nitrato reductasa y la nitrito reductasa (Vidal & Gutiérrez, 2008). La regulación de la respuesta a déficit de N depende principalmente a nivel de expresión génica (Kiba & col., 2018), pero los efectos afectan tanto el metabolismo como la estructura del organismo. Un regulador relevante y punto de partida en la señalización del N lo compone el transportador NRT1, que también actúa como receptor del nutriente, razón por la que algunos autores lo señalan como un transceptor (Bouguyon & col., 2012; Zhang & col., 2019). En su función de transportador, este transceptor tiene afinidad dual, es decir, es capaz de transportar N presente en bajas concentraciones (alta afinidad) como en altas cantidades (baja afinidad), lo cual es posible gracias a la fosforilación por parte de la kinasa CIPK23 (Bouguyon & col., 2012). Por otro lado, ANR1 es un factor de transcripción reportado como regulador maestro de la regulación de la respuesta a déficit de N (Bouguyon & col., 2012). ANR1 es miembro de la familia MADS-box y se expresa exclusivamente en raíces, principalmente en primordios de RL (Bouguyon, & col., 2012). Su función se

asocia al desarrollo de dichos primordios ante el déficit moderado de nitrato (Sun & col., 2017). Es importante recalcar que la respuesta a déficit de N no es estricta, pues distingue diferentes niveles de limitación. Por ejemplo, bajo déficit moderado (0,5 mM) de N, se promueve el alargamiento de las RL (Sun & col., 2017), sin embargo, bajo condiciones de severa limitación, el crecimiento y desarrollo de estos órganos se ve inhibida (Gruber & col., 2013; Sun & col., 2017). Asimismo, la absorción de N está fuertemente ligada a la disponibilidad de carbono, considerando que la oxidación de este es crucial para su reducción (Vidal & Gutiérrez, 2008; Xu & col., 2012), por ello, la respuesta ante el déficit de N puede ser muy variable, dependiendo incluso de procesos como la disponibilidad de azúcar y la capacidad fotosintética (Xu & col., 2012). Resultaría conveniente evaluar diferentes condiciones de carencia de nitrato (déficit moderado y severo, considerando variaciones del radio Carbono-Nitrógeno) para determinar la participación de este factor de transcripción en alguna condición dada.

Los resultados obtenidos mostraron una alta dispersión de datos. Respecto de la variación del crecimiento de la RP, por ejemplo, plantas silvestres mostraron un aumento del crecimiento de este órgano en condiciones de déficit de N, no así plantas *bzip25-2* ni *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Este comportamiento en plantas silvestres ha sido reportado en la literatura (Gruber & col., 2013). Los resultados señalan, por lo tanto, que bZIP25 es necesario para la generación de la respuesta a nivel de la RP, pero la variante bZIP25.2 no es suficiente para que esta ocurra. Por su parte, no se observó incremento en el índice de RL, pero sí se reportó de manera cualitativa un aumento en el crecimiento de las mismas (Figura 28, Anexo), lo cual concuerda con lo estudiado en la literatura (Gruber & col., 2013). Sun & col. (2017) señalan que bajo moderado déficit de N existe un efecto estimulador en el desarrollo de RL, sin embargo, resulta difícil establecer límites entre

deficiencia “moderada” y “severa” de nutrientes. Krouk & col (2010) reportaron inhibición del desarrollo de nuevas RL en cuando la fuente de nitrógeno es KNO_3 1 mM. Tomando en cuenta que la condición de deficiencia aquí evaluada fue de 0,5 mM, esta sería clasificada como de déficit severo. La literatura reporta que bajo condiciones severas de déficit de nitrógeno se genera un efecto inhibitorio en la formación de nuevas RL (Gruber & col., 2013; Sun & col., 2017), lo cual explicaría por qué no se observaron diferencias significativas de este parámetro en plantas silvestres bajo tratamientos con KNO_3 . Por otro lado, estas diferencias se observaron en tratamientos con NH_4NO_3 , donde plantas silvestres aumentan su densidad de RL ante el déficit de N, pero no mutantes *bzip25-2* ni *bzip25-2/bzip25.2-GFP*, por lo que se hace necesario evaluar diferentes condiciones de déficit de nitrógeno.

Los resultados sugieren, de manera preliminar, la participación de bZIP25 en la respuesta a déficit de N, pero la variante bZIP25.2 no sería suficiente, al menos por sí sola, de generar esta respuesta. Para determinar mejor la participación de bZIP25 en la regulación de este proceso, más estudios son necesarios, enfocándose particularmente en la evaluación de diferentes rangos de deficiencia de N, así como también en la duración de los tratamientos realizados.

Las respuestas frente al estrés abiótico por déficit nutricional no componen necesariamente vías independientes. La investigación realizada estudió la respuesta a la limitación de N y P por separado, y si bien fenotipo generado en ambos tratamientos es distinto, es importante mencionar que ambos estímulos podrían compartir rutas similares y generar respuestas diferentes, de las cuales bZIP25 podría ser parte. Por ejemplo, está descrito que el gen *XPL1* (At3g18000) es regulado positivamente durante

la respuesta a estrés por déficit de P, teniendo impacto en el desarrollo de la raíz principal y, a su vez, el mismo gen es regulado negativamente en la respuesta a estrés por N. Ahora que se mostró que bZIP25 está implicado en la respuesta a déficit nutricional, el siguiente paso es conocer qué rol tiene en este proceso. Para futuras investigaciones resultaría conveniente estudiar la relación entre bZIP25 y los genes candidatos a ser regulados por él, que formen parte de la respuesta frente al déficit nutricional.

6. CONCLUSIONES

1. Se identificaron plantas mutantes *bzip25-2* que acumulan el producto génico de la variante de mRNA *bZIP25.2* en el núcleo de las células de *Arabidopsis thaliana*. Las plantas identificadas son homocigotos para el transgén *bZIP25.2-GFP*
2. La variante de empalme alternativo de *bZIP25*, *bZIP25.2*, participa y es suficiente para la regulación negativa del tráfico endocítico desde la membrana plasmática hacia la vacuola.
3. *bZIP25* es requerido en la respuesta a estrés por déficit de fosfato cuando este se suministra como Na_2HPO_4 . Su pérdida de función impacta negativamente en la organogénesis de raíces laterales, lo cual puede estar relacionado con su rol de modulador del tráfico endocítico, ruta necesaria en la formación de estos órganos.
4. La variante *bZIP25.2* es partícipe de la respuesta a déficit de fosfato cuando el nutriente es suministrado como Na_2HPO_4 , permitiendo el desarrollo de RL en condiciones de carencia nutricional.
5. *bZIP25* participaría de la respuesta a estrés por déficit de nitrato cuando este se suministra en forma de NH_4NO_3 en las condiciones aquí estudiadas, afectándola a nivel de la raíz principal. Sin embargo, la variante *bZIP25.2* no estaría participando de este proceso.

7. BIBLIOGRAFÍA

Al-Ghazi, Y., Muller, B., Pinloche E, S., Tranbarger, T., Nacry, P., & Rossignol, M. et al. (2003). Temporal responses of Arabidopsis root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant, Cell and Environment*, 26(7), 1053-1066. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003. 01030.x

Amaral, E., Guatimosim, S., & Guatimosim, C. (2010). Using the Fluorescent Styryl Dye FM1-43 to Visualize Synaptic Vesicles Exocytosis and Endocytosis in Motor Nerve Terminals. *Methods in Molecular Biology*, 137-148. doi: 10.1007/978-1-60761-950-5_8

Barber, S. A. (1995). *Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach* (2nd ed., p. 4,5). New York: John Wiley & Sons.

Bayle, V., Arrighi, J., Creff, A., Nespoulous, C., Vialaret, J., & Rossignol, M. et al. (2011). Arabidopsis thaliana High-Affinity Phosphate Transporters Exhibit Multiple Levels of Posttranslational Regulation. *The Plant Cell*, 23(4), 1523-1535. doi: 10.1105/tpc.110.081067

Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 1055–1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>

Blankenship, R.E. (2014). *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Inc.

Blochlinger, K., & Diggelmann, H. (1984). Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Molecular and Cellular Biology*, 4(12), 2929-2931. doi: 10.1128/mcb.4.12.2929

Bouguyon, E., Brun, F., Meynard, D., Kubeš, M., Pervent, M., Leran, S., Gojon, A. (2015). Multiple mechanisms of nitrate sensing by Arabidopsis nitrate transceptor NRT1.1. *Nature Plants*, 1(3). doi: 10.1038/nplants.2015.15

Brodersen, D., Clemons, W., Carter, A., Morgan-Warren, R., Wimberly, B., & Ramakrishnan, V. (2000). The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit. *Cell*, 103(7), 1143-1154. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00216-6

Caldwell, M. M., & Pearcy, R. W. (2012). Exploitation of environmental heterogeneity by plants: ecophysiological processes above- and belowground (pp. 305–306). San Diego: Academic Press.

Cardona-López, X., Cuyas, L., Marín, E., Rajulu, C., Irigoyen, M., & Gil, E. et al. (2015). ESCRT-III-Associated Protein ALIX Mediates High-Affinity Phosphate Transporter Trafficking to Maintain Phosphate Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27(9), 2560-2581. doi: 10.1105/tpc.15.00393

- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R., Beeckman, T., Dhooge, S., & Swarup, R. et al. (2001). Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *The Plant Cell*, 13(4), 843-852. doi: 10.1105/tpc.13.4.843
- Dawson, T. P., Perryman, A. H., & Osborne, T. M. (2014). Modelling impacts of climate change on global food security. *Climatic Change*, 134(3), 429–440. <https://doi.org/10.1007/s10584-014-1277-y>
- De Smet, S., Cuypers, A., Vangronsveld, J., & Remans, T. (2015). Gene Networks Involved in Hormonal Control of Root Development in Arabidopsis thaliana: A Framework for Studying Its Disturbance by Metal Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19195–19224. doi:10.3390/ijms160819195
- Desnos, T. (2008). Root branching responses to phosphate and nitrate. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(1), 82-87. doi: 10.1016/j.pbi.2007.10.003
- Dhankher, O., & Foyer, C. (2018). Climate resilient crops for improving global food security and safety. *Plant, Cell & Environment*, 41(5), 877-884. doi: 10.1111/pce.13207
- Duan, H., & Ding, X. (2007). Effects of hygromycin on growth and development of Arabidopsis seedling roots. *Pakistan Journal of Botany*, 39(6), 2167-2173.
- Duan, H. & Ding, X. (2011). The influences of Hygromycin B on growth of Arabidopsis thaliana cotyledon and leaf. *African Journal of Biotechnology*, 10(77). doi: 10.5897/ajb11.2179
- Eisenach, C., Francisco, R. & Martinoia, E. (2015). Plant Vacuoles. *Current Biology*, 25(4)
- Fan, L., Li, R., Pan, J., Ding, Z., & Lin, J. (2015). Endocytosis and its regulation in plants. *Trends in Plant Science*, 20(6), 388-397. doi: 10.1016/j.tplants.2015.03.014
- Gruber, B., Giehl, R., Friedel, S., & von Wirén, N. (2013). Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiology*, 163(1), 161-179. doi: 10.1104/pp.113.218453
- Hochholdinger, F. and Zimmermann, R. (2008) Conserved and diverse mechanisms in root development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 70–74
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D. A. (2017). Agriculture in 2050: Recalibrating Targets for Sustainable Intensification. *BioScience*, 67(4), 386–391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., & Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 7(3), 106-111. doi: 10.1016/s1360-1385(01)02223-3

Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Löffke, C., Teichmann, T., Tanaka, H., & Friml, J. (2011). Clathrin Mediates Endocytosis and Polar Distribution of PIN Auxin Transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(5), 1920-1931. doi: 10.1105/tpc.111.083030

Kozlowski, T. (1972). *Seed biology, volume I: Importance, development and germination* (pp. 118–120). New York, N.Y.: Academic.

Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., & Mounier, E. et al. (2010). Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell*, 18(6), 927-937. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.008

Lafon-Placette, C., & Köhler, C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, 17, 64-69. doi: 10.1016/j.pbi.2013.11.008

Lavy, M., & Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development*, 143(18), 3226-3229. doi: 10.1242/dev.131870

Laskowski, M., Williams, M.E., Nusbaum, H.C., & Sussex, I.M. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, 121 10, 3303-10.

Leffel, S., Mabon, S., & Stewart, C. (1997). Applications of Green Fluorescent Protein in Plants. *Biotechniques*, 23(5), 912-918. doi: 10.2144/97235bi01

Leyser, O. (2017). Auxin Signaling. *Plant Physiology*, 176(1), 465-479. doi: 10.1104/pp.17.00765

Lima, J. E., Kojima, S., Takahashi, H., & Wirén, N. V. (2010). Ammonium Triggers Lateral Root Branching in Arabidopsis in an Ammonium Transporter 1;3-Dependent Manner. *The Plant Cell*, 22(11), 3621–3633. doi: 10.1105/tpc.110.076216

López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 280–287. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(03)00035-9)

Malamy, J., & Benfey, P. (1997). Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends in Plant Science*, 2. doi: 10.1016/S1360-1385(97)90054-6

Martinez, O., & Goud, B. (1998). Rab proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, 1404(1-2), 101-112. doi: 10.1016/s0167-4889(98)00050-0

Nakazawa, M., & Matsui, M. (2003). Selection of Hygromycin-Resistant Arabidopsis Seedlings. *Biotechniques*, 34(1), 28-30. doi: 10.2144/03341bm02

Neill, S., Desikan, R., & Hancock, J. (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159(1), 11-35. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00804.x

Norambuena, L., Zouhar, J., Hicks, G., & Raikhel, N. (2008). Identification of cellular pathways affected by Sortin2, a synthetic compound that affects protein targeting to the

vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Chemical Biology*, 8(1), 1. doi: 10.1186/1472-6769-8-1

Osorio-Navarro, C. (2016) Tesis de pregrado: "El factor de transcripción bZIP25 de *Arabidopsis thaliana* participa en el desarrollo de raíces laterales mediante la regulación de la endocitosis de manera independiente a la señalización gatillada por la fitohormona auxina"

Paciorek, T. (2006). Auxin signaling. *Journal of Cell Science*, 119(7), 1199-1202. doi: 10.1242/jcs.02910

Paez Valencia, J., Goodman, K., & Otegui, M. (2016). Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 309-335. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-112242

Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., & Laplace, L. et al. (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14(7), 399-408. doi: 10.1016/j.tplants.2009.05.002

Pérez-Henríquez, P., Raikhel, N., & Norambuena, L. (2012). Endocytic Trafficking towards the Vacuole Plays a Key Role in the Auxin Receptor SCFTIR-Independent Mechanism of Lateral Root Formation in *A. thaliana*. *Molecular Plant*, 5(6), 1195-1209. doi: 10.1093/mp/sss066

Pizarro, L. (2015) Tesis Doctoral: "Identificación y estudio funcional de factores de transcripción que regulan la expresión de genes del sistema de endomembranas en *Arabidopsis thaliana*".

Puga, M., Rojas-Triana, M., de Lorenzo, L., Leyva, A., Rubio, V., & Paz-Ares, J. (2017). Novel signals in the regulation of Pi starvation responses in plants: facts and promises. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 40-49. doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.007

Reynaerts A., De Block M., Hernalsteens JP., Van Montagu M. (1989) Selectable and screenable markers. In: Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht

Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., & Baster, P. et al. (2010). ABP1 Mediates Auxin Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell*, 143(1), 111-121. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.027

Rouached, H., Arpat, A., & Poirier, Y. (2010). Regulation of Phosphate Starvation Responses in Plants: Signaling Players and Cross-Talks. *Molecular Plant*, 3(2), 288-299. doi: 10.1093/mp/ssp120

Rubio, V. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development*, 15(16), 2122-2133. doi: 10.1101/gad.204401

Šamaj, J., Read, N., Volkmann, D., Menzel, D., & Baluška, F. (2005). The endocytic network in plants. *Trends in Cell Biology*, 15(8), 425-433. doi: 10.1016/j.tcb.2005.06.006

Schmidt, R. J., Burr, F. A., Aukerman, M. J., & Burr, B. (1990). Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(1), 46–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.1.46>

Sun, C.-H., Yu, J.-Q., & Hu, D.-G. (2017). Nitrate: A Crucial Signal during Lateral Roots Development. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00485

Tuteja, N. (2007). Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 2(3), 135-138. doi: 10.4161/psb.2.3.4156

Vidal, E. A., & Gutiérrez, R. A. (2008). A system view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5), 521–529. doi: 10.1016/j.pbi.2008.07.003

Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y., Krebs, M., Langhans, M., & van den Berg, W. et al. (2010). Endocytic and Secretory Traffic in Arabidopsis Merge in the Trans-Golgi Network/Early Endosome, an Independent and Highly Dynamic Organelle. *The Plant Cell*, 22(4), 1344-1357. doi: 10.1105/tpc.109.072637

Wang, Y., Zhang, Y., Zhou, R., Dossa, K., Yu, J., & Li, D. et al. (2018). Identification and characterization of the bZIP transcription factor family and its expression in response to abiotic stresses in sesame. *PLOS ONE*, 13(7), e0200850. doi: 10.1371/journal.pone.0200850

Welch, R. M., & Shuman, L. (1995). Micronutrient Nutrition of Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(1), 49–82. <https://doi.org/10.1080/07352689509701922>

Weltmeier, F., Rahmani, F., Ehlert, A., Dietrich, K., Schütze, K., & Wang, X. et al. (2008). Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Molecular Biology*, 69(1-2), 107-119. doi: 10.1007/s11103-008-9410-9

Xu, G., Fan, X., & Miller, A. J. (2012). Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 153–182. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105532

Zhang, X., Cui, Y., Yu, M., Su, B., Gong, W., & Baluška, F. et al. (2019). Phosphorylation-Mediated Dynamics of Nitrate Transceptor NRT1.1 Regulate Auxin Flux and Nitrate Signaling in Lateral Root Growth. *Plant Physiology*, 181(2), 480-498. doi: 10.1104/pp.19.00346

"La desertificación en Chile". Departamento de evaluación de la Ley, Unidad de Diagnóstico Parlamentario. Cámara de diputados de Chile (2012). Visitado el 29 de febrero, 2020, desde el sitio: <https://www.camara.cl/camara/media/seminarios/desertificacion.pdf>

“68% of the world population projected to live in urban areas by 2050, says UN”. UN DESA | United Nations Department of Economic and Social Affairs. (2019). Visitado el 25 de Octubre 2019, desde el sitio <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/2018-revision-of-world-urbanization-prospects.html>

“World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100”. UN DESA | United Nations Department of Economic and Social Affairs. (2017). Visitado el 18 de agosto, 2019, UN DESA | United Nations Department of Economic and Social Affairs, desde el sitio: <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2017.html>

8. ANEXO

Tabla VII. Sales utilizadas en la preparación de los medios de cultivo para los tratamientos de fosfato y nitrato. Se generó un stock de sales de 0,5 L al 50X para cada tratamiento. Las condiciones de +P (1,25 mM), -P (1 µM), +N (10 mM) y -N (0,5 mM) fueron generadas añadiendo la cantidad necesaria de cada sal para obtener la concentración requerida según la condición. El MS Reconstituido se preparó siguiendo las cantidades usadas en el Tratamiento KH₂PO₄ con una concentración de P de 1,25 mM.

Sales (mg/L; 50X)	Tratamiento Na ₂ HPO ₄	Tratamiento KH ₂ PO ₄	Tratamiento KNO ₃	Tratamiento NH ₄ NO ₃
NH ₄ NO ₃	40	412,5	-	***
KNO ₃	48	475	***	-
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1100	11025	441	441
MgSO ₄ *7H ₂ O	925	92,5	370	370
KH ₂ PO ₄	-	***	42,5	42,5
Na ₂ HPO ₄	***	-	-	-
KI	20,75	20,75	0,83	0,83
H ₃ BO ₃	38,75	155	6,2	6,2
MnSO ₄ *H ₂ O	422,5	422,5	16,9	16,9
ZnSO ₄ *7H ₂ O	2156,25	215	8,6	8,6
NaMoO ₄ *2H ₂ O	6,25	6,25	0,25	0,25
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,625	0,625	0,025	0,025
CoCl ₂ *5H ₂ O	0,625	0,625	0,025	0,025
FeSO ₄ *7H ₂ O	695	695	27,8	27,8
Na ₂ -EDTA*7H ₂ O	932,5	932,5	37,3	37,3
Mioinositol	250	2500	100	100
Glicina	5	50	2	2

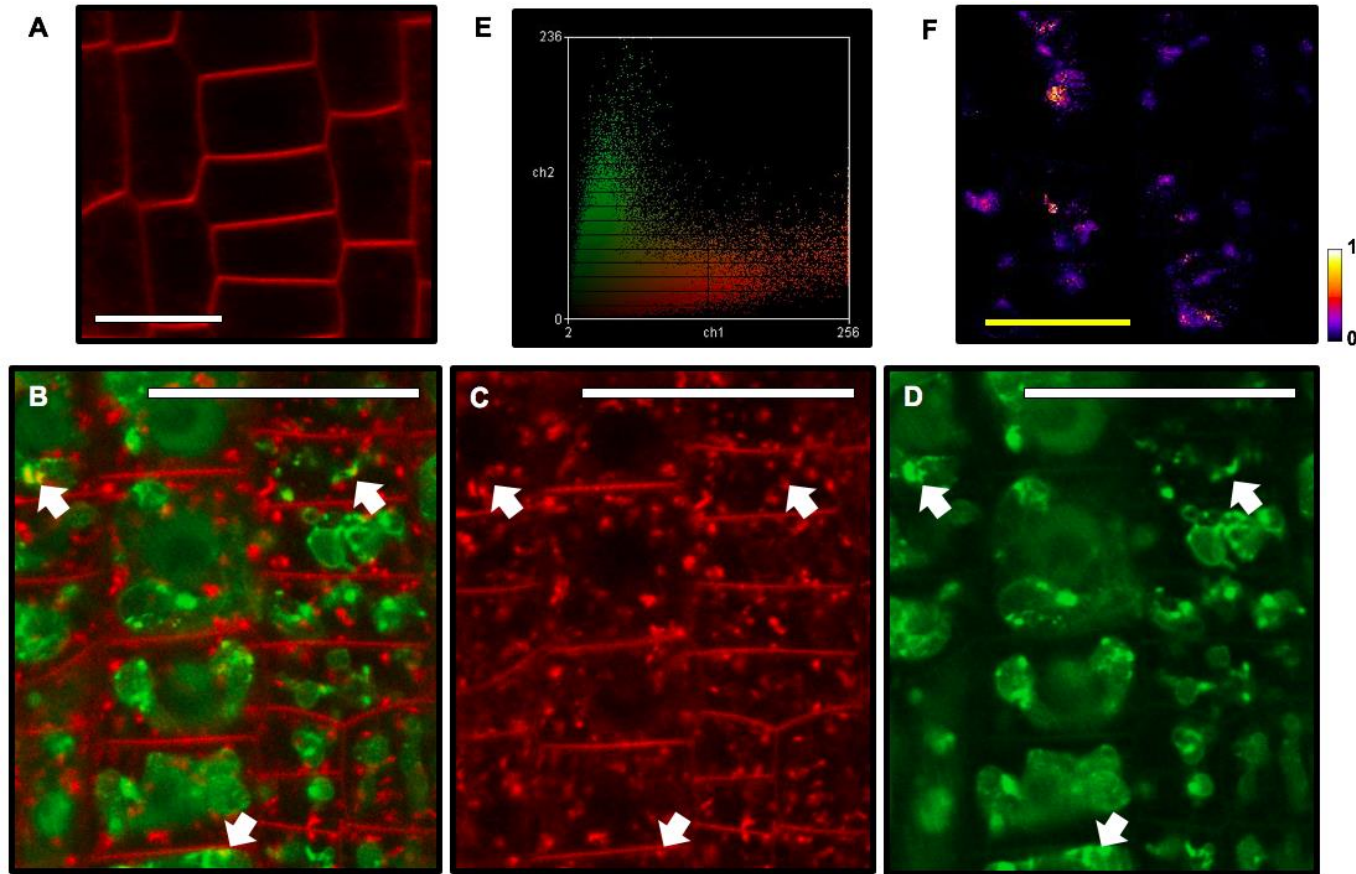


Figura 24. Plantas *bzip25-2/bZIP25.1-GFP* rescatan el fenotipo mutante, desacelerando el tráfico endocítico. (A) es la imagen obtenida del canal que recoge la señal del trazador FM4-64, tras 5 minutos desde la incubación con el fluoróforo, mostrando estadios tempranos del tráfico endocítico (Membrana Plasmática-EE/TGN). (B) muestra la codistribución de los trazadores FM4-64 (rojo) y FM1-43 (verde) 60 minutos después de la incubación con FM4-64 y 3 horas después de la incubación con FM1-43, donde cada uno se puede ver por separado en (C) y (D), respectivamente. Las flechas indican estructuras de tipo vacuolar donde hay colocalización de los fluoróforos. La barra blanca de tamaño representa 20 μm . Imágenes recogidas mediante microscopía confocal, utilizando rangos de longitud de onda entre 533 y 586 nm (señal FM1-43) y entre 664 y 758 nm (señal FM4-64) en células de la epidermis en plantas de 10 días. (E) Codistribución de pixeles, que muestra la representación de ambos trazadores para un mismo pixel. (D) Mapa de colocalización de los trazadores. La escala de color indica el grado de colocalización, de menor (negro) a mayor intensidad (blanco). Se indican zonas representativas de plantas evaluadas. La barra de tamaño en (D) representa 10 μm .

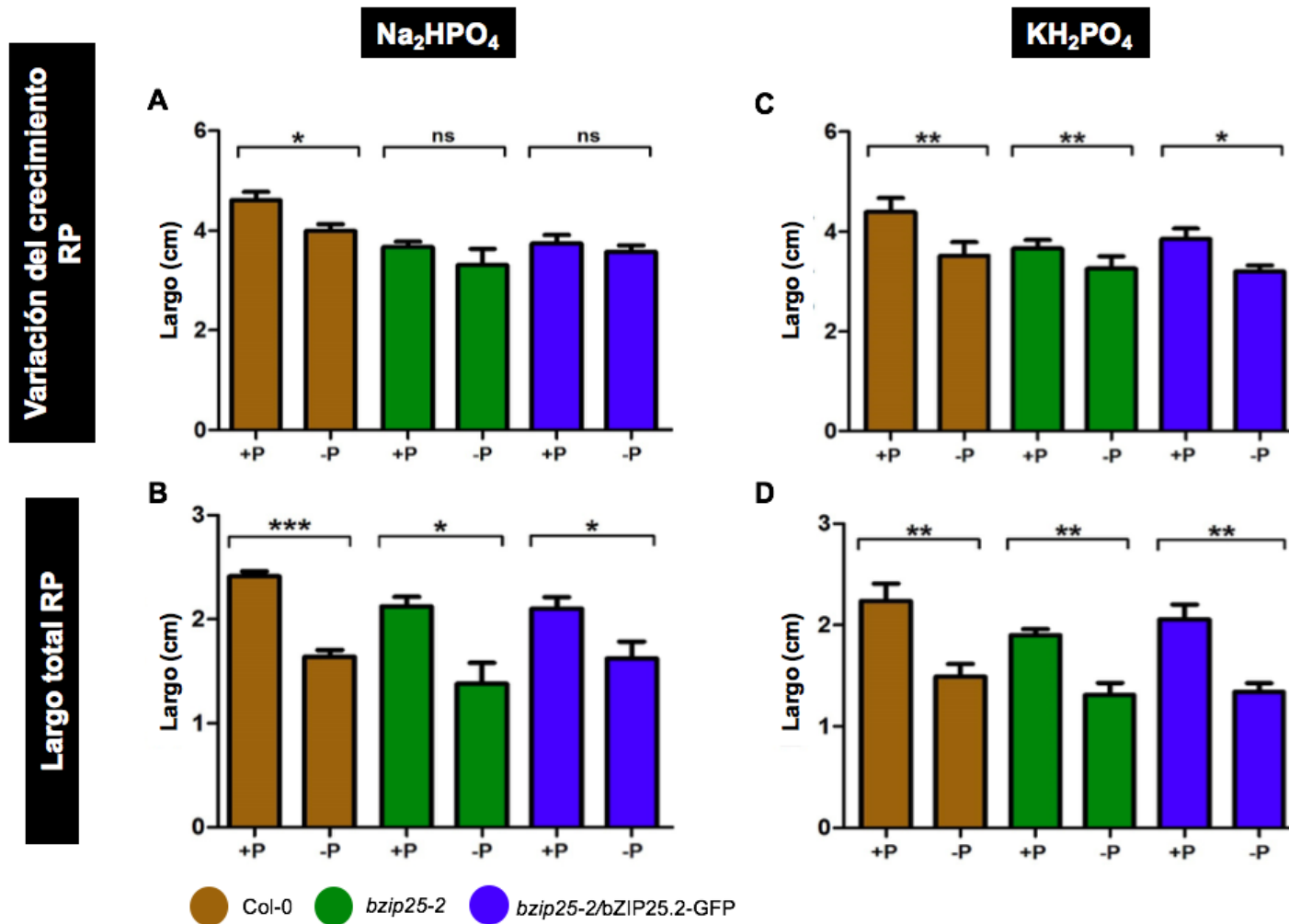


Figura 25. Todas las líneas evaluadas responden con la inhibición del crecimiento de su raíz principal ante el déficit de fosfato. Arquitectura radical en diferentes condiciones nutricionales de P 4 dpt. Se muestra la variación del crecimiento de la raíz durante los días de tratamiento cuyas fuentes eran Na₂HPO₄ (A) y KH₂PO₄ (C) y el crecimiento total de la RP cuando la fuente era Na₂HPO₄ (B) y KH₂PO₄ (D). Plantas *bzip25-2* responden igual que plantas silvestres ante el déficit de P en ambas fuentes del nutriente, al igual que plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Los resultados corresponden a tres réplicas biológicas; n > 25 por cada condición. Las barras de error representan el error estándar asociado. *=*p* < 0,01; **=*p* < 0,005; ***=*p* < 0,0005; ns= no significativo.

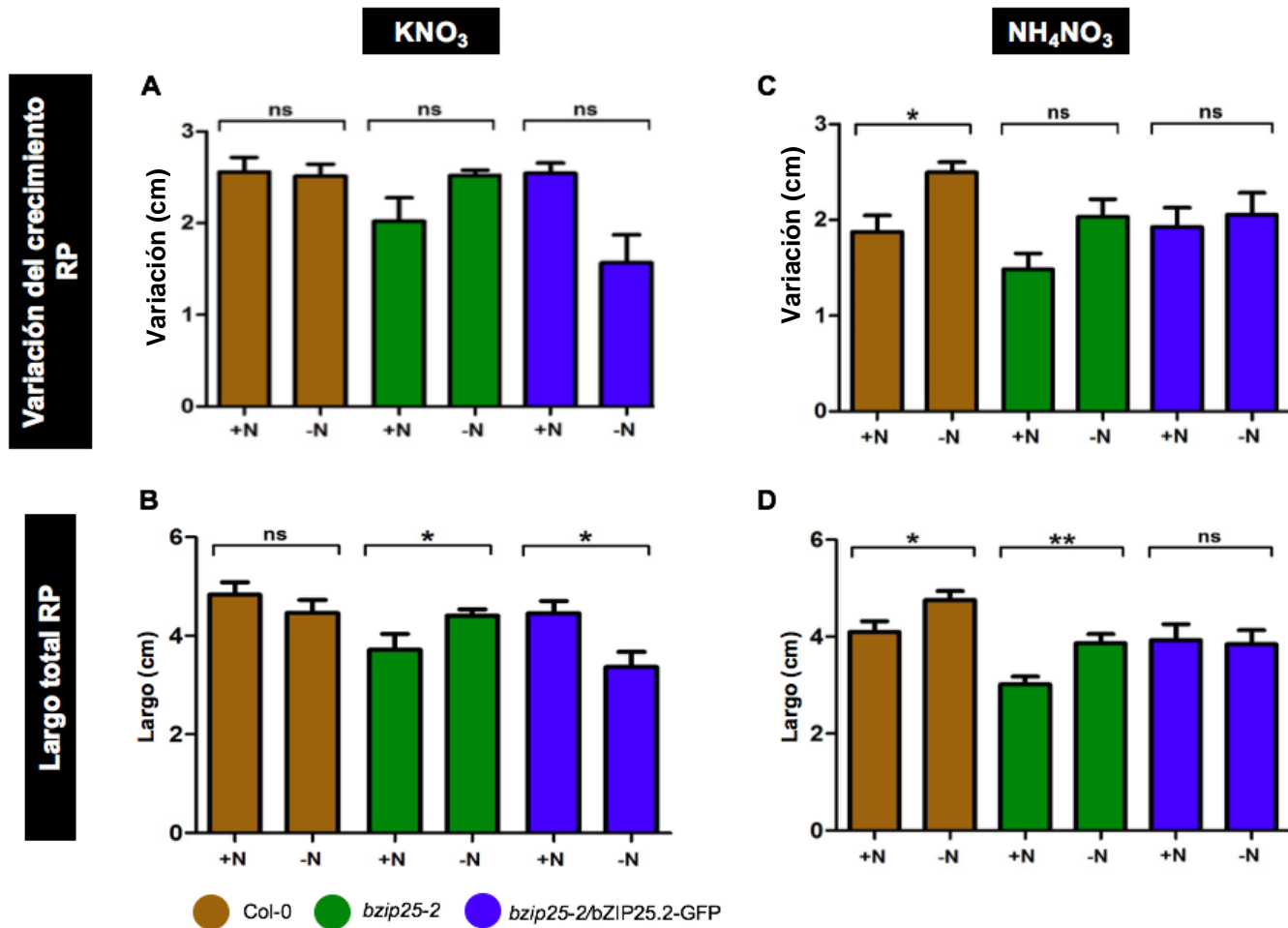


Figura 26. Los tres genotipos estudiados tienen diferentes respuestas en su raíz principal frente al déficit de nitrato. Variación del crecimiento de la RP 4 dpt cuando la fuente es KNO₃ (A) y NH₄NO₃ (C) y crecimiento total de la raíz en tratamientos con KNO₃ (B) y NH₄NO₃ (D) como fuentes de N. Alta variabilidad en la respuesta al déficit de N, careciendo de un patrón de comportamiento. Los resultados corresponden a tres réplicas biológicas; n > 25 por cada condición. Las barras de error representan el error estándar asociado. *=*p* < 0,01; **=*p* < 0,005; ***=*p* < 0,0005; ns= no significativo.

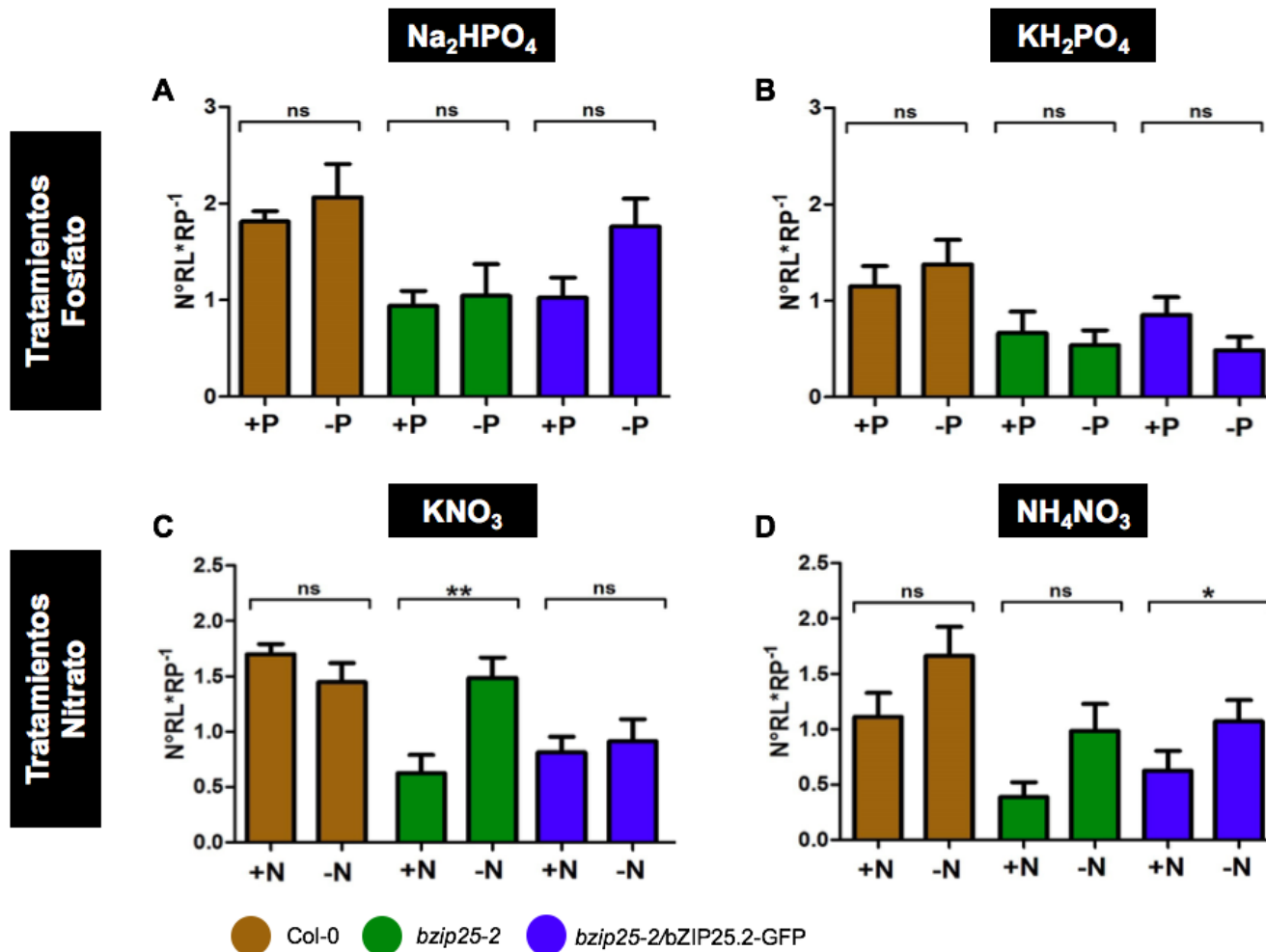


Figura 27. Índice de raíces laterales 4 dpt en tratamientos de fosfato y nitrato. (A) y (B) muestran el índice de RL en plantas crecidas en medio de cultivo cuya fuente de P fue Na_2HPO_4 o KH_2PO_4 , respectivamente. En ambos casos, no se observan diferencias significativas en ninguno de los genotipos evaluados. (C) y (D) muestran el índice de RL en plantas crecidas en medio de cultivo cuya fuente de N fue KNO_3 o NH_4NO_3 , respectivamente. Plantas silvestres no muestran cambios estadísticamente significativos en este parámetro, en tanto mutantes *bzip25-2* solo aumentan este valor bajo tratamientos con KNO_3 , mientras que plantas *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* solo lo hacen en tratamientos con NH_4NO_3 .

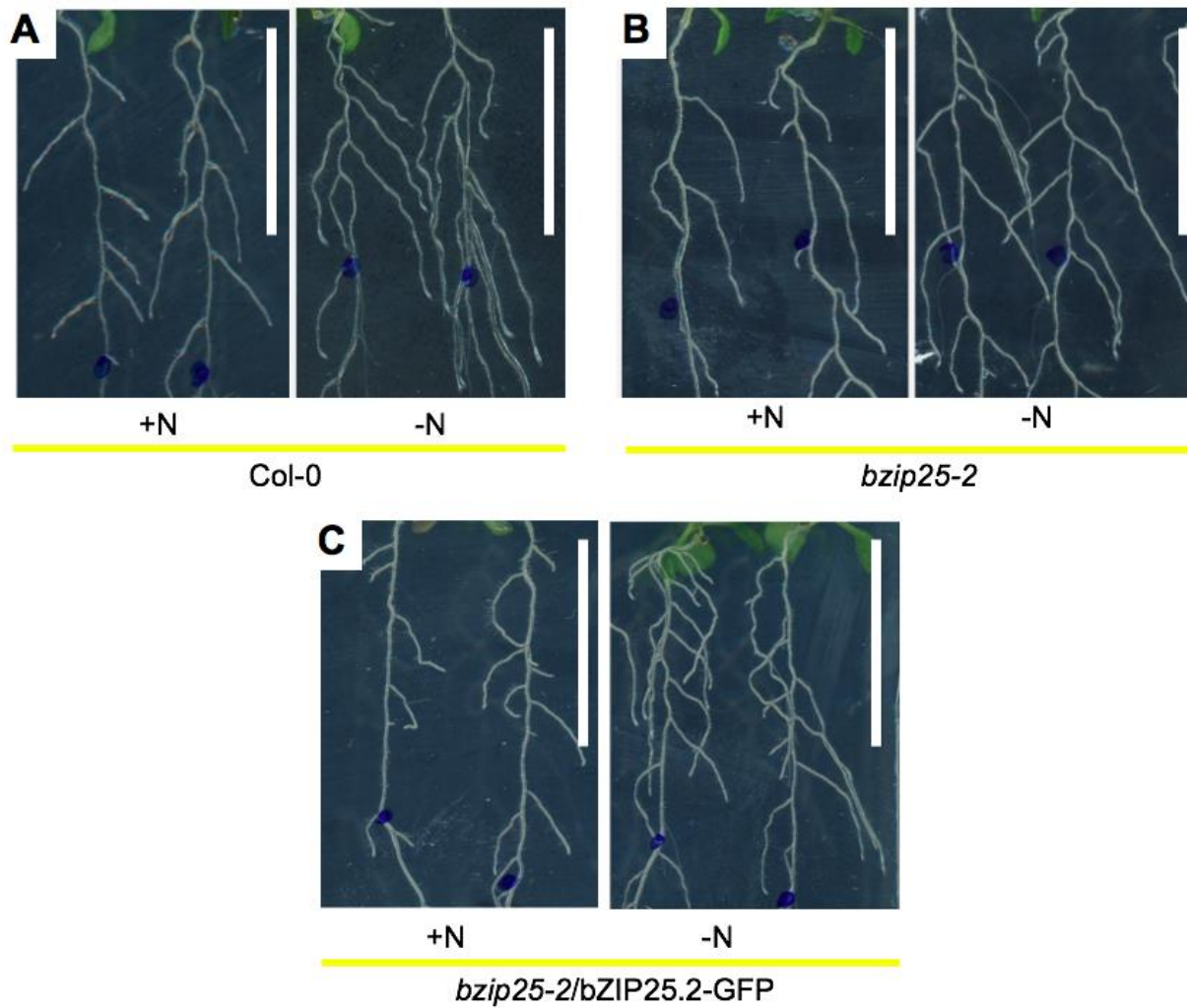


Figura 28. El déficit de nitrato genera un alargamiento de las RL existentes en plantas silvestres, *bzip25-2* y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP*. Luego de 6 dpt, un crecimiento de las RL se observó en las líneas silvestre (A), *bzip25-2* (B) y *bzip25-2/bZIP25.2-GFP* (C), mostrando el mismo comportamiento en tratamientos con KNO_3 y NH_4NO_3 . La fotografía muestra individuos representativos en tratamientos cuando la fuente es NH_4NO_3 . La barra de tamaño representa 1 cm.

bZIP25.1	MHIVFSVDDLTESFWVPAPAPSPGSSSTPSPTQNVADGMTRSQSEWAFHRLINELSGSDSSPTTNTIERSPPPVSLSR	80
bZIP25.2	MHIVFSVDDLTESFWVPAPAPSPGSSSTPSPTQNVADGMTRSQSEWAFHRLINELSGSDSSPTTNTIERSPPPVSLSR	80
bZIP25.3	MHIVFSVDDLTESFWVPAPAPSPGSSSTPSPTQNVADGMTRSQSEWAFHRLINELSGSDSSPTTNTIERSPPPVSLSR	80
bZIP25.1	LEETVDETEDVVEIQKPQNHRRLPVDDQGKNNRAPSSDPVDSSAPVVDPNQYHAILKSKLELACAAVARRVGTVPKPED	160
bZIP25.2	LEETVDETEDVVEIQKPQNHRRLPVDDQGKNNRAPSSDPVDSSAPVVDPNQYHAILKSKLELACAAVARRVGTVPKPED	160
bZIP25.3	LEETVDETEDVVEIQKPQNHRRLPVDDQGKNNRAPSSDPVDSSAPVVDPNQYHAILKSKLELACAAVARRVGTVPKPED	160
bZIP25.1	SSASASNQKQAQGSIVAQTSPGASSVRFSPSTTSTQKKPDVPAQTSISSRDDSDDDDLGDADNGDPTDVKRARRMLSNR	240
bZIP25.2	SSASASNQKQAQGSIVAQTSPGASSVRFSPSTTSTQKKPDVPAQTSISSRDDSDDDDLGDADNGDPTDVKRARRMLSNR	240
bZIP25.3	SSASASNQKQAQGSIVAQTSPGASSVRFSPSTTSTQKKPDVPAQTSISSRDDSDDDDLGDADNGDPTDVKRARRMLSNR	240
bZIP25.1	ESARRSRRRKQEQMNEFDTQVGLRA[9]SDMNHKYDAAVDNRIRADIETLRTKVKMAEETVKRVTGVNPLHWSRPNM	326
bZIP25.2	ESARRSRRRKQEQMNEFDTQVR-----SFISCSYIYTFLESFLLFNSLQGFIGKVFTNCR-----	295
bZIP25.3	ESARRSRRRKQEQMNEFDTQVKFLPI-----VAVDNRIRADIETLRTKVKMAEETVKRVTGVNPLHWSRPNM	309
bZIP25.1	GIPFSNTPSASSSIPPNSNHILKPANSSTNTSAGLAQNQRVETANFLPEQVNREGMQNPFAPDSNLYETLPHWNHKKH	403
bZIP25.2	-----	
bZIP25.3	GIPFSNTPSASSSIPPNSNHILKPANSSTNTSAGLAQNQRVETANFLPEQVNREGMQNPFAPDSNLYETLPHWNHKKH	386

Figura 29. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las variantes de empalme alternativo de bZIP25. En celeste destaca el primer dominio bZIP, presente en las tres variantes, mientras que en azul se indica el segundo dominio de unión a DNA, ausente en la variante bZIP25.2.