



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Efecto de la aclimatación al frío en la regulación transcripcional de la serina
palmitoiltransferasa de *Arabidopsis thaliana***

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

Q.A. LIZBETH ELENA GUTIÉRREZ ANGOA

**DRA. MARINA GAVILANES RUIZ
Facultad de Química, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES
Facultad de Medicina, UNAM**

**DR. FELIPE CRUZ GARCÍA
Facultad de Química, UNAM**

Ciudad de México. Abril, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Wilhelm Hansberg Torres
VOCAL	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
VOCAL	Dra. Rosario Vera Estrella
VOCAL	Dr. Roberto Coria Ortega
SECRETARIO	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Sitio en donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 101, Conjunto E, Departamento de Bioquímica,
Facultad de Química, UNAM**

Asesor del tema

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Sustentante

Q. A. Lizbeth Elena Gutiérrez Angoa



RECONOCIMIENTOS

A la M. en C. Manuela Nájera Martínez (Facultad de Química, UNAM) por su asesoría en el montaje de las técnicas de Biología Molecular.

Al Dr. Javier Plasencia de la Parra (Facultad de Química, UNAM) por su asesoría en el establecimiento de la técnica de PCR punto final.

A la Q.F.B. Ma. del Consuelo Enríquez Arredondo (Facultad de Química, UNAM) por su asistencia en el trabajo de laboratorio.

Al Dr. Edgar B. Cahoon (Center of Plant Sciences Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, E.U.) por proporcionarnos las semillas de la planta mutante *Atlcb2b hp / Atlcb2a* usadas en este trabajo.

Al Dr. Ismael Bustos Jaimes (Facultad de Medicina, UNAM) y **al Dr. Felipe Cruz García** (Facultad de Química, UNAM) por su asesoría dentro del comité tutorial.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra por su ayuda en el crecimiento de las plantas y en el uso del equipo utilizado en este trabajo.

A los miembros del jurado, por sus aportaciones al análisis de los resultados y en especial a la redacción del manuscrito.

- ❖ **La Q.A. Lizbeth Elena Gutiérrez Angoa** realizó el proyecto de Maestría gracias a la beca proporcionada por CONACYT (Registro No. 549789)
- ❖ **El trabajo realizado en esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de la DGAPA (UNAM), proyecto PAPIIT (IN222815), CONACYT (238368) y PAIP (50009115).**
- ❖ **Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo para la asistencia a congresos**

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 101 del Dpto. de Bioquímica del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, en Cd. Universitaria.

**ÍNDICE**

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. LAS PLANTAS Y LAS BAJAS TEMPERATURAS	2
1.1 Distribución selectiva de las especies de plantas según la temperatura.....	2
1.2 El estrés por frío en las plantas	2
1.3 Percepción y transducción de señales durante el estrés por frío	3
1.4 Regulación de los genes de respuesta a frío. La vía ICE-CBF/DREB	6
1.5 Genes regulados por frío.....	7
1.6 El papel de la membrana plasmática en la resistencia a las bajas temperaturas	7
2. MEMBRANA PLASMÁTICA	10
2.1 LOS LÍPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	11
2.1.1 Glicerolípidos.....	11
2.1.2 Esfingolípidos	11
2.1.2.1 Síntesis de esfingolípidos.....	14
2.1.2.2 Funciones de los esfingolípidos.....	15
2.1.3 Esteroles	16
3. LA SERINA PALMITOILTRANSFERASA (SPT).....	17
3.1 Estructura de la SPT.....	17
3.2 Regulación de la SPT.....	19
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Material biológico.....	22
2. Siembra y crecimiento de plántulas de <i>A. thaliana</i> en caja Petri	22
3. Siembra y crecimiento de plántulas de <i>A. thaliana</i> en maceta.....	22
4. Obtención de las semillas.....	23
5. Inducción del silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b	23
6. Determinación del tiempo de aclimatación al frío de las plántulas de <i>A. thaliana</i>	23
7. Determinación del efecto del silenciamiento en la expresión del gen <i>LCB2b</i> en el fenómeno de aclimatación al frío.....	24



8. Registro fenotípico de las plántulas.....	24
9. Extracción del RNA.....	24
10. Cuantificación y calibración del RNA total.....	25
11. Reacciones de la RT-PCR.....	25
11.1 Síntesis del cDNA.....	25
11.2 Reacciones de la PCR y determinación densitométrica de las amplificaciones.....	26
12. Verificación de la secuencia de los productos de la PCR.....	27
12.1 Purificación del producto de la PCR.....	27
12.2 Reacción de ligación.....	27
12.3 Transformación por choque térmico de <i>E. coli</i> y selección de células transformantes.....	27
12.4 Extracción y restricción del plásmido.....	28
RESULTADOS.....	30
1. Determinación del efecto de la aclimatación en el fenotipo del silenciamiento del gen <i>LCB2b</i>	30
2. Determinación del tiempo adecuado para observar el efecto del silenciamiento inducido con la metoxifenzida en plántulas hp+ germinadas y crecidas en macetas.....	32
3. Determinación del tiempo necesario para la aclimatación al frío de plántulas silvestres de <i>A. thaliana</i>	33
4. Determinación de la respuesta al congelamiento de las plántulas mutantes hp.....	34
5. Determinación del efecto de las bajas temperaturas en la regulación transcripcional de los genes de <i>LCB2a</i> y <i>LCB2b</i>	36
5.1 Determinación de un gen de referencia y medición de los niveles de transcritos de <i>LCB2a</i> y <i>LCB2b</i> en plántulas silvestres NA y AC.....	38
5.2 Medición de los niveles del transcrito <i>LCB2b</i> en la línea mutante <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i>	42
6. Clonación y secuenciación de los productos de PCR.....	43
DISCUSIÓN.....	46
1. La capacidad de aclimatación de las plántulas silvestres de <i>A. thaliana</i> es la misma entre 3 y 5 semanas de edad.....	47
2. Los genes <i>LCB2a</i> y <i>LCB2b</i> no modifican su expresión durante la aclimatación al frío en las plántulas silvestres.....	49
3. El fenotipo de silenciamiento del gen <i>LCB2b</i> en las plántulas mutantes hp es retardado con la aclimatación.....	51
4. La expresión del gen <i>LCB2b</i> se ve regulada durante la aclimatación al frío en las plántulas hp.....	52
5. La ausencia del gen <i>LCB2a</i> en las plántulas hp les confiere un fenotipo de resistencia al congelamiento.....	53
CONCLUSIONES PARTICULARES.....	56



CONCLUSIÓN GENERAL	56
PERSPECTIVAS.....	56
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS.....	67



RESUMEN

El estrés por frío es uno de los principales factores ambientales que limitan la productividad de las plantas. Muchas plantas incrementan su tolerancia al congelamiento cuando se exponen previamente a temperaturas bajas que son no congelantes. Este fenómeno es llamado aclimatación al frío, proceso que resulta en cambios fisiológicos y moleculares en las plantas. Entre éstos, se han reportado cambios en la proporción de los lípidos de la membrana plasmática tales como un incremento en la proporción de especies di-insaturadas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, así como una disminución en la proporción de cerebrosidos, los cuales son un tipo de esfingolípidos.

La primera enzima en la vía de síntesis *de novo* de los esfingolípidos es la serina palmitoiltransferasa (SPT). Esta enzima está formada por dos subunidades: una reguladora (LCB1) y una catalítica (LCB2). A su vez la subunidad LCB2 tiene dos isoformas: LCB2a y LCB2b. El propósito de este proyecto fue conocer si la transcripción de los genes que codifican para la subunidad catalítica de esta enzima se regula durante la aclimatación al frío. El estudio se llevó a cabo en plantas de *Arabidopsis thaliana* de dos genotipos: la silvestre y la mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. En la primera, la SPT está en dos formas heterodiméricas LCB1/LCB2a y LCB1/LCB2b. En la segunda solo está el heterodímero LCB1/LCB2b, en el cual *LCB2b* puede ir disminuyendo por silenciamiento génico.

Los resultados obtenidos muestran que las plántulas de *A. thaliana* son capaces de aclimatarse desde la primera semana a 4 °C. Además, que la respuesta a la aclimatación no cambia entre las 3 y las 5 semanas de edad de las plántulas. No se encontraron cambios en los niveles de los transcritos *LCB2a* y *LCB2b* en respuesta a frío en el genotipo silvestre. Mientras que en la línea mutante, de acuerdo al fenotipo, el silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b se retrasa tras la exposición a 4 °C. Esto último es consistente con una expresión incrementada del gen *LCB2b* tras la aclimatación de esta línea mutante. Los resultados sugieren que existe una regulación transcripcional de los genes que codifican para la subunidad catalítica de la SPT cuando la planta expresa sólo una de las versiones del heterodímero (en este caso la versión LCB1/LCB2b).



INTRODUCCIÓN

1. LAS PLANTAS Y LAS BAJAS TEMPERATURAS

1.1 Distribución selectiva de las especies de plantas según la temperatura

Como factor ecológico, la baja temperatura ejerce una influencia de extrema importancia en la distribución global de los organismos y es relevante para la adaptación y rendimiento de todas las especies vegetales en los ecosistemas. La exposición a las bajas temperaturas tiene una frecuencia diaria o estacional a la cual las plantas se deben adaptar (Ashraf y Harris, 2005).

Debido a esto, cada especie tiene un umbral térmico óptimo para desarrollarse. Por ello, los cultivos tropicales y subtropicales pueden dañarse con las bajas temperaturas (cerca de 0 °C), mientras que las plantas de clima templado tienen la habilidad de aclimatarse al frío y soportar temperaturas de -5 a -30 °C. Las plantas perennes de los bosques de latitudes altas pueden incluso sobrevivir a temperaturas por debajo de -30 °C (Thomashow, 1998).

1.2 El estrés por frío en las plantas

El estrés por frío puede ser clasificado como estrés por enfriamiento (exposición a temperaturas de 0-15 °C) y estrés por congelamiento (exposición a temperaturas de <0 °C) (Miura y Furumoto, 2013). En respuesta a ambos, las plantas pueden desplegar mecanismos de tolerancia o resistencia al frío. La capacidad de tolerancia al frío cambia durante el ciclo de vida de las plantas, ya sea en sus estados de crecimiento, reproductivo o vegetativo (Bertin *et al.*, 1996).

En la semilla, durante la germinación y el desarrollo temprano de la plántula, las plantas pasan por varios estados con diferentes grados de sensibilidad a las bajas temperaturas. El primer estado, la imbibición de la semilla, y el último, el inicio de la fotosíntesis, son los más sensibles. A medida que la temperatura disminuye por debajo de la temperatura óptima, el crecimiento se retarda más (Ashraf y Harris, 2005). La influencia de la baja temperatura ha sido estudiada en múltiples especies vegetales. En el maíz, por ejemplo, los principales efectos de la baja temperatura en el desarrollo de las plantas son la disminución de la fotosíntesis y el crecimiento, la pérdida de área foliar y la clorosis de las hojas (Miedema, 1982). En general, cualquier disminución en la temperatura del suelo puede afectar el crecimiento, la absorción de nutrientes, la producción de hormonas en la raíz, así como la elongación de las hojas (Richner *et al.*, 1996). En un caso particular, Raper y Thomas (1972) determinaron que la baja temperatura continua induce una elongación anormal de las hojas superiores al afectar la división celular de las hojas de tabaco.

Generalmente, las plantas originarias de las regiones templadas exhiben un amplio grado de tolerancia al frío y pueden incrementar su resistencia al congelamiento si hay una exposición previa a



temperaturas de enfriamiento sin llegar al congelamiento. Este proceso es conocido como aclimatación (Thomashow, 1999). Por otro lado, las plantas de orígenes tropical o subtropical, en general son sensibles al estrés por frío y carecen del mecanismo de aclimatación (Levitt, 1980). La respuesta de las plantas al estrés por temperaturas por debajo de 0 °C y que se exponen previamente a temperaturas moderadamente bajas puede ser dividida en tres distintas fases: la aclimatación, el congelamiento y la recuperación después del congelamiento (Li *et al.*, 2008).

Las bases moleculares de la aclimatación al frío y la tolerancia adquirida al congelamiento en plantas, principalmente en *A. thaliana* y en cereales de invierno, han sido muy estudiadas. Para adaptarse al estrés por frío, durante la aclimatación, se modifica la expresión genética y el metabolismo (Chinnusamy *et al.*, 2010).

Una amplia gama de estudios indican que los sistemas membranosos de la célula son el sitio primario del daño por congelamiento en las plantas, debido a la deshidratación inducida por el estrés por frío (Steponkus, 1984). Contra este y otros daños, las plantas que presentan resistencia al congelamiento despliegan un gran número de mecanismos que involucran tanto a las membranas como al interior celular y que están orquestados por vías de transducción que procesan y responden a la señal de baja temperatura que dispara el proceso de aclimatación.

1.3 Percepción y transducción de señales durante el estrés por frío

En mamíferos se han identificado receptores específicos para la baja temperatura, incluyendo el receptor de mentol (Peier *et al.*, 2012) y más recientemente el TRPA1 (por sus siglas en inglés transient receptor potential cation channel family member A1) (Karashima *et al.*, 2009). Los receptores TRP son una clase específica de canales de iones con actividades y dominios característicos de proteínas transmembranales. Desafortunadamente, esta información es de poca ayuda en el entendimiento de la percepción del frío en las plantas, ya que el análisis *in silico* de la secuencia genómica indica que las plantas no poseen canales TRP (Knight y Knight, 2012).

Hasta ahora, no se han identificado sensores para las bajas temperaturas en las plantas. Sin embargo, las plantas pueden percibir las bajas temperaturas a través de cambios en las propiedades fisicoquímicas de los lípidos membranales, debido a que la fluidez de la membrana se reduce durante la aclimatación (Orvar *et al.*, 2000). Este cambio de fluidez responde de manera inmediata a la temperatura, pues es una propiedad que depende de la estructura y composición de los lípidos membranales y por ello no necesita de una proteína o un elemento transductor que dispare este cambio de la conformación de los lípidos.

En general, cuando los organismos poiquiloterms tales como bacterias, plantas y peces se exponen a temperaturas más bajas que las de sus condiciones normales de crecimiento, sus membranas se



rigidizan gracias a las propiedades de sus lípidos. Estos organismos logran adaptarse a las nuevas condiciones a través de la insaturación de los ácidos grasos de sus lípidos membranales, lo que fluidifica nuevamente a las membranas. Particularmente en cianobacterias, se determinó que el aumento rápido del grado de insaturación de los ácidos grasos, correspondió a un aumento de la expresión del gen de una desaturasa. Además, la disminución de la temperatura produjo un cambio en la actividad de la histidina cinasa Hik33, solo sensible al cambio en la fluidez membranal inducida por frío (Los y Murata, 2000).

La hipótesis de que la membrana plasmática es el sensor primario de la percepción por frío en las plantas se sustenta por varios estudios. La mutante de *fad2* de *A. thaliana* defectuosa en la oleato desaturasa exhibe rigidización de la membrana y sensibilidad al estrés por frío, sugiriendo la relación de la percepción del estrés por frío debido a la rigidez de la membrana plasmática (Vaultier *et al.*, 2006). Esta fluidez en la membrana plasmática produce cambios en las regiones de los microdominios que conducen al re-arreglo de la actina del citoesqueleto, con la posible activación de los canales de Ca^{2+} durante la aclimatación (Figura 1) (Orvar *et al.*, 2000).

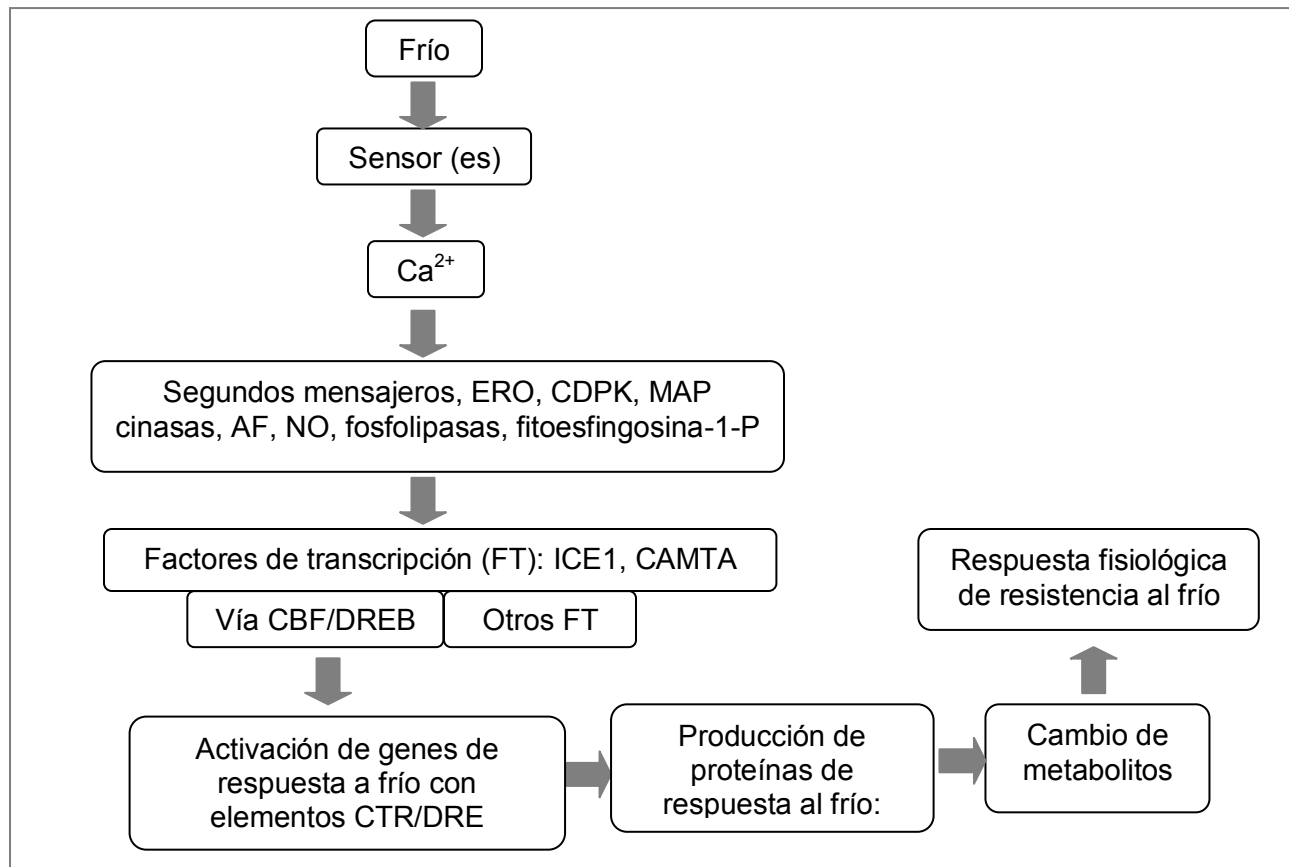


Figura 1. Esquema ilustrativo de la respuesta molecular de las plantas a las temperaturas bajas. AF (ácido fosfatídico), CAMTA (activador transcripcional de unión calmodulina), CBF/DREB (por sus siglas en inglés, C-repeat-binding factor/dehydration responsive element-binding factor), CDPK (Proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+}), CTR/DRE (elementos C-repeat y de respuesta a deshidratación), ERO (especies reactivas de oxígeno), NO (óxido nítrico), MAP cinasas (proteínas cinasas activadas por mitógenos).



La señalización del Ca^{2+} nuclear es importante en la transcripción génica en plantas (Mazars *et al.*, 2011), ya que se ha demostrado que las proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPK) funcionan como reguladores positivos en la expresión génica y la tolerancia al frío en las plantas (Saijo *et al.*, 2010), en tanto que el sensor de Ca^{2+} calmodulina 3 es un regulador negativo (Townley *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha identificado al activador transcripcional de unión a calmodulina (*CAMTA3*) como un regulador positivo de la expresión del factor de transcripción CBF2 (por sus siglas en inglés C-repeat binding factor 2) a través de la unión a un elemento regulador en su promotor (Doherty *et al.*, 2009), el cual está involucrado en la regulación de genes de respuesta a frío.

Además de la membrana plasmática, el cloroplasto también juega un papel importante en la percepción de la temperatura del ambiente. A bajas temperaturas hay un desequilibrio entre la capacidad de tomar la energía de la luz y la capacidad para disipar esta energía a través de la actividad metabólica, lo que causa un exceso de presión sobre la excitación del fotosistema II (PSII), llevando a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Miura *et al.*, 2013). Las ERO son tóxicas y causan daño a las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y al DNA, lo que finalmente lleva a la muerte celular.

La fosforilación de proteínas en respuesta al frío y la supresión de la actividad de las proteínas fosfatasas son esenciales en la percepción de las bajas temperaturas (Figura 1). Las cascadas de MPK (Proteínas cinasas activadas por mitógenos) están implicadas en la regulación de la señalización y la tolerancia al frío. En particular, en *A. thaliana*, la MPK4 y la MPK6 son fosforiladas por MKK2 (MAP kinase kinase 2) cuando la planta se expone al frío. Además, las plantas que expresan una MKK2 activada constitutivamente, exhiben tolerancia al frío y la regulación de los CBF, los cuales a su vez activan genes de respuesta al frío (Teige *et al.*, 2004). Dutilleul *et al.*, (2012) demostraron que sólo MPK6, pero no MPK4, está involucrada en la respuesta al frío. Sin embargo, la participación de otras MPK en respuesta al frío no se puede excluir, debido a que la doble mutante *mpk9/mpk12* exhibe un cierre de estomas reducido tras la estimulación con el frío (Jammes *et al.*, 2009). Se ha sugerido la acción de la fosfolipasa C río arriba de la cascada MPK9/MPK12 llevando al cierre de los estomas como una respuesta al estrés por frío (Saucedo-García *et al.*, 2015).

Los lípidos o las moléculas derivadas de estos son participantes importantes en la respuesta al frío. Por ejemplo, en *A. thaliana* se ha observado un incremento en los niveles del ácido fosfatídico por la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana dentro de los primeros minutos de exposición a frío. Se ha demostrado que dicha hidrólisis es catalizada por las fosfolipasas C y D (Ruelland *et al.*, 2002). Además de las moléculas derivadas de los fosfolípidos, recientemente se ha demostrado que los esfingolípidos son moléculas señalizadoras durante el estrés por frío ya que se observado un incremento de los niveles de fitoesfingosina-1-fosfato durante el proceso de aclimatación, y que esto



es catalizado por la cinasa de bases de cadena larga LCBK2. El incremento de fitoesfingosina-1-P lleva a la activación de la MPK6 durante la exposición a frío (Dutilleul *et al.*, 2012).

El óxido nítrico, una especie reactiva del nitrógeno, también participa en la transducción de la señal por frío, funcionando como un regulador negativo de la síntesis de fitoesfingosina-1-P y fosoesfingolípidos. En *A. thaliana* la expresión de *CBF1* y *CBF3*, está regulada positivamente por el óxido nítrico, mientras que la expresión de *CBF2* permanece sin alteraciones. Además de los CBF, el óxido nítrico regula positivamente a los genes de respuesta al frío *COR15a*, *LT130* y *LT178* (Cantrel *et al.*, 2011).

1.4 Regulación de los genes de respuesta a frío. La vía ICE-CBF/DREB

La respuesta al frío a nivel molecular implica una reprogramación génica de la planta. La vía de respuesta CBF/DREB1 es importante para la producción de proteínas de respuesta a frío. En *A. thaliana*, hay tres genes *CBF/DREB1* (por sus siglas en inglés C-repeat-binding factor/dehydration responsive element-binding factor 1) que están involucrados en la regulación de la expresión de los genes de respuesta a frío: *CBF1/DREB1B*, *CBF2/DREB1C* y *CBF3/DREB1A*.

Las proteínas CBF pertenecen a la familia de proteínas de unión a DNA AP2/EREBP (Apetala / proteína de unión de elementos de respuesta al etileno) (Riechman y Meyerowitz, 1998) y se unen a elementos regulados en el DNA que determinan la respuesta al frío y a deshidratación (DRE) (Yameguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994) como el también llamado C-repeat (CTR) (Baker *et al.*, 1994). Los elementos CTR/DRE contienen la secuencia central conservada CCGAC, la cual es suficiente para inducir la transcripción génica con estrés por frío (Baker *et al.*, 1994; Yameguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994) y están presentes en muchos genes inducibles por frío (Thomashow *et al.*, 1999).

El análisis genómico indica que los genes *CBF* están organizados en tándem en el cromosoma 4 de *A. thaliana* (Medina *et al.*, 1999). *CBF1* y *CBF3* son inducidos al mismo tiempo y antes que *CBF2*, el cual es un regulador negativo de *CBF3* y de *CBF1*. Se piensa que *CBF3* regula la expresión de *CBF2* (Novillo *et al.*, 2004). Las funciones de *CBF1* y *CBF3* difieren de *CBF2* y actúan aditivamente para inducir el conjunto de genes de respuesta a *CBF* requerido para completar el proceso de aclimatación (Novillo *et al.*, 2007).

La vía *CBF* (principalmente *CBF3*) está controlada por un factor de transcripción tipo MYC, llamado ICE1 (por sus siglas en inglés, INDUCER OF CBF EXPRESION), este factor se puede unir a elementos cis de reconocimiento MYC (CANNTG) en el promotor de *CBF3* y sus regulones durante la aclimatación (Chinnusamy *et al.*, 2003). Aproximadamente el 40 % de los genes *COR* (por sus siglas



en inglés Cold responsive genes) y el 46% de los factores de transcripción regulados por frío son regulados por ICE1 (Lee *et al.*, 2005).

La mutación en *ice1* afecta la inducción temprana de *CBF1* y *CBF2*, pero no en momentos posteriores (Chinnusamy *et al.*, 2003), sugiriendo que otras proteínas tipo ICE median la inducción por frío de *CBF1* y *CBF2*. ICE1 se regula por ubiquitinación (Dong *et al.*, 2006) y sumoilación (Miura *et al.*, 2007). Sin embargo, se desconocen los mecanismos precisos para la activación del ICE1, así como para la transducción de la percepción y los segundos mensajeros desencadenados por el ICE1.

1.5 Genes regulados por frío

Se ha mostrado que en plantas la expresión de los genes *COR* es crítica para la tolerancia y la aclimatación al frío (Figura 1). En *A. thaliana* los genes *COR78/RD29A*, *COR47*, *COR15A* y *COR6.6* codifican deshidrinas del grupo LEAII (Ingram y Bartels, 1996). Se piensa que las proteínas LEA son importantes para la estabilización de la membrana y para evitar la agregación de las proteínas (Hundertmark y Hinch, 2008). Por ejemplo, el gen *COR15a* codifica un polipéptido de 15 KDa, el cual es dirigido al cloroplasto (Lin y Thomashow, 1992). Durante la importación al cloroplasto se remueve la secuencia señal resultando en un polipéptido maduro designado como COR15am que se localiza en el estroma del cloroplasto y evita la formación de la fase hexagonal II por la alteración de la curvatura intrínseca de la envoltura interna del cloroplasto que ocurre cuando baja la temperatura (Steponkus *et al.*, 1998).

Las deshidrinas ERD10 (de respuesta temprana a deshidratación 10) y ERD14 de repuesta a frío, son proteínas que funcionan como chaperonas e interactúan con las vesículas de los fosfolípidos a través de fuerzas electrostáticas (Kiyosue *et al.*, 1994; Kovacs *et al.*, 2008). También se induce la expresión de las proteínas HSP (proteínas de choque térmico) con el frío en las plantas y funcionan en la protección de la membrana, en el replegado de las proteínas desnaturalizadas y evitando la agregación de las proteínas (Renaut *et al.*, 2006; Timperio *et al.*, 2008).

1.6 El papel de la membrana plasmática en la resistencia a las bajas temperaturas

La membrana plasmática es la principal interface entre el medio extracelular e intracelular y actúa como una barrera semipermeable permitiendo la entrada y salida de agua durante el ciclo de congelamiento/descongelamiento. También sirve como una barrera para excluir la implantación de la nucleación de cristales de hielo por el hielo extracelular.

Todas las membranas celulares son vulnerables a la desestabilización inducida por el frío, por lo que el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática es de primordial importancia para la sobrevivencia, jugando un papel crítico durante un ciclo de congelamiento/descongelamiento. Con mayor frecuencia, la formación de hielo ocurre primero en la superficie de las plantas por nucleación



heterogénea. Subsecuentemente, la formación del hielo se propaga a la matriz intracelular. Por el gradiente de potencial químico formado fuera de la célula y la solución sin congelar dentro de ella, el agua sale y se congela fuera de la célula. Este evento resulta en la deshidratación celular (Uemura y Steponkus, 1999).

En protoplastos aislados de hojas no aclimatadas, la deshidratación inducida por congelamiento conduce a diferentes lesiones, la incidencia de las cuales depende del grado de deshidratación y está en función directa de la temperatura a la que son enfriados los protoplastos. A las temperaturas LT_{50} (temperatura letal 50 o la temperatura a la cual el 50 % de los protoplastos son dañados) o temperaturas más bajas, la contracción osmótica inducida por congelamiento resulta en la vesiculación endocítica de la membrana plasmática. Aunque la vesiculación endocítica *per se* no es perjudicial, la gran reducción de la superficie de la membrana plasmática es irreversible. Consecuentemente la lisis ocurre antes de que los protoplastos recuperen su volumen original durante el descongelamiento del medio de suspensión, lo cual es referido como lisis inducida por expansión (EIL) (Dowgert y Steponkus, 1984; Gordon-Kamm y Steponkus, 1984).

Cuando se congelan los protoplastos no aclimatados, la deshidratación llega a ser más severa y el daño se manifiesta como una pérdida de la respuesta osmótica (LOR). La LOR de los protoplastos no aclimatados es una consecuencia de la formación de la fase hexagonal II (H_{II}) inducida por congelamiento en regiones de la membrana plasmática puesta en estrecha aposición con varias endomembranas (Gordon-Kamm y Steponkus, 1984b). La fase H_{II} es un arreglo que pueden adoptar los lípidos membranales y que es diferente al acomodo clásico de bicapa. En la fase H_{II} los lípidos adoptan estructuraciones de cilindros paralelos largos en los que los centros contienen agua, mientras que las cadenas acílicas interaccionan con las de los cilindros vecinos. El daño de los protoplastos aclimatados es manifestado como LOR, pero no ocurre la formación de la fase H_{II} (Uemura y Steponkus, 1999).

Entre las endomembranas se observa más frecuentemente a la envoltura de los cloroplastos como uno de los participantes para formar la fase H_{II} con la membrana plasmática (Webb *et al.*, 1994; Uemura *et al.*, 1995). Esta forma de daño es referida como la pérdida de la respuesta osmótica asociada con la fase H_{II} (LOR- H_{II}).

Durante la aclimatación, la estabilidad de la membrana plasmática a muy bajas temperaturas se incrementa, en parte, como una consecuencia de las alteraciones en su composición lipídica. Se ha estudiado el efecto de la aclimatación en la composición lipídica de la membrana plasmática de *A. thaliana* (Uemura *et al.*, 1995), se observa un incremento en la proporción de fosfolípidos de la membrana plasmática después de la aclimatación al frío (Tabla 1). Esto coincide con lo observado en



especies herbáceas, en hojas de centeno (Uemura y Yoshida, 1984) y en hojas de avena (Uemura y Steponkus, 1994). Se ha asociado el incremento en la proporción de fosfatidilcolina en la membrana plasmática con la disminución en la incidencia de la lisis inducida por expansión durante la aclimatación al frío (Steponkus *et al.*, 1990).

En centeno y avena, el incremento de PL durante la aclimatación al frío está asociado al incremento de especies insaturadas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Uemura y Steponkus, 1994). Estos cambios también ocurren en *A. thaliana* (Uemura *et al.*, 1995) (Tabla 1). Se ha reportado una disminución en la tendencia de la formación de la fase H_{II} inducida por congelamiento después de la aclimatación, principalmente por el aumento en la proporción de fosfolípidos insaturados.

La proporción de cerebrósidos (que son un tipo de esfingolípidos) en la membrana plasmática, antes y después de la aclimatación al frío, varía entre las especies de plantas. La proporción de cerebrósidos en la membrana plasmática de *A. thaliana* es baja con respecto a la proporción de fosfolípidos antes de la aclimatación y disminuye durante la aclimatación al frío (Uemura *et al.*, 1995).

Tabla 1. Composición lipídica de la membrana plasmática aislada de hojas de *A. thaliana* no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC). Los resultados son el promedio \pm SD de tres determinaciones (Uemura *et al.*, 1995)

Lípido	NA	AC
	% en mol de lípidos totales	
Fosfolípidos	46.8 \pm 1.1	57.1 \pm 1.5
Cerebrósidos	7.3 \pm 1.01	4.3 \pm 1.4
Esteroles libres	37.7 \pm 1.1	31.2 \pm 1.9
Esteril glucósidos	4.9 \pm 0.6	4.6 \pm 0.9
Acil esteril glucósidos	3.4 \pm 0.4	2.9 \pm 0.3

Aunque hubo diferencias substanciales en la proporción de esteroles libres y formas glicosiladas de los esteroles, esteril glucósidos y acil esteril glucósidos de la membrana plasmática entre diferentes especies, los cambios en la proporción relativa durante la aclimatación al frío fueron generalmente muy pequeños. En *A. thaliana*, hubo una disminución en la proporción de esteroles libres durante la aclimatación al frío, pero poco cambio en las proporciones de esteril glucósidos y acil esteril glucósidos (Uemura *et al.*, 1995).



2. MEMBRANA PLASMÁTICA

Las membranas biológicas definen los límites externos de las células y regulan el tráfico molecular; en células eucariotas dividen el espacio interno en compartimientos discretos para segregar procesos y componentes. Son continuas, flexibles, auto selladas y selectivamente permeables a solutos polares y/o cargados eléctricamente (Nelson y Cox, 2009).

La membrana plasmática forma el límite exterior de la célula viva (Buchanan *et al.*, 2000) y posee características y propiedades comunes a todas las membranas biológicas:

- a) Están constituidas por lípidos, proteínas y carbohidratos (Nelson y Cox, 2009)
- b) Presentan estructura laminar formada por dos monocapas, con la cabeza de los lípidos a lo largo de las dos superficies y sus cadenas acilo formando el dominio no polar en medio. En el modelo del mosaico fluido (Singer y Nicolson, 1972), las membranas constituyen una bicapa lipídica en la cual las proteínas insertadas y los lípidos podían difundirse libremente en el plano lateral de la membrana. Sin embargo, en el modelo actual, mismo que contiene las características iniciales, los lípidos y las proteínas no están distribuidos homogéneamente, tienen la habilidad para separarse en microdominios que difirieren en sus composiciones de lípidos y de proteínas. Los microdominios o balsas lipídicas son descritas como dominios dinámicos enriquecidos en colesterol, esfingolípidos, y proteínas (Simon e Ikonen, 1997; Brown y London, 1998), mismos que tienen un papel importante en diferentes procesos moleculares (Lingwood y Simons, 2010).
- c) Son asimétricas (Devaux y Morris, 2004), es decir, tiene diferentes composiciones lipídicas en la cara externa que en la interna de la bicapa. La asimetría de los lípidos se puede generar por la actividad de enzimas específicas (Van Meer, 2008).
- d) Presentan movilidad. Debido a que las moléculas de lípidos individuales en una bicapa no están unidos entre sí covalentemente, son libres para moverse. El estudio del movimiento de fosfolípidos en las bicapas ha revelado que estas moléculas se pueden difundir lateralmente, rotar, saltar y sumergirse, flexionar sus colas y efectuar un movimiento transmembranal (flip-flop) (Buchanan *et al.*, 2000).
- e) Presentan mesomorfismo liotrópico. Debido a que las membranas están compuestas de anfífilos y que estos se estructuran como una bicapa en el medio acuoso de las células, presentan mesomorfismo liotrópico. Esta propiedad consiste en la capacidad que tienen los anfífilos de adoptar en medios acuosos diferentes formas de asociación estructural que son regulares y ordenadas. De acuerdo a lo anterior y a su organización lipídica, las estructuras laminares de una bicapa pueden ser divididas en tres fases o estados liotrópicos principales: La fase sólida ordenada, la fase líquida ordenada y la fase líquida desordenada. La presentación de cada fase depende de las especies lipídicas, la insaturación de las cadenas



acíclicas, la temperatura, la presión y otros parámetros. En la fase sólida ordenada, los lípidos están muy rígidos, estrechamente empaquetados y el movimiento lateral es muy lento. En la fase líquida desordenada, los lípidos están mucho más relajados, menos condensados, las cadenas acíclicas son móviles, están menos compactadas con las vecinas, y los coeficientes de difusión lateral son altos, especialmente a temperaturas elevadas (Mouritsen, 1991). La temperatura de transición de fase o T_m es definida como la temperatura a la cual las membranas compuestas de un solo tipo de lípidos cambia de fase sólida ordenada a la fase líquida ordenada y desordenada. La T_m depende de la longitud y el grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos (Silvius *et al.*, 1979).

2.1 LOS LÍPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Los lípidos de la membrana plasmática son anfipáticos, es decir, contienen tanto dominios estructurales hidrofílicos como hidrofóbicos. La composición lipídica de las diferentes membranas varía según la endomembrana, el tipo celular y el organismo (Van Meer *et al.*, 2008).

2.1.1 Glicerolípidos

Los glicerolípidos de la membrana plasmática tienen dos ácidos grasos y una cabeza polar unidos al esqueleto del glicerol (Ohlrogge y Browse, 1995). Los ácidos grasos de los glicerolípidos pueden estar saturados o insaturados en *trans* o en *cis*, siendo esta última orientación, su número y posición, las que los hacen fluidos a temperatura ambiente (Buchanan *et al.*, 2000) y por ello tienden a formar la fase líquido desordenada.

2.1.2 Esfingolípidos

Los esfingolípidos representan, según una estimación general, $\geq 40\%$ de los lípidos de la membrana plasmática en las plantas (Sperling *et al.*, 2005). Sin embargo, aún no hay estudios que permitan conocer las proporciones exactas y las diferentes especies de cada una de las tres principales clases de lípidos membranales. El esqueleto hidrofóbico de los esfingolípidos es la ceramida, la cual está compuesta de un ácido graso unido a través de un enlace amida a una base de cadena larga (BCL) (Chen *et al.*, 2009). Estos ácidos grasos tienen de 14 a 32 carbonos con saturaciones o bien insaturaciones en *trans*, lo cual le da una forma más rígida, cilíndrica, más larga y estrecha que la de los glicerolípidos, por lo que se empaquetan más estrechamente. Su presencia rígida en la membrana es compensada por los esteroides, que tienen un efecto fluidificante y los cuales son los principales lípidos menos polares de las membranas celulares. Con los esteroides, los esfingolípidos se pueden acoplar paralelamente en la bicapa, pues sus formas se complementan para configurar zonas muy compactas.



Una característica de los esfingolípidos es el alto grado de hidroxilación de los ácidos grasos y de las BCL que componen sus esqueletos de ceramida (Markham *et al.*, 2013). Los grupos hidroxilo de los carbonos 1 y 3 de la BCL se forman de los precursores serina y palmitoil-CoA, respectivamente, mientras que el tercer grupo hidroxilo en el carbono 4 es adicionado después de la síntesis de la BCL por hidroxilasas específicas (Kaul y Lester, 1978).

Las BCL también pueden ser insaturadas por: un doble enlace en *trans* entre los carbonos 4 y 5 (o en posición $\Delta 4$) de la BCL dihidroxilada y/o un doble enlace en *cis* o *trans* entre los carbonos 8 y 9 (o en posición $\Delta 8$) de las BCL dihidroxiladas o trihidroxiladas (Lynch y Dunn, 2004).

Las BCL más abundantes en plantas están compuestas por un máximo de ocho diferentes bases esfingoideas de 18 carbonos derivadas de la *D-eritro*-esfinganina (Sperling y Heinz, 2003) (Figura 2).

Los ácidos grasos que componen las ceramidas de las plantas consisten de ácidos grasos de cadena larga de >14 C y ácidos grasos de cadena muy larga con longitudes de cadena de hasta 32 carbonos y que están, ya sea saturados o monoinsaturados con un doble enlace *cis* $\omega 9$ (Chen *et al.*, 2009). Usualmente contienen un grupo α -hidroxilo y pueden también contener un doble enlace en la posición 9 (Imai *et al.*, 2000).

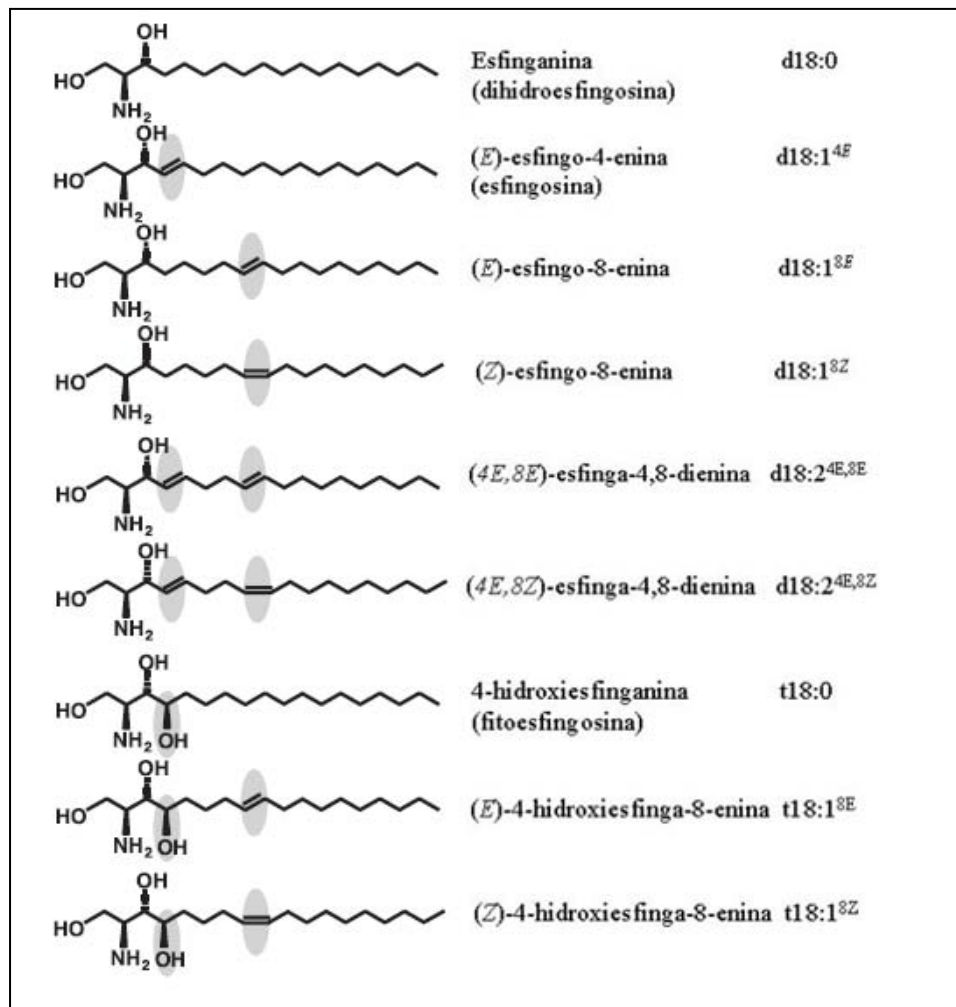


Figura 2. Estructuras de las bases de cadena larga comunes de plantas. Todas las bases dihidroxiladas son *D-eritro* y todas las bases esfingoides trihidroxiladas tienen una configuración *D-ribo* (tomada de Sperling y Heinz, 2003).

La porción hidrofílica de los esfingolípidos consiste de un grupo polar que está unido al C-1 de la fracción de la BCL de la ceramida. Se ha encontrado una amplia gama de diferentes grupos de cabeza polar en eucariotes. Estos incluyen residuos de carbohidratos que pueden ser simples como un residuo de glucosa o galactosa, y que han sido encontrados en glucosil y galactosilceramidas, o bien carbohidratos complejos como las cadenas extensas de residuos de azúcar encontrados en gangliósidos. Otros grupos de la cabeza polar incluye a la fosfocolina que se encuentra en las esfingomielinas de mamíferos y en fracciones con base de fosfoinositol que son característicos de esfingolípidos de levaduras (Imai *et al.*, 2000).

Las dos mayores sub-clases de esfingolípidos complejos identificados en plantas son glucosil ceramidas o glucocerebrósidos o esfingolípidos neutros y glucosil inositolfosfoceramidas o esfingolípidos ácidos (Figura 3) (Markham *et al.*, 2007). Se debe resaltar que cada especie de esfingolípidos complejos puede diferir en el tipo de BCL, ácido graso y cabeza polar, por lo que la variedad de estructuras de esfingolípidos complejos es enorme.

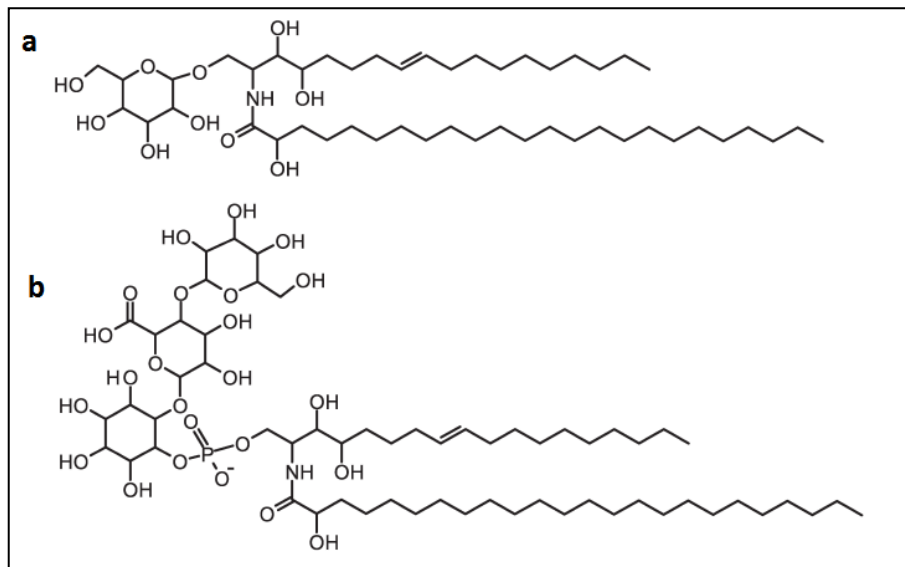


Figura 3. Estructura de los dos grupos de esfingolípidos complejos más abundantes en plantas. a) Glucosil ceramidas y b) Glucosilinositol fosfoceramidas.



2.1.2.1 Síntesis de esfingolípidos

La biosíntesis de los esfingolípidos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi.

a) Síntesis de ceramida

La síntesis de los esfingolípidos comienza con el ensamble enzimático de la parte hidrofóbica, es decir, de la ceramida. Ésta se inicia con la condensación de la serina con la palmitoil-CoA para formar 3-cetoesfinganina. La reacción es catalizada por la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT). Se ha demostrado que la SPT de *A. thaliana* consiste de dos subunidades, LCB1 y LCB2. Aunque ambas subunidades comparten similitudes estructurales, el residuo catalítico de lisina reside en la subunidad LCB2 (Tamura *et al.*, 2001). Se cree que la subunidad LCB1 funciona estabilizando a la subunidad LCB2 (Han *et al.*, 2004). En *A. thaliana*, la subunidad LCB2 tiene dos variantes génicas o isógenas: *LCB2a* y *LCB2b*, los cuales son funcionalmente redundantes (Chen *et al.*, 2008).

En un segundo paso, la 3-cetoesfinganina es reducida por la 3-cetoesfinganina reductasa, para formar esfinganina (d18:0), la cual es utilizada para ensamblar a la ceramida en una condensación de la BCL esfinganina con el ácido graso-CoA, una reacción que es catalizada por la ceramida sintasa o esfinganina *N*-aciltransferasa, enzima que también se encuentra en dos versiones, una de las cuales se inhibe con la fumonisina B1 (Markham *et al.*, 2011).

Por su parte, los ácidos grasos de cadena muy larga surgen de la elongación de la cadena acílica. Ésta se sintetiza originalmente como una cadena de 16C a partir de incrementos de dos carbonos que involucran cuatro reacciones: (1) la condensación de malonil-CoA con una cadena acil-CoA, (2) la reducción del intermediario 3-cetoacil-CoA resultante, (3) la deshidratación del intermediario 3-hidroxiacil-CoA formado y (4) reducción del producto de deshidratación, la enoil-CoA, para formar la cadena acil-CoA elongada con dos carbonos (Blacklock y Jaworski, 2006).

b) Síntesis de esfingolípidos complejos

La mayoría de las ceramidas producidas en las células de las plantas sirven como sustrato para la unión de los grupos polares de la cabeza para formar esfingolípidos complejos, que son los componentes esfingolipídicos más abundantes de las membranas. Las BCL libres se encuentran en cantidades muy bajas y las ceramidas, aunque son más abundantes que las BCL libres, lo son mucho menos que los esfingolípidos complejos. Estas reacciones de síntesis de esfingolípidos complejos consisten predominantemente en la incorporación de un residuo de glucosa a la ceramida para formar GluCer, catalizado por una GluCer sintasa, o la incorporación de un residuo de fosforinositol para formar una inositolfosforil ceramida (IPC) catalizado por la IPC sintasa, siendo el IPC el precursor de



los glucosil inositol fosfoceramidas o GIPC (Chen *et al.*, 2009), los cuales pueden tener varios residuos de azúcares incorporados por glucosil transferasas.

c) Modificaciones a las bases de cadena larga

Las ocho bases de cadena larga que derivan de la esfinganina son formadas por al menos una de tres enzimas:

(1) La hidroxilasa C-4 de BCL, codificada en *A. thaliana* por los genes *SBH1* y *SBH2*; cataliza la introducción de un grupo hidroxilo en la posición C4 de la BCL dihidroxilada (Chen *et al.*, 2008).

(2) La desaturasa $\Delta 4$ de BCL que introduce un doble enlace en la posición $\Delta 4$ exclusivamente en orientación *trans* (Michaelson *et al.*, 2009).

(3) La desaturasa $\Delta 8$ de BCL, codificada en *A. thaliana* por los genes *SLD1* y *SLD2*; introduce un doble enlace en el carbono 8 de las BCL ya sea en *cis* o en *trans* (Chen *et al.*, 2012).

d) α -Hidroxilación de los ácidos grasos

Una característica distintiva de las ceramidas componentes de los esfingolípidos de la mayoría de los eucariotes, es la presencia de un grupo α -hidroxilo en el residuo de ácido graso, lo cual resulta de la actividad de una de las dos α -hidroxilasas de ácidos grasos de esfingolípidos (Smith *et al.*, 2013).

2.1.2.2 Funciones de los esfingolípidos

a) Los esfingolípidos como componentes estructurales de la membrana plasmática

Las dos mayores sub-clases de esfingolípidos complejos identificados en las plantas son las glucosilceramidas o glucocerebrósidos, que comprenden ~30 % de los esfingolípidos de las hojas de *A. thaliana* (Markham *et al.*, 2006; Markham y Jaworski, 2007) y las glucosil inositol fosfoceramidas, las cuales comprenden ~60 % de los esfingolípidos de las hojas (Markham y Jaworski, 2007).

Los estudios que utilizan mutantes que carecen de la subunidad LCB2 de la SPT de *A. thaliana* demuestran que los esfingolípidos son esenciales para la viabilidad de las células de la planta (Dietrich *et al.*, 2008). En este trabajo se demostró que las mutaciones que producen genes inactivos codificantes de las subunidades de la SPT resultan letales para la planta.

b) Los esfingolípidos en la señalización y la regulación celular

Además de la función estructural de los esfingolípidos en las membranas celulares de las plantas, las BCL tanto fosforiladas como no modificadas covalentemente juegan un papel en la señalización de diversos procesos: como segundos mensajeros en las vías de transducción que llevan al cierre de los



estomas (Ng *et al.*, 2001), a la muerte celular programada (Saucedo-García *et al.*, 2011) y en la respuesta a bajas temperaturas (Dutilleul *et al.*, 2014).

Los estomas son poros en la epidermis de las hojas y tallos que son importantes para la captación de dióxido de carbono durante la fotosíntesis y para la reducción de la pérdida de agua por la transpiración. Las células guarda regulan la apertura y cierre estomatal por respuesta a diversos ambientes químicos y ambientales, tales como la intensidad de la luz, la temperatura, la humedad, los niveles de CO₂ y las señales hormonales. La esfingosina–fosfato es un segundo mensajero que participa en una vía de señalización ante sequía y por ello facilita el cierre de los estomas (Ng *et al.*, 2001).

Enfoques farmacológicos de la adición de BCL y ceramidas a cultivos de células de plantas y tejidos apoyan el papel de esas moléculas como mediadores de la muerte celular programada. La muerte celular programada es un evento esencial en el desarrollo y respuesta al estrés por patógenos en las plantas, entre otros procesos (Van Door y Woltering, 2005; Saucedo-García *et al.*, 2011). Una doble mutante de las hidroxilasas C-4 de BCL de *A. thaliana*, la *sbh1/sbh2*, carece completamente de BCL hidroxiladas, son plantas enanas, debido a los defectos tanto en la elongación como en la división celular y además ponen en evidencia una regulación positiva constitutiva de genes de respuesta de la muerte celular programada y de la respuesta hipersensible inducida por patógenos (Chen *et al.*, 2008).

Se ha reportado la formación de fitoesfingosina-1-fosfato y ceramida fosforilada tras la exposición a frío de las plantas (Guillas *et al.*, 2011). Este incremento en las BCL puede indirectamente regular la acumulación de las ERO (Saucedo *et al.*, 2015).

c) Los esfingolípidos en las interacciones célula-célula

Los glicofosfoesfingolípidos en las plantas participan en el reconocimiento molecular y las interacciones en las superficies de las células. Una doble mutante de la desaturasa $\Delta 8$ *slid1* y *slid2*, carece de BCL, es indistinguible de plantas silvestres crecidas bajo condiciones óptimas. Sin embargo, el crecimiento de la mutante a 0 °C desarrolla clorosis y una senescencia prematura comparada con la silvestre (Chen *et al.*, 2012). Estos datos sugieren que la desaturación $\Delta 8$ de las BCL contribuye a las propiedades estructurales de la membrana plasmática en la tolerancia a condiciones extremas del medioambiente.

2.1.3 Esteroles

Una tercera clase de lípidos membranales está conformada por los esteroides, los cuales están formados por cuatro anillos. Los esteroides de la bicapa de la membrana se comportan diferente de los



fosfolípidos, principalmente porque el dominio hidrofóbico de un esteroles es mucho más grande, planar y el grupo de cabeza polar es pequeño y no cargado (el OH de la posición 3 del esteroles) (Figura 4) (Buchanan *et al.*, 2000).

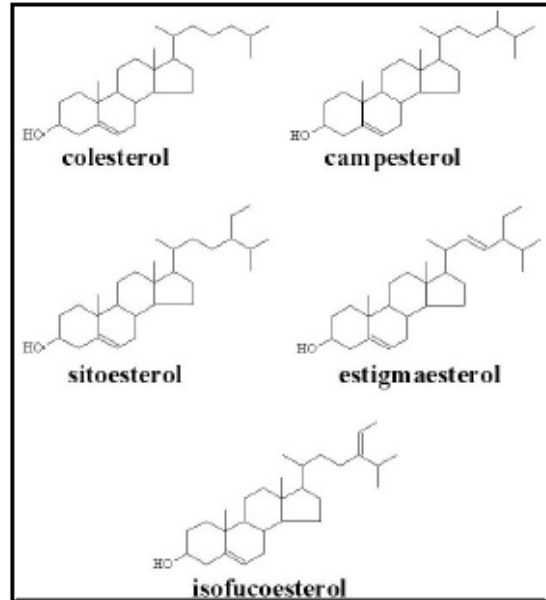


Figura 4. Estructura de los principales esteroides en las plantas (modificada de Buchanan *et al.*, 2000).

3. LA SERINA PALMITOILTRANSFERASA (SPT)

Como se mencionó previamente, el primer paso en la biosíntesis de esfingolípidos es la condensación de serina y palmitoil-CoA, una reacción catalizada por la serina palmitoiltransferasa (SPT). Los resultados recientes indican que la SPT es una enzima clave para la regulación de los niveles de esfingolípidos en las células. La regulación de la síntesis de esfingolípidos en el paso de la SPT evita una acumulación dañina de intermediarios metabólicos de esfingolípidos incluyendo las bases esfingoides y las ceramidas (Hanada, 2003).

3.1 Estructura de la SPT

La SPT se produce como un homodímero soluble en algunas bacterias (Ikushiro *et al.*, 2001). Sin embargo, en todos los eucariotes estudiados hasta la fecha, la SPT es una proteína heterodimérica asociada al retículo endoplásmico que consiste de las subunidades LCB1 y LCB2 (Hanada, 2003). Chen *et al.* (2006) demostraron que la SPT de *A. thaliana* (E.C. SPT: 2.3.1.50) tiene una configuración similar de las subunidades.



La subunidad LCB2 de *A. thaliana* (AtLCB2) fue caracterizada por Tamura *et al.* (2001). Esta proteína contiene una secuencia única, ³⁰⁷GTFTKSFG³¹⁴, la cual está relacionada a un motivo de unión a piridoxal fosfato que se encuentra únicamente en los miembros de la subfamilia α -oxamina. El residuo de lisina de este motivo forma una base de Schiff con piridoxal fosfato (Mukherjee y Dekker, 1990), un cofactor típico de las liasas. Además, el motivo GTFTKSFG está completamente conservado entre las proteínas LCB2 de *A. thaliana*, *S. cerevisiae* y de humano, sugiriendo que esos polipéptidos constituyen las subunidades catalíticas de la SPT. Dietrich *et al.* (2008) demostraron que *A. thaliana* tiene dos genes (*AtLCB2a* y *AtLCB2b*) que codifican isoformas funcionales de la subunidad LCB2. No se observaron alteraciones de esfingolípidos ni en el crecimiento en plantas mutantes de T-DNA para cada gen, pero las dobles mutantes homocigotas no fueron recuperables, lo que sugiere que esos genes son funcionalmente redundantes y la presencia de al menos uno es esencial.

LCB1 de *A. thaliana* (*AtLCB1*) está solamente relacionada en <25 % con las LCB2s, incluyendo a *AtLCB2* y otras α -oxaminas sintetas. *AtLCB1* es un gen de una sola copia y carece de una lisina en el sitio activo (Chen *et al.*, 2006). Los estudios de mutación y remodelación indican que el sitio activo de la SPT se encuentra en la interfase de la enzima heterodimérica y que los residuos de ambas subunidades están involucrados en la catálisis (Gable *et al.*, 2002). Además, se ha sugerido que LCB1 estabiliza a LCB2 (Gable *et al.*, 2000). Se ha encontrado que una mutación en el gen *LCB1* de *A. thaliana* causa la letalidad de los embriones (Teng *et al.*, 2008). Además, la supresión parcial de *LCB1* lleva a la reducción del tamaño de las plantas debido a la reducción de la expansión celular por la falta de esfingolípidos complejos que forman la matriz de la membrana plasmática (Chen *et al.*, 2006).

Ambas, la LCB1 y la LCB2 tienen un solo dominio muy hidrofóbico, el cual representa un dominio transmembranal de aproximadamente 20 aminoácidos, la LCB1 y la LCB2 parecen no estar glicosiladas. El amino y el carboxilo terminales están orientados hacia el lumen y el citosol, respectivamente, del retículo endoplásmico, teniendo el sitio activo orientado hacia el citosol (Hanada *et al.*, 2003).

En nuestro laboratorio, nos dimos a la tarea de ver la estructura de la SPT, por lo que se realizó un modelado molecular de las subunidades de esta enzima (Figura 5) a partir de su secuencia de aminoácidos. En la Figura 5 se puede observar la gran similitud entre las tres subunidades y aún más entre la subunidad LCB2a y LCB2b.

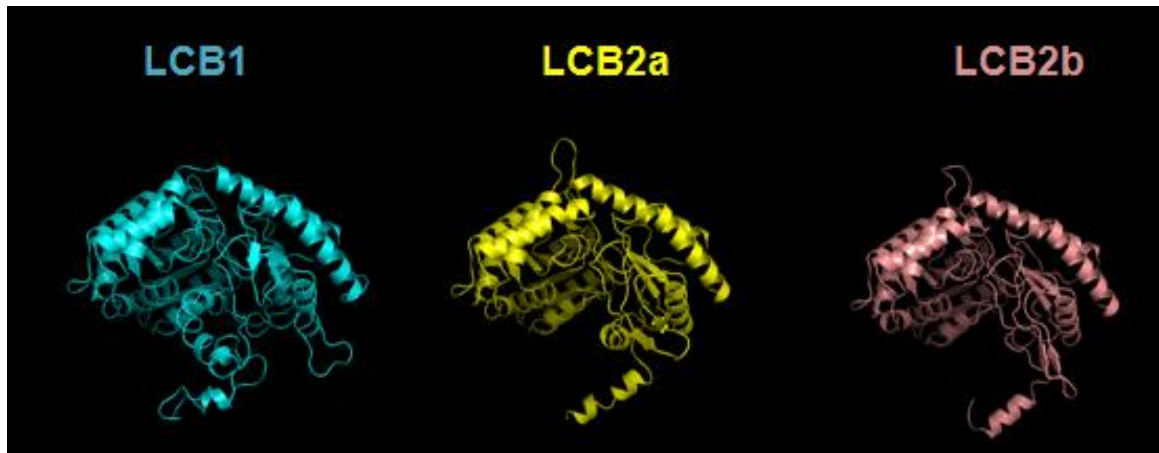


Figura 5. Modelo molecular de las subunidades de la SPT. Se muestran los modelos de las subunidades LCB1, LCB2a y LCB2b basados en la estructura de la SPT1 de *Sphingomonas paucimobilis*. Estos modelos no consideran la región transmembranal de las subunidades. El modelo se realizó en el programa pyMOL por el Dr. Ismael Bustos Jaimes (Facultad de Medicina, UNAM)

3.2 Regulación de la SPT

Un avance importante en el entendimiento de la regulación de la SPT fue el descubrimiento de una subunidad pequeña de la SPT, llamada Tsc3p, la cual se une y estimula la actividad de la SPT de levadura (Gable *et al.*, 2000). Recientemente se han identificado en humanos y mamíferos proteínas equivalentes funcionales pero sin relación estructural a Tsc3p, llamadas subunidades pequeñas de la SPT (ssSPT).

En una búsqueda de identidad usando ssSPT de humano, se identificaron dos genes de *A. thaliana* designados como *ssSPTa* y *ssSPTb*, los cuales codifican para polipéptidos de 56 aminoácidos. Como las ssSPT de humanos (Han *et al.*, 2009), las ssSPTs de *A. thaliana* interactúan físicamente con LCB1, LCB2a y LCB2b en el heterodímero de la SPT y estimulan su actividad (Kimberlin *et al.*, 2013).

Las ssSPTs de *A. thaliana* tienen un solo dominio transmembranal que comprende de 19-23 aminoácidos en la porción central de los polipéptidos y su carboxilo terminal está orientado hacia el lumen del retículo endoplásmico (Kimberlin *et al.*, 2013).

La diferencia más llamativa entre *ssSPTa* y *ssSPTb* es su nivel de expresión en los diferentes tejidos de *A. thaliana*. De todos los órganos examinados, *ssSPTa* está más expresada que *ssSPTb*. La mayor diferencia fue detectada en polen, lo cual concuerda con la letalidad del polen mostrada en la mutante *ssspta-1* (Kimberlin *et al.*, 2013).

Las evidencias, particularmente de los estudios en levadura, apuntan a una regulación compleja de la actividad de la SPT, la cual es responsable inicial de la vía de síntesis *de novo* de los niveles de esfingolípidos intracelulares. En el modelo actual de regulación (Figura 6), el heterodímero LCB1/LCB2 y las ssSPTa/b de *Arabidopsis thaliana* están en el corazón del complejo. En este modelo, los polipéptidos Orm1/2 y la fosfatasa Sac1 interactúan físicamente con el heterodímero de la SPT para regular su actividad (Breslow *et al.*, 2010). Los polipéptidos Orm1 y Orm2 regulan negativamente la actividad de la SPT en respuesta a altos niveles de esfingolípidos intracelulares (Breslow *et al.*, 2010; Roelants *et al.*, 2011). Ésta regulación negativa de la SPT es contrarrestada por la fosforilación del amino terminal de Orm1/Orm2 por la proteína cinasa Ypk en respuesta a bajos niveles de esfingolípidos intracelulares (Roelants *et al.*, 2011). En *A. thaliana* se han identificado los homólogos de Orm 1 y Orm2 (Hiellmqvist *et al.*, 2002) pero sus funciones no se han caracterizado. Es posible que las ssSPTs de *A. thaliana* faciliten o establezcan la interacción de LCB1/LCB2 y potencien así la actividad de la SPT (Kimberlin *et al.*, 2013).

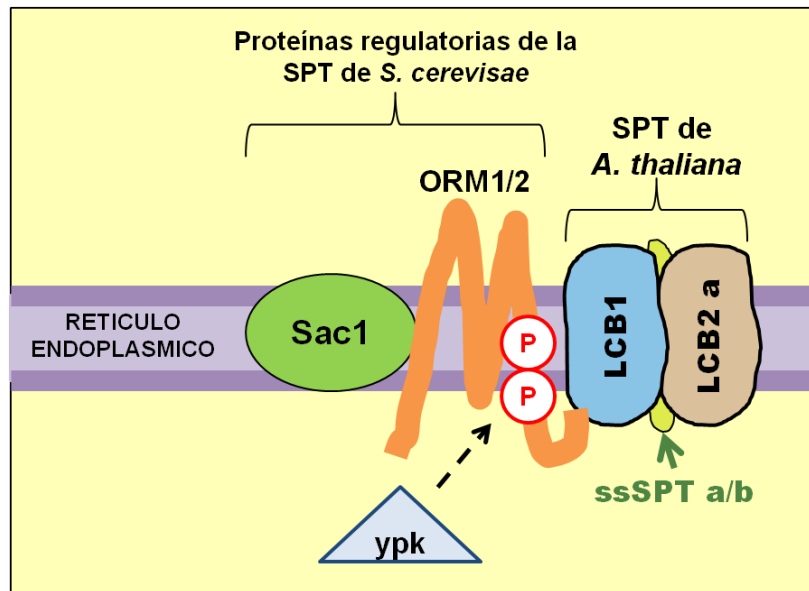


Figura 6. Modelo del mecanismo regulador de la SPT de de levadura aplicado a *A. thaliana*. El heterodímero de la SPT consiste de las subunidades LCB1 y LCB2a o LCB2b en *A.thaliana* y está asociado al retículo endoplásmico. Las subunidades pequeñas ssSPTa y ssSPTb potencian la actividad de la SPT a través de interacciones con el heterodímero LCB1/LCB2. En la levadura, la SPT contiene la estructura heterodimérica también y unos polipéptidos ORM1 y ORM2, los cuales actúan como reguladores negativos. Esta regulación está mediada por los niveles de esfingolípidos intracelulares. Bajos niveles inducen la fosforilación reversible de ORM1/2 llevada a cabo por la cinasa ypk; altos niveles producen la desfosforilación mediada por Sac1. En *A. thaliana* se han identificado homólogos de *Orm1* y *Orm2*, pero sus funciones no se han caracterizado, por lo que es probable que una regulación negativa sea efectuada por estas proteínas homólogas (modificada de Kimberlin *et al.*, 2013).



HIPÓTESIS

La disminución de los esfingolípidos complejos en la membrana plasmática durante la aclimatación al frío se debe a una menor transcripción de los genes de la serina palmitoiltransferasa.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la aclimatación al frío en el nivel de transcripción de los genes que codifican a las subunidades LCB2a y LCB2b de la serina palmitoiltransferasa, en plántulas de *A. thaliana* del genotipo silvestre y de la línea mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar los tiempos óptimos para ver el efecto del silenciamiento del gen *LCB2b* en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* usando el inductor metoxifenozida.
- b) Determinar el efecto de la aclimatación en las plántulas silvestres y de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* silenciadas y no silenciadas. Determinar los fenotipos para establecer los tiempos apropiados de aclimatación.
- c) Determinar el tiempo óptimo de exposición a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ como forma de reto al proceso de aclimatación inducido en las plantas de ambos genotipos.
- d) Determinar los niveles de un gen cuya expresión sea constante durante la aclimatación (gen de referencia).
- e) Cuantificar la expresión de los genes *LCB2a* y *LCB2b* relativa al gen de referencia en las plántulas silvestres y de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Se usaron plántulas silvestres de *A. thaliana* Col-0 y de la línea mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Esta mutante fue creada por Dietrich *et al.* (2008) a partir de una mutante progenitora (*Atlcb2a-1*), la cual posee una mutación en el gen *AtLCB2a* al tener insertado un T-DNA, dejándolo inactivo y perdiendo la capacidad de transcribirse para originar a la proteína LCB2a. Por lo que esta mutante sólo cuenta con el heterodímero LCB1/LCB2b de la enzima SPT, la cual cataliza el primer paso de la síntesis de esfingolípidos. En este fondo genético, Dietrich *et al.* (2008) construyó una horquilla de RNA que funciona como un RNAi para silenciar el gen *LCB2b*. La horquilla se expresa de manera controlada por la aplicación del insecticida metoxifenoazida. Con el fin de abreviar el nombre, en este trabajo la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* es llamada hp y se utiliza un signo positivo o negativo para hacer referencia a la aplicación o ausencia del inductor, respectivamente.

2. Siembra y crecimiento de plántulas de *A. thaliana* en caja Petri

Las semillas se colocaron en un tubo de 1.5 mL, se agregó 1 mL de NaHClO₄ al 20 % (estéril) y 1 µL de Tween 20 (concentración final de 0.1 %), se agitaron vigorosamente por 20 min, se centrifugaron en una minifuga por 10 s y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, las semillas se lavaron con 1 mL de NaHClO₄ al 20 %, se agitaron suavemente por 10 min, se centrifugaron por 10 s en una minifuga y se eliminó el sobrenadante. Las semillas se enjuagaron varias veces (mínimo 5 veces), cada vez con 1 mL de agua estéril y se agitaron durante 30 s. Después de cada lavado se centrifugaron en la minifuga por 10 s y se eliminó el sobrenadante. Por último, se agregó agua estéril a las semillas de manera que se resuspendieran fácilmente.

Las semillas desinfectadas se sembraron en cajas Petri que contenían el medio de Gamborg B-5 (3.2 g/L), agarosa al 1 % y sacarosa al 1 %. Las cajas se cubrieron con una película plástica Ega-Pack para prevenir el paso de esporas y microorganismos. Para romper la latencia, las cajas con las semillas sembradas se cubrieron con aluminio y se mantuvieron por 48 h a 4 °C, posteriormente se pasaron a la cámara de incubación a 22 °C en un fotoperiodo de 16 h oscuridad y 8 h de luz durante 3 semanas aproximadamente.

3. Siembra y crecimiento de plántulas de *A. thaliana* en maceta

Previamente a la siembra, las macetas se remojaron en HClO₄ comercial al 30 % (Cloralex) y posteriormente fueron enjuagadas con agua de la llave. El sustrato en el que se crecieron las plántulas fue compuesto de 1 ½ parte de Mix 4 Aggregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), ½ parte de vermiculita Premium Grade (Sunshine, Sun Gro Horticultura; Canada Ltd.) y



½ parte de agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlalnepantla, Edo. de México) humedecido con agua de la llave.

Las macetas se llenaron con el sustrato humedecido. Las semillas a crecer se colocaron sobre el sustrato. Al principio, las charolas con macetas se cubrieron con domos transparentes y se regaron por la orilla y superficie de cada maceta 2 veces a la semana con agua. Las plántulas se crecieron en invernadero con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a una temperatura de 22 a 25 °C.

4. Obtención de las semillas

Una vez que las plántulas alcanzaron al menos 4 semanas de edad se trasplantaron de una o tres plántulas por maceta en donde crecieron hasta la producción de semillas. Las plantas se dejaron secar y sólo se colectaron hasta las semillas que permanecieron en la vaina.

5. Inducción del silenciamiento del gen de la subunidad LCB2b

Se tomaron 5 mL del stock comercial de Intrepid® (cuyo principio activo es la metoxifenoazida) con una pipeta graduada y se colocaron en un matraz aforado de 50 mL, se llevó a la marca de aforo con agua bidestilada para obtener una solución 5:50 (v:v). De la solución resultante, se tomaron 4 mL con una pipeta graduada, se colocaron en un matraz aforado de 100 mL y se llevó hasta la marca de aforo con agua bidestilada. La concentración final de la solución fue de 1:250 (v:v).

La aspersion de la solución en las plántulas se realizó con ayuda de un atomizador y se realizaron 15 aplicaciones de manera homogénea por maceta. En estas 15 aplicaciones o disparos, se aspergieron aproximadamente 2.5 mL de la solución de Intrepid.

El grado del efecto del silenciamiento en las plántulas mutantes *Atlcb2b hp/Atlcb2a* se registró fotográficamente a partir de los fenotipos observados.

6. Determinación del tiempo de aclimatación al frío de las plántulas de *A. thaliana*

a) Plántulas que se sometieron a diferentes edades al reto de congelamiento:

Con dos semanas de edad, todas las plántulas se colocaron en aclimatación (AC), a 4 °C, y fueron sacadas periódicamente; a la primera, segunda o tercera semana, una vez terminado su tiempo de AC, se sometieron a -15 °C por 1, 2 o 3 h, enseguida se colocaron a 4 °C por la mitad de tiempo que estuvieron en congelamiento. Por último, se dejaron en recuperación a 22 °C por una semana. Se registró el fenotipo de las plántulas fotográficamente.

b) Plántulas que se sometieron a la misma edad al reto de congelamiento:

Las plántulas fueron crecidas por dos semanas y sometidas a la AC progresivamente, es decir, primero ingresaron las plántulas que estuvieron 3 semanas en AC, luego las que estuvieron 2



semanas y por último las que sólo estuvieron una semana. Todas las plántulas salieron al mismo tiempo de la AC y fueron sometidas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1, 2 o 3 h, enseguida se colocaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por la mitad de tiempo que estuvieron en congelamiento. Por último, se dejaron en recuperación a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una semana. Se registró el fenotipo de las plántulas fotográficamente.

7. Determinación del efecto del silenciamiento en la expresión del gen *LCB2b* en el fenómeno de aclimatación al frío.

Se aplicó metoxifenoazida 1:250 (v:v) a las plántulas de la línea hp de 2 semanas de edad y se generaron dos lotes de plántulas; uno para exposición a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aclimatación, AC) y otro a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (no aclimatación, NA). Las plántulas que crecieron siempre a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ se colectaron a los 0, 3, 6, 8 y 10 días después de la exposición con metoxifenoazida. Las plántulas que se sometieron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ se crecieron primero a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que el efecto del silenciamiento fue visible por daño en las hojas, es decir, a los 6 días después de la inducción. Posteriormente se pasaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las plántulas se colectaron en 2 tiempos diferentes en los que el fenotipo de daño por el silenciamiento fue similar al de las plántulas que se expusieron al inductor por 8 y 10 días a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó el registro fenotípico de las plántulas a nivel macro y microscópico. De cada uno de los tiempos establecidos se colectó la parte aérea de las plántulas de la siguiente forma: se cortaron las hojas, se registró el peso, para quitar el exceso de tierra que pudieran tener se enjuagaron las hojas con agua bidestilada, se secaron con una sanita, posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior extracción de RNA.

8. Registro fenotípico de las plántulas

Una vez que las plántulas se sometieron a los tratamientos correspondientes; NA, AC, reto de congelamiento y/o aplicación del inductor del silenciamiento, se realizó el registro fotográfico de manera macroscópica con una cámara Nikon modelo L120, con una exposición de -1.0 y utilizando una fuente de luz externa constante. De manera microscópica, el registro fotográfico se realizó con ayuda de una cámara especial acoplada a un microscopio óptico, la captura de la imagen llevó a cabo con el software Motic Images Plus 2.0.

9. Extracción del RNA

A partir de las plántulas colectadas en los tiempos establecidos en el punto 7 de la Metodología, se realizó a la extracción de RNA, proceso para el cual se ocupó material esterilizado a $120\text{ }^{\circ}\text{C}/1\text{ h}$ en todo momento, durante el proceso las muestras permanecieron en hielo y las centrifugaciones se realizaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se colocó la muestra en un mortero y se pulverizó con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se adicionaron 3 volúmenes de Trizol y se homogenizó hasta obtener una solución uniforme, la cual



se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, se transfirió a tubos de 1.5 mL (750 μ L por cada tubo) y se centrifugó a 13981.7 g durante 15 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo de 1.5 mL, se adicionaron 200 μ L de fenol-cloroformo, se agitó por 15 s y se centrifugó a 13981.7 g durante 15 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 mL, se adicionaron 400 μ L de cloroformo, se agitó por 15 s y se centrifugó a 13981.7 g durante 15 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo de 1.5 mL, se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló y se incubó a -20 °C toda la noche. La muestra se centrifugó a 13981.7 g durante 15 min y se decantó el sobrenadante. El botón se lavó con 1 mL de etanol al 70 %, se centrifugó a 13981.7 g durante 15 min y se decantó el sobrenadante. El botón se secó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se disolvió en 500 μ L de H₂O-dietil pirocarbonato (DEPC), se adicionaron 167 μ L de LiCl 8 M (4 °C) y se incubó a 4 °C durante toda la noche. La concentración final de LiCl fue de 2 M. Se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 13981.7 g. El botón se disolvió en 250 μ L de H₂O-DEPC, se agregaron 500 μ L de etanol al 95 % y 25 μ L de acetato de sodio 3 M. Se incubó toda la noche a -20 °C. La muestra se centrifugó a 13981.7 g por 20 min y se decantó el sobrenadante. El botón se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó a 13981.7 g por 5 min y se eliminó el etanol residual. El botón se secó a temperatura ambiente por 5 min y se resuspendió en 100 μ L de H₂O-DEPC. Se centrifugó a 13981.7 g por 5 min y sólo se tomaron 90 μ L de la solución. La muestra de RNA total se cuantificó la concentración de RNA total y se almacenó a -70 °C.

10. Cuantificación y calibración del RNA total

La cuantificación del RNA total en cada muestra se realizó con 1.5 μ L utilizando el NANODROP 2000 Thermo Scientific. Además, se calibró el RNA por análisis densitométrico de las bandas correspondientes al RNAr 28S o 18S en un gel de agarosa al 2 % con amortiguador TAE 1X (preparado con H₂O-DEPC) y bromuro de etidio 0.5 μ g/mL. Las muestras se mezclaron con 2 μ L de amortiguador de carga y el H₂O-DEPC necesaria para completar 10 μ L. El gel se resolvió a 70 V por 30 min. La imagen del gel se capturó en el equipo CHEMIDOC MP y la densitometría de las bandas se analizó con el software Carestream 5.0, lo que permitió homogeneizar la concentración de las muestras en un rango de diferencia inferior al 14 %.

11. Reacciones de la RT-PCR

11.1 Síntesis del cDNA

La síntesis de cDNA se realizó utilizando la enzima transcriptasa reversa, la cual sintetiza una molécula de cDNA a partir de una molécula de RNA mensajero poliadenilado, para ello se colocó en un tubo estéril de 600 μ L el volumen necesario para tener 1 μ g de RNA de cada muestra, se adicionó 1 μ L de oligo dT (61 μ M) y la cantidad necesaria de H₂O-DEPC para completar 10 μ L. Esta mezcla se incubó a 70 °C por 5 min para desnaturalizar el RNA, posteriormente se enfrió en hielo por 5 min.



Seguido de esto, se adicionaron 15 μL de la mezcla de reacción indicada en la Tabla 2. La mezcla se incubó a 25 °C por 5 min para realizar el alineamiento y a 42 °C por 1 h para la síntesis del cDNA. Para inactivar a la enzima se calentó a 70 °C por 15 min. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

Tabla 2. Mezcla de reacción para la transcripción reversa

Reactivo	Para 1 reacción (μL)
Amortiguador Improm II 5X	4
MgCl_2 25 mM	2.4
dNTPs 10 mM	1
Transcriptasa Reversa	1
H_2O -DEPC	6.6
Volumen final	15

11.2 Reacciones de la PCR y determinación densitométrica de las amplificaciones

La amplificación de las secuencias de interés se llevó a cabo en un termociclador en un volumen final de 20 μL con los reactivos indicados en la Tabla 3, los oligonucleótidos utilizados fueron los reportados por Dietrich *et al.* (2008). Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2 % con TAE 1X adicionado con bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El gel se resolvió a 70 V por 30 min.

Tabla 3. Reactivos y volúmenes utilizados para las reacciones de PCR

Reactivo	Volumen (μL)
Amortiguador Go Taq Pol 5X	4
dNTPs 10 mM	0.4
Iniciador sentido (10 μM)	2
Iniciador anti sentido (10 μM)	2
Go Taq Polimerasa 5 u/ μL	0.2
cDNA	1
H_2O estéril	10.4
Volumen final	20

Las amplificaciones de los genes de interés, ya sea *LCB2a* o *LCB2b*, se cargaron en el mismo gel que el gen de referencia (*TUBULINA*); se capturó la imagen del gel con el equipo CHEMIDOC MP y se midió la densidad de las bandas con ayuda del programa Carestream 5.0. La expresión de los genes se reportó como la densidad de banda del gen *LCB2a* o *LCB2b* entre la densidad de banda del gen *TUBULINA*. Las mediciones se realizaron por duplicado y a partir de 2 lotes de plántulas diferentes. Cada lote contiene alrededor de 100 plántulas.

El análisis estadístico se realizó con la herramienta análisis de varianza de un factor del programa Excel, se comparó el tratamiento con su respectivo control; el valor de alfa es de 0.05 a 0.1.



12. Verificación de la secuencia de los productos de la PCR

Con el propósito de verificar que los oligonucleótidos utilizados eran capaces de diferenciar entre los dos genes *LCB2a* y *LCB2b*, los cuales tienen una alta homología, se clonaron y secuenciaron los productos de PCR obtenidos. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento para el producto de PCR del gen de tubulina.

12.1 Purificación del producto de la PCR

Se amplificó por sextuplicado la secuencia a clonar y los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 2.5 % con TAE 1X y adicionado con bromuro de etidio 0.5 µg/ml a 70 V por 30 min. Las bandas con el producto amplificado se cortaron, pesaron y colocaron en un tubo de 1.5 mL. Para extraer los productos de PCR del gel de agarosa se utilizó protocolo de Qiagen y se cuantificó con ayuda del espectrofotómetro NANODROP 2000 Thermo Scientific. Para verificar la obtención del producto amplificado, el resultado de la extracción se corrió en un gel de agarosa al 2.5 %.

12.2 Reacción de ligación

Con el propósito de ligar los productos de PCR al vector pGEM[®]-T easy de promega y posteriormente introducirlos a células competentes de *E. coli*, se calculó la cantidad necesaria para obtener la relación deseada de vector:inserto con la siguiente fórmula:

$$\frac{ng \text{ vector} \times Tama \text{ o inserto } kb}{Tama \text{ o vector } kb} \times \text{proporci} \text{ n molar inserto:vector} = ng \text{ del inserto}$$

Se realizó la mezcla indicada en la Tabla 4, se incubó 1 h a temperatura ambiente y a 4 °C toda la noche.

Tabla 4. Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de ligación

	Para 1 rxn
Amortiguador de ligación 2x	5
pGEM-Easy (50 ng)	1
Producto de PCR	
T4 DNA ligasa	1
H ₂ O	cbp 10 µL

12.3 Transformación por choque térmico de *E. coli* y selección de células transformantes

Las células competentes de la cepa *E.coli* DH5α se descongelaron en hielo, se les adicionó la reacción de ligación (10 µL) y se mantuvieron en hielo por 20 min más. Posteriormente se dio un choque térmico a 42 °C por 45-50 s en baño de agua e inmediatamente después se regresaron al



hielo por 2 min. Se adicionaron 800 μL de medio SOC estéril (640 μL de medio LB y 160 μL de glucosa 0.1 M) y se incubaron a 37 °C por 2 h con agitación a 3.3 g.

Mientras tanto, se prepararon las cajas de Petri con medio LB con ampicilina: Se adicionaron 100 μL de IPTG 100 mM y 20 μL de X-Gal 50 mg/ μL . Se colocó cada una de las soluciones en la caja y se esparcieron con varilla de vidrio hasta que se adsorbieron en el agar.

Se centrifugó el tubo de reacción a 13981.7 g por 1 min, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 150 μL de medio LB para resuspender el botón de células. Para obtener colonias aisladas, se plaquearon 2 cajas con medio LB y ampicilina (una con 50 μL y la otra con 150 μL de las células resuspendidas) hasta que se adsorbieron en el agar. Las cajas se incubaron 37 °C toda la noche (12-24 h) y enseguida se colocaron a 4 °C para permitir el desarrollo de color.

La clonación exitosa de un inserto en el vector pGEM-T interrumpe la secuencia que codifica a la β -galactosidasa. Usualmente las clonas que contienen producto de PCR producen colonias blancas, pero las colonias azules pueden resultar de fragmentos que son clonados en el marco con el gen *lacZ*, por ello se seleccionaron 3 colonias blancas y 1 azul. Las colonias seleccionadas se sembraron en medio líquido a 37 °C toda la noche (12-24 h).

12.4 Extracción y restricción del plásmido

Se tomaron 1.4 mL del medio de cultivo que contiene las células transformadas y se colocaron en un tubo de 1.6 mL, se centrifugaron durante 1 min y se decantó el sobrenadante, esto se repitió 2 veces más. Para quitar el exceso de medio se centrifugó a 13981.7 g por 30 s. El pellet se resuspendió en 600 μL de amortiguador TE, se adicionaron 100 μL del amortiguador de lisis y se mezcló por inversión. Se adicionaron 300 μL del amortiguador de neutralización, se mezcló y se centrifugó a 13981.7 g por 4 min, se recuperó el sobrenadante y se colocó en la columna Zymo-spin. Se centrifugó 15 s a 13981.7 g y se descartó el centrifugado. La columna se lavó con 200 μL del amortiguador Endo-wash y se centrifugó 30 s a 13981.7 g. Un segundo lavado se realizó adicionando 400 μL del amortiguador Zupply Wash a la columna y se centrifugó a 13981.7 g por 1 min. Para eluir el plásmido, se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.6 mL, se adicionaron 30 μL de agua estéril directamente a la matriz, se dejó reposar 1 min y se centrifugó 30 s. Por último, se transfirieron 25 μL de la solución a otro tubo limpio. Se cuantificó el resultado de la extracción con el espectrofotómetro NANODROP 2000 Thermo Scientific.

Para separar al producto de PCR del plásmido, se realizó la reacción de restricción. Primero se calculó el volumen necesario para colocar 300 ng de plásmido en la reacción y se colocó en un tubo de 1.6 mL, donde se adicionó la cantidad de agua necesaria para completar 15 μL de acuerdo a la Tabla 4, se homogeneizó la mezcla, se calentó a 92 °C por 5 min y se enfrió en hielo por 5 min.



Posteriormente, se adicionó la cantidad establecida de amortiguador y enzima de acuerdo a la Tabla 5 y se incubó a 37 °C por 1 h.

Tabla 5. Reactivos y volúmenes utilizados para la restricción del plásmido

Reactivo	Volumen (μL)
DNA plasmídico	
Amortiguador	1.5
EcoR1	1
H ₂ O	cbp 15

Para corroborar que el plásmido y el producto de PCR se encontraban separados, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 2.5%, en donde se debe observar el plásmido en 3000 pb y el producto PCR. Se seleccionó el plásmido que tuviera el producto de PCR y se mandó a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.



RESULTADOS

Con el propósito de determinar si la disminución de los esfingolípidos de la membrana plasmática de *A. thaliana* es debida a una disminución en el nivel de los transcritos de los genes que codifican para la subunidad catalítica de la SPT, se analizó el comportamiento de esta enzima en dos genotipos diferentes. Las plántulas silvestres que tienen las dos versiones de la enzima, el heterodímero LCB1/LCB2a y el heterodímero LCB1/LCB2b. Las plántulas mutantes *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, llamadas abreviadamente hp en este trabajo, tienen interrumpido el gen *LCB2a* por la inserción de un transposón, mientras que el otro isogene, *LCB2b*, puede ser silenciado a voluntad por la inducción de la síntesis de una horquilla de RNA, para lo cual se usa la metoxifenazida. Como consecuencia del abatimiento de la expresión de los genes de la subunidad catalítica de la SPT, esta línea mutante presenta una reducción del 34 % de esfingolípidos totales en la planta (Dietrich *et al.*, 2008).

En este estudio se utilizaron plántulas de 2-5 semanas de edad para poder documentar el fenotipo del silenciamiento del gen *LCB2b*, el cual se hace evidente días después de la aplicación de la metoxifenozida.

1. Determinación del efecto de la aclimatación en el fenotipo del silenciamiento del gen *LCB2b*

Con la finalidad de determinar el efecto de la baja temperatura en el silenciamiento del gen *LCB2b*, se analizó el fenotipo tras la adición de metoxifenazida a 22 y a 4 °C. Para ello, se crecieron plántulas silvestres (plántulas WT) y de la línea hp por 3 semanas en cajas Petri a 22 °C. A ésta edad se les aplicó metoxifenozida y se dejó actuar por 4 días a 22 °C. Posteriormente, las plántulas se sometieron a temperaturas de 22 °C (condiciones de no aclimatación o NA) y/o bien a 4 °C (condiciones de aclimatación o AC) por 7 días. En la línea silvestre no se observaron cambios fenotípicos por la adición del agente inductor en ninguna de las dos condiciones de temperatura; 22 °C o 4 °C. Lo mismo se observó con las plántulas hp que no fueron tratadas con el inductor (plántulas hp-) (Figura 7).

En las plántulas hp NA expuestas al inductor (plántulas hp+), se observó la decoloración de las hojas y en algunos casos necrosis a los 11 días después de aplicación del inductor, mientras que las plántulas hp+ a este mismo tiempo de exposición pero sometidas a 4 °C (plántulas AC) no mostraron daños visibles. Por lo que las plántulas hp+ y su respectivo control, WT+, se expusieron por más tiempo a 4 °C hasta que fuera visible el efecto fenotípico del inductor en la línea hp, efecto que se presentó 2 semanas después con respecto a las plántulas crecidas siempre a 22 °C (NA) (Figura 7).

El experimento también fue realizado con 6 días de exposición al inductor previamente a la exposición de condiciones de NA y AC (Figura 8). Los resultados mostraron los mismos fenotipos

reportados en la Figura 7. Estos experimentos indican que el efecto de silenciamiento se alargó a los 4 °C.

	11 días posteriores a la aplicación del inductor				AC (2 semanas más)	
	NA		AC		-MTZ	+MTZ
	-MTZ	+MTZ	-MTZ	+MTZ		
WT						
hp						

Figura 7. Fenotipos del efecto del silenciamiento del gen *LCB2b* en las plántulas de *A. thaliana* sometidas a NA o AC. Con 4 días a 22 °C previos a NA y AC. Se aplicó metoxifenozida a plántulas WT y hp de 3 semanas de edad que fueron crecidas en cajas Petri y se dejaron 4 días a 22 °C, posteriormente se colocaron en NA o AC por 7 días y se les tomó foto 11 días después de la aplicación del inductor. Las plántulas AC se dejaron a 4 °C dos semanas más y se les volvió a fotografiar. Cada condición experimental incluyó aproximadamente 100 plántulas por caja.

	13 días posteriores a la aplicación del inductor				AC (2 semanas más)	
	NA		AC		-MTZ	+MTZ
	-MTZ	+MTZ	-MTZ	+MTZ		
WT						
hp						

Figura 8. Fenotipos del efecto del silenciamiento del gen *LCB2b* en las plántulas de *A. thaliana* sometidas a NA o AC. Con 4 días a 22 °C previos a NA y AC. Se aplicó metoxifenozida a plántulas WT y hp de 3 semanas de edad que fueron crecidas en cajas Petri y se dejaron 6 días a 22 °C, posteriormente se colocaron en NA o AC por 7 días y se les tomó foto 13 días después de la aplicación del inductor. Las plántulas AC se dejaron a 4 °C dos semanas más y se les volvió a fotografiar. Cada condición experimental incluyó aproximadamente 100 plántulas por caja.



2. Determinación del tiempo adecuado para observar el efecto del silenciamiento inducido con la metoxifenozida en plántulas hp+ germinadas y crecidas en macetas.

Con el propósito de estudiar la respuesta de las plántulas al frío en un sistema experimental de más fácil manejo, se germinaron y crecieron las plántulas de *A. thaliana* en maceta.

Se sembraron semillas de *A. thaliana* de la línea mutante hp provenientes de diferentes cosechas de semillas (nombradas como tubo 20, 21 y 22). Se crecieron por dos semanas y se expusieron al inductor como se explica en el punto 6 de la metodología. El registro fenotípico se muestra en la Figura 9, en donde se observa la aparición de la clorosis de las hojas desde el sexto día posterior a la aplicación del inductor y que esta clorosis aumenta dependiendo del tiempo de exposición al inductor. Los resultados mostraron consistencia en los tres lotes de semillas. Con base en estos experimentos se determinó que el tiempo conveniente de crecimiento de las plántulas para los siguientes experimentos es de 2 semanas y que las plántulas se expondrían 6 días al inductor previamente a los tratamientos de no aclimatación o aclimatación.

Días de inducción	Semillas del tubo 20		Semillas del tubo 21		Semillas del tubo 22	
	-MTZ	+MTZ	-MTZ	+MTZ	-MTZ	+MTZ
0						
5						
6						
7						
10						

Figura 9. Seguimiento del fenotipo de silenciamiento del gen *LCB2b* de las plántulas de hp de *A. thaliana*. Plántulas hp provenientes de diferentes cosechas de semillas se crecieron en macetas con tierra por 2 semanas, una vez aplicado el inductor, se tomó el registro fenotípico macro y microscópico a los 0, 5, 6, 7 y 10 días. Se presenta un experimento representativo de dos réplicas independientes. Cada experimento incluyó aproximadamente 100 plántulas por maceta.

3. Determinación del tiempo necesario para la aclimatación al frío de plántulas silvestres de *A. thaliana*

Con la intención de conocer el tiempo que las plántulas de *A. thaliana* deben permanecer a 4 °C para lograr aclimatarse y cuál es el tiempo a -15 °C (temperatura de reto de congelación) para lograr dañar a las plántulas, se realizaron los siguientes experimentos.

En el primero, las plántulas silvestres de 2 semanas de edad se sometieron a los diferentes tiempos de aclimatación (1, 2 y 3 semanas), posteriormente se congelaron a -15 °C por 1, 2 y 3 h, finalmente se dejaron recuperar a 22 °C por 1 semana y se tomó el registro fenotípico. Con estos tratamientos, las plántulas fueron expuestas a 3 diferentes edades (3, 4 y 5 semanas) al congelamiento.

En la Figura 10 se puede observar que las plántulas AC por una semana no presentaron grandes diferencias con su respectivo control NA, con excepción del tamaño, ya que las plántulas AC, al haber estado expuestas a 4 °C, crecieron más lentamente.

Tiempo de exposición a 4 °C (edad)	1 semana (3 semanas de edad)		2 semanas (4 semanas de edad)		3 semanas (5 semanas de edad)	
	NA	AC	NA	AC	NA	AC
1h						
2h						
3h						

Figura 10. Fenotipo de recuperación de las plántulas silvestres aclimatadas y expuestas a diferentes edades a -15 °C. Plántulas silvestres de dos semanas de edad fueron sometidas a AC por 1, 2 y 3 semanas, posteriormente se sometieron a -15 °C por 1, 2 y 3 h. El registro fenotípico se realizó una semana después de la recuperación a 22 °C. Se presenta un experimento representativo de dos réplicas independientes. Cada experimento incluyó aproximadamente 120 plántulas por maceta.

Las plántulas AC por dos semanas mostraron mayor daño por el congelamiento que las plántulas NA de la misma edad. Por último, las plántulas que se sometieron a aclimatación por 3 semanas no sufrieron daños por el congelamiento, en tanto que las NA se dañaron a las 3 h de exposición a -15°C .

Se realizó un segundo experimento en el que plántulas se introdujeron a la aclimatación gradualmente, de tal forma que estas fueran expuestas al reto de congelamiento a la misma edad (5 semanas). El registro fenotípico de recuperación se encuentra en la Figura 11, en donde se observa que desde la primera semana de AC, las plántulas resistieron el congelamiento hasta por 3 h, en comparación con las NA, que con la exposición a -15°C presentaron daños severos.













Tiempo de exposición a 4°C Tiempo de reto a -15°C	AC			NA
	1 semana	2 semanas	3 semanas	3 semanas
1h				
2h				
3h				

Figura 11. Fenotipo de recuperación de plántulas silvestres aclimatadas y expuestas a la misma edad a -15°C . Plántulas silvestres de dos semanas de edad fueron sometidas a AC gradualmente por 1, 2 y 3 de tal forma que a las 5 semanas de edad todas fueron expuestas a -15°C por 1, 2 y 3 h. El registro fenotípico se realizó una semana después de recuperación a 22°C . Se presenta un experimento representativo de dos réplicas independientes. Cada experimento incluyó aproximadamente 120 plántulas por maceta.

4. Determinación de la respuesta al congelamiento de las plántulas mutantes hp

De las determinaciones anteriores se encontró que con seis días de exposición al inductor se puede observar fenotípicamente el efecto del silenciamiento de *LCB2b* en las plántulas hp NA y que éste se veía retardado dos semanas bajo exposición a 4°C . Por otro lado, se determinó que las plántulas

silvestres, de cinco semanas de edad, eran capaces de aclimatarse sometiendo una semana a 4 °C a -15 °C por 3 h.

Con base en los resultados anteriores y con el objetivo de conocer la respuesta al congelamiento de las plántulas hp, se expusieron plántulas de esta línea al inductor a las dos semanas de edad y éste se dejó actuar por 6 días. Posteriormente, las plántulas se sometieron a AC por dos semanas para después ser congeladas a -15 °C por 3 h, y se dejaron recuperar por una semana. A las plántulas hp NA se les expuso al inductor seis días antes de que se sometieran al congelamiento. Las plántulas de este experimento que no se sometieron al inductor (hp- y WT-) se sometieron a los mismos tiempos de NA y AC que a las plántulas hp+.

En la Figura 12 se puede observar que, en comparación con las plántulas WT-, las plántulas hp- no presentaron daños por el congelamiento aún sin ser sometidas a la AC. Las plántulas hp+ mostraron cierto grado de necrosis en sus hojas. Sin embargo, para saber si el fenotipo de las plántulas hp+ después de la recuperación era sólo debido al efecto del inductor o por el daño del congelamiento, se sometieron plántulas hp+ a NA o AC. Como se puede observar en la Figura 13, las plántulas hp+ mostraron un grado de daño en sus hojas muy similar a las plántulas hp+ que si fueron sometidas al congelamiento. Por lo que el congelamiento no fue la causa del daño en las hojas de las plántulas hp+.






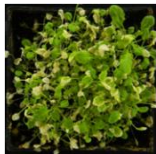


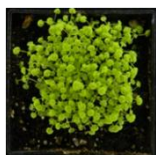

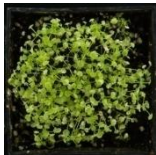
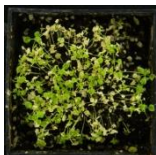
	WT-		hp-		hp+	
	Antes del reto a -15 °C	Recuperación	Antes del reto a -15 °C	Recuperación	Antes del reto a -15 °C	Recuperación
NA						
AC						

Figura 12. Fenotipo de recuperación al congelamiento de las plántulas hp. Las plántulas mutantes hp de dos semanas de edad fueron tratadas con metoxifenoizida por seis días y posteriormente aclimatadas por 2 semanas. En el caso de las plántulas NA, éstas fueron tratadas con MTZ seis días antes del término de la NA. De esta forma las plántulas hp NA y AC fueron sometidas a la misma edad a -15 °C por 3h. El registro fenotípico se realizó una semana después de la recuperación a 22 °C. Se presenta un experimento representativo de dos réplicas independientes. Cada experimento incluyó aproximadamente 120 plántulas por maceta.





	hp+ Sin reto	
	Antes del no-reto	Recuperación
NA		
AC		

Figura 13. Fenotipo de las plántulas hp+ sin reto al congelamiento. Plántulas mutantes hp de dos semanas de edad se trataron con metoxifenoazida por seis días y posteriormente aclimatadas por dos semanas. En el caso de las plántulas NA, éstas fueron tratadas con metoxifenoazida seis días antes del término de la NA. Debido a que estas plántulas no se sometieron al reto de congelamiento, una vez terminado el tiempo de NA o AC se colocaron a 22 °C para la recuperación por una semana y se realizó el registro fenotípico. Se presenta un experimento representativo de dos réplicas independientes. Cada experimento incluyó aproximadamente 120 plántulas por maceta.

5. Determinación del efecto de las bajas temperaturas en la regulación transcripcional de los genes de *LCB2a* y *LCB2b*

Con el propósito de conocer los niveles de los transcritos de los genes de las subunidades catalíticas de la SPT, se colectaron muestras de las plántulas expuestas por diferentes tiempos al inductor del silenciamiento de *LCB2b* en la planta mutante hp.

Los tiempos de colecta de las plántulas tratadas fueron 0, 3, 6, 8 y 10 días después de la aplicación del inductor (dpi) en condiciones de NA, en tanto que en condiciones de AC los tiempos seleccionados fueron 18 y 25 dpi. Los tiempos de colecta en condiciones de AC se eligieron de acuerdo al fenotipo de silenciamiento que presentaron las hojas (grado de clorosis). Estas plántulas se expusieron primero al inductor por seis días a 22 °C, posteriormente se colocaron a 4 °C y se colectaron a los 18 y 25 dpi, siendo el tiempo en el que presentaron el mismo grado de clorosis que las hojas de las plántulas NA expuestas por 8 y 10 días al inductor. El registro fotográfico (Figura 14) se realizó macro y microscópicamente.

De todas las plántulas colectadas, se extrajo el RNA y a partir de éste se elaboró el cDNA. Sin embargo, para poder realizar la determinación de los niveles de los transcritos de *LCB2a* y *LCB2b* en condiciones de AC, era necesario contar con un gen que no modificara su expresión a bajas temperaturas, para ello se realizó el siguiente experimento.

		Días después del inductor					
		0 días	3 días	6 días		8 días	10 días
hp-	22 °C				NA		
	22 °C					18 días	25 días
		4 °C			AC		
4 °C							
hp+	22 °C				NA		
	22 °C					18 días	25 días
		4 °C			AC		
4 °C							

Figura 14. Fenotipo del silenciamiento del gen *LCB2b* en la plántula mutante *hp*. Las plántulas *hp+* fueron tratadas con metoxifenozida a las dos semanas de edad, el registro fotográfico se realizó a los 0, 3, 6, 8 y 10 días posteriores a la aplicación del inductor en condiciones de NA, y a los 18 y 25 días en condiciones de AC. Las plántulas *hp-* no fueron tratadas con el inductor. Se presenta un experimento representativo de dos réplicas independientes. Cada experimento incluyó aproximadamente 120 plántulas por maceta.

5.1 Determinación de un gen de referencia y medición de los niveles de transcritos de *LCB2a* y *LCB2b* en plántulas silvestres NA y AC.

Para determinar si existía una regulación transcripcional de la SPT por el frío, era necesario contar con un gen que no respondiera a las bajas temperaturas. Por esta razón, se analizaron tres genes; el de la *adenina fosforribosil transferasa 1 (APT1)*, la *tubulina (TUB)* y el *factor de elongación de la traducción 1 α (eEF1 α)*.

Para analizar la expresión de estos tres genes, se colectaron muestras de plántulas silvestres a algunos de los tiempos de colecta elegidos para analizar a la planta mutante hp, es decir, 0 y 6 dpi en condiciones de NA y 18 y 25 dpi en condiciones de AC. Para poder comparar los niveles de los transcritos, en este experimento también se colectaron muestras a los 18 y 25 dpi en condiciones de NA. Las plántulas colectadas mostraron un fenotipo sano (Figura 15). Cabe aclarar que el término dpi es solo para referenciarlo a los tiempos de colecta, pero no se aplicó el agente inductor a estas muestras.

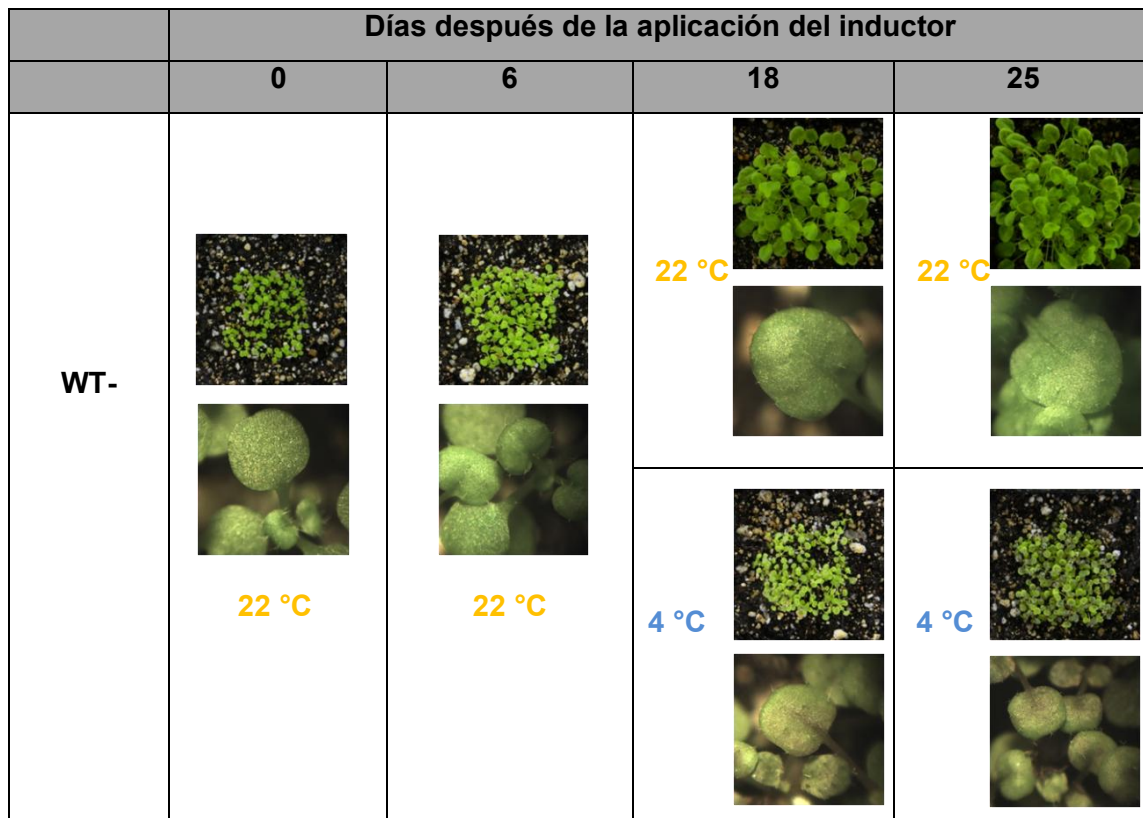


Figura 15. Fenotipo de plántulas silvestres NA y AC. Plántulas silvestres NA fueron crecidas a 22 °C y colectadas a los 0, 6, 18 y 25 días posteriores a las dos semanas de edad. Las plántulas AC fueron colocadas a 4 °C a las dos semanas con seis días de edad y se colectaron a los 18 y 25 días posteriores a las dos semanas de edad. Se presenta un experimento representativo de dos réplicas independientes. Cada experimento incluyó aproximadamente 120 plántulas por maceta.



Una vez obtenido el RNA de las muestras colectadas, se calibró el RNA con respecto al RNAr 28S (Figura 17A) y se elaboró el cDNA correspondiente. A partir de la muestra llamada 0 dpi, se realizaron curvas de amplificación para cada gen, esto con el propósito de conocer los ciclos requeridos en la PCR para observar cambios en los niveles de transcripción de los genes (Figura 16).

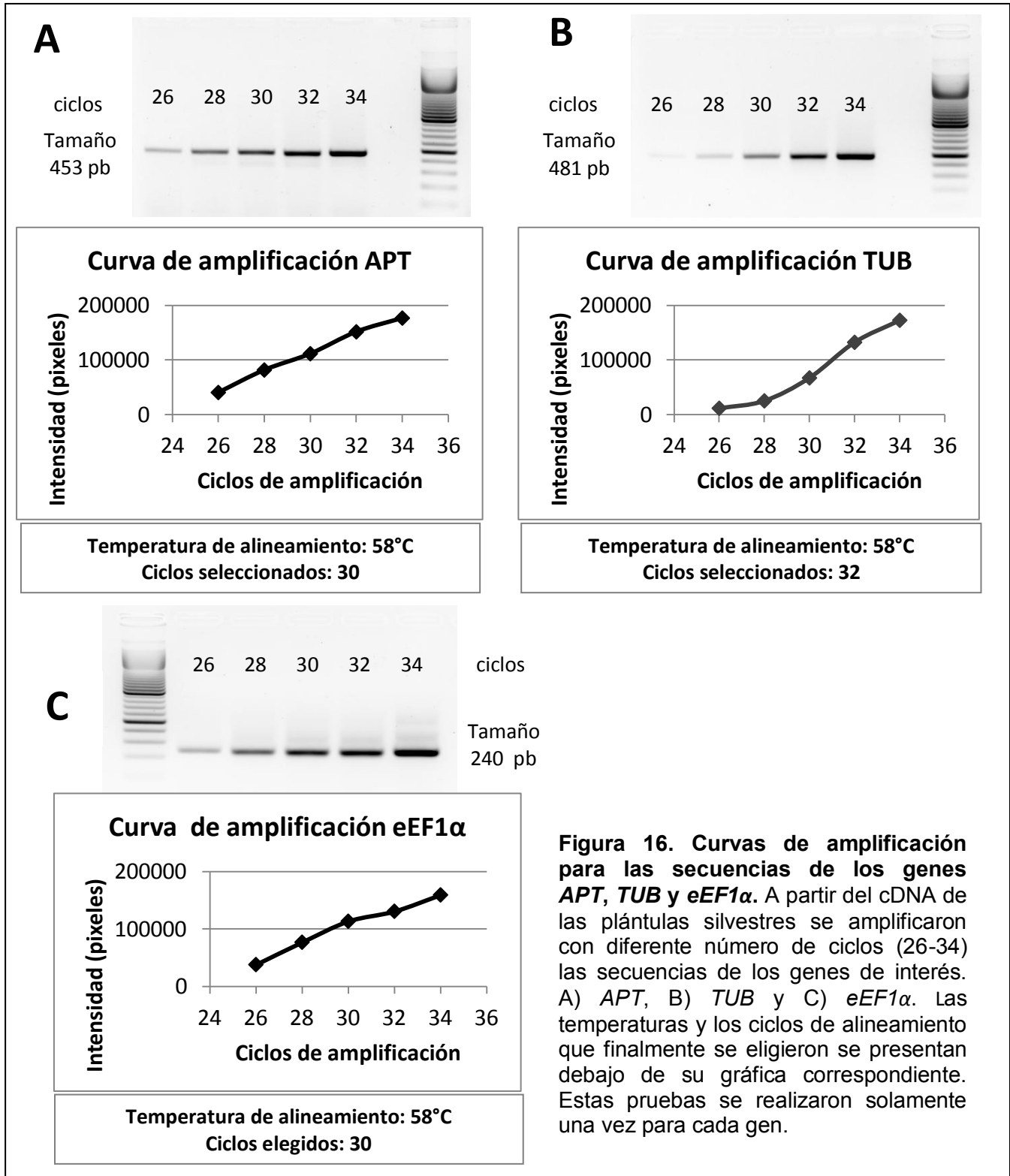
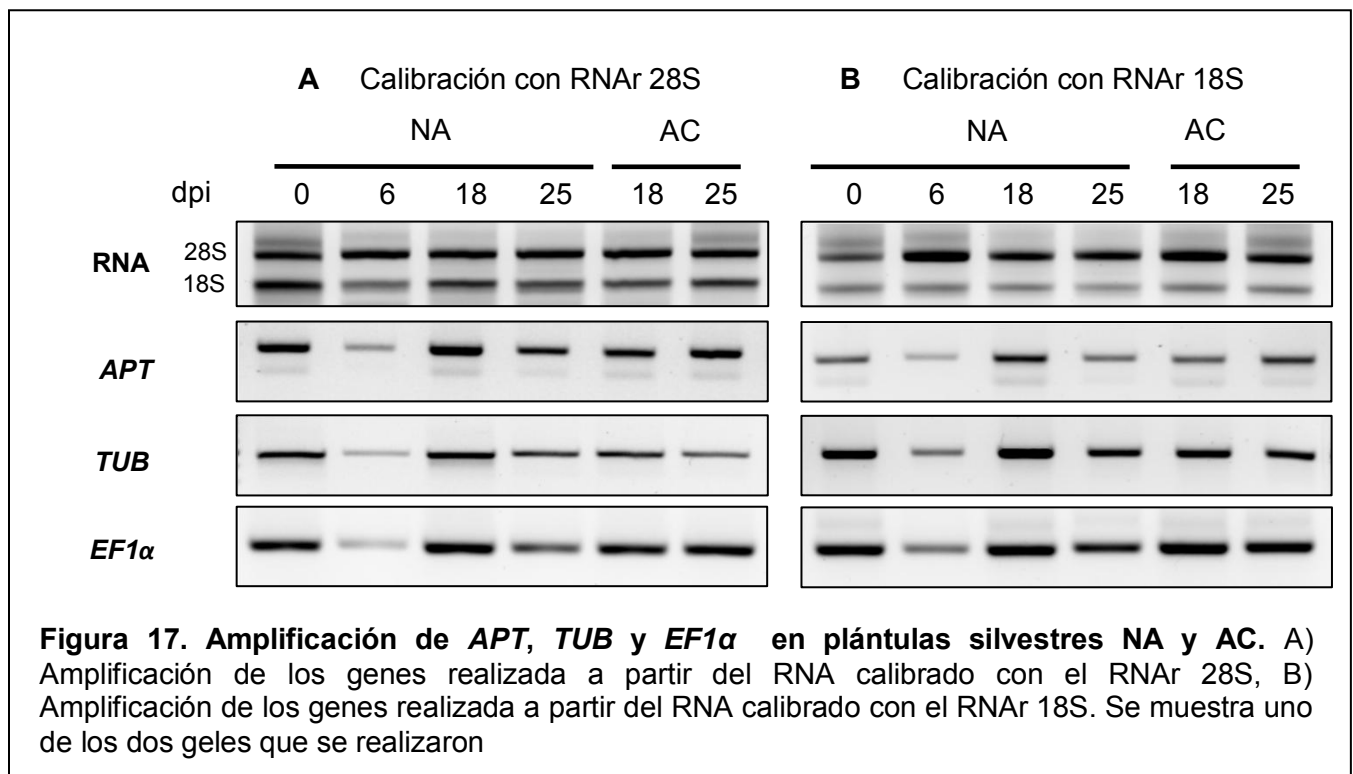


Figura 16. Curvas de amplificación para las secuencias de los genes APT, TUB y eEF1α. A partir del cDNA de las plántulas silvestres se amplificaron con diferente número de ciclos (26-34) las secuencias de los genes de interés. A) APT, B) TUB y C) eEF1α. Las temperaturas y los ciclos de alineamiento que finalmente se eligieron se presentan debajo de su gráfica correspondiente. Estas pruebas se realizaron solamente una vez para cada gen.



En la Figura 16 se puede observar que los ciclos seleccionados permiten obtener una amplificación en la fase exponencial. Una vez establecidas las condiciones de amplificación, se procedió a determinar los niveles de los transcritos de los 3 genes en las muestras. En la Figura 17A se muestra los patrones de amplificación para cada gen, se observó un patrón de expresión similar entre amplificación de *APT*, *TUB* y *eEF1 α* . Dicho patrón no presentó una respuesta al tratamiento de frío en ninguno de los 3 genes. Sin embargo, debido a que se observaron pequeñas variaciones en la amplificación, quisimos explorar la posibilidad de que este comportamiento fuera debido a la cantidad de RNA adicionado a la reacción de RT-PCR, por lo que se calibraron las muestras, ahora con el RNAr 18S y se volvieron a estandarizar las condiciones para la amplificación de los genes (ANEXO A). En la Figura 17B se puede observar que el patrón de amplificación entre los 3 genes es el mismo que el obtenido con la calibración realizada con el ribosomal 28S. Con esto comprobamos que los 3 genes seleccionados no respondían al tratamiento de frío. Con base en estos resultados y debido a que en reportes previos (Agarwal *et al.*, 2006) se determinó que *TUBULINA* no respondía al tratamiento de frío en *A. thaliana*, se eligió a este gen como nuestro gen de referencia. A partir de ahora todas las muestras se calibraron con base al RNAr 18S.



Para realizar las mediciones de los genes *LCB2a* y *LCB2b*, se procedió primeramente a calibrar la amplificación del gen de referencia en todas las muestras, colocando la cantidad de cDNA necesaria en la reacción de PCR para obtener una amplificación similar de *TUBULINA* en todas las muestras,



posteriormente se utilizaron las mismas cantidades de cDNA para amplificar los genes *LCB2a* y *LCB2b*. También se realizó una curva de amplificación para determinar los ciclos necesarios de la PCR que nos permitieran ver cambios en la expresión de *LCB2a* y *LCB2b* (ANEXO B).

En la Figura 18A se muestran las amplificaciones de los genes *LCB2a*, *LCB2b* y *TUBULINA*. En el gráfico se observa que durante el periodo de no aclimatación no hubo cambios en la expresión de los genes *LCB2a* y *LCB2b*. El mismo comportamiento se observó cuando las plántulas se aclimataron.

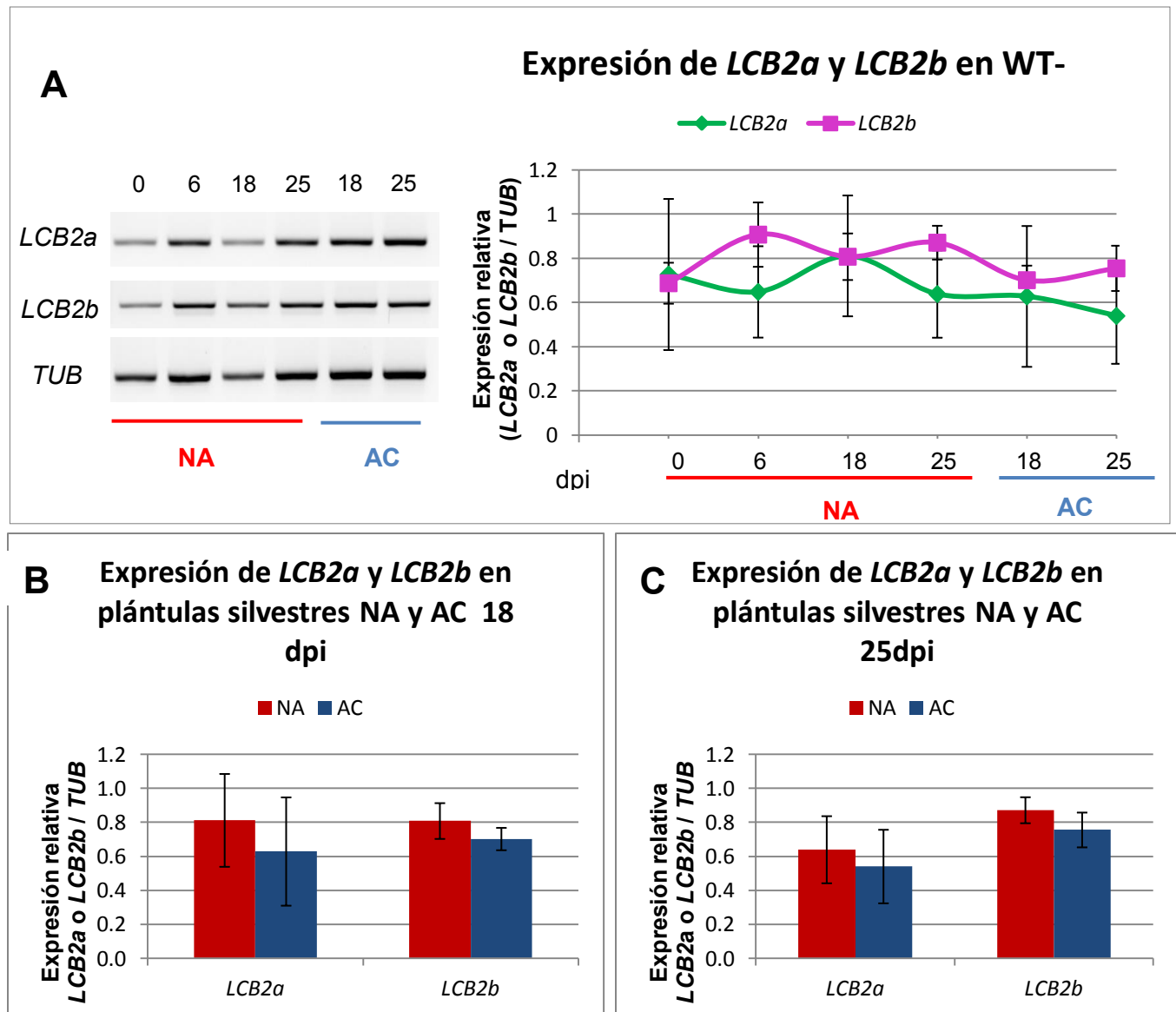


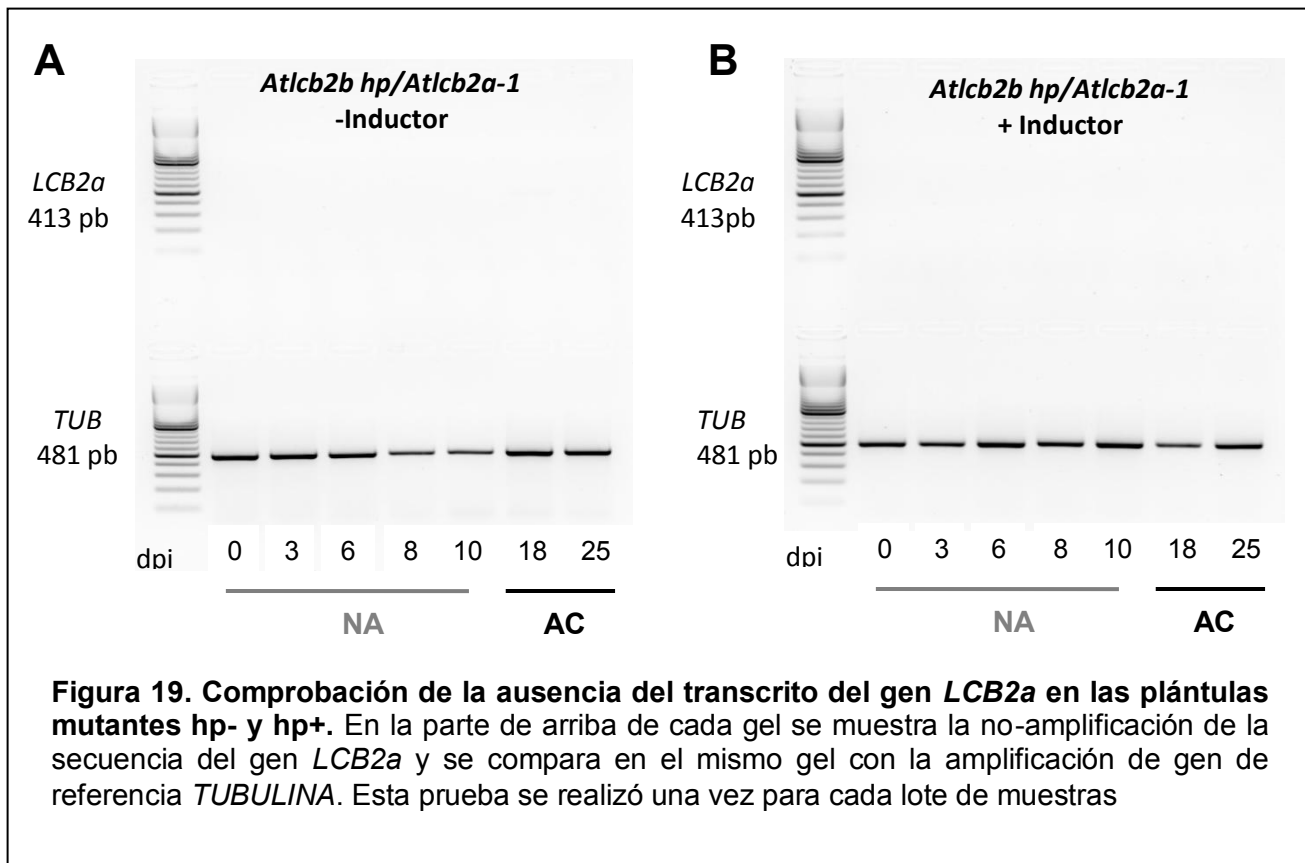
Figura 18. Expresión relativa de *LCB2a* y *LCB2b* en plántulas silvestres NA y AC. A) Se realizó la medición de los transcritos a los 0, 6, 18 y 25 días después de la aplicación del inductor (dpi) en condiciones de NA y a los 18 y 25 dpi en condiciones de AC. Del lado izquierdo se muestran los gels representativos de las determinaciones y del lado derecho el gráfico con las mediciones de los niveles de expresión de los genes *LCB2a* y *LCB2b* con respecto al gen de la *TUBULINA*, B) Figura comparativa de los niveles de transcritos de *LCB2a* y *LCB2b* NA y AC a los 18 dpi y en C) a los 25 dpi. Los valores graficados son el promedio de cinco determinaciones \pm EE de dos muestras independientes por cada condición. Los datos fueron procesados en Excel utilizando el análisis de varianza de un factor comparando las muestra AC contra las muestras NA.



Para ver más claramente el efecto de la aclimatación en los niveles de los transcritos de *LCB2a* y de *LCB2b*, a partir de estas mismas mediciones, se realizó la Figura 18 B y C, en donde se comparan los niveles de transcrito a los 18 y 25 dpi en condiciones de NA y AC. Los resultados obtenidos muestran que en las plántulas silvestres no existe cambio en la expresión de los genes *LCB2a* ni *LCB2b* tras el tratamiento de aclimatación.

5.2 Medición de los niveles del transcrito *LCB2b* en la línea mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a*

Con la finalidad de conocer el comportamiento de la expresión de los genes de las subunidades catalíticas de la SPT cuando esta sólo puede expresar una de sus dos versiones (*LCB1/LCB2b*), se midieron los niveles del transcrito del gen *LCB2b* en plántulas mutantes *hp* a diferentes tiempos elegidos en el punto 5 de esta tesis. Como primer paso, se corroboró la ausencia del transcrito del gen *LCB2a* en todas las plántulas de la línea mutante *hp* (Figura 19).



En la Figura 20 se observa que durante los diferentes tiempos de colecta en condiciones de NA, los niveles de *LCB2b* no cambiaron en las plántulas *hp*-. Sin embargo, cuando estas plántulas se expusieron a la AC, específicamente a los 25 dpi, la expresión del gen *LCB2b* aumentó.

Cuando las plántulas mutantes *hp* se exponen a metoxifenoza se activa el sistema de silenciamiento del gen *LCB2b*, lo cual se puede observar en la Figura 19. Se muestra que a los 3 días



posteriores a la aplicación del inductor (dpi) las plántulas *hp+* tuvieron una expresión prácticamente nula del gen *LCB2b*, y para los 6 dpi hubo un pequeño aumento de la expresión del gen, nivel que se conservó hasta los 10 dpi. Cuando estas plántulas *hp+* fueron sometidas a AC, la expresión del gen *LCB2b*, que ya había sido silenciada hasta el nivel del día 6, se incrementó ligera pero significativamente.

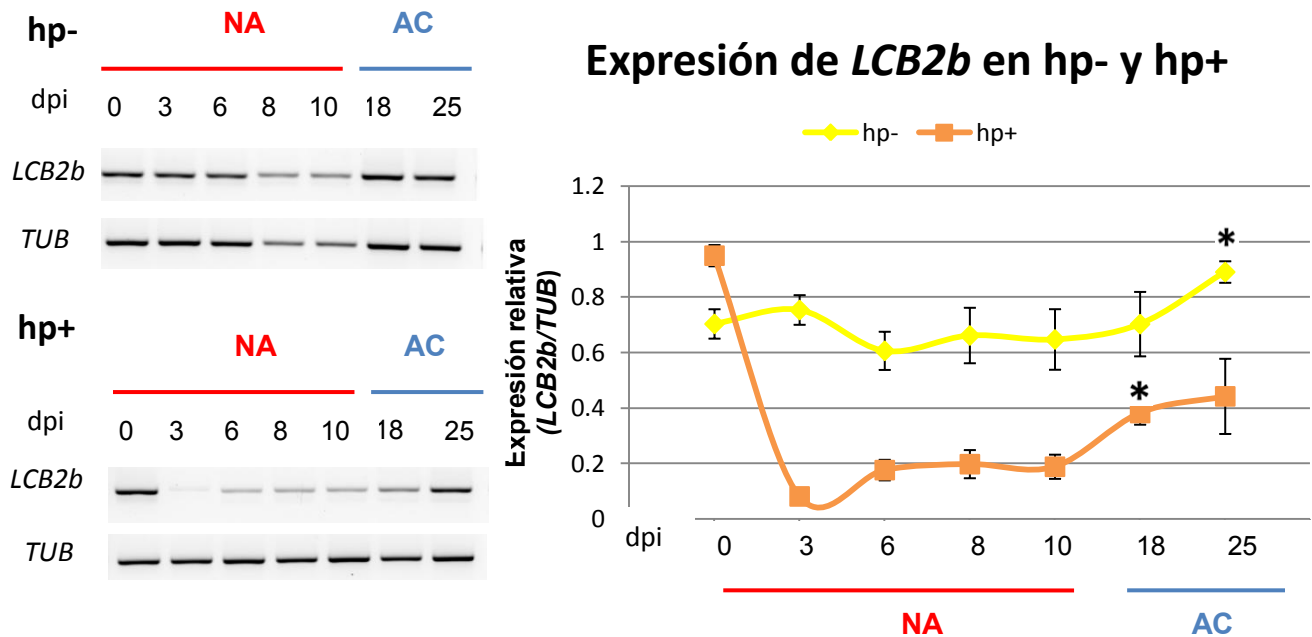


Figura 20. Expresión relativa de *LCB2b* en plántulas *hp-* y *hp+* en condiciones de NA y AC. La detección del transcrito *LCB2b* en las plántulas *hp-* y *hp+*, se realizó a los 0, 3, 6, 8 y 10 días posteriores a la aplicación del inductor (dpi). Las plántulas AC se analizaron a los 18 y 25 dpi. Del lado izquierdo se muestran geles representativos de las determinaciones, a partir de los cuales se realizaron las mediciones. Del lado derecho se muestra el gráfico resultante de las mediciones relativas de *LCB2b* con respecto al de la *TUBULINA*. Los valores graficados son el promedio de 5 determinaciones \pm EE de dos muestras independientes por cada condición. Los datos fueron procesados en Excel utilizando el análisis de varianza de un factor comparando las muestra AC contra las muestras NA. El asterisco indica diferencia significativa entre los valores comparados, $P=0.1$

6. Clonación y secuenciación de los productos de PCR

Debido a la alta identidad entre los genes *LCB2a* y *LCB2b*, se comprobó que los oligonucleótidos utilizados fueron capaces de diferenciar entre ambos genes y por tanto amplificaron a los productos deseados. El producto de PCR de *LCB2a* resultó idéntico a la secuencia del cDNA de *LCB2a* y no a la de *LCB2b* (Figura 21). Asimismo, el producto de PCR de *LCB2b* fue idéntico a la secuencia del cDNA de *LCB2b* y no a la de *LCB2a* (Figura 22). La secuenciación también demostró que el producto de PCR de *TUB* resultó idéntico a la región del cDNA que se deseaba amplificar (ANEXO C).

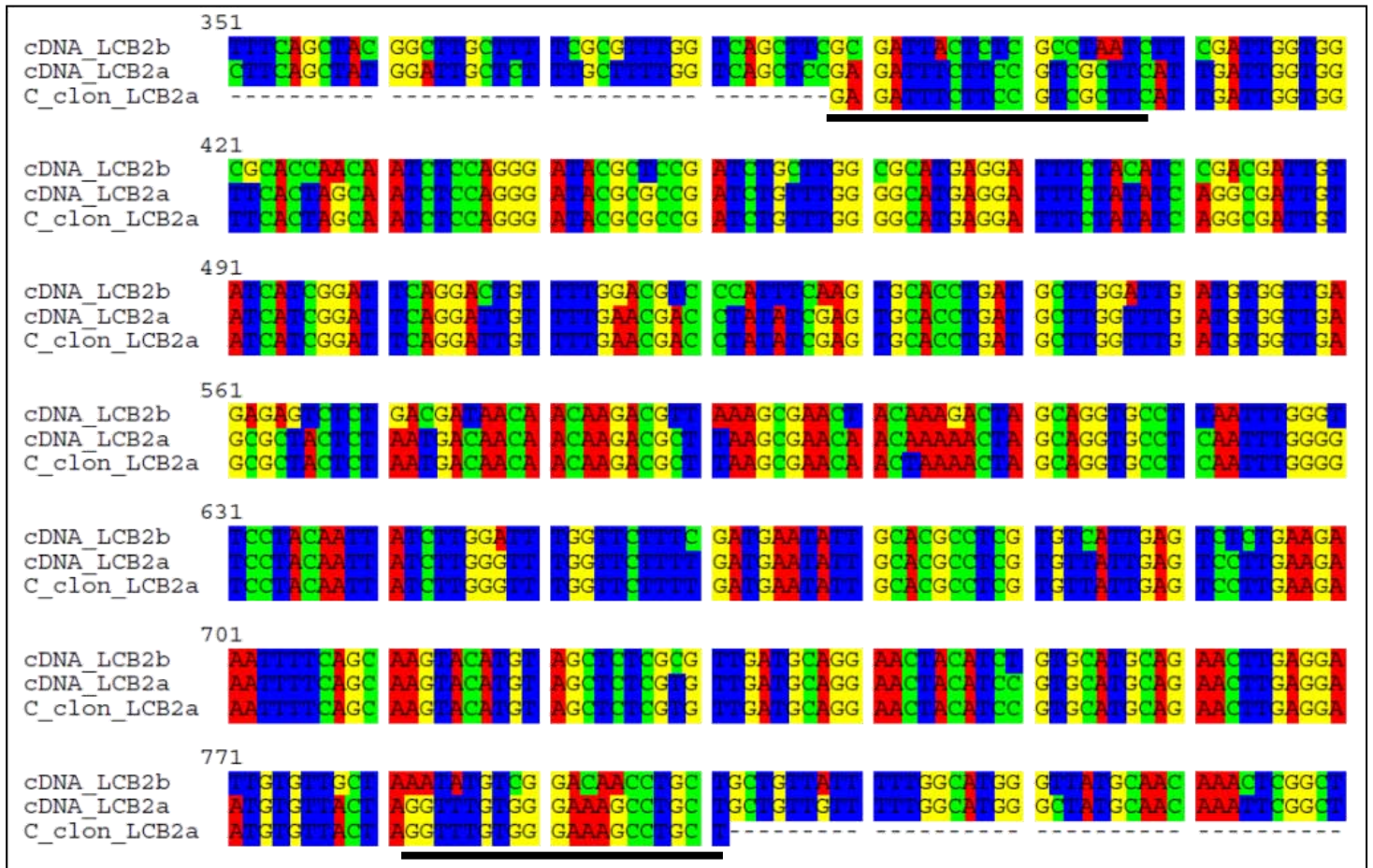


Figura 21. Análisis del producto de PCR de LCB2a. Se muestra la comparación entre las secuencias de los cDNA de LCB2a y LCB2b con el producto de PCR de LCB2a (clon_LCB2a). Los oligonucleótidos utilizados se encuentran marcados con una línea negra.

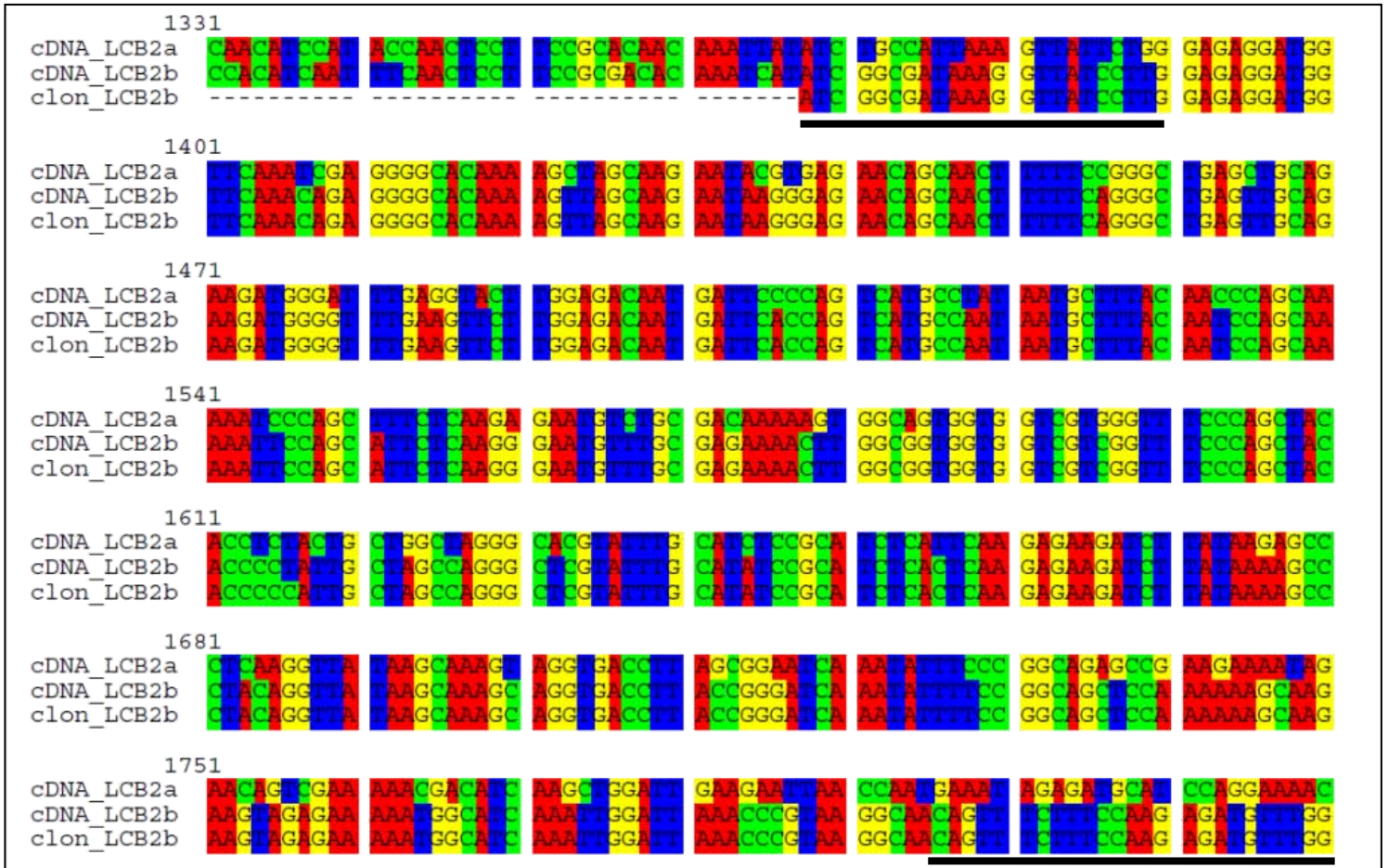


Figura 22. Análisis del producto de PCR de *LCB2b*. Se muestra la comparación entre las secuencias de los cDNA de *LCB2a* y *LCB2b* con el producto de PCR de *LCB2b* (clon_LCB2b). Los oligonucleótidos utilizados se encuentran marcados con una línea negra.



DISCUSIÓN

El estrés por frío es una condición a la que se enfrentan las plantas en periodos diarios o estacionales y cuyos mecanismos moleculares aún no se entienden bien. Su dilucidación es importante tanto en términos de los mecanismos fisiológicos y moleculares desencadenados en las plantas como en términos de los mecanismos celulares de respuesta para contender con las bajas temperaturas. Entre estos mecanismos está la aclimatación, en la que los esfingolípidos juegan un papel importante.

La síntesis *de novo* de los esfingolípidos está muy conservada en eucariotes. La primera reacción de la vía está catalizada por la SPT, una enzima presente en todos los organismos, la cual, por ser la primera enzima de la vía, resulta un blanco estratégico de regulación metabólica. Este trabajo se ha enfocado en explorar la posibilidad de que la disminución de esfingolípidos membranales por una exposición al frío (Uemura *et al.*, 1995), se deba a una menor generación de esfingolípidos. Esta disminución podría originarse por un mecanismo post-traducciona l de regulación de la actividad de la enzima SPT, algo que apenas se comienza a entender (Hjelmqvist *et al.*, 2002; Kimberlin *et al.*, 2013). Pero la disminución de los esfingolípidos se podría deber a una menor síntesis de la SPT, lo cual puede derivar de un control transcripcional de los genes que codifican a las subunidades de la enzima. Esta condición no es fácil de explorar, pues la SPT es una enzima compleja, cuyo heterodímero está formado por una subunidad reguladora (LCB1) y una catalítica (LCB2). La última está presente en dos versiones en *A. thaliana*: LCB2a y LCB2b, ambas versiones son funcionalmente redundantes (Dietrich *et al.*, 2008).

Bajo estas consideraciones, en esta tesis se planteó la pregunta sobre la existencia de una regulación transcripcional de los genes codificantes de la subunidad catalítica de la SPT (LCB2) de *A. thaliana*, cuando las plantas son sometidas a la aclimatación al frío. La estrategia experimental se basó en estudiar la expresión de los genes de las subunidades catalíticas en plantas con dos entornos genéticos diferentes. En uno de ellos, el de las plantas silvestres, la expresión de los transcritos *LCB2a* y *LCB2b* responde libremente a la exposición a la condición de aclimatación. El otro entorno genético es el de la línea *hp*, en la que no existe la posibilidad de que la planta exprese el gen *LCB2a*, pues está interrumpido por un transposón (Dietrich *et al.*, 2008), de tal manera que la síntesis de esfingolípidos de la planta depende solo del gen *LCB2b*. Sin embargo, esta condición se ve comprometida de una manera crítica cuando el gen *LCB2b* es silenciado gradualmente por la expresión controlada de una horquilla de RNA que se induce por la metoxifeno zida. En este trabajo, también se exploró el comportamiento de la planta con este genotipo ante la aclimatación. Se eligió esta estrategia ya que algunos genes se expresan dependiendo de las condiciones de estrés ambiental o metabólico.



1. La capacidad de aclimatación de las plántulas silvestres de *A. thaliana* es la misma entre 3 y 5 semanas de edad

En nuestro laboratorio se tiene establecido el tiempo necesario para aclimatar a las plantas silvestres adultas de *A. thaliana* (Cano-Ramirez, 2014). Sin embargo, debido a que la tolerancia al frío cambia durante el ciclo de vida de las plantas (Bertin *et al.*, 1996), en este trabajo se determinó el tiempo necesario para aclimatar a las plántulas silvestres de *A. thaliana*. Una aclimatación exitosa conduce a una respuesta de sobrevivencia de la planta expuesta a condiciones de congelación.

El daño causado por el congelamiento es principalmente consecuencia de la deshidratación de las células, lo cual causa daños irreversibles a las membranas (Steponkus, 1984). Además, existe una elevada producción de ERO que contribuye al daño de las membranas, así como a la desnaturalización de proteínas (Thomashow, 1999). Las plantas expuestas al estrés por frío muestran síntomas fenotípicos que incluyen: reducida expansión de las hojas, marchitez, clorosis, que eventualmente pueden desembocar en una necrosis generalizada de todos los tejidos (Yadav, 2010). En este trabajo se probaron tres tiempos diferentes de congelamiento (1, 2 y 3 h) para determinar cuál de ellos era suficiente para causar un daño evidente en las plántulas.

La tolerancia al congelamiento que se obtiene con la aclimatación, es un proceso gradual en el que se desencadenan respuestas moleculares tales como: sistemas de transducción de señales, la detoxificación de las ERO, la producción de moléculas crio-protectoras, la activación de factores de transcripción y de genes de respuesta al estrés, sólo por mencionar las más generales (Yadav, 2010). Con el propósito de determinar el tiempo mínimo en el que las plántulas desarrollan tolerancia al congelamiento se probaron tres diferentes tiempos de aclimatación (exposición a 4 °C): 1, 2 y 3 semanas. Se consideró como una aclimatación exitosa cuando hay ausencia de clorosis o necrosis de las hojas de las plántulas, lo cual fue evaluado una vez transcurrido el periodo de recuperación.

Debido a que había que considerar el tiempo de crecimiento, el tiempo de aclimatación y el tiempo de reto dentro del diseño experimental, se procedió a estandarizar cada uno de ellos con las plántulas silvestres, las cuales se encuentran en un periodo de crecimiento muy activo. Para evaluar el efecto de la aclimatación en la edad de las plántulas, se diseñaron dos tipos de experimentos. En el primer experimento (Figura 23A), todas las plantas se crecieron por 2 semanas a 22° C y a partir de este momento se inició la aclimatación en tres diferentes grupos: de 1, 2 y 3 semanas a 4°C. Al término de estos tiempos, los grupos se expusieron al reto de -15 °C. Este diseño implica que si bien todas las plantas iniciaron la aclimatación a la misma edad, los grupos recibieron el reto a las 3, 4 y 5 semanas de edad. En el segundo experimento (Figura 23B), un grupo de plantas se creció por dos semanas y a esa edad se inició la aclimatación por 3 semanas; otro grupo se creció por tres semanas, al cabo de las cuales se inició la aclimatación por 2 semanas y en un tercer grupo, las plantas se crecieron por 4



semanas; al cabo de las cuales, se les sometió a la aclimatación por 1 semana. Terminada la aclimatación, las plántulas se sometieron al reto de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. En este segundo experimento, las plantas tenían diferente edad al inicio de la aclimatación, pero todas tenían la misma edad al momento del reto.

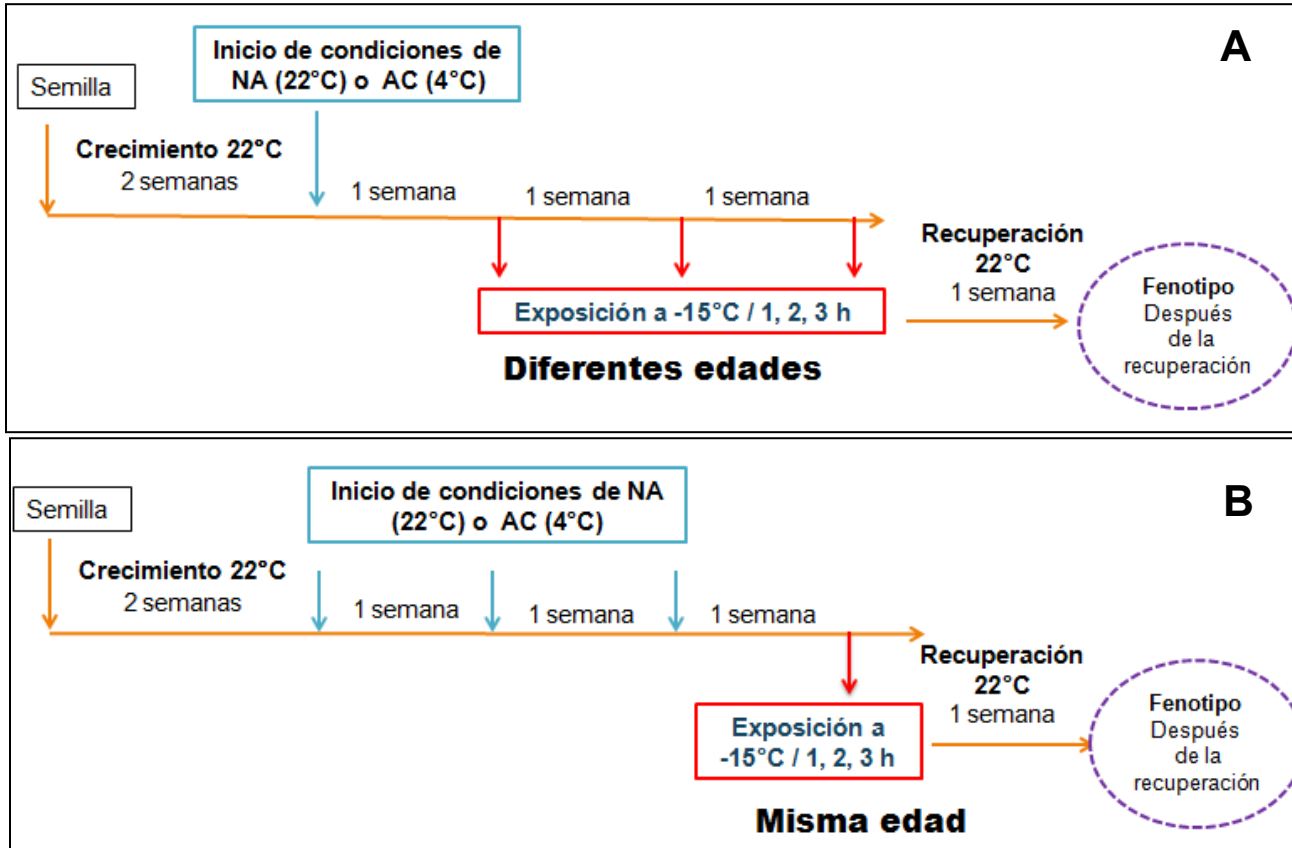


Figura 23. Diagramas de trabajo para determinar el tiempo de aclimatación exitoso de las plántulas silvestres de *A. thaliana*. A) Plántulas silvestres de 2 semanas de edad se sometieron a tres diferentes tiempos de aclimatación (1, 2 y 3 semanas), posteriormente se congelaron a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1, 2 o 3 h, finalmente se dejaron recuperar a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una semana y se tomó el registro fenotípico. B) plántulas se introdujeron a la aclimatación gradualmente, de tal forma que estas fueran expuestas a la misma edad (5 semanas) al reto de congelamiento por 1, 2 o 3 h, finalmente se dejaron recuperar a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una semana y se tomó el registro fenotípico.

Cuando las plántulas se expusieron al congelamiento a diferentes edades, los resultados revelaron que las plántulas de 3, 4 y 5 semanas de edad, aun sin ser aclimatadas presentaron resistencia al congelamiento durante 1 o 2 h. La aclimatación en las plántulas de 3 y 5 semanas de edad mejoró su resistencia al congelamiento. Los resultados anteriores indican que las plántulas silvestres de dos semanas tienen naturalmente una capacidad intrínseca de resistir un estrés de congelamiento y que esta resistencia se mejoró con aclimatación de una semana, lo que implica que entre 2 y 5 semanas se pueden los mecanismos que conducen a una tolerancia al congelamiento en las plántulas silvestres. Cuando las plántulas silvestres se expusieron al congelamiento a la misma edad, los



resultados indican que las plántulas de 5 semanas tienen una resistencia basal al congelamiento, lo cual concuerda con los resultados del primer tipo de experimento. Cuando las plántulas de diferente edad (2, 3 y 4 semanas) se expusieron a la aclimatación (por 3, 2 y 1 semanas, respectivamente), la magnitud de la resistencia al congelamiento fue la misma en todos los casos. Estos resultados indican que al menos en el intervalo de edades estudiado (3-5 semanas), las plántulas fueron capaces de desarrollar una aclimatación exitosa y que ésta fue de la misma magnitud, si se lleva a cabo por 1, 2 o 3 semanas de exposición a 4 °C. Los resultados son complementarios y consistentes con los reportados por Uemura *et al.* (1995), quienes evaluaron la capacidad de aclimatación por la liberación de solutos de hojas de plántulas de *A. thaliana* inmediatamente después del reto de congelamiento, indicando que la capacidad de aclimatación de las plántulas silvestres de *A. thaliana* aumentó entre el primero y el séptimo día, alcanzando un máximo a los 7 días que se mantuvo hasta los 14 días.

Comparando estos resultados con los obtenidos previamente en el laboratorio con plantas adultas, las plántulas presentaron mayor resistencia al reto de congelamiento, ya que fue necesario someterlas por 3 h a -15 °C para causar daños evidentes, en comparación con las plantas adultas silvestres que sufrieron daños por congelamiento a los 80 min de exposición. Esto coincide con el trabajo realizado por Takagi *et al.* (2003), en el que las hojas más jóvenes de las plantas fueron más tolerantes al congelamiento que las hojas maduras. Lo anterior sugiere que los tejidos que son más activos metabólicamente, pueden reaccionar de forma más rápida y efectiva al estrés por frío.

2. Los genes *LCB2a* y *LCB2b* no modifican su expresión durante la aclimatación al frío en las plántulas silvestres

Este trabajo se enfocó en el estudio de los niveles de transcripción de los genes que codifican para la subunidad catalítica de la SPT; la subunidad LCB2, que contiene el residuo de serina encargado de unir al fosfato de piridoxal requerido para la reacción. Cabe resaltar que en ese trabajo no se analizó la expresión del gen de la subunidad LCB1 cuya expresión se ha demostrado que es esencial para el desarrollo de las plantas (Chen *et al.*, 2006). No se pudieron recuperar las mutantes homocigotas sin el gen *LCB1* de *A. thaliana*, lo cual es consistente con un papel esencial de los esfingolípidos durante el desarrollo de las plantas. Ahí la represión parcial de *LCB1* con un RNAi resulta en plantas que crecen mal, una morfología alterada de las hojas y el desarrollan de lesiones necróticas en las hojas maduras (Chen *et al.*, 2006).

En este trabajo se demostró que el nivel de expresión de los genes *LCB2a* y *LCB2b* no cambió entre la segunda y la cuarta semana de edad en condiciones normales de crecimiento de las plántulas silvestres. Además no pudimos determinar diferencias en el nivel de expresión entre *LCB2a* y *LCB2b*. Lo anterior contrasta con el reporte Dietrich *et al.*, (2008), el cual determinó por el método de Northern



que *LCB2a* se expresa en mayor proporción que *LCB2b* en las hojas de plántulas de *A. thaliana*. Las mediciones realizadas en este trabajo se llevaron a cabo haciendo uso de la técnica de PCR punto final, por lo que quizás la baja sensibilidad de este procedimiento no haya permitido observar cambios pequeños en los niveles de expresión de los genes.

Cuando las plántulas silvestres se aclimataron (18 y 25 días), los niveles de los transcritos no cambiaron con respecto a las plántulas que no fueron aclimatadas, lo que refleja que la expresión de los genes *LCB2a* y *LCB2b* no se modifica por la aclimatación. La dispersión alrededor de los valores permite llegar a la conclusión anterior pero hay que reconocer que los valores promedio de ambos genes durante la aclimatación son menores con respecto a los valores obtenidos sin aclimatación. Por ello, es necesario hacer más réplicas de estos experimentos o determinar los niveles de transcrito de ambos genes mediante una técnica más sensible. Tomando como cierta la conclusión de que la aclimatación no produce cambios en los niveles de los transcritos de los dos genes *LCB2*, sugiere que ambos genes no son responsables de una menor cantidad de SPT ni de la disminución de esfingolípidos de la membrana plasmática de *A. thaliana* reportados por Uemura *et al.*, (1995). Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Kilian *et al.*, (2007) con microarreglos, quienes analizaron los cambios en la expresión de 2400 genes de *A. thaliana* bajo diferentes condiciones de estrés. Sus resultados indicaron que no había cambios en la expresión de los genes de la SPT de *A. thaliana* en las primeras 24 h de estrés por frío, pero no siguieron tiempos más largos (ANEXO D).

Un análisis *in silico* de las secuencias de los promotores de *LCB2a* y *LCB2b* indica que no hay regiones de unión a factores de transcripción de respuesta a frío. Sin embargo, resulta interesante que en los promotores de ambos genes existen motivos putativos de respuesta a la luz y de respuesta a estrés ambiental. En contraste con los resultados anteriores, hay dos casos en los que se ha encontrado una regulación en la transcripción de los genes de la SPT bajo condiciones de estrés en las plantas. Uno de ellos es el estudio realizado en *A. thaliana* en estrés por sal, en donde se encontró una regulación positiva de los niveles del transcrito de las tres subunidades de la SPT; *LCB1*, *LCB2a* y más aún el transcrito que codifica para la subunidad *LCB2b* (Wu *et al.*, 2014). El otro caso es el estudio realizado en *Nicotiana benthamiana*, en el que se encontró un aumento en la expresión del gen *LCB2* en respuesta a la infección con el patógeno no hospedero *Pseudomonas cichorii* (Takahashi *et al.*, 2009).

Si no hay una regulación transcripcional de los genes de la SPT que explique la disminución de los esfingolípidos de la membrana plasmática, ¿qué otra posibilidad explica tal efecto? A nivel post-traducciona, se ha estudiado recientemente la regulación de la SPT en términos de sus subunidades pequeñas, llamadas ssSPTa y ssSPTb, las cuales interactúan físicamente con la *LCB2a* y la *LCB2b*, respectivamente. Estos polipéptidos estimulan la actividad de la SPT y contribuyen a la especificidad



por el sustrato acil-CoA (Han *et al.*, 2009; Kimberlin *et al.*, 2013). Sin embargo, aún no se ha dilucidado el mecanismo por el cual las ssSPT estimulan la actividad de la SPT. Se han identificado en *A. thaliana* otros polipéptidos regulatorios de la SPT (Hjelmqvist *et al.*, 2002), pero su función sólo se ha establecido en levaduras. Estos polipéptidos llamados ORM1 y ORM2 regulan negativamente la actividad de la SPT mediante fosforilación en el amino terminal de la enzima cuando hay niveles altos de esfingolípidos. Por otro lado, un análisis esfingolipidómico demostró que la mutante *sbh1/sbh2*, la cual carece de los genes que codifican para las hidroxilasas en C-4 de las BCL y que por lo tanto carece de BCL trihidroxiladas, presenta un nivel de dos a tres veces más alto de esfingolípidos totales con respecto a las plantas silvestres (Chen *et al.*, 2008). Se ha sugerido que los esfingolípidos trihidroxilados o intermediarios biosintéticos controlan la actividad de la SPT vía las ORMs en plantas (Markham *et al.*, 2013). Estos trabajos indican que la regulación de la SPT a través de sus subunidades pequeñas es un área importante de investigación que puede dar información valiosa sobre la homeostasis de los esfingolípidos en condiciones basales y de estrés.

Las plantas utilizan al menos dos vías para generar esfingolípidos, la biosíntesis *de novo*, comenzando con la condensación de la serina y un acil-CoA y la vía de generación alternativa, en donde las ceramidas y las BCL son liberadas a partir de esfingolípidos complejos preformados. En plántulas de *A. thaliana* tratadas con frío se ha observado una formación rápida y transitoria de la BCL fitoesfingosina-1-fostato (Dutilleul *et al.*, 2012) y de las ceramidas fosforiladas (Cantrel *et al.*, 2011). Dutilleul *et al.* (2015) demostraron que tanto la actividad como la expresión génica de la ceramida cinasa ACD5 (por sus siglas en inglés, accelerated cell death) son las responsables del aumento de las ceramidas fosforiladas en el tratamiento con frío reportado en *A. thaliana* por Cantrel *et al.* (2011). Es difícil adjudicar el aumento de los esfingolípidos simples a una degradación de los esfingolípidos complejos de la membrana plasmática para explicar el resultado de disminución de esfingolípidos complejos en la membrana plasmática observado por Uemura *et al.* (1995) bajo exposición a bajas temperaturas. Si bien la función señalizadora de los esfingolípidos simples se debe a un aumento transitorio de BCL (Saucedo-García *et al.*, 2011), estos niveles no podrían alterar el contenido masivo de esfingolípidos complejos en la membrana plasmática (Cacas *et al.*, 2011).

3. El fenotipo de silenciamiento del gen *LCB2b* en las plántulas mutantes *hp* es retardado con la aclimatación

La inducción de la expresión de la horquilla de RNA que funciona como un RNAi que silencia la expresión del gen *LCB2b* en la línea mutante *hp*, se vio reflejada en un fenotipo de clorosis generalizada en las hojas de las plantas adultas de la línea mutante *hp+* de *A. thaliana* (Dietrich *et al.*, 2008). En este trabajo, para estudiar el efecto de la aclimatación en la expresión del gen *LCB2b* en plántulas mutantes *hp+*, se evaluó la acción del inductor metoxifenazida aplicado a los 4 y 6 días antes de la exposición a la AC por una semana. Mientras el fenotipo de silenciamiento ya era muy



evidente al término del periodo control (NA), en condiciones de AC el fenotipo de silenciamiento no era perceptible, sugiriendo que las bajas temperaturas no permiten el efecto del agente inductor. Por ello, las plántulas hp+ y su control WT+ (plantas silvestres expuestas al inductor) se mantuvieron en AC por un periodo de tiempo adicional. El fenotipo de clorosis en las hojas de las plántulas hp+ debida al silenciamiento se presentó 2 semanas después en condiciones de AC en comparación con las plántulas NA. De estas observaciones surgen las siguientes preguntas: ¿El mecanismo de silenciamiento ya había sido encendido tanto a los 4 y a los 6 dpi a 22 °C? Si esto fuera así, ¿el retardo en el fenotipo de silenciamiento se debió a que el frío del tratamiento posterior estaba inhibiendo el mecanismo de silenciamiento? O bien, ¿existía una regulación transcripcional positiva del gen *LCB2b* en respuesta a frío, que de alguna manera estaba contrarrestando el efecto del silenciamiento? Szittyá *et al.* (2003) demostraron que el silenciamiento mediado por el RNAi es dependiente de la temperatura en las plantas. Los RNAi contienen secuencias específicas que les permiten mediar el silenciamiento génico transcripcional que incluye una metilación directa de segmentos complementarios de DNA (Mette *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2002). A bajas temperaturas, la metilación mediada con el RNAi probablemente disminuya causando una reanudación en la expresión de los genes silenciados (Szittyá *et al.*, 2003). Lo anterior podría explicar el retardo del silenciamiento observado en las plantas hp. A ello se podría sumar una posible regulación positiva de *LCB2* como la demostrada en un caso de respuesta a estrés por patógenos (Takahashi *et al.*, 2009) o al incremento en el nivel de transcripción del gen *LCB2b* en respuesta a estrés por sal (Wu *et al.*, 2014).

4. La expresión del gen *LCB2b* se ve regulada durante la aclimatación al frío en las plántulas hp

Para responder a las preguntas planteadas en la sección anterior, se evaluó la expresión del gen *LCB2b* a diferentes tiempos de exposición al inductor: 0, 3, 6, 8 y 10 dpi sin aclimatación. Los fenotipos de estas plántulas mostraron que la clorosis de las hojas debido al silenciamiento se incrementó con el paso del tiempo, siendo las plántulas más cloróticas y dañadas las expuestas al inductor por 8 y 10 días. Con la finalidad de conocer el efecto de la aclimatación en la regulación del gen *LCB2b* en las plántulas hp+, el inductor se dejó actuar por 6 días a 22 °C y se sometieron a la aclimatación. Las plántulas se colectaron hasta que su grado de daño por efecto del silenciamiento fuera equivalente fenotípicamente al de las plántulas colectadas a los 8 y 10 días en NA. Por lo que las plántulas hp+ que se sometieron a la AC se colectaron a los 18 y 25 dpi.

El nivel del transcrito *LCB2b* determinado en la mutante hp- indicó que su expresión, al igual que en las plántulas silvestres, no cambió durante la no aclimatación. Este resultado era el esperado, ya que en estas plántulas no había posibilidad de silenciamiento del gen *LCB2b*. Sin embargo, cuando las plántulas hp- se expusieron a la aclimatación, la expresión del gen *LCB2b* a los 25 dpi incrementó el



29 % indicando una respuesta de la expresión génica de *LCB2b* a la aclimatación en las plántulas hp-. Lo anterior sugiere que hay una regulación transcripcional durante la aclimatación de esta subunidad de la SPT, pero se lleva a cabo cuando sólo hay una versión del heterodímero (en este caso la LCB1/LCB2b). La función redundante de los genes *LCB2a* y *LCB2b* (Dietrich *et al.*, 2008) hace pensar que en una mutante que dependiera sólo del heterodímero LCB1/LCB2a, también veríamos un aumento en la expresión del gen *LCB2a* en respuesta a la aclimatación. Aunque el estudio que reporta una mayor respuesta del gen *LCB2b* en respuesta al estrés salino (Takahashi *et al.*, 2009), sugiere que el incremento de la expresión de *LCB2a* puede ser menor.

En las plántulas hp+ NA, la acción del inductor del silenciamiento del gen *LCB2b* se observó desde el tercer día post-inducción con una disminución drástica de la expresión de dicho gen, lo que indica que cuando las plántulas hp+ se sometieron a la aclimatación a los 6 dpi, el proceso de silenciamiento ya había comenzado. Sin embargo, cuando estas plántulas se sometieron a la aclimatación, la expresión de *LCB2b* aumentó (a los 18 dpi) con respecto las plántulas que no se aclimataron, en las que la expresión se mantuvo en niveles basales. A los 25 dpi en las plántulas hp+ aclimatadas, la dispersión experimental no permite concluir un aumento del transcrito. Sin embargo, considerando que la expresión del gen aumentó a los 25 dpi en las plántulas hp- AC, se puede suponer un aumento en la expresión de *LCB2b* en las plántulas hp+ a los 25 dpi. Estos resultados sugieren que el aumento en la expresión del gen *LCB2b* en las plántulas hp silenciadas está dado por una regulación positiva de la expresión de este transcrito en respuesta a la aclimatación, y no por la inhibición del sistema de silenciamiento por las bajas temperaturas. Lo último se apoya en que tanto en las plántulas en las que no se había encendido el proceso de silenciamiento (hp-) como en las que sí (hp+), se observó el incremento del transcrito.

La regulación transcripcional de los genes de la SPT se ha descrito en varios organismos (Farrell *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2009). Sin embargo, el mecanismo por el cual son regulados no se ha descrito en plantas. Geekiyana y Chan (2011) encontraron que existen miRNAs capaces de modular la expresión de los genes de la SPT durante la enfermedad del Alzheimer en humanos.

5. La ausencia del gen *LCB2a* en las plántulas hp les confiere un fenotipo de resistencia al congelamiento

Debido a que la exposición de las plántulas al inductor por tiempos prolongados resulta en daños severos y muerte en la planta y a que el fenotipo de silenciamiento del gen *LCB2b* en las plántulas hp+ se vio retardado por la exposición al frío, fue necesario ajustar los tiempos para someter a las plántulas hp al congelamiento a la misma edad. Se escogió el tiempo de congelación de 3 h usado en las plántulas silvestres, con el cual se observa daño generalizado cuando las plántulas no son aclimatadas. Las plántulas hp presentaron fenotipos de resistencia a la congelación y clorosis en las



plántulas hp+. Para poder ver si el daño en las hojas hp+ era debido al estrés por el congelamiento o al fenotipo de silenciamiento, se hicieron controles con plántulas hp+ sin congelamiento.

La resistencia al congelamiento y sin una previa aclimatación denota la importancia de conocer las características que estas plántulas adquirieron al no tener expresado el gen *LCB2a*. Si bien, las plántulas hp+ resistieron el congelamiento aún sin haber sido aclimatadas, presentaron un grado moderado de clorosis en sus hojas pero estos daños parecen estar asociados con la acción del inductor, porque las plántulas hp+ que no fueron sometidas al congelamiento, presentaron un grado de clorosis similar. Este comportamiento señala que la inducción del silenciamiento del gen *LCB2b* en las plántulas hp+ no perjudicó la respuesta de estas plántulas ante el congelamiento.

En el laboratorio se determinó que la fluidez de la membrana plasmática de las plantas adultas hp- y hp+ es menor que la de las plantas silvestres (Cano-Ramírez, 2014). Cabe la posibilidad de que esta característica de las plantas hp funcione como una preparación para contender con el congelamiento sin necesidad de someterse al proceso de aclimatación, ya que Orvar *et al.*, (2000) determinó que el incremento de la rigidez de la membrana plasmática es una de las primeras respuestas en la percepción del frío. El aumento de la rigidez podría corresponder a un aumento en los esfingolípidos membranales y por tanto a un aumento en la transcripción, la actividad o en la cantidad de la SPT como respuesta a las bajas temperaturas. En concordancia con lo anterior, el hecho de que las plántulas mutantes hp- y hp+ tuvieran un aumento en los niveles del transcrito *LCB2b* durante la aclimatación, lo cual no sucedió en las plántulas silvestres, sugiere que a las plántulas hp- y hp+, al contar sólo con una versión de la subunidad catalítica de la SPT, les fue de primordial importancia conservar esa única versión, probablemente debido a la relevancia de mantener la síntesis de esfingolípidos durante la aclimatación al frío.

Existen estudios recientes en los que se describe la importancia de los esfingolípidos durante el proceso de aclimatación. Su participación como moléculas estructurales en respuesta al frío se ha documentado a través de su presencia como esfingolípidos complejos en balsas lipídicas esenciales para la acumulación de una proteína importante para la resistencia al congelamiento (Minami *et al.*, 2015; Cacas *et al.*, 2016). También como lípidos estructurales, las modificaciones que sufren los esfingolípidos complejos durante su síntesis son importantes, por ejemplo, la insaturación $\Delta 8$ de las BCLs es primordial para la sobrevivencia de *A. thaliana* a las bajas temperaturas (Chen *et al.*, 2012). Como moléculas señalizadoras, los esfingolípidos simples participan en el proceso de respuesta a frío, ya que se ha demostrado que la base de cadena larga t18:0 o fitoesfingosina-1-fosfato es necesaria para la activación de la MPK6 en respuesta a bajas temperaturas (Dutilleul *et al.*, 2012). Saucedo-García *et al.* (2015) ha propuesto que la activación de MPK6 puede regular la acumulación de las especies reactivas de oxígeno durante la aclimatación, en similitud con lo que puede ocurrir en



el estrés por patógenos (Saucedo-García *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha demostrado que la fosforilación transitoria de las bases de cadena larga es regulada por el óxido nítrico, el cual también es inducido en respuesta al frío (Cantrel *et al.*, 2011). Aunado a estas respuestas de los esfingolípidos al frío, se sabe que la transferencia de fosfolípidos con VLCFA (por sus siglas en inglés very-long-chain fatty acid), los cuales forman parte de los esfingolípidos, es sensible a las bajas temperaturas. Dadas todas estas importantes funciones conocidas de los esfingolípidos en la tolerancia a las bajas temperaturas, resulta lógico esperar que la regulación de su síntesis y degradación estén afectadas en este estrés. La SPT es indudablemente, un candidato ideal para instrumentar este control.



CONCLUSIONES PARTICULARES

- La capacidad de aclimatación de las plántulas silvestres de *A. thaliana* es la misma entre 3 y 5 semanas de edad.
- Los niveles de los transcritos de los genes *LCB2a* y *LCB2b* no cambian durante la aclimatación al frío en las plántulas silvestres.
- El fenotipo producido por el silenciamiento del gen *LCB2b* en las plántulas mutantes hp es retardado por la aclimatación.
- El nivel de expresión del gen *LCB2b* aumenta en ausencia de *LCB2a* durante la aclimatación al frío en las plántulas mutantes hp.
- La ausencia del gen *LCB2a* en las plántulas hp les confiere un fenotipo de resistencia al congelamiento.

CONCLUSION GENERAL

La disminución de los niveles de esfingolípidos de la membrana plasmática de *A. thaliana* durante la aclimatación al frío no se debe a una disminución en la transcripción de los genes que codifican para las subunidades *LCB2a* y *LCB2b* de la serina palmitoiltransferasa. Sin embargo, cuando la producción de esfingolípidos depende sólo de una versión del heterodímero (*LCB1/LCB2b*), los niveles del transcrito del gen *LCB2b* aumentan.

PERSPECTIVAS

Debido a que en algunos tiempos de muestreo las determinaciones de los transcritos de *LCB2a* y *LCB2b* en las plántulas silvestres presentaron una variación considerable, es importante hacer estas cuantificaciones con una técnica más sensible, como lo es la qPCR. Asimismo, resulta importante cuantificar los niveles del gen *LCB1*, ya que sólo un gen es responsable de su expresión y su regulación podría ser crucial en la aclimatación.

Para conocer si existe una regulación de la SPT a nivel de proteína, es importante determinar los niveles de la enzima y su actividad catalítica en las plántulas silvestres y en las plántulas hp- y hp+ en condiciones de NA y AC.

El análisis de esfingolípidos membranales en los tiempos de variación de los transcritos de los genes de la SPT es un parámetro necesario para entender los resultados obtenidos.

La confrontación de los niveles de transcritos de las tres subunidades de la SPT, la actividad de la enzima, sus niveles como proteína y la composición de esfingolípidos membranales, mejorarán la comprensión de la homeostasis membranal y la regulación de la SPT en condiciones de estrés.



BIBLIOGRAFÍA

- Ashraf, M. A., Harris, P. J. (2005).** Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches. Food Products Press. Faisalabad.
- Baker, S. S., Wilhelm, K. S., Thomashow, M. F. (1994).** The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought-and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*, 24, 701-713.
- Bertin, P., Kinet, J. M., Bouharmont, J. (1996).** Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. *Euphytica*, 89, 201-210.
- Blacklock, B. J., Jaworski, J. G. (2006).** Substrate specificity of *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA synthases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, 583-590.
- Breslow, D. K., Collins, S. R., Bodenmiller, B., Aebersold, R., Simons, K., Shevchenko, A., Ejsing, C. S., Weissman, J. S. (2010).** Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature*, 463, 1048-1053.
- Brown, D. A., London, E. (1998).** Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 111-136.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000).** *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Vol. 40), American Society of Plant Physiologists. Rockville.
- Buré, C., Cacas, J. L., Wang, F., Gaudin, K., Domergue, F., Mongrand, S., Schmitter, J. M. (2011).** Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 3131-3145.
- Cacas, J. L., Buré, C., Grosjean, K., Gerbeau-Pissot, P., Lherminier, J., Rombouts, Y., Fouillen, L., Germain, V., Bayer, E., Cluzet, S., Robert, F., Schmitter, J. M., Deleu, M., Lins, L., Simon-Plas, F., Mongrand, S. (2015).** Re-visiting plant plasma membrane lipids in tobacco: a focus on sphingolipids. *Plant Physiology*, 170, 367-384.
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W. M., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowsky, A., Baudouin, E. (2011).** Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 189, 415-427.



- Chen, M., Markham, J. E., Cahoon, E. B. (2012).** Sphingolipid $\Delta 8$ unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69, 769-781.
- Chen, M., Markham, J. E., Dietrich, C. R., Jaworski, J. G., Cahoon, E. B. (2008).** Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20, 1862-1878.
- Chen, M, Cahoon E. B., Saucedo-García M., Plasencia J. Gavilanes-Ruiz M (2009).** Plant sphingolipids: Structure, synthesis and function. En: *Lipids in Photosynthesis. Essential and Regulatory Functions.* (Wada H and Murata N Eds.) *Advances in Photosynthesis and Respiration.* Vol. 30. Govindjee, Series Ed. Springer, Dordrecht. Pp 77-115.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.H., Hong, X., Agarwal, M. and Zhu, J.K. (2003)** ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 17, 1043–1054.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. K., Sunkar, R. (2010).** Gene regulation during cold stress acclimation in plants. In: *Plant Stress Tolerance. Methods in Molecular Biology.* Humana Press. Pp. 39-55
- Contreras, F. X., Ernst, A. M., Wieland, F., Brügger, B. (2011).** Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1-18
- Devaux, P. F., Morris, R. (2004).** Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*. 241-246.
- Dietrich, C. R., Han, G., Chen, M., Berg, R. H., Dunn, T. M., Cahoon, E. B. (2008).** Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis LCB2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *The Plant Journal*, 54, 284-298.
- Dutilleul, C., Benhassaine-Kesri, G., Demandre, C., Rézé,N., Launay, A., Pelletier, S., Renou, J. P., Zachowski, A., Baudouin, E., Guilas, I. (2012).** Phytosphingosine-phosphate is a signal for *AtMPK6* activation and *Arabidopsis* response to chilling. *New Phytologist*, 194, 181–191.
- Dong, C. H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q., Zhu, J. K. (2006).** The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 8281–8286.
- Dowgert, M. F., Steponkus, P. L. (1984).** Behavior of the plasma membrane of isolated protoplasts during a freeze-thaw cycle. *Plant Physiology*, 75, 1139-1151.



- Farrell, A. M., Uchida, Y., Nagiec, M. M., Harris, I. R., Dickson, R. C., Elias, P. M., Holleran, W. M. (1998). UVB irradiation up-regulates serine palmitoyltransferase in cultured human keratinocytes. *Journal of Lipid Research*, 39, 2031-2038.
- Gable, K., Han, G., Monaghan, E., Bacikova, D., Natarajan, M., Williams, R., Dunn, T. M. (2002). Mutations in the yeast *LCB1* and *LCB2* genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 10194-10200.
- Gable, K., Slife, H., Bacikova, D., Monaghan, E., Dunn, T. M. (2000). Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 7597-7603.
- Gordon-Kamm, W. J., Steponkus, P. L. (1984a). The behavior of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts: implications in freezing injury. *Protoplasma*, 123, 83-94.
- Gordon-Kamm, W. J., Steponkus, P. L. (1984b). Lamellar-to-hexagonal III phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81, 6373-6377.
- Guillas, I., Zachowski, A., Baudouin, E. (2011). A matter of fat: interaction between nitric oxide and sphingolipid signaling in plant cold response. *Plant Signaling and Behavior*, 140-142.
- Han, G., Gupta, S. D., Gable, K., Niranjanakumari, S., Moitra, P., Eichler, F., Brown, R. H., Harmon, J. F., Dunn, T. M. (2009). Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 8186-8191.
- Han, G., Gable, K., Yan, L., Natarajan, M., Krishnamurthy, J., Gupta, S. D., Dunn, T. M. (2004). The topology of the *LCB1p* subunit of yeast serine palmitoyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 53707-53716.
- Hanada, K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1632, 16-30.
- Hopkins, W. G., Hüner, N. P. (1995). *Introduction to plant physiology* (Vol. 355). J. Wiley. New York.
- Hundertmark, M., Hinch, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 118.



- Ingram, J., Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47, 377-403.
- Imai, H., Yamamoto, K., Shibahara, A., Miyatani, S., Nakayama, T. (2000). Determining double-bond positions in monoenoic 2-hydroxy fatty acids of glucosylceramides by gas chromatography-mass spectrometry. *Lipids*, 35, 233-236.
- Ikushiro, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H. (2001). A Water-soluble Homodimeric Serine Palmitoyltransferase from *Sphingomonas paucimobilis* EY2395T Strain purification, characterization, cloning, and overproduction. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 18249-18256.
- Jammes, F., Song, C., Shin, D., Munemasa, S., Takeda, K., Gu, D., Cho, D., Giordo, R., Sritubtim, S., Leonhardt, N., Ellis, B. E., Murata, Y., Kwak, M. (2009). MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 20520-20525.
- Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K. Y., Vennekens, R., Nilius, B., Voets, T. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 1273-1278.
- Kaul, K., Lester, R. L. (1978). Isolation of six novel phosphoinositol-containing sphingolipids from tobacco leaves. *Biochemistry*, 17, 3569-3575.
- Kim, H. S., Oh, J. M., Luan, S., Carlson, J. E., Ahn, S. J. (2013). Cold stress causes rapid but differential changes in properties of plasma membrane H⁺-ATPase of camelina and rapeseed. *Journal of Plant Physiology*, 170, 828-837.
- Kimberlin, A. N., Majumder, S., Han, G., Chen, M., Cahoon, R. E., Stone, J. M., Dunn, T. M., Cahoon, E. B. (2013). *Arabidopsis* 56-amino acid serine palmitoyltransferase-interacting proteins stimulate sphingolipid synthesis, are essential, and affect mycotoxin sensitivity. *The Plant Cell*, 25, 4627-4639.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994). Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 35, 225-231.
- Knight, M. R., Knight, H. (2012). Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist*, 195, 737-751.



- Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z., Tompa, P. (2008).** Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology*, 147, 381-390.
- Lee, B. H., Henderson, D. A. Zhu, J.K. (2005)** The *Arabidopsis* cold responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell*, 17, 3155–3175.
- Levitt, J. (1980).** Water, radiation, salt, and other stresses (Vol. 2). Elsevier. New York
- Li, W., Wang, R., Li, M., Li, L., Wang, C., Welti, R., Wang, X. (2008).** Differential degradation of extraplastidic and plastidic lipids during freezing and post-freezing recovery in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 461-468.
- Lin, C., Thomashow, M. F. (1992).** A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 183, 1103-1108.
- Lingwood, D., Simons, K. (2010).** Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327, 46-50.
- Luckey, M. (2014).** Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations. Cambridge University Press. New York.
- Lynch, D. V., Dunn, T. M. (2004).** An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist*, 161, 677-702.
- Markham, J. E., Jaworski, J. G. (2007).** Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 1304-1314.
- Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B., Jaworski, J. G. (2006).** Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 22684-22694.
- Markham, J. E., Lynch, D. V., Napier, J. A., Dunn, T. M., Cahoon, E. B. (2013).** Plant sphingolipids: function follows form. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 350-357
- Martz, F., Sutinen, M. L., Kiviniemi, S., Palta, J. P. (2006).** Changes in freezing tolerance, plasma membrane H⁺-ATPase activity and fatty acid composition in *Pinus resinosa* needles during cold acclimation and de-acclimation. *Tree Physiology*, 26, 783-790.



- Mazars, C., Brière, C., Bourque, S., Thuleau, P. (2011).** Nuclear calcium signaling: an emerging topic in plants. *Biochimie*, 93, 2068-2074.
- Medina, J., BARGUES, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M., Salinas, J. (1999).** The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology*, 119, 463-470.
- Michaelson, L. V., Zäuner, S., Markham, J. E., Haslam, R. P., Desikan, R., Mugford, S., Napier, J. A. (2009).** Functional characterization of a higher plant sphingolipid $\Delta 4$ -desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149, 487-498.
- Miedema, P. (1982).** The effects of low temperature on *Zea mays*. *Advances in Agronomy*, 35, 93-128.
- Miura, K., Jin, J. B., Lee, J., Yoo, C. Y., Stirm, V., Miura, T., Ashworth, E. N., Bressan, R. A., Yun, D. J., Hasegawa, P. M. (2007).** SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19, 1403–1414.
- Miura, K., Furumoto, T. (2013).** Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 5312-5337.
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Andersen, J. P., Vilsen, B., Palmgren, M. G., Nissen, P. (2011).** A structural overview of the plasma membrane Na^+ , K^+ -ATPase and H^+ -ATPase ion pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 60-70.
- Mouritsen, O. G. (1991).** Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 57, 179-194
- Mukherjee, J. J., Dekker, E. E. (1990).** 2-Amino-3-ketobutyrate CoA ligase of *Escherichia coli*: stoichiometry of pyridoxal phosphate binding and location of the pyridoxyllysine peptide in the primary structure of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1037, 24-29.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2009).** *Lehninger Principios de Bioquímica*. Omega. New York
- Ng, C. K., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B., and Hetherington, A. M. (2001).** Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 410, 596–599.



- Novillo, F., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Salinas, J. (2004).** CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 101, 3985-3990.
- Novillo, F., Medina, J., Salinas, J. (2007).** *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 104, 21002–21007
- Ohlrogge, J., Browse, J. (1995).** Lipid biosynthesis. The Plant Cell, 7, 957-958
- Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F., Dhindsa, R. S. (2000).** Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. The Plant Journal, 23, 785-794.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A. (2002).** A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. Cell, 108, 705-715.
- Petty, H. R. (1993).** Molecular biology of membranes. Springer. New York
- Raper, C. D., Thomas, J. F. (1972).** Temperatures in early post-transplant growth: Effect on shape of mature *Nicotiana tabacum* L. leaves. Crop Science, 12, 540-542
- Renaut, J., Hausman, J. F., Wisniewski, M. E. (2006).** Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. Physiologia Plantarum, 126, 97-109.
- Richner, W., Soldati, A., Stamp, P. (1996).** Shoot-to-root relations in field-grown maize seedlings. Agronomy Journal, 88, 56-61.
- Riechmann, J. L., Meyerowitz, E. M. (1998).** The AP2/EREBP family of plant transcription factors. Biological Chemistry, 379, 633-646.
- Ruelland, E., Cantrel, C., Gawer, M., Kader, J. C., Zachowski, A. (2002).** Activation of phospholipases C and D is a nearly response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. Plant Physiology, 130, 999–1007.
- Roelants, F. M., Breslow, D. K., Muir, A., Weissman, J. S., Thorner, J. (2011).** Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 108, 19222-19227



- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K., Izui, K. (2000). Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant Journal*, 23, 319–327.
- Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruiz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F., Calzada-Alejo, V., Zurita-Villegas, V., Luna-Loaiza, V., Moreno-Sánchez, R., Bernal-Lugo, I., Sánchez-Nieto, S. (2012) Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4513-4526.
- Saucedo-García, M., Guevara-García, A., González-Solís, A., Cruz-García, F., Vázquez-Santana, S., Markham, J. E., Lozano-Rosas, G., Dietrich, C., Ramos-Vega, M., Cahoon, E., Gavilanes-Ruiz, M. (2011). MPK6, sphinganine and the *LCB2a* gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 191, 943-957.
- Saucedo-García, M., Gavilanes-Ruiz, M., Arce-Cervantes, O. (2015). Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs, and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-14.
- Silvius, J. R., Read, B. D., McElhaney, R. N. (1979). Thermotropic phase transitions of phosphatidylcholines with odd-numbered *n*-acyl chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 555, 175-178.
- Simons, K., Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.
- Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720-731.
- Smith, M. A., Dauk, M., Ramadan, H., Yang, H., Seamons, L. E., Haslam, R. P., Beaudoin, F., Ramirez-Erosa, I., Forseille, L. (2013). Involvement of *Arabidopsis* Acyl-Coenzyme a desaturase-like2 (*At2g31360*) in the biosynthesis of the very-long-chain monounsaturated fatty acid components of membrane lipids. *Plant Physiology*, 161, 81-96.
- Sperling, P., Heinz, E. (2003). Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1632, 1-15
- Sperling, P., Franke, S., Lüthje, S., Heinz, E. (2005). Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 1031-1038.



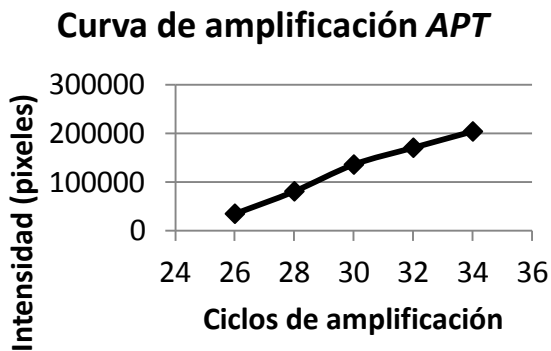
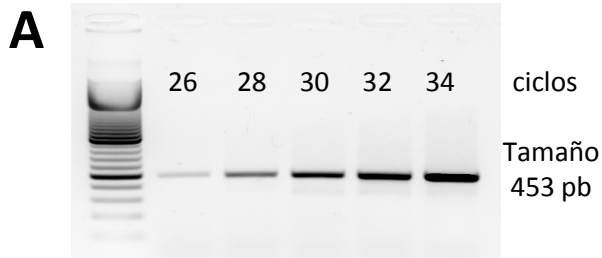
- Steponkus, P. L., Lynch, D. V., Uemura, M., Heber, U., Pearce, R. S. (1990).** The influence of cold acclimation on the lipid composition and cryobehaviour of the plasma membrane of isolated rye protoplasts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B: Biological Sciences*, 326, 571-583.
- Steponkus, P. L. (1984).** Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35, 543-584.
- Steponkus, P. L., Uemura, M., Joseph, R. A., Gilmour, S. J., Thomashow, M. F. (1998).** Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95, 14570-14575.
- Tamura, K., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Imai, H. (2001).** Characterization of an *Arabidopsis* cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 42, 1274-1281.
- Doherty, C. J., van Buskirk, H. A., Myers, S. J., Thomashow, M. F. (2009).** Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21, 972-984.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L., Hirt, H. (2004).** The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 15, 141-152.
- Thomashow, M. F. (1998).** Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology*, 118, 1-7.
- Thomashow, M. F. (1999).** Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 50, 571-599.
- Timperio, A. M., Egidi, M. G., Zolla, L. (2008).** Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71, 391-411.
- Townley, H. E., Knight, M. R. (2002).** Calmodulin as a potential negative regulator of *Arabidopsis* COR gene expression. *Plant Physiology*, 128, 1169-1172.
- Uemura, M., Yoshida, S. (1984).** Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology*, 75, 818-826.
- Uemura, M., Joseph, R. A., Steponkus, P. L. (1995).** Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant Physiology*, 109, 15-30.



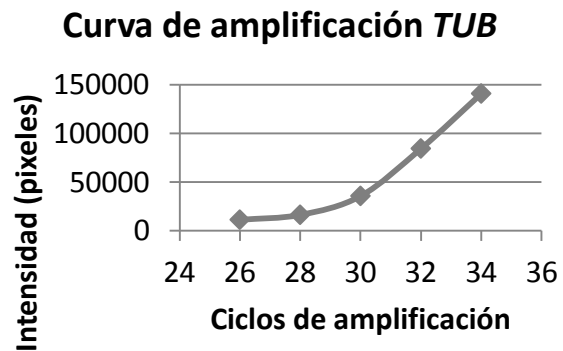
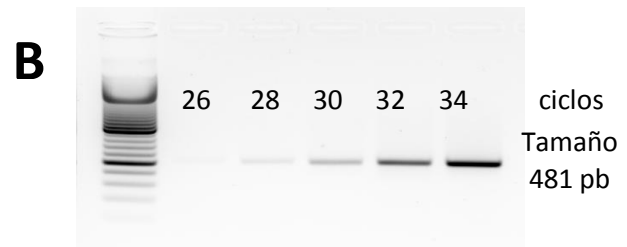
- Uemura, M., Steponkus, P. L. (1999).** Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *Journal of Plant Research*, 112, 245-254.
- Van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. (2008).** Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 112-124.
- van Doorn, W. G., Woltering, E. J. (2005).** Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*, 10, 117-122.
- Vara, F., Serrano, R. (1982).** Partial purification and properties of the proton-translocating ATPase of plant plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 12826-12830.
- Vaultier, M. N., Cantrel, C., Vergnolle, C., Justin, A. M., Demandre, C., Benhassaine-Kesri, G., Ciceq, D., Zachowski, A., Ruelland, E. (2006).** Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 580, 4218-4223.
- Webb, M. S., Uemura, M., Steponkus, P. L. (1994).** A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance. *Plant Physiology*, 104, 467-478.
- Yadav, S. K. (2010).** Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for sustainable development*, 30, 515-527
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994).** A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6, 251-264.
- Yoshida, S. (1984).** Chemical and biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz. cv Goroji). *Plant Physiology*, 76, 257-265.

ANEXOS

ANEXO A



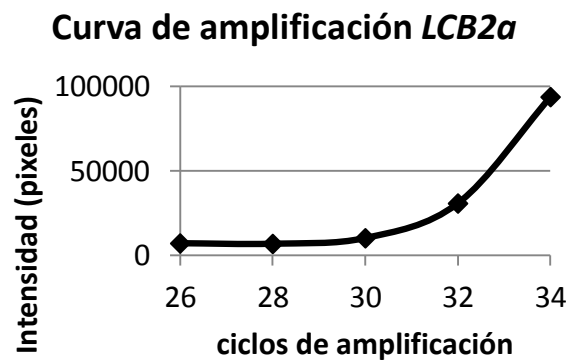
Temperatura de alineamiento: 58°C
Ciclos seleccionados: 29



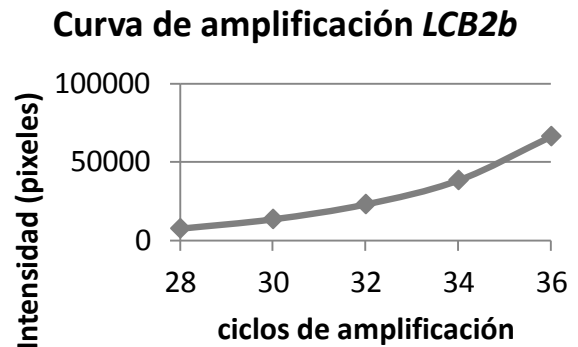
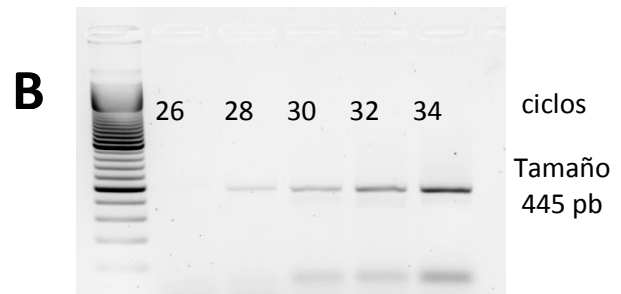
Temperatura de alineamiento: 58°C
Ciclos seleccionados: 33

Curvas de amplificación para las secuencias de los genes *ATP* y *TUB*. A partir del cDNA de las plántulas silvestres se amplificaron las secuencias de los genes de interés a diferentes ciclos (26-34). A) *APT* y B) *TUB*, las temperaturas y los ciclos de alineamiento que finalmente se eligieron se presentan debajo de la gráfica correspondiente. Para el gen *eEF1 α* se decidió usar las condiciones determinadas anteriormente: T° alineamiento=58 °C, 33 ciclos. Estas pruebas se realizaron solamente una vez para cada gen.

ANEXO B



Temperatura de alineamiento: 58°C
Ciclos seleccionados: 33

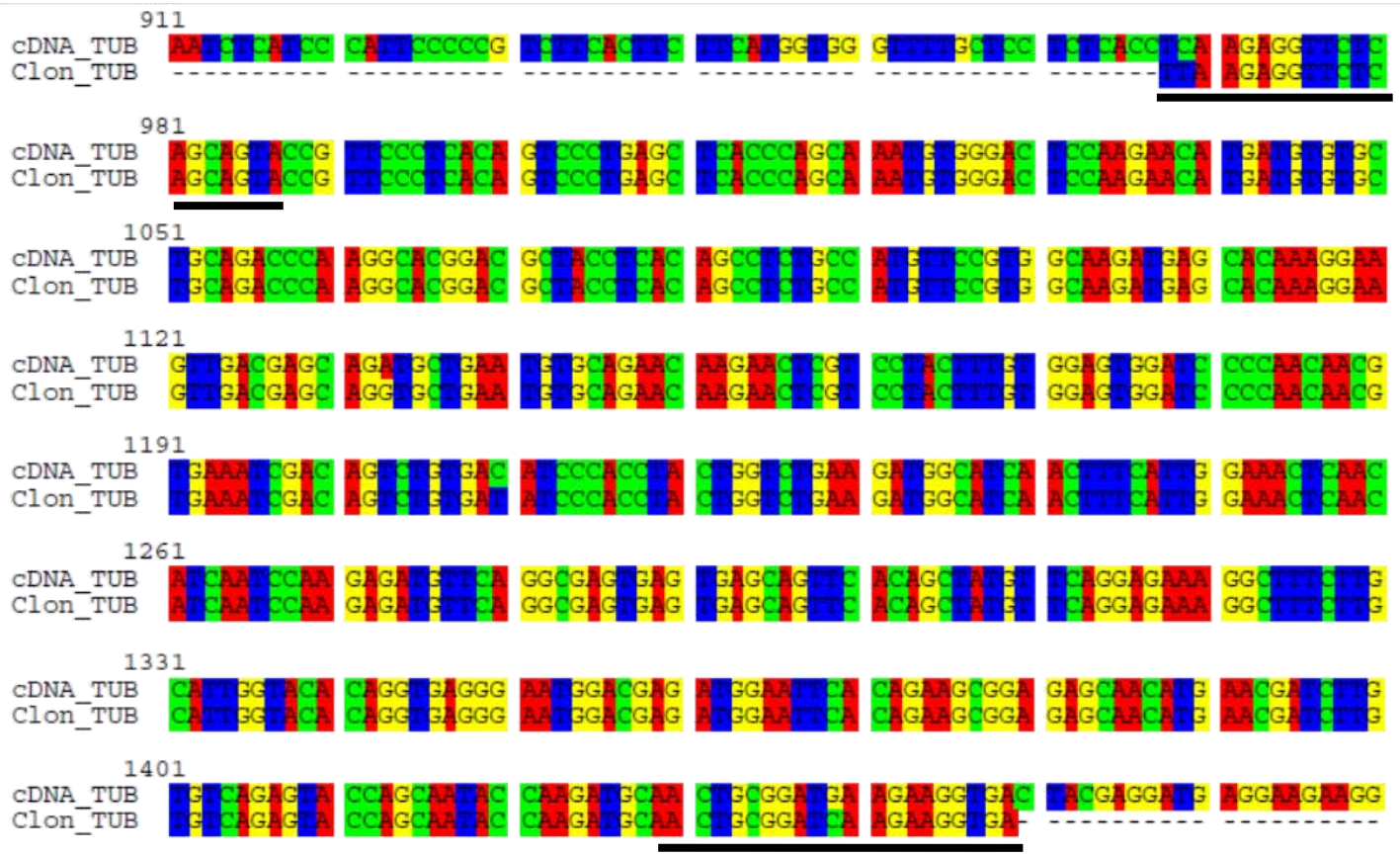


Temperatura de alineamiento: 62°C
Ciclos seleccionados: 33

Curvas de amplificación para las secuencias de los genes *LCB2a* y *LCB2b*. A partir del cDNA de las plántulas silvestres se amplificaron las secuencias de los genes de interés a diferentes ciclos (26-34). A) *LCB2a* y B) *LCB2b*, las temperaturas y los ciclos de alineamiento que finalmente se eligieron se presentan debajo de la gráfica correspondiente. Estas pruebas se realizaron solamente una vez para cada gen.



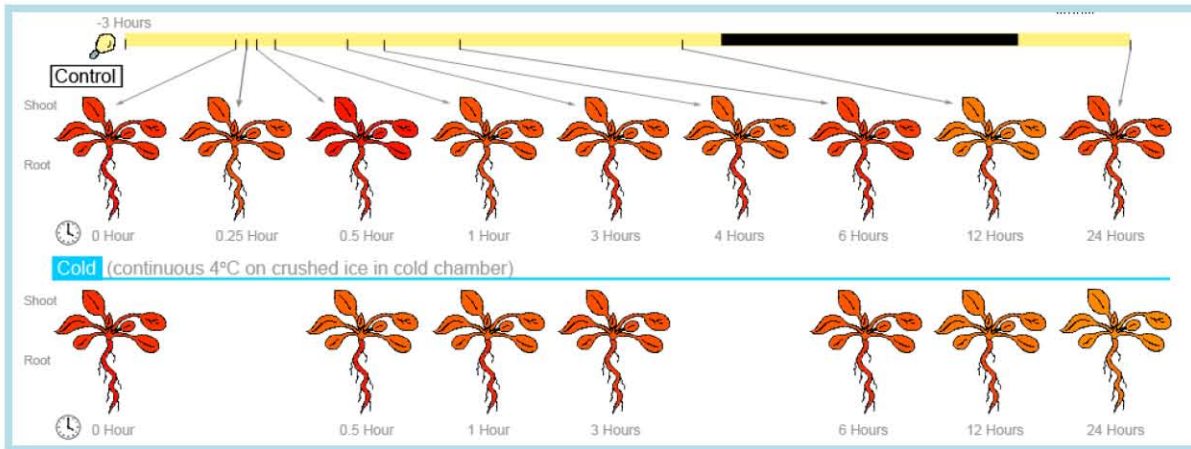
ANEXO C



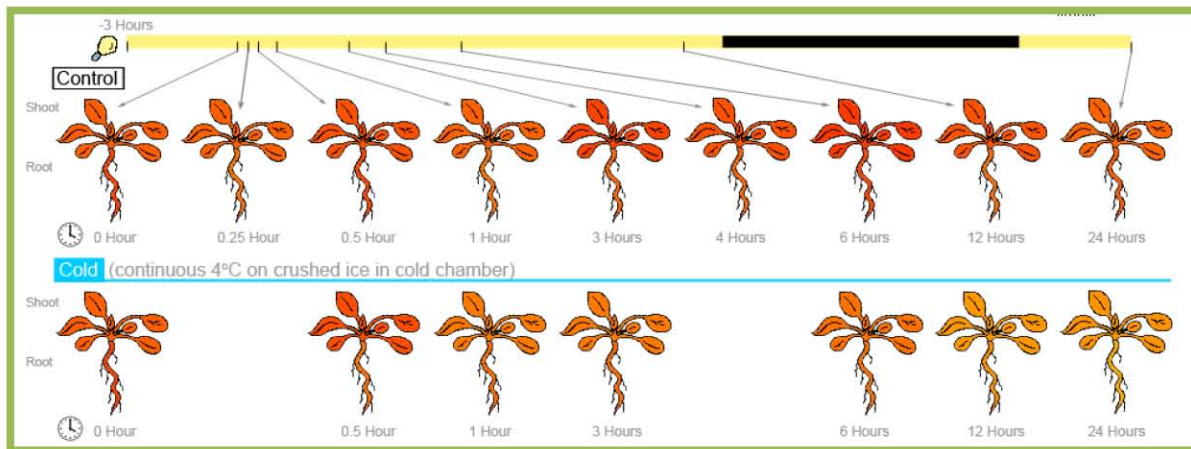
Análisis del producto de PCR de TUB. Se muestra la comparación entre el cDNA de TUB con el producto de PCR obtenido. Los oligonucleótidos utilizados se encuentran marcados con una línea negra.

ANEXO D

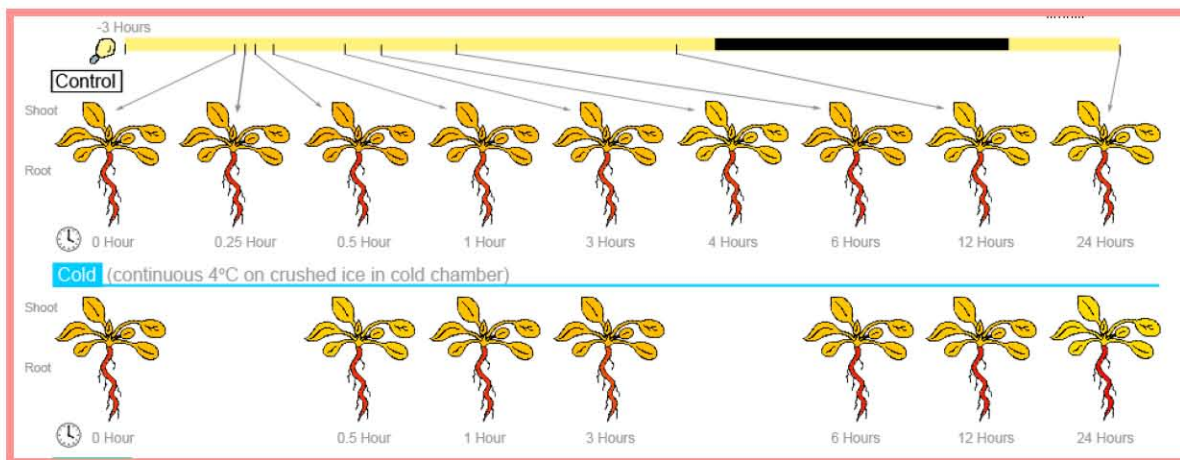
LCB1



LCB2a



LCB2b



Análisis bioinformático de la expresión de los genes de la SPT en respuesta al estrés por frío. En la figura se muestran los cambios en el nivel de expresión de cada gen según el aumento o disminución en la intensidad del color de los dibujos de las plantas. El análisis se realizó con la herramienta en línea “Arabidopsis eFP browser”.



ANEXO E

ANÁLISIS DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES *LCB2a* y *LCB2b*

El análisis de las secuencias de los promotores se llevó a cabo en la base de datos AtcisDB (*Arabidopsis thaliana cis-regulatory database*) del programa AGRIS disponible en la página *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR). El programa predijo la región del promotor de cada gen y determinó motivos putativos de unión a factores de transcripción.

Tabla. Motivos *cis*-reguladores localizados en la región promotora del gen *LCB2a* (*locus* At5g23670)

Motivo de unión	Secuencia	Posición en el <i>locus</i> *	Descripción
AtMYB2	CTAACCA	2527, 1186	Homólogo de MYB que participa en la expresión génica regulada por ácido abscísico y sequía
AtMYC2	CACATG	2302	Homólogo de MYC que participa en la expresión génica regulada por ácido abscísico y sequía
Bellringer BS1	AAATTTAAA	1195, 1790, 1980	Represión de AGAMOUS en inflorescencia de meristemas.
Bellringer BS2	AAATTAGT	919, 802	
Bellringer BS3	ACTAATTT	803, 920	
ATB2	ACTCAT	440	Activador transcripcional en respuesta a hipo-osmolaridad
CARg	CC(A/T)(A/T)(A/T)(A/T)(A/T)GG	2219	Regulación antagonista de genes involucrados con la floración
ARF1	TGTCTC	1402,2496	Unión a genes de respuesta auxina
DPBF1&2	ACACNNG	630, 1822, 1083, 640	Interactúa con elementos embrión específicos y de respuesta a ácido abscísico
Sitio de unión al promotor MYB	(A/C)ACC(A/T)A(A/C)C	2056	Activa la transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de pigmentos flavonoides
MYB1	(A/C)TCC(A/T)ACC	1355	Unión a elementos específicos de la caja G-box
MYB4	A(A/C)C(A/T)A(A/C)C	269, 2623, 2056, 1681	Función putativa en respuesta a estrés ambiental
RAV1-A	CAACA	692, 1395, 2189, 2243, 2414, 2137, 1437, 602	Se une a secuencia de reconocimiento a través de dominios de unión a DNA
DRE-like	(A/G/T)(A/G)CC	2110	Función putativa en respuesta a estrés



	GACN(A/T)		ambiental
GATA [LRE]	(A/T)GATA(G/A)	186, 355, 477, 623, 1058, 1510, 2162, 2722, 2728, 2639, 2083, 1634, 1452	Motivo de respuesta a la luz
Ibox	GATAAG	356	Motivo de respuesta a la luz
L1-box	TAAATG(C/T)A	2389	Secuencia detectada por la proteína de homodominio L1
T-box	ACTTTG	1074, 2543	Motivo de respuesta a la luz
SORLIP2	GGGCC	2651, 2678	Motivo involucrado en la red de genes regulados por la luz
SORLIP5	GAGTGAG	1923	Motivo involucrado en la red de genes regulados por la luz

*Con respecto al inicio del gen en el cromosoma. Posición en el cromosoma 5: 7978888 - 7981662

Tabla. Motivos *cis*-reguladores localizados en la región promotora del gen *LCB2b* (*locus* At3g48780)

Motivo de unión	Secuencia	Posición en el <i>locus</i> *	Descripción
Bellringer BS1 IN AG	AAATTTAA	104	Represión de AGAMOUS en inflorescencia de meristemas.
Bellringer BS2 IN AG	AAATTAGT	2273	
Bellringer BS3 IN AG	ACTAATTT	2272	
ATB2	ACTCAT	4	Activador transcripcional en respuesta a hipo-osmolaridad
W-box	TTGACT	1634, 1642, 252	Secuencia involucrada en la unión de una proteína que activa la resistencia a enfermedades en plantas.
DPBF1&2	ACACNNG	793, 1627	Interactúa con elementos embrión específicos y de respuesta a ácido abscísico
MYB4	A(A/C)C(A/T)A(A/C)C	1590, 699	Función putativa en respuesta a estrés ambiental
RAV1-A	CAACA	249,1533,18 91,1342,750	Se une a secuencia de reconocimiento a través de dominios de unión a DNA
ABRE	(C/T)ACGTGGC	287	Elementos de respuesta a ácido abscísico
BoxII	GGTTAA	1819	Activación transcripcional de genes regulados por luz
GATA [LRE]	(A/T)GATA(G/A)	525, 893, 1480,769	Motivo de respuesta a la luz
Ibox	GATAAG	175, 768	Motivo de respuesta a la luz
T-box	ACTTTG	139	Motivo de respuesta a la luz
SORLREP3	TGTATATAT	158	Motivo de respuesta a la luz



SORLIP1	AGCCAC	2278	Motivo de respuesta a la luz
---------	--------	------	------------------------------

*Con respecto al inicio del gen en el cromosoma. Posición en el cromosoma 3: 18097800 - 18100094