



Universidad
Andrés Bello®

Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

ESTUDIO DEL ROL DE LOS SEGUNDOS MENSAJEROS (CALCIO y ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO) EN LA TRANSLOCACIÓN AL NÚCLEO DE LA PROTEÍNA ATBZIP60U DE *ARABIDOPSIS THALIANA*, EN CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología.

Director: Adrián Andrés Moreno Vilches

SOFIA PAULINA MUÑOZ CONTRERAS

Santiago, Chile.

ENERO, 2019



Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**“ESTUDIO DEL ROL DE LOS SEGUNDOS MENSAJEROS (CALCIO y
ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO) EN LA TRANSLOCACIÓN AL
NÚCLEO DE LA PROTEÍNA ATBZIP60U DE *ARABIDOPSIS THALIANA*, EN
CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO”
SOFIA PAULINA MUÑOZ CONTRERAS**

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Memoria de Título Dr. Adrián Andrés Moreno Vilches, Laboratorio LRS, Universidad Andrés Bello.

Prof. Adrián Andrés Moreno Vilches
Director

Dra. María Cecilia Gamboa Garrido
Comisión Evaluadora

Dra. Susana Saez Aguayo
Comisión Evaluadora

Dr. Juan Antonio Valdés Muñoz
Director de Carrera Ingeniería en Biotecnología

Santiago, Chile. Enero, 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre que sin ella y todo su esfuerzo nada de esto podría ser posible, gracias por todo lo que me has dado, gracias por tu apoyo incondicional. También debo agradecer a mi pareja por todo el apoyo que me ha dado a lo largo de mi desarrollo como estudiante, y la paciencia que ha tenido contigo. Gracias a ambos por todo.

También quiero agradecer al Doctor Adrián por recibirme y darme una oportunidad en su laboratorio "LRS", por todo su apoyo durante la construcción de la Memoria de Título.

Quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio, gracias a Fa, Sofi y Shivi por la ayuda y la presión ejercida en mí, también agradezco las risas, las conversaciones y los consejos, también a los otros compañeros del centro y a la tía, que la molestaba siempre con los medios.

Gracias a mi familia y a Dios.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	3
INDICE GENERAL	4
INDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
1.INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Introducción.....	10
1.2. Hipótesis.....	13
1.3. Objetivo General.....	13
1.4. Objetivos Especifico.....	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1. Materiales.....	14
2.1.1. Material biológico.....	14
2.1.1.1. Material vegetal.....	14
2.1.2. Medios de cultivo.....	14
2.1.3 Programas computacionales.....	16
2.2. Métodos.....	17
2.2.1 Condiciones de crecimiento de las plantas.....	17
2.2.2 Técnicas de microscopia.....	17
2.2.2.1 Detección de fluorescencia usando microscopia de fluorescencia.....	17
3.RESULTADOS.....	19
3.1. Análisis del rol del calcio en la translocación de la proteína AtbZIP60s y AtbZIP60u bajo condiciones de estrés osmótico en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
3.2. Observación del efecto de ROS en la translocación de AtbZIP60u,	

desde el retículo endoplasmático al núcleo durante el estrés osmótico en <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
4.DISCUSIÓN.....	31
4.1. Los iones de calcio tienen un rol en la translocación del factor de transcripción AtbZIP60u desde el retículo endoplasmático al núcleo bajo condiciones de estrés osmótico	31
4.2. ROS tiene un rol en la translocación del factor de transcripción AtbZIP60u desde el retículo endoplasmático al núcleo bajo condiciones de estrés osmótico.....	33
5.CONCLUSIÓN.....	34
6.REFERENCIAS.....	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Detección de la fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60s en medio MS suplementado con calcio y bajo condiciones de estrés osmótico.....	18
Figura 2: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo condiciones de estrés osmótico con un aumento de calcio.....	19
Figura 3: La fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u no se ve afectada por el aumento en la disponibilidad de calcio bajo condiciones de estrés osmótico.....	20
Figura 4: Observación de la fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60s en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo condiciones de estrés osmótico con la disminución de calcio citosólico.....	21
Figura 5: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en condiciones de estrés osmótico y disminución en la concentración de calcio.....	22
Figura 6: La fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u se ve afectada por la disminución en la disponibilidad de calcio citosólico libre bajo condiciones de estrés osmótico.....	23
Figura 7: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60s bajo condiciones de estrés osmótico y un aumento en la disponibilidad de ROS.....	24
Figura 8: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en condiciones de aumento en la disponibilidad de ROS bajo condiciones de estrés osmótico.....	25
Figura 9: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en condiciones donde hay un aumento en la disponibilidad de ROS bajo condiciones de estrés osmótico.....	26

Figura 10: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60s en condiciones de estrés osmótico y disminución en la disponibilidad de ROS..... 27

Figura 11: Visualización de la fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a la disminución de ROS bajo condiciones de estrés osmótico..... 28

ABREVIATURAS

AA: Antimicina A

DPI: difenilenoyodonio

EGTA: Acido glicol- etileno- bis (2- amonoetileter)-*N,N,N',N'*-tetraacetico

ERAD: Sistema de degradación asociado al retículo endoplasmático

GFP: Proteína Fluorescente verde

IRE1: Enzima que requiere inositol 1

MS: Murashige and Skoog

RE: retículo endoplasmático

ROS: Especies reactivas de oxigeno

UPR: Respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas

RESUMEN

Las plantas son organismos sésiles (no se pueden mover) cuyo ambiente cambia con el tiempo, es por esto, que han desarrollado distintos mecanismos para responder a estos cambios en el ambiente, que pueden ser infecciones por patógenos (estrés biótico), estrés osmótico, estrés salino, cambios en la temperatura o falta de nutrientes (estrés abiótico). A nivel molecular estas situaciones de estrés generan en las plantas un aumento en la síntesis de proteínas de secreción y de membranas; estas proteínas deben ser plegadas en el retículo endoplasmático (RE), sin embargo, la maquinaria encargada del correcto plegamiento de las proteínas en ciertas ocasiones no logra plegar todas las proteínas, y estas proteínas no plegadas comienzan a acumularse en el RE, generando un fenómeno llamado estrés en el RE. En respuesta a este estrés, se activa el sistema UPR, en el cual se aumenta los genes asociados a chaperonas y componentes del ERAD que permiten el correcto plegamiento de las proteínas o la eliminación de estas. En *Arabidopsis thaliana* existe un gen llamado *AtbZIP60*, cuyo ARN mensajero es procesado por una proteína localizada en el RE conocida como IRE1. Luego de esta modificación conocida como *splicing* no convencional se genera una proteína soluble que es capaz de translocar al núcleo y regular la expresión de genes asociados al UPR. Recientemente, se ha reportado que este gen participaría en la respuesta frente a la salinidad y estrés osmótico, y que su participación requeriría de un segundo mensajero, como calcio, especies reactivas de oxígeno (ROS) o ácido fosfatídico. Es por lo anterior que se plantea que alguno de estos segundos mensajeros participa en la translocación al núcleo de la proteína AtbZIP60, en condiciones de estrés osmótico. Para analizar esto se utilizaron tres líneas de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que permitieron visualizar la fluorescencia de la proteína AtbZIP60 procesada (AtbZIP60s; línea 68) y la proteína AtbZIP60 no procesada (AtbZIP60u; líneas L101 y L111) con la técnica de microscopia de epifluorescencia, bajo estrés osmótico y con niveles aumentados de los mensajeros secundarios, o una inhibición de estos. Se observó que el aumento de calcio citosólico no afecta la fluorescencia de la proteína AtbZIP60s y AtbZIP60u, como tampoco ocurre al disminuir la disponibilidad de calcio. El aumento de los niveles de ROS al igual que el calcio no estaría afectando la fluorescencia de la proteína AtbZIP60s y AtbZIP60u, sin embargo, una disminución de los niveles de ROS estaría afectando la fluorescencia de AtbZIP60u, pero no la fluorescencia de la proteína AtbZIP60s.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Las plantas al ser organismos sésiles han tenido que enfrentar los desafíos ambientales que pueden ser de naturaleza biótica (bacterias, fungi, virus, insectos, entre otros) y abiótica (sequía, temperaturas extremas, baja disponibilidad de nutrientes, metales pesados, daños mecánicos, entre otros) (Loon, 2016), de manera más rápida, eficaz y específica, en comparación a los organismos que tienen la capacidad de moverse para sobrevivir. Para adaptarse a estas condiciones de crecimiento tan adversas, las plantas deben ser capaces de detectar la naturaleza y la fuerza del estímulo del medioambiente, además de poder interpretarlos y activar las respuestas fisiológicas apropiadas (Kissoudis y cols, 2014), esto permite a las plantas realizar modificaciones en casi todos los aspectos de su biología tanto morfológicos, anatómicos y fisiológicos como celulares y moleculares (Sonal y cols, 2016; Mishra y cols, 2017).

A nivel molecular, el estrés biótico o abiótico puede generar un incremento en la demanda en la síntesis de proteínas, éstas generalmente son de membrana y de secreción, este tipo de proteínas deben ser plegadas en el RE luego de su síntesis, lo que en determinadas condiciones conlleva a que la capacidad del sistema de plegamiento y degradación del retículo endoplasmático (RE) lleguen al límite, lo que finalmente genera una acumulación en la cantidad de proteínas mal plegadas y no plegadas en el retículo endoplasmático (Vitale & Boston, 2008; Howell S. , 2013), esta situación es conocida como estrés del RE, y cuya persistencia en el tiempo puede provocar la muerte celular. Para sobrellevar este tipo de estrés, las células eucariontes han desarrollado un mecanismo de respuesta frente a la acumulación de proteínas mal plegadas conocido como *unfolded protein response* (UPR) (Buchberger y cols, 2010; Ruberti & Brandizzi, 2014; Roberti y cols, 2015), proceso por el cual aumenta la expresión de genes asociados a las funciones del RE, como chaperonas que ayudan al correcto plegamiento de las cadenas aminoacídicas, y componentes del sistema de degradación asociados al RE (ERAD; por sus siglas en inglés) (Wan & Jiang, 2016), lo que permite aumentar la capacidad de plegamiento de las proteínas mal plegadas en el RE. La activación de este mecanismo permite a las células, recuperar las funciones del RE (como el correcto plegamiento de las proteínas o estimular la degradación de las proteínas mal plegadas mediante el sistema ERAD). Si todos estos procesos no logran restaurar la homeostasis celular dentro de un determinado tiempo, se inicia un proceso de muerte celular programada (apoptosis) (Araki y cols 2003; Iwata & Koizumi, 2005; Iwata y cols, 2008).

En las células eucariontes se han logrado identificar tres proteínas asociadas a la activación del UPR, cada una funciona en paralelo y utiliza un mecanismo único de transducción

de señales, además de tener cada una un componente de señalización de clase transmembrana residente en RE, estas son: PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) y IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*), esta última es la más conservada y es la única que se encuentra en eucariontes inferiores (Water & Ron, 2011). IRE1 es la más estudiada debido que se encuentra en levaduras, lo que ha permitido conocer en su totalidad su participación en UPR. Se sabe que IRE1 es una proteína quinasa/endoribonucleasa de transmembrana, donde su dominio N-terminal se encuentran en el lumen del RE y detecta la acumulación de proteínas mal plegadas, y su dominio serina/treonina quinasa y endoribonucleasa están en el citosol (Ruberti & Brandizzi, 2014). Esta proteína usa un mecanismo de *splicing* no convencional sobre su sustrato, el cual es un ARN mensajero (mARN), que luego de este corte, sufre un cambio en el marco abierto de lectura con lo cual codifica un factor de transcripción capaz de ser translocado al núcleo y que a su vez regula la expresión de genes asociados al UPR; en metazoos el sustrato para IRE1 se llama XBP1 (*X-box binding protein 1*) (Water & Ron, 2011).

En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado un gen ortólogo para XBP1, llamado *AtbZIP60*, que también participa en la regulación de la expresión de los genes asociados a la respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas. El ARN mensajero del gen *AtbZIP60* codifica la información para la síntesis de un factor de transcripción del tipo bZIP (*basic leucine zipper protein*), el cual contiene un dominio transmembrana localizado en la membrana del RE (Koizumi y cols, 2005). El ARN mensajero del gen *AtbZIP60* codifica en un factor de transcripción que es procesado por IRE1, esto genera un cambio en el marco abierto de lectura del mARN generando la síntesis de una proteína soluble, la cual transloca al núcleo y regula la expresión de genes asociados a la síntesis, plegamiento y degradación de proteínas en el RE (Nagashima y cols, 2011). Este proceso es una parte fundamental de la respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE y se ha reportado que en condiciones de estrés biótico (ataque por bacterias, hongos y virus) así como en estrés abiótico (calor), este mecanismo se activa en algunos organismos vegetales (Deng y cols, 2011). Adicionalmente, existen reportes que sugerirían que el gen *AtbZIP60* participaría en la respuesta de ciertos organismos vegetales a otros tipos de estrés abiótico como salinidad y estrés osmótico (Fujita y cols, 2007). Sin embargo, el procesamiento del ARN mensajero de *AtbZIP60* no ocurre bajo las condiciones de estrés anteriormente mencionadas lo que plantea la interrogante de como *AtbZIP60* participaría en la respuesta a estos tipos de estrés (Parra-Rojas y cols, 2015).

Como se mencionó con anterioridad, en condiciones normales, el ARN mensajero del gen *AtbZIP60* codifica la información para la síntesis de un factor de transcripción del tipo bZIP que contiene un dominio transmembrana, el cual se localiza en la membrana del RE (Parra-Rojas y

cols, 2015). Por tal motivo, si el ARN mensajero de este gen no es procesado bajo condiciones de estrés salino u osmótico por IRE1, debe existir algún otro mecanismo que permita liberar a la porción de la proteína que contiene el dominio de factor de transcripción, permitiendo que *AtbZIP60* pueda ejercer una función de regulador de la expresión génica bajo las condiciones de estrés abiótico anteriormente mencionadas. Análisis realizados con anterioridad sugieren que la proteína *AtbZIP60u*, así denominada para diferenciarle de la proteína derivada del mensajero procesado de *AtbZIP60s*, es proteolizada bajo condiciones de estrés osmótico en el RE (Moreno AA y otros, manuscrito en preparación). Adicionalmente, en ese manuscrito se describen los genes blancos de regulación por parte de *AtbZIP60u* bajo condiciones de estrés osmótico, así como la translocación de la proteína desde el RE al núcleo. Sin embargo, los reportes que asocian el rol del gen *AtbZIP60* a condiciones de estrés salino u osmótico (Fujita y cols, 2007), sugieren que elementos de señalización estarían involucrados en la respuesta frente al estrés, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los iones de calcio (Ca^{2+}) que son actores tempranos que ayudan a coordinar la respuesta frente al estrés abiótico (Ranty y cols, 2016).

Es por ello que, en el presente trabajo de investigación, se estudió el rol de estos segundos mensajeros en el evento de translocación de *AtbZIP60u* desde el RE al núcleo bajo condiciones de estrés osmótico.

1.2. Hipótesis

En *Arabidopsis thaliana* los segundos mensajeros, tales como calcio y ROS participan en la translocación al núcleo de la proteína AtbZIP60u, en condiciones de estrés osmótico.

1.3. Objetivo General

Estudiar el rol del calcio y ROS en la translocación al núcleo de la proteína AtbZIP60u, bajo condiciones de estrés osmótico en *Arabidopsis thaliana*.

1.4. Objetivos específicos

- Examinar si el aumento de un segundo mensajero como calcio y ROS afecta la localización subcelular de la proteína AtbZIP60u en condiciones de estrés osmótico.
- Evaluar si la disminución de un segundo mensajero como calcio y ROS altera la localización subcelular de la proteína AtbZIP60u se ve afectada en condiciones de estrés osmótico.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales.

2.1.1. Material biológico.

2.1.1.1. Material vegetal.

Arabidopsis thaliana: Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron tres líneas transgénicas de plantas de *Arabidopsis thaliana*; denominadas L68, L101 y L111. Estas líneas fueron realizadas con anterioridad por el Doctor Adrián Moreno en su tesis doctoral (Moreno Vilches, 2015), en la sección de materiales y métodos se detalla la obtención de estas tres líneas. La línea L68 posee la construcción *bzip60/bZIP60pro:GFP-bZIP60g*, que contiene el promotor endógeno del gen *AtbZIP60*, la secuencia codificante para la proteína fluorescente verde (GFP) y la región codificante de *AtbZIP60* incluyendo la región 3'UTR; en la región codificante de este gen se encuentra la secuencia que es reconocida por IRE1. Tanto la línea L101 como L111 poseen la construcción *bzip60/bZIP60pro:GFP-bZIP60gNS*, que posee el promotor endógeno para *AtbZIP60*, la secuencia codificante para la proteína fluorescente verde (GFP) y la región codificante de *AtbZIP60* incluyendo la región 3'UTR, pero esta última contiene con dos mutaciones puntuales (dos pares de base) en la secuencia que es reconocida IRE1.

Las plantas usadas corresponden a la tercera generación (T3) y anteriormente se comprobó que las plantas son homocigotas para cada construcción.

2.1.2. Medios de cultivo.

Para el desarrollo de los experimentos se usaron diferentes medios de cultivo sólidos, cuya composición y preparación se detallan a continuación:

Medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962): este medio de cultivo líquido se utiliza para la propagación de especies vegetales. Generalmente este medio es suplementado con vitaminas y alguna fuente de carbono como sacarosa, y para solidificarlo se usa agar- agar o Phytigel®.

Medio solido MS: este medio se realiza con medio basal MS (4,4 g/l), más sacarosa al 1% p/v, luego se ajusta a pH 5,7-5,8 con NaOH, a continuación, se agrega Phytigel® (0,8% p/v). Finalmente se esteriliza en el autoclave durante 30 minutos, pasado este tiempo, se distribuye el

medio en placas Petri estériles al interior de la campana bajo condiciones de esterilidad. Las placas se mantienen tapadas con papel aluminio y a 22 °C.

Medio osmótico: este medio se realiza con medio basal MS (4,4 g/l), más sacarosa al 1% p/v, más D-manitol al 300mM (este reactivo al ser higroscópico se mantiene en la estufa a 60°C hasta su uso), luego se ajusta a pH 5,7-5,8 con NaOH, a continuación, se agrega Phytigel® (0,8% p/v). Finalmente se esteriliza en el autoclave durante 30 minutos, pasado este tiempo, se distribuye el medio en placas Petri estériles al interior de la campana. Las placas se mantienen tapadas con papel aluminio y a 22 °C.

Medio para aumentar el Calcio: se realizaron dos medios con distintas concentraciones finales de calcio (5mM y 10mM) en medio osmótico. Para ambos medios antes de distribuir en la placa Petri se mezcla en un Falcon de 15ml: 13,5ml de medio osmótico más 1,5ml de CaCl₂ 100mM, se agita vigorosamente, la concentración final de CaCl₂ por placa es de 10mM. A continuación, se voltea todo el contenido del falcon en la placa. Para la concentración de 5mM se agrega 0,75ml de CaCl₂ 100mM más 14,25 de medio osmótico.

Medio para disminuir el Calcio: este medio se realiza de la misma forma que el medio para aumentar el calcio, pero en vez de CaCl₂ se utiliza EGTA. Se preparan tres placas con concentraciones distintas EGTA por cada medio, que se detallan a continuación:

- Concentración de EGTA 0,1 mM final: 15 ml de medio + 15 µl de EGTA 0,1M.
- Concentración de EGTA 1 mM final: 15 ml de medio + 150 µl de EGTA 0,1M.
- Concentración de EGTA 5 mM final: 14,3ml de medio + 750 µl de EGTA 0,1M.

Medio para aumentar el ROS: se utilizaron tres concentraciones distintas de Antimicina A (AA) y se realizaron de la misma forma que el medio para aumentar calcio. Se prepararon con las siguientes concentraciones:

- Concentración de AA 5 µM final: 15 ml de medio + 75 µl de AA 1mM.
- Concentración de AA 10 µM final: 15 ml de medio + 150 µl de AA 1mM.
- Concentración de AA 20 µM final: 15 ml de medio + 300 µl de AA 1mM.

Medio para disminuir el ROS: se prepararon dos concentración finales distintas para DPI de la misma manera que el medio para aumentar el calcio. A continuación, se detalla la preparación de cada concentración:

- Concentración de DPI 10 μ M final: 15 ml de medio + 15 μ l de DPI 10mM.
- Concentración de DPI 100 μ M final: 15 ml de medio + 150 μ l de DPI 10mM.

2.1.3 Programas computacionales

- QCAPTURE PRO 7 para visualizar, capturar y analizar las imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia Olympus IX-81.

2.2. Métodos

2.2.1 Condiciones de crecimiento de las plantas.

Arabidopsis thaliana: Todas las semillas utilizadas fueron esterilizadas usando agua MiliQ estéril con agitación durante 5 minutos, luego se aplicó una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 7 minutos con agitación, y posteriormente se lavaron 4 veces con agua MiliQ estéril. Posteriormente, se dejaron las semillas esterilizadas en oscuridad por 48 horas a 4°C, antes de ser sembradas y transferidas a la cámara de cultivo de tejidos.

Para los experimentos de inducción del estrés osmótico con los distintos compuestos que permitieron aumentar o disminuir los segundos mensajeros las semillas estériles fueron sembradas en medio sólido MS estéril durante 8 días, bajo condiciones estériles (campana). Al cabo de este tiempo las plantas fueron trasplantadas con mucho cuidado con la ayuda de una pinza a los distintos medios utilizados para cada experimento, estos medios fueron: el medio para inducir el estrés osmótico (300 mM de manitol), el medio para aumentar calcio (5 mM y 10 mM de CaCl_2), el medio para disminuir el calcio (0,1 mM; 1 mM y 5 mM de EGTA), el medio para aumentar el ROS (5 μM , 10 μM y 20 μM de AA) y el medio para disminuir ROS (10 μM y 100 μM de DPI), estas plantas estuvieron durante 6 horas en cada medio.

Se esterilizaron y sembraron alrededor de 100 semillas por cada línea (L101, L111 y L68), luego por cada experimento se utilizaron alrededor de 6 plantas de cada línea. Estos experimentos se repitieron 3 veces cada uno por cada línea.

2.2.2 Técnicas de microscopia.

2.2.2.1 Detección de fluorescencia usando microscopia de fluorescencia.

La detección de fluorescencia en la zona aérea de las plantas transgénicas de las líneas L68, L101 y L111 fue realizada utilizando el microscopio de fluorescencia invertido IX81 de Olympus. Luego de las 6 horas de tratamiento, las plantas fueron montadas en un portaobjeto sobre una gota de agua, luego se colocó un cubre objeto sobre la planta. Finalmente fueron observadas utilizando objetivo de 10X en el microscopio de epifluorescencia. La emisión de fluorescencia de GFP fue lograda mediante la excitación con una lámpara de mercurio a alta

presión y un filtro de fluorescencia, con rango de excitación de 465 a 495 nm y un rango de emisión de 515 a 555 nm.

3. RESULTADOS

Las plantas para adaptarse a las condiciones adversas (estrés abiótico y biótico) a las cuales se puede ver enfrentada durante su ciclo de vida, han desarrollado distintos sistemas capaces de detectar la naturaleza, la fuerza del estrés, la interpretación y activación de una respuesta fisiológica apropiada para cada condición (Kissoudis y cols, 2014). Dentro de los elementos de señalización temprana que están involucrados en la respuesta frente al estrés se encuentran los iones de Ca^{+2} y ROS, los cuales ayudan a coordinar la respuesta adaptativa de la planta (Aldon y cols, 2018).

3.1. Análisis del rol del calcio en la translocación de la proteína AtbZIP60s y AtbZIP60u bajo condiciones de estrés osmótico en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

El calcio tiene muchas funciones en las plantas, una de estas es su importante rol como segundo mensajero frente a la respuesta a algún estrés. Para llevar a cabo esta función deben ocurrir cambios en los niveles de calcio tanto en la célula como en los tejidos.

Para evaluar el rol del calcio como segundo mensajero y saber si desempeña alguna función en la translocación del factor de transcripción AtbZIP60u bajo estrés osmótico, se sometieron las tres líneas transgénicas, L68 (figura 1), L101 (figura 2) y L111 (figura 3) a tratamientos con cloruro de calcio más manitol, este tratamiento aumentaría el calcio bajo condiciones de estrés osmótico. También se realizaron tratamientos con EGTA más manitol, para evaluar si la disminución de calcio en condiciones de estrés osmótico (medio MS más manitol 300 mM) influye en la fluorescencia de AtbZIP60u en las tres líneas transgénicas (figura 4, figura 5 y figura 6).

En la figura 1 se observó fluorescencia en todos los tejidos aéreos, sin embargo en la figura 1 (control) solo existe fluorescencia en las estípulas, mientras que en la figura 1B, 1C y 1D hay fluorescencia en hojas. Visualmente al comparar las plantas sometidas solo a estrés osmótico (figura 1B) con las que estuvieron bajo estrés osmótico más cloruro de calcio en distintas concentraciones 5 mM (figura 1C) y 10 mM (figura 1D) no hay cambios apreciables en la fluorescencia. Las plantas usadas con estos tratamientos corresponden a la línea L68, que no tiene mutación en la región reconocida por IRE1, por lo que translocaría al núcleo como AtbZIP60s y solo serviría como control positivo para el estrés osmótico.

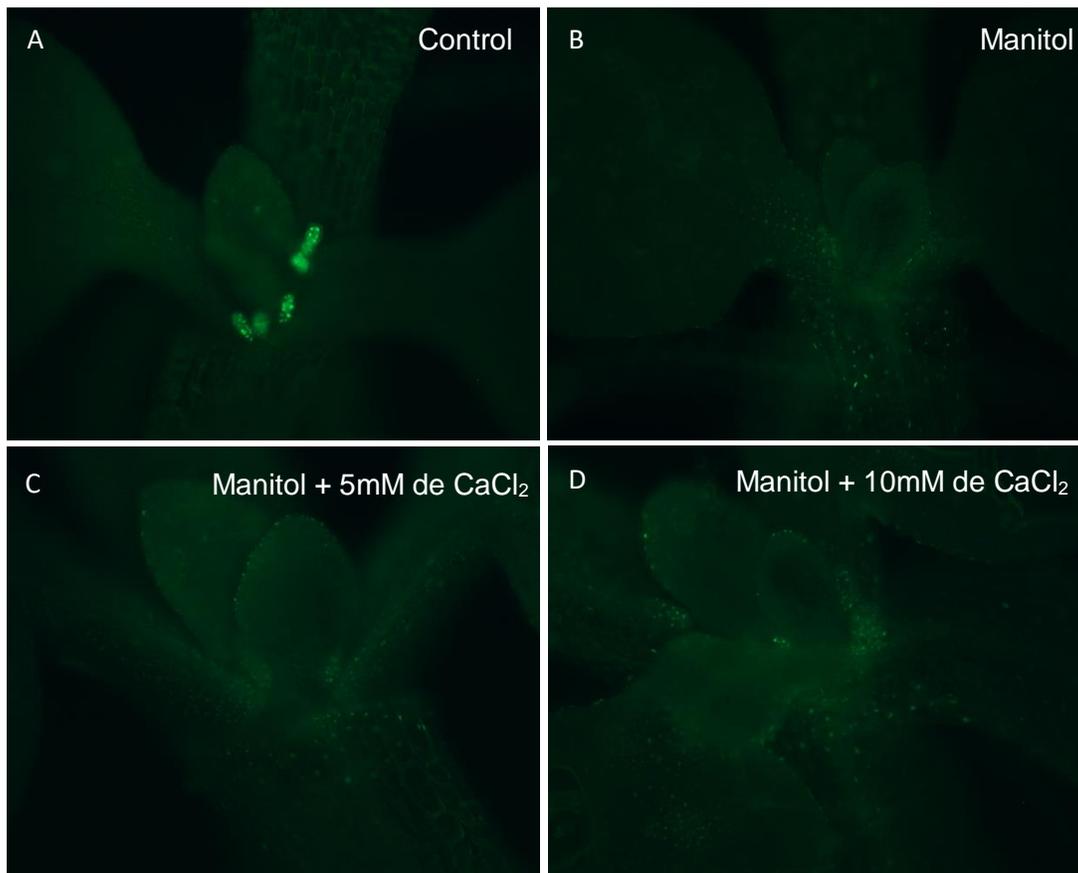


Figura 1: Observación de la fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60s en medio MS con un aumento en la disponibilidad de calcio bajo condiciones de estrés osmótico. A-D. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L68 (ProAtbZIP60: GFP- secAtbZIP60g). **A.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300 mM durante 6 horas. **C-D.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo de las plantas tratadas con manitol 300 mM más CaCl₂ por 6 horas, se usaron dos concentraciones de cloruro de calcio 5 mM (**C**) y 10mM (**D**). Cada experimento se realizó tres veces.

Las plantas observadas tanto en la figura 2 y figura 3 poseen una mutación puntual en dos pares de base en la zona del *splicing* no convencional realizada por IRE1 en el factor de transcripción AtbZIP60, estas fueron sometidas a distintos tratamientos, solo con MS (Figura 2A y 3A) que no presenta fluorescencia en ninguna parte del tejido aéreo; la figura 2B y 3B solo están tratadas con manitol y presentan fluorescencia en hojas y las plantas (figura 2C, 2D, 3C y 3D) tratadas con manitol y con las distintas concentraciones de calcio, ya sea 5 mM (figura 2C y 3C) y 10 mM (figura 2D y 3D), también presenta fluorescencia en las hojas. Al igual que en la figura 1 visualmente no existe una gran diferencia entre la fluorescencia observada en las plantas de la línea L101 y L111 bajo estrés osmótico tratadas con distintas concentraciones de cloruro de calcio.

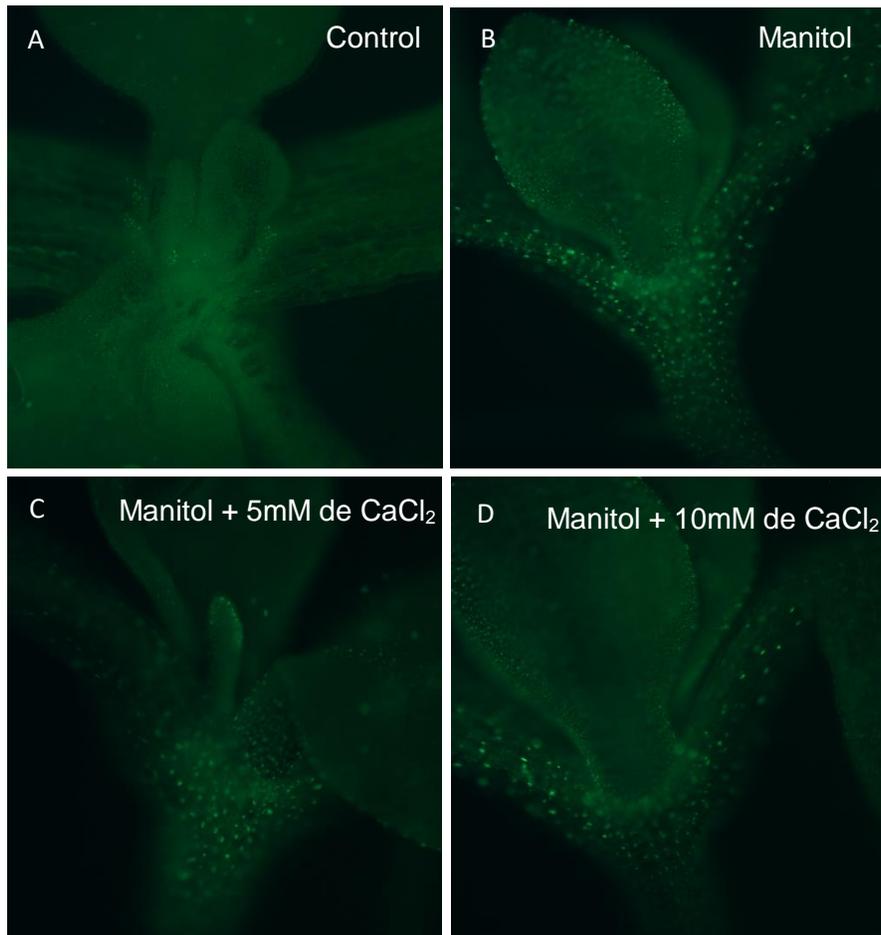


Figura 2: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en plantas de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés osmótico con un aumento de calcio. A-D. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L101 (ProAtbZIP60: GFP-secAtbZIP60gNS, con una mutación puntual en dos pares de bases en la zona de *splicing* no convencional). **A.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de las plantas tratadas con manitol 300 mM durante 6 horas. **C-D.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300 mM más CaCl₂ por 6 horas, se usaron dos concentraciones de cloruro de calcio 5mM (**C**) y 10mM (**D**).

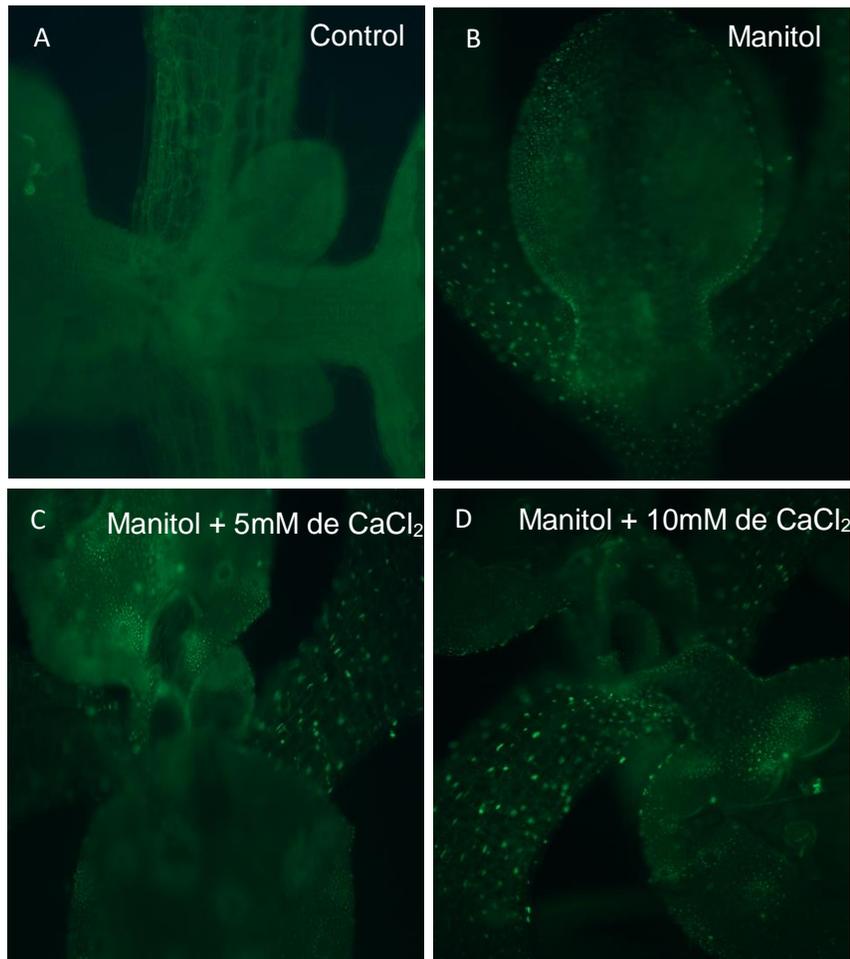


Figura 3: La fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u no se ve afectada por el aumento en la disponibilidad de calcio bajo condiciones de estrés osmótico. A-D. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L111 (ProAtbZIP60: GFP-secAtbZIP60gNS). **A.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de las plantas tratadas con manitol 300 mM durante 6 horas. **C-D.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300 mM más CaCl₂ por 6 horas, se usaron dos concentraciones de cloruro de calcio 5mM (**C**) y 10mM (**D**).

Los resultados correspondientes a las figura 1, figura 2 y figura 3 podrían sugerir que un aumento en la concentración de calcio no ayuda en la translocación del factor transcripción AtbZIP60u desde el retículo endoplasmático al núcleo bajo condiciones de estrés osmótico, debido a que no hay un aumento de fluorescencia.

El segundo experimento realizado para observar si el calcio influye en la translocación de AtbZIP60u desde el retículo endoplasmático al núcleo (figura 4, figura 5 y figura 6), consistió en disminuir la disponibilidad de calcio libre en el citosol de las células (Mori y cols, 2018), para esto se utilizaron distintas concentraciones de EGTA (0,1 mM, 1 mM y 5 mM) con manitol 300 mM por 6 horas a plantas de 8 días.

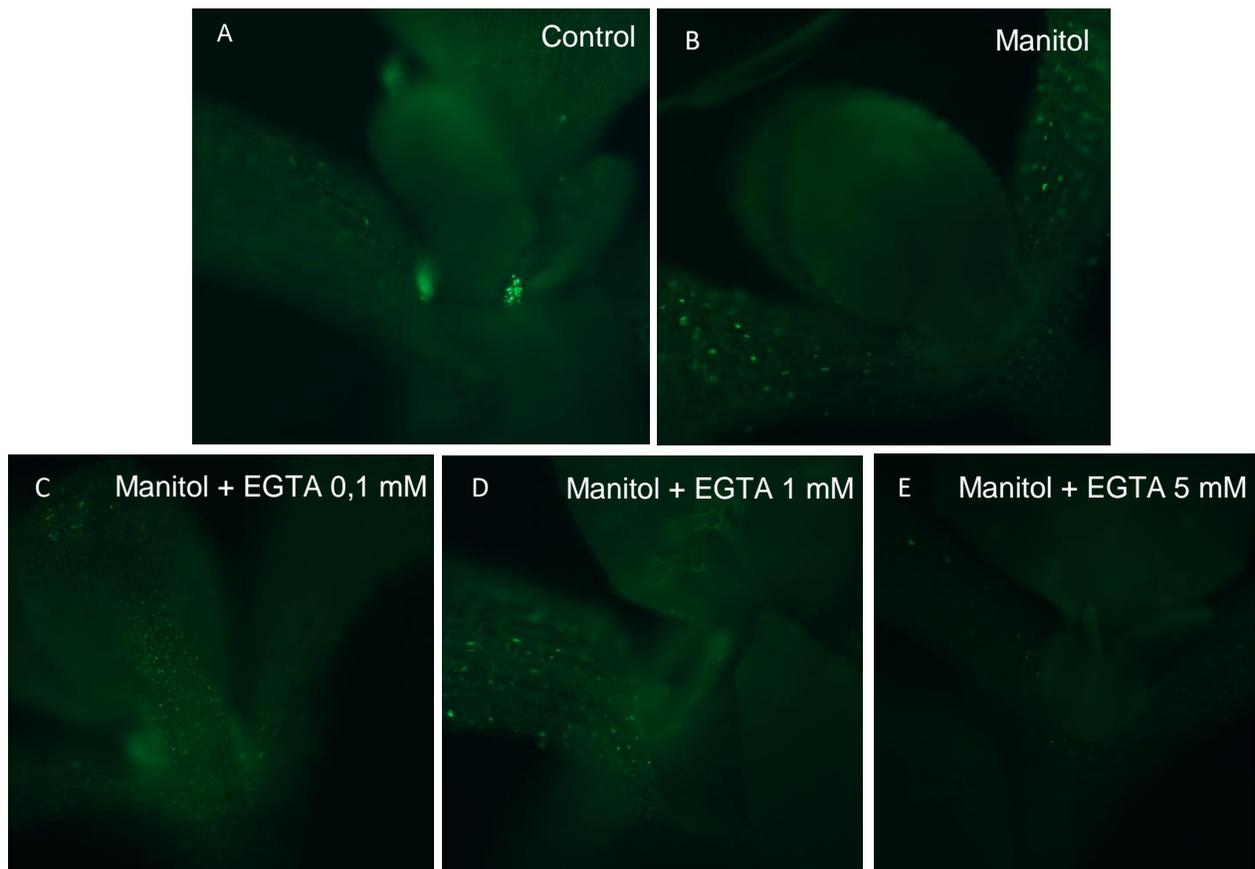


Figura 4: Observación de la fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60s en plantas de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés osmótico con la disminución de calcio citosólico. A-E. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L68 **A.** Detección de la fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300mM durante 6 horas. **C-E.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300mM más EGTA por 6 horas, se usaron tres concentraciones de EGTA: 0,1 mM (**C**), 1 mM (**D**) y 5 mM (**E**).

En la figura 4A se observó fluorescencia en la estípulas de una planta de 8 días en medio MS. En el control positivo para el estrés osmótico (figura 4B) se ve fluorescencia en gran parte del tejido aéreo de la planta, al igual que en las figuras 4C y 4D, que fueron plantas de 8 días sometidas a estrés osmótico con dos concentraciones de EGTA, 0,1 mM y 1 mM respectivamente. Sin embargo, al comparar la figura 4B y 4E se observa que la fluorescencia a una concentración de 5 mM de EGTA en medio osmótico (300 mM) se ve disminuida. Estos resultados sugieren que las concentraciones de 0,1 mM y 1 mM de EGTA no afectan lo suficiente para que la translocación del factor de transcripción no ocurra, por otro lado, la concentración de 5 mM de EGTA sí podría afectar la translocación de AtbZIP60s.

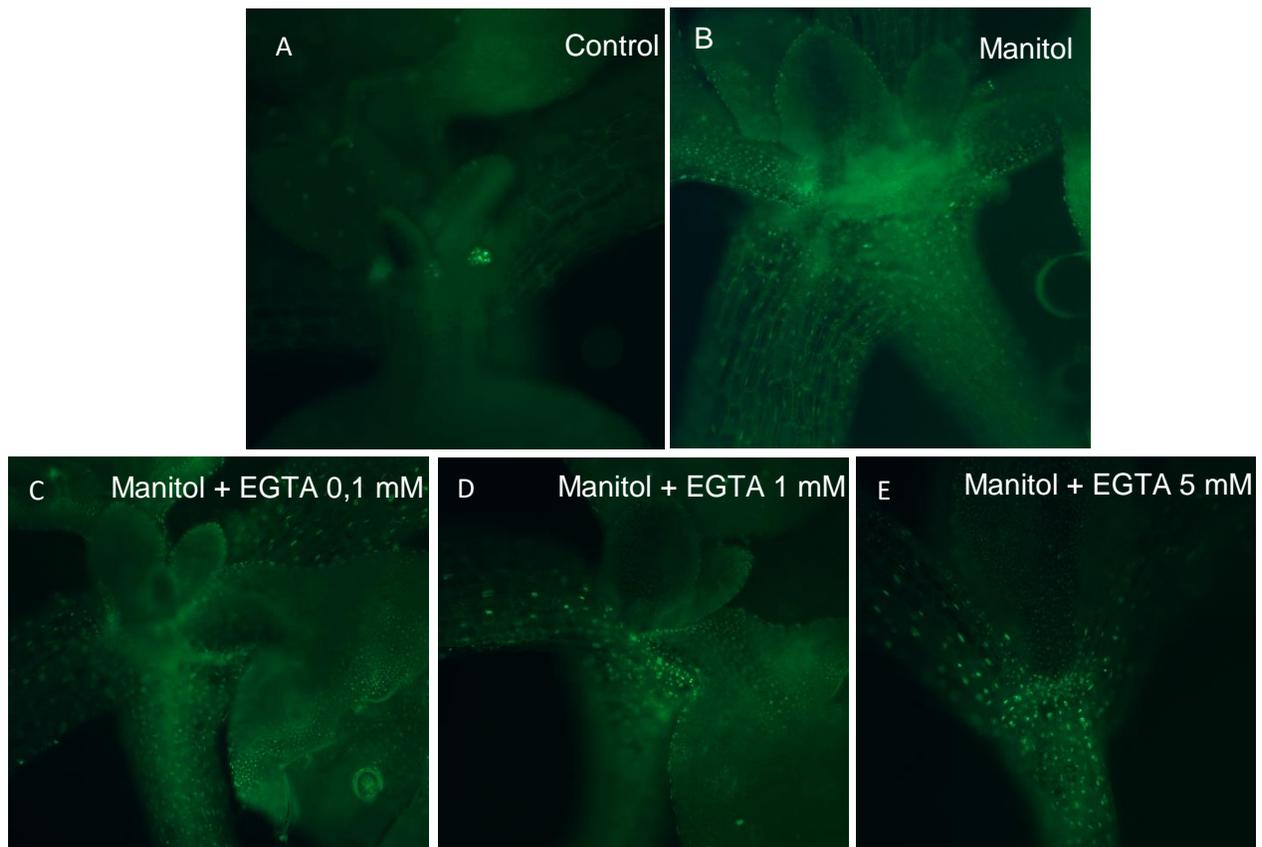


Figura 5: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en plantas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés osmótico y disminución en la concentración de calcio. A-E. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L101. **A.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300mM durante 6 horas. **C-E.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas de 8 días tratadas con manitol 300mM más EGTA por 6 horas, se usaron tres concentraciones de EGTA: 0,1 mM (**C**), 1 mM (**D**) y 5 mM (**E**).

Las figuras 5 y 6 corresponden a plantas transgénicas que poseen una mutación en la zona de corte del factor de transcripción reconocida por IRE1. Estas fueron crecidas en medio MS durante 8 días para luego ser sometidas a estrés osmótico (300 mM de manitol) durante 6 horas (figura 5B y 6B), y otras fueron tratadas con distintas concentraciones de EGTA, 0,1 mM (figura 5C y 6C), 1 mM (figura 5D y 6D) y 5 mM (figura 5E y 6E) por 6 horas.

En la figura 5A se ve fluorescencia solo en las estípulas, mientras que en el resto de la figura 5 (B-E) existe fluorescencia en gran parte del tejido aéreo de las plantas sometidos a los distintos tratamientos, al compararlas unas con otras la diferencia de fluorescencia es mínima. Esto podría sugerir que la translocación de AtbZIP60u de la línea L101 no se vería afectada por la disminución de los iones de calcio en el citosol.

Al igual que en las mayoría de las figuras del control, la figura 6A solo presenta fluorescencia en las estípulas, sin embargo, la fluorescencia en la planta sometida a estrés osmótico (figura 6B) es bastante baja en todo el tejido aéreo. Mientras que en la figura 6C y 6E la fluorescencia es casi nula, pero en la figura 6D la fluorescencia se observa en casi la mitad del tejido aéreo. Estos resultados se contradicen con lo observado en la línea L101, ya que parece ser que la disminución de iones de calcio en el citosol si afectaría la translocación de AtbZIP60u.

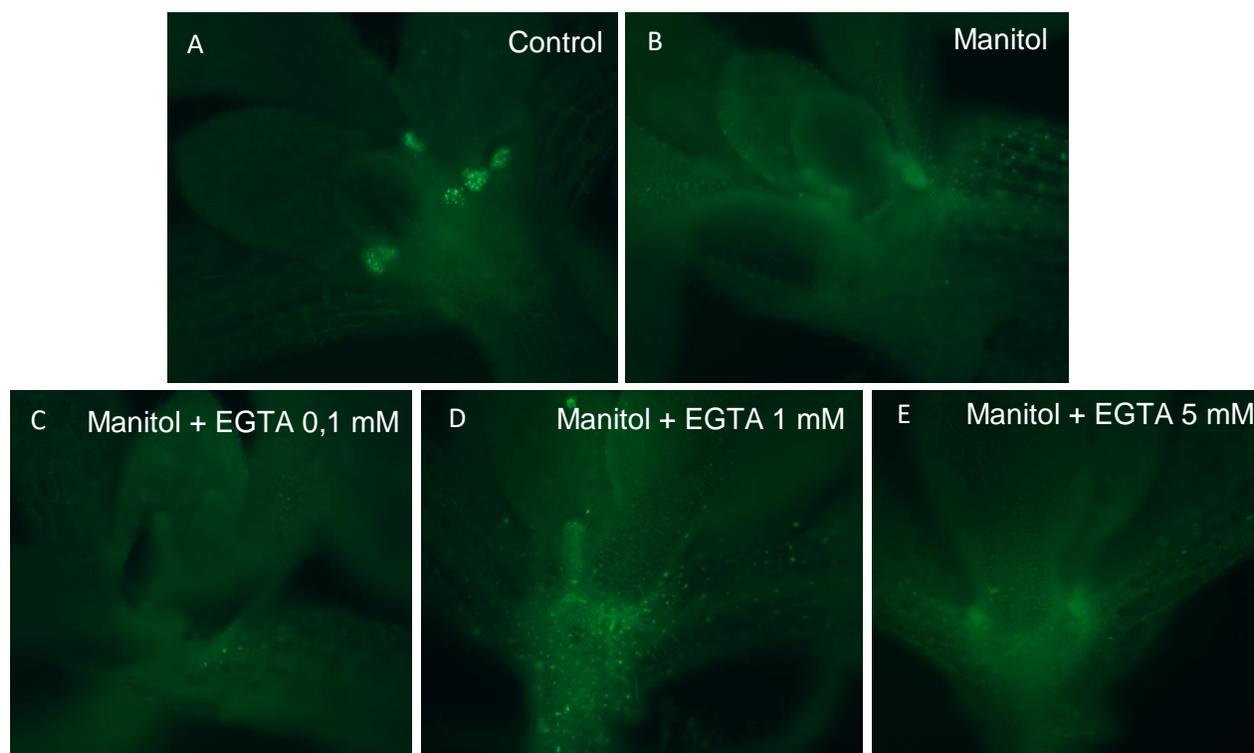


Figura 6: La fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u se ve afectada por la disminución en la disponibilidad de calcio citosólico libre bajo condiciones de estrés osmótico. A-E. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L111. **A.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300mM durante 6 horas. **C-E.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas de 8 días tratadas con manitol 300mM más EGTA por 6 horas, se usaron tres concentraciones de EGTA: 0,1 mM (**C**), 1 mM (**D**) y 5 mM (**E**).

3.2. Observación del efecto de ROS en la translocación de AtbZIP60u, desde el retículo endoplasmático al núcleo durante el estrés osmótico en *Arabidopsis thaliana*.

Al principio se sabía que ROS solo era un desecho toxico en las plantas, pero con el tiempo se descubrió que es un segundo mensajero (molécula de señalización) que regula muchos procesos biológicos en las plantas, como por ejemplo ayudar en el inicio de la respuesta frente al estrés generado por el ambiente o agentes patógenos (Gupta y cols, 2016).

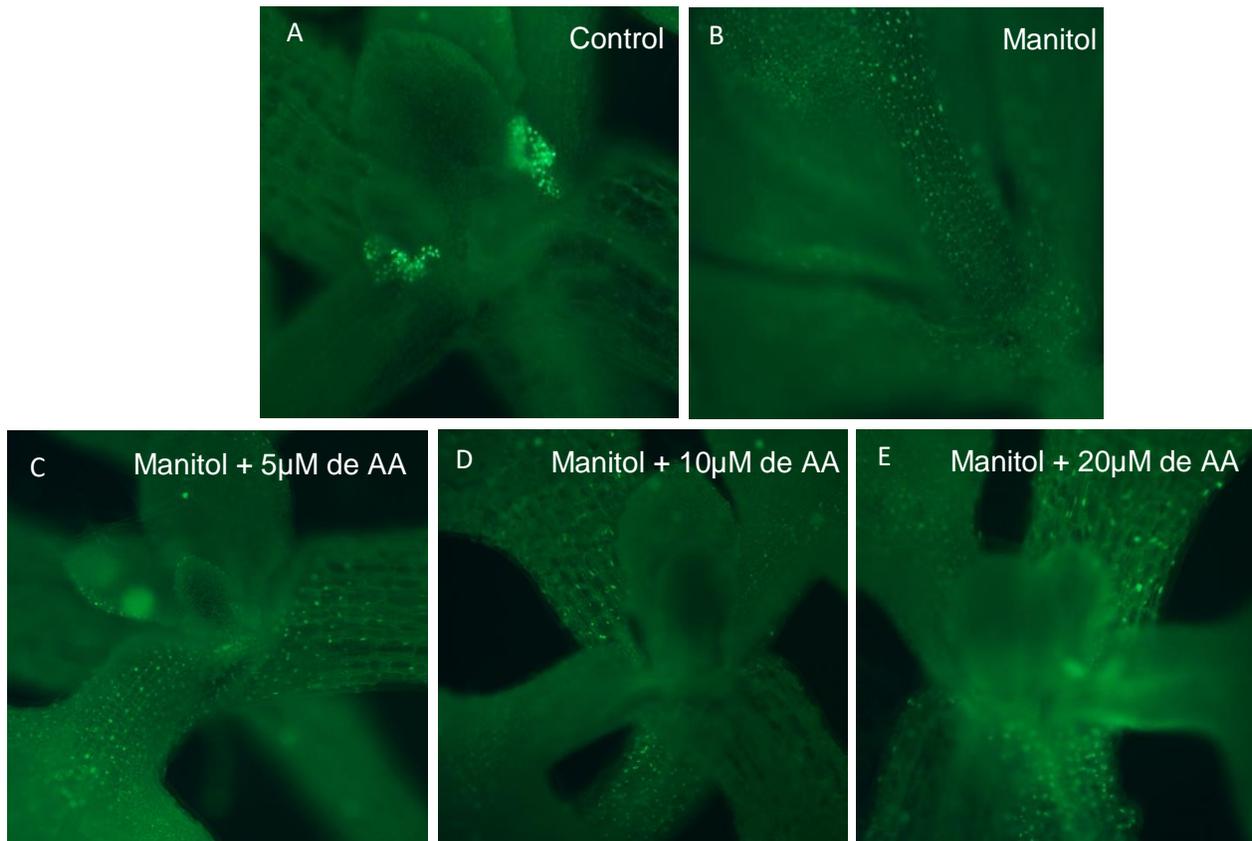


Figura 7: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60s bajo condiciones de estrés osmótico y un aumento en la disponibilidad de ROS. A-E. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L68. **A.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en plantas de 8 días tratadas con manitol 300 mM durante 6 horas. **C-E.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas de 8 días tratadas con manitol 300 mM más Antimicina A (AA) por 6 horas, se usaron tres concentraciones de AA: 5 µM (**C**), 10 µM (**D**) y 20 µM (**E**).

Para analizar el rol de ROS en las plantas durante el estrés osmótico se llevaron a cabo dos experimentos principalmente, aumentar los niveles de ROS en la planta (figura 7, 8 y 9) y disminuir los niveles de estos (figura 10, 11 y 12). El aumento de ROS se realizó con tratamientos de Antimicina A (AA) en distintas concentraciones, 5 µM (figura 7C, 8C y 9C), 10 µM (figura 7D,

8D y 9D) y 20 μM (figura 7E, 8E y 9E) bajo estrés osmótico (300 mM) durante 6 horas a plantas de 8 días.

En la figura 7A se observa fluorescencia solo en las estípulas, mientras que en la figura 7B, 7C, 7D y 7E hay fluorescencia en gran parte del tejido aéreo de las plantas sometidas a los tratamientos con distintas concentraciones de AA bajo estrés osmótico. Estos resultados sugieren que el aumento de ROS no influiría en la translación de AtbZIP60s desde el retículo endoplasmático al núcleo

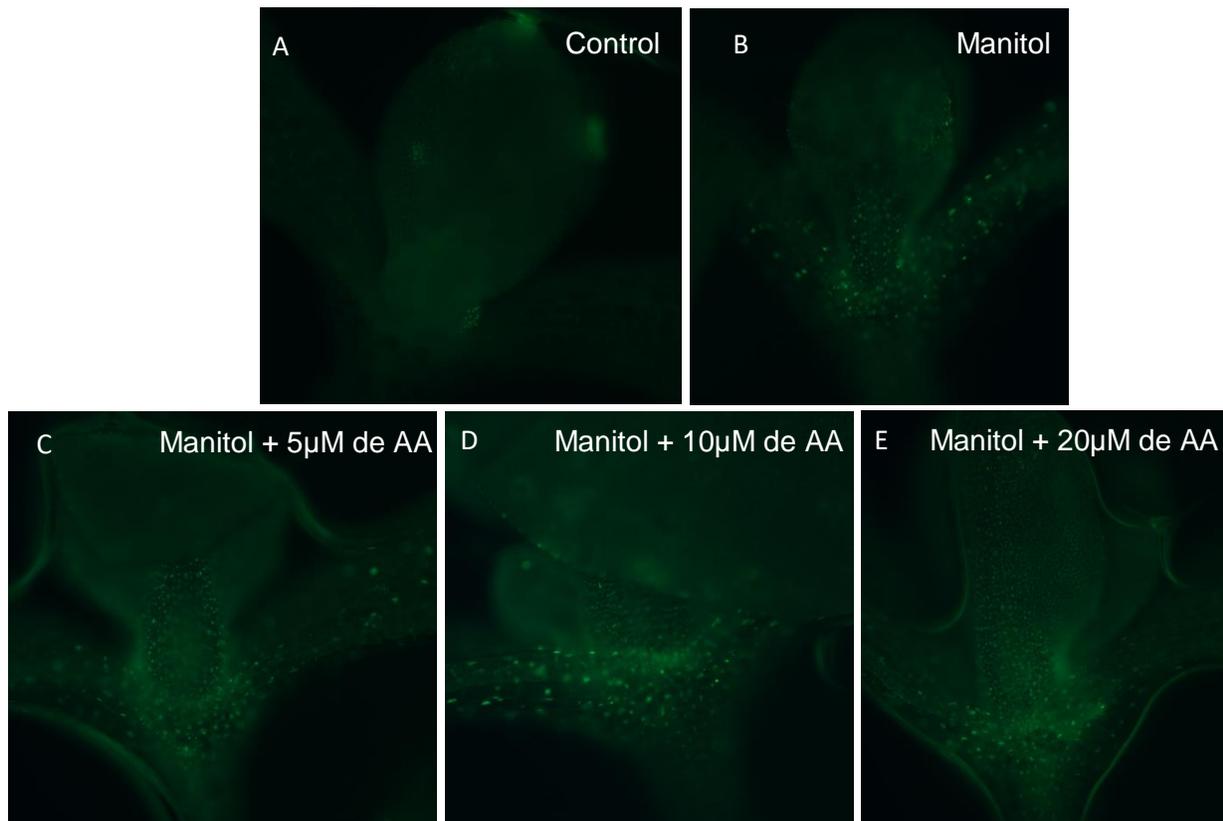


Figura 8: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en condiciones de aumento en la disponibilidad de ROS bajo condiciones de estrés osmótico. A-E. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L101 **A.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas de 8 días tratadas con manitol 300mM durante 6 horas. **C-E.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas de 8 días tratadas con manitol 300mM más Antimicina A (AA) por 6 horas, se usaron tres concentraciones de AA: 5 μM (**C**), 10 μM (**D**) y 20 μM (**E**).

Las figuras 8A y 9A corresponden al control negativo para estrés osmótico (plantas solo en medio MS) y solo se aprecia una pequeña fluorescencia en la estípula en la figura 8A. Luego al comparar la fluorescencia del control positivo para estrés osmótico (figura 8B y 9B) con los tratamientos con distintas concentraciones AA, se observa que no existe una diferencia

significativa en la fluorescencia, ya que en las figuras 8B, 8C, 8D y 8E existe fluorescencia en casi todo el tejido aéreo de las plantas, esto también ocurre con las figuras 9B, 9C, 9D y 9E. Esto sugeriría que un aumento en la disponibilidad de ROS no influiría en la translocación del factor de transcripción AtbZIP60u.

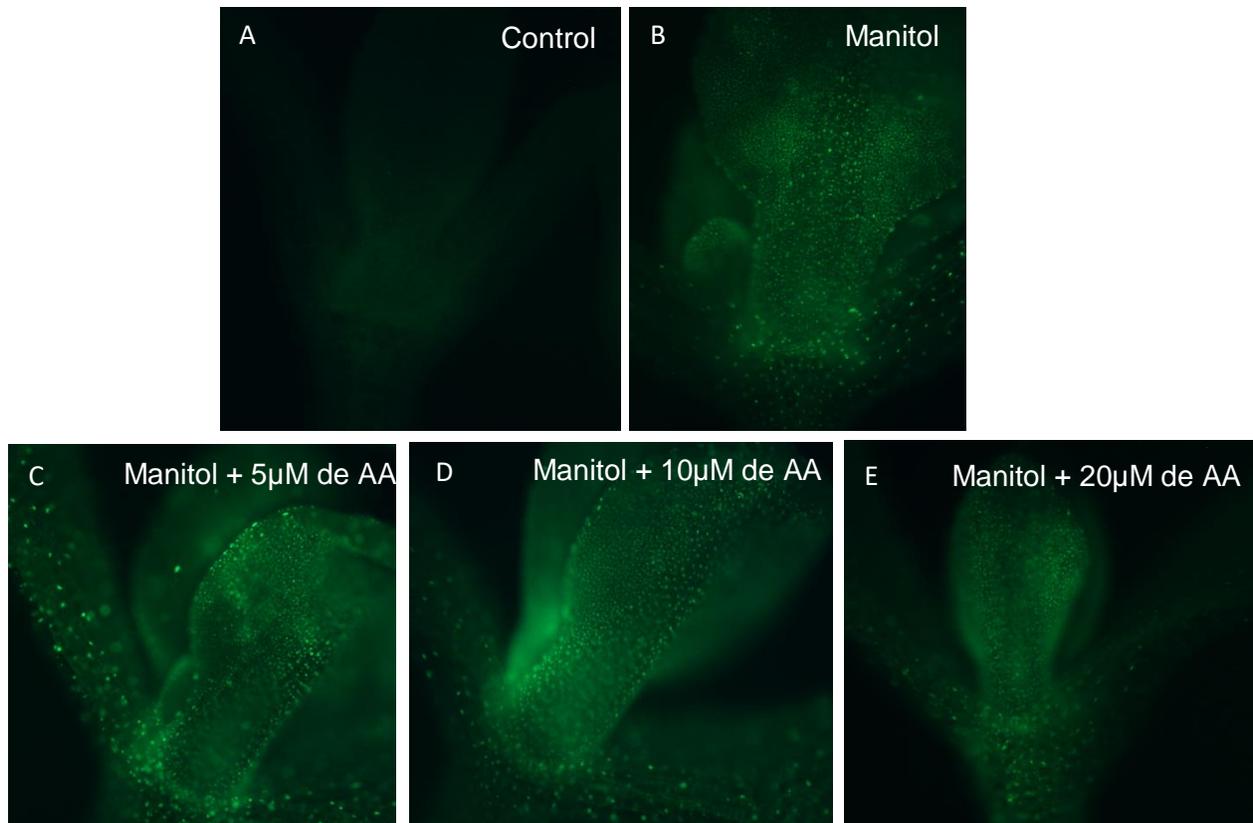


Figura 9: Fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en condiciones donde hay un aumento en la disponibilidad de ROS bajo condiciones de estrés osmótico. A-E. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L111. **A.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas de 8 días tratadas con manitol 300mM durante 6 horas. **C-E.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas de 8 días tratadas con manitol 300mM más Antimicina A (AA) por 6 horas, se usaron tres concentraciones de AA: 5 μ M (**C**), 10 μ M (**D**) y 20 μ M (**E**).

Otra manera de observar si ROS está involucrado en la translocación del AtbZIP60u, es disminuyendo la cantidad de ROS disponible, para esto se realizó tratamientos con distintas concentraciones de DPI (10 μ M y 100 μ M) bajo estrés osmótico, durante 6 horas a plantas de *Arabidopsis thaliana* de 8 días (figura 10, 11, 12).

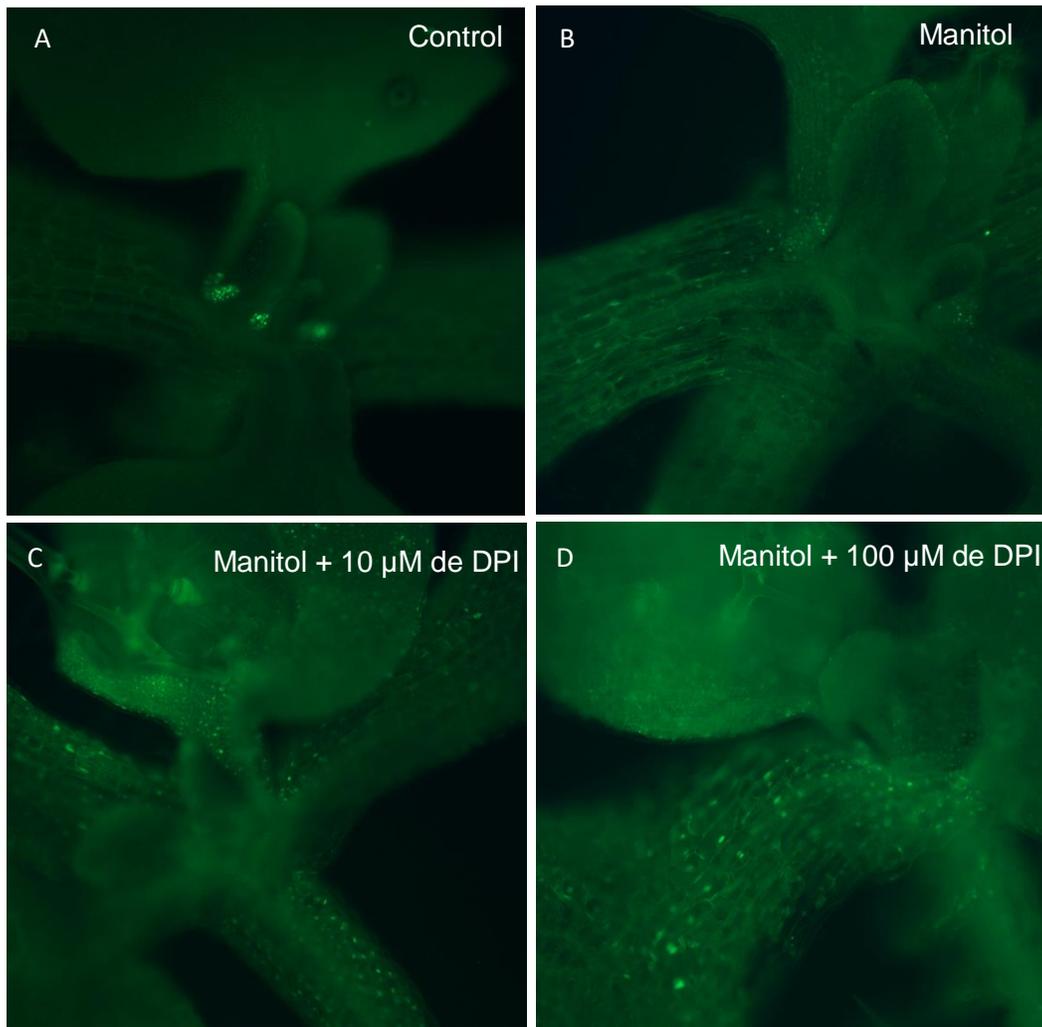


Figura 10: Fluorescencia del factor de transcripción AtrZIP60s en condiciones de estrés osmótico y disminución en la disponibilidad de ROS. A-D. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L68. **A.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300 mM durante 6 horas. **C-D.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300 mM más DPI por 6 horas, se usaron dos concentraciones de DPI 10μM (**C**) y 100μM (**D**).

En la figura 10A se observa fluorescencia solo en las estípulas, mientras que en la figura 10B existe fluorescencia solo en una pequeña parte de del tejido aéreo de la planta. Las plantas sometidas a los tratamientos con distintas concentraciones de DPI bajo estrés osmótico (figura 10C y 10D) muestran una fluorescencia en cerca de la mitad del tejido aéreo. Al comparar la fluorescencia de las figuras 10B, 10C y 10D se puede observar que existe mayor fluorescencia en las plantas sometidas a tratamientos con DPI bajo estrés osmótico versus las plantas sometidas solo a estrés osmótico. Estos resultados obtenidos no son los esperados.

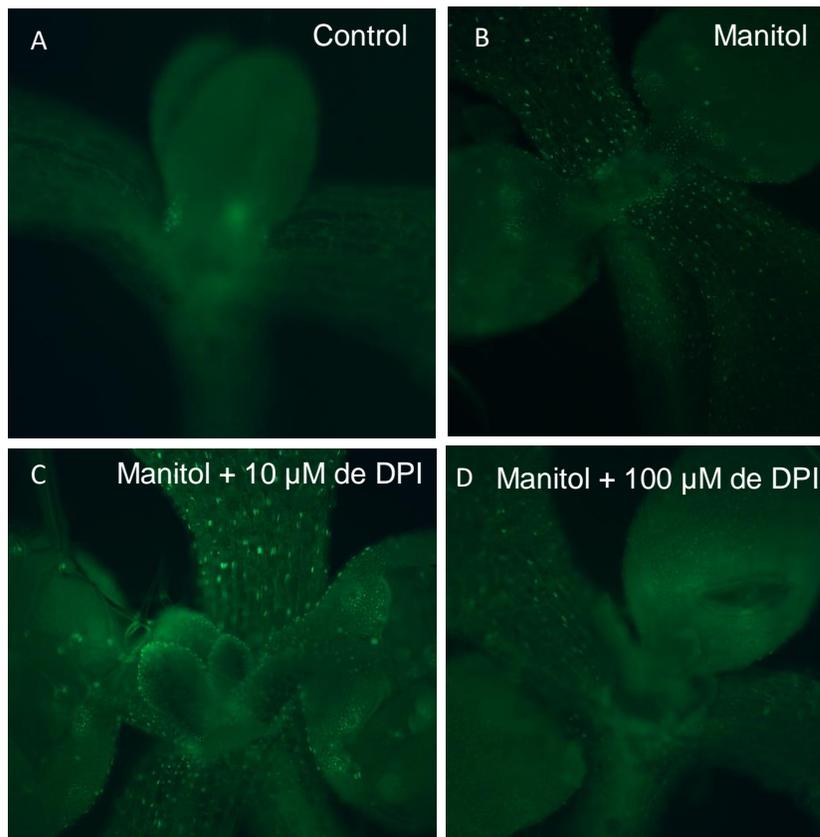


Figura 11: Visualización de la fluorescencia del factor de transcripción AtbZIP60u en plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a la disminución de ROS bajo condiciones de estrés osmótico. A-D. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la línea L101. **A. Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas sin tratamientos (solo medio MS). **B.** Detección de fluorescencia en el tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300mM durante 6 horas. **C-D.** Detección de fluorescencia en tejido aéreo en las plantas tratadas con manitol 300mM más DPI por 6 horas, se usaron dos concentraciones de DPI 10μM (**C**) y 100μM (**D**).**

La figura 11A corresponde al control, se observó fluorescencia en el sector de las estípulas, mientras que en el control positivo para estrés osmótico (figura 11B) se ve fluorescencia en gran parte del tejido aéreo al igual que en la figura 11D, que corresponde a plantas con tratamiento de DPI 10 μM bajo estrés osmótico, sin embargo, en la figura 11D la planta sometida a tratamiento con DPI 100 μM bajo estrés osmótico, muestra una disminución en la fluorescencia al compararla con la figura 11B. Estos resultados podrían sugerir que la disminución en la disponibilidad de ROS podría afectar la translocación de AtbZIP60u bajo condiciones de estrés osmótico, debido a la disminución de fluorescencia.

4.DISCUSIÓN

En una investigación previa a la nuestra se emplearon las mismas líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y se obtuvieron como resultados que la nueva variante para AtbZIP60 (AtbZIP60u) se localiza en el núcleo cuando se realizaron tratamientos que inducen el estrés osmótico, donde se utilizó manitol 300 mM para inducir este tipo de estrés (Moreno, 2015), es por esta razón que para generar estrés osmótico se utilizó manitol a una concentración de 300mM en los experimentos. Gracias a estos antecedentes se puede inferir que la fluorescencia observada en todas la figuras obtenidas en esta investigación con manitol y con los tratamientos para aumentar o disminuir los segundos mensajeros provienen del núcleo.

En las figuras donde se observó fluorescencia en la zona aérea de planta llamada estípula, se debe a que este órgano tiene una tasa de replicación muy alta y por lo tanto existe una gran cantidad de síntesis de proteínas, activando el UPR. Es por esta razón que solo debería haber fluorescencia en las estípulas de todas las figuras control para la línea L68, que es la línea transgénica que no posee la mutación en el sitio de corte realizado por IRE1, sin embargo, se observó fluorescencia en las estípulas de algunas figura control de las línea L101 y L111, esto podría deberse a que AtbZIP60u al igual que AtbZIP60s (línea L68) estaría regulando genes del sistema UPR.

4.1. El calcio tiene un rol en la translocación del factor de transcripción AtbZIP60u desde el retículo endoplasmático al núcleo bajo condiciones de estrés osmótico.

Antecedentes a esta investigación indican que los iones de calcio son usados como segundos mensajeros frente al estrés abiótico, donde la concentración de calcio citosólico varía de acuerdo con el estímulo (Mori y cols, 2018). Frente a este antecedente planteamos la hipótesis de que el calcio ayudaría a la translocación del factor de transcripción AtbZIP60u en condiciones de estrés osmótico en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para esto se realizaron dos experimentos, los cuales consistieron en someter a tres líneas transgénicas (L68, L101 y L111) de *Arabidopsis thaliana* a tratamientos con cloruro de calcio para aumentar la disponibilidad de calcio y con EGTA para disminuir disponibilidad de iones de calcio citosólico libre (Tsugama y cols, 2018) bajo condiciones de estrés osmótico (300 mM manitol), estos tratamientos se realizaron por 6 horas a plantas de 8 días.

Según los resultados obtenidos al comparar las figuras 1, 2 y 3, tratadas con cloruro de calcio en ambas concentraciones y en condiciones de estrés osmótico, el aumento en la disponibilidad de calcio no aumenta la fluorescencia, por lo que no aumentaría la translocación al núcleo de AtbZIP60u. Estos resultados se pueden deber a que existen otros mecanismos de

señalización en la respuesta frente al estrés osmótico o el calcio que posee la planta es suficiente para que sea usado como segundo mensajero, ya que el calcio se almacena en varias estructuras de la planta, como la vacuola, el núcleo, el RE y los sistemas que detectan los cambios en la concentración de calcio en el citosol son muy sensibles (Reddy A, 2011).

En la figura 4 se observa una disminución en la fluorescencia en plantas bajo estrés osmótico tratadas con concentraciones de EGTA 5 mM al comparlas con la figura 4,B; pero no hay diferencia en la fluorescencia con las concentraciones de 0,1 mM y 1 mM de EGTA, como se ha visto en otras investigación (Mori y cols, 2018) la concentración necesaria para que el calcio disminuya al interior de la célula es de 5 mM de EGTA, esto indicaría que al disminuir la concentración de calcio citosólico y la fluorescencia, la translocación al núcleo de AtbZIP60u si podría estar modulada por el calcio. Estos resultados contrastan con los observados en la figura 5, debido a que en esta imagen no se ve ningún cambio en la fluorescencia entre las plantas sometidas a los tratamientos con las distintas concentraciones de EGTA bajo condiciones de estrés osmótico.

El manitol es un compuesto higroscópico, es decir, absorbe de manera muy rápida la humedad y para poder usarlo para hacer los medios que generan estrés osmótico, debe estar lo mas seco posible, por ende, se deja unos dos días en la estufa antes de uso, de lo contrario no genera estrés osmótico. Lo nombrado anteriormente fue lo que ocurrió en la figura 6, no se ve fluorescencia en la figura 6B; que es el control para manitol, ya que el medio de manitol usado para cada experimento es el mismo, los medios utilizados para este experimento no generaron estrés osmótico.

Según los resultados obtenidos respecto al rol del calcio en la translocación al núcleo de la proteína AtbZIP60u se podría sugerir que la falta de calcio si podría estar modulando la translocación al núcleo de la proteína.

4.2. ROS tiene un rol en la translocación del factor de transcripción AtbZIP60u desde el retículo endoplasmático al núcleo bajo condiciones de estrés osmótico.

Recientes estudios han revelado la capacidad de ROS para actuar como molécula de señalización en respuesta al estrés (Gupta, 2016), es por esta razón que para evaluar su rol en la translocación al núcleo de AtbZIP60u se aumentó ROS con Antimicina A (AA) y se disminuyó ROS con DPI.

En la figuras 7, 8 ,9 corresponden a plantas sometidas a tratamientos con aumento de ROS y al comparar las plantas sometidas a estrés osmótico con las tenían el tratamiento con las AA, no se observa ninguna diferencia visual. Esto también ocurrió cuando se aumentó el calcio, por lo tanto, el aumento de ROS no aumenta la traslocación al núcleo de AtbZIP60u.

En la figura 10B ocurrió algo muy parecido que en la figura 6B, lo más probable es que el manitol haya estado húmedo al momento de preparar los medios y por lo tanto no servir para generar el estrés osmótico. Sin embargo, se observa fluorescencia en la figura 10D, esto podría indicar que el DPI está generando algún fenómeno en la planta el cual estaría activando AtbZIP60u.

En la figura 11 se observa una disminución en de fluorescencia al comparar la 11B con la 11D, esto indicaría que la disminución de ROS si estaría afectando la translocación al núcleo de la proteína ATBZIP60u.

Sin embrago, se deberían hacer más experimentos para que estos resultados sean más exactos, como un western blot para GFP (es más cuantitativo) a proteínas obtenidas en el núcleo, quizás hacer una curva de tiempo, ya que cada tratamiento se observó a 6 horas.

5.CONCLUSIÓN

- El aumento de los segundos mensajeros, ya sean ROS o calcio no estarían facilitando la translocación al núcleo de AtbZIP60u.
- La disminución de los segundos mensajeros calcio y ROS si podrían estar involucrados en la translocación al núcleo de la proteína AtbZIP60u.

6.REFERENCIAS

- Aldon, D., Mbengue, M., Mazars, C., & Galaud, J.-P. (2018). Calcium Signalling in Plant Biotic Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-19.
- Araki, E., Oyadomari, S., & Mori, M. (2003). Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Internal Medicine*, 7-14.
- Bhargava, S., & Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 21-32.
- Buchberger, A., Bukau, B., & Sommer, T. (2010). Protein Quality Control in the Cytosol and the Endoplasmic Reticulum: Brothers in Arms. *Molecular Cell*, 238-252.
- CM, D. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, 844-890.
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, J. X., Srivastava, R., Rothstein, S. J., & Howell, S. H. (2011). Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1-6.
- Fujita, M., Mizukado, S., Fujita, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., . . . Yamaguchi-Shinozaki. (2007). Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale Full-length cDNA Over-eXpressor (FOX) gene hunting system. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 250-257.
- Gupta, K., Sengupta, A., Chakraborty, M., & Gupta, B. (2016). Hydrogen Peroxide and Polyamines Act as Double Edged Swords in Plant Abiotic Stress Responses. *Frontiers in the Plant Science*, 1-19.
- Howell, S. H. (2013). Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 477-499.
- Iwata, & Koizumi. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc Natl Acad Sci*, 5280–5285.
- Iwata, Y., Fedoroff, N. V., & Koizumi, N. (2008). Arabidopsis bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell*, 3107–3121.

- Kissoudis, C., van de Wiele, C., Visser, R., & van der Linden, G. (2014). Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Plant Breeding*, 207.
- Koizumi, Yuji, Iwata, & Nozomu. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 5280-5285.
- Lewis, B., & Spalding, E. . (1998). Nonselective block by La³⁺ of Arabidopsis ion channels involved in signal transduction. *The Journal of Membrane Biology*, 81-90.
- Loon, L. V. (2016). The Intelligent Behavior of Plants. *Trends in Plants Science*, 286-294.
- Mishra, S., Upadhyay, S., & Shukla, R. (2017). The Role of Strigolactones and Their Potential Cross-talk under Hostile Ecological Conditions in Plants. *Frontiers in Physiology*, 1-2.
- Moreno Vilches, A. A. (2015). *Estudio de la vía de señalización mediada por IRE1 durante la respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en Arabidopsis thaliana* (Tesis doctoral). Universidad Andres Bello, Santiago de Chile.
- Mori, K., Renhu, N., Naito, M., Nakamura, A., Shiba, H., Yamamoto, T., . . . Miura, K. (2018). Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 mediate cold-induced cytosolic Ca²⁺ increase and cold tolerance in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 1-9.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 473–497.
- Nagashima, Y., Mishiba, K.-i., Suzuk, E., Shimada, Y., Iwata, Y., & Nozomu, K. (2011). Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Nature*, 1-9.
- Parra-Rojas, J., Moreno, A., Mitina, I., & Ariel, O. (2015). The Dynamic of the Splicing of bZIP60 and the Proteins Encoded by the Spliced and Unspliced mRNAs Reveals Some Unique Features during the Activation of UPR in Arabidopsis thaliana. *PLOS ONE*, 3-6.
- Ranty, B., Aldon, D., Cotelle, V., Galaud, J.-P., Thuleau, P., & Mazars, C. (2016). Calcium Sensors as Key Hubs in Plant Responses to Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiology*, 1-7.
- Reddy A., Ali G., Celesnik H., & Day I. (2011). Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell*, 2010-2032.

Ruberti, B., & Federica, C. (2014). Conserved and plant-unique strategies for overcoming endoplasmic reticulum stress. *Frontiers in Plant Science*, 1-8.

Ruberti, C., Sang-JinKim, Stefano, G., & B. F. (2015). Unfolded protein response in plants: one master, many questions. *Current Opinion in Plant Biology*, 59-66.

Sonal, M., Swati, U., & Rakesh, K. (2016). The Role of Strigolactones and Their Potential Cross-talk under Hostile Ecological Conditions in Plants. *Frontiers in Physiology*, 1-2.

Tsugama, D., Liu S., Fujino K., Takano T (2018). Calcium signalling regulates the functions of the bZIP protein VIP1 in touch responses in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 1219–1229

Vitale , A., & Boston, R. (2008). Endoplasmic Reticulum Quality Control and the Unfolded Protein Response: Insights from Plants. *t*, 1581–1588.

Wan, S., & Jiang, L. (2016). Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. *Protoplasma*, 753-764.

Water, P., & Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response:From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* , 1080-1086.