



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Respuesta a bajas temperaturas de cultivos
celulares de una línea de *Arabidopsis thaliana*
deficiente en la síntesis de esfingolípidos.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

Bióloga

P R E S E N T A:

Ursula Aguirre Palacios



DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017**



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.



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.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno:
Aguirre
Palacios
Ursula
55 3791 6517
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305132042
2. Datos del tutor
Dra.
Marina
Gavilanes
Ruiz
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Sonia
Vázquez
Santana
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Javier Andrés
Juárez
Díaz
5. Datos del sinodal 3
I.A.
Teresa de Jesús
Olivera
Flores
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Alfonso José
Vilchis
Peluyera
7. Datos del trabajo escrito
Respuesta a bajas temperaturas de cultivos celulares de una línea de *Arabidopsis thaliana* deficiente en la síntesis de esfingolípidos
55 p
2016

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias a los proyectos PAPIIT IN222815, DGAPA, UNAM; CONACYT CB 238368 y 238368; PAIP 50009115, Facultad de Química, UNAM.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por su apoyo y por haberme dado la oportunidad de realizar éste trabajo.

A la I.A. Teresa de Jesús Olivera Flores por la dirección de éste trabajo, por el apoyo y por compartir su conocimiento.

A la Q.F.B. María del Consuelo Enríquez Arredondo por el apoyo en la realización de éste trabajo.

A la M. en D. Aracely Arandal Martínez por su apoyo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y por su amistad.

Al M.V.Z Jorge Israel Aparicio Hernández por su apoyo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, por compartir su conocimiento.

A los compañeros del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales: Fredy, Cristina, Luis, Claudia, Gary, Sara, Harold y Félix por su valiosa ayuda en el laboratorio, por compartir sus experiencias y sus conocimientos.

A Patricia Palacios Salcedo, a Héctor Aguirre Álvarez, a Miguel y Rafael por el apoyo total.

A Julio César Paz García por su apoyo.

A Pablo Aguirre González, a María Luisa Álvarez Hernández y a Esther Salcedo Vallerero por sus historias, por sus consejos y por su cariño.

A los miembros del Jurado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
1. Aspectos generales de la membrana plasmática.....	4
1.1 Estructura y componentes de la membrana plasmática	5
1.1.1 Proteínas	5
1.1.2 Carbohidratos	5
1.1.3 Lípidos.....	6
1.1.4 Composición de los lípidos membranales	7
1.1.5 Síntesis de lípidos.....	7
1.1.6 Glicerolípidos	7
2. Esfingolípidos	8
2.1 Vía de síntesis de esfingolípidos.....	8
2.2 Función de los esfingolípidos.....	9
3. Membrana plasmática y estrés por frío.	10
4. Daños estructurales de la membrana plasmática por bajas temperaturas.....	11
5. Modificaciones estructurales en la membrana plasmática para resistir bajas temperaturas.....	11
ANTECEDENTES.....	12
1. Aspectos generales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
1.1 Clasificación taxonómica.....	12
1.2 Descripción botánica.....	12
1.3 Lugar de origen y condiciones ambientales de crecimiento.....	13
1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.	13
2. Cultivo de tejidos vegetales.	14
2.1 Medio de cultivo.....	14
2.2 Reguladores de crecimiento.....	16
3. Cultivo <i>in vitro</i>	17
3.1 Cinética de crecimiento de callo.....	17
4. Los esfingolípidos en la respuesta a frío.	18
5. Características del genotipo mutante <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i> (HP).	19
HIPÓTESIS.....	20

OBJETIVOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. Diagrama del proceso experimental.	21
2. Material biológico.	21
3. Medios de cultivo.	22
3.1 Descripción de la Metoxifenazida (MFZ).	22
4. Desinfección y siembra de semillas <i>in vitro</i>	23
5. Condiciones de incubación y subcultivos de callo.	24
6. Cinética de crecimiento callo de los genotipos WT y HP.....	24
7. Establecimiento del callo en medio de cultivo sólido adicionado con MFZ para el silenciamiento del gen codificante de la subunidad LCB2b.	24
7.1 Adición de MFZ al medio de cultivo y cinética de crecimiento de callo expuesto a una dilución 1:250 (v:v) y 1:500 (v:v) de MFZ.	25
7.2 Adición de MFZ al medio de cultivo y cinética de crecimiento de callos –WT, +WT y -HP, + HP, a una dilución 1:1000 (v:v) de MFZ incubado a 4 °C.	25
8. Análisis de datos.....	26
RESULTADOS	27
1. Caracterización de la cinética de crecimiento de peso fresco del cultivo de callo de los genotipos WT y HP.....	27
2. Evaluación de cultivos de callo de los genotipos –WT, +WT y -HP, +HP, a las diluciones 1:250 (v:v) y 1:500 (v:v) de MFZ.	28
3. Evaluación de cultivos de callo de los genotipos –WT, +WT y –HP, +HP, a una dilución 1:1000(v:v) de MFZ incubados a 25° C y 4° C.	32
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES	44
PERSPECTIVAS	44
REFERENCIAS	45
ANEXO	50

ABREVIATURAS

AIA	ácido indolacético
ANA	ácido naftalenacético
BA	6-bencilaminopurina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
MES	2-(n-morfolino) etanosulfónico
MFZ	metoxifenazida
PVP	polivinilpirrolidona
SPT	serina palmitoiltransferasa
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético

RESUMEN

Los esfingolípidos son muy abundantes en plantas y llevan a cabo funciones estructurales en la membrana y como segundos mensajeros en vías de señalización que se activan ante estímulos tales como el frío y la sequía entre otros. En este trabajo, se planteó el uso de una línea celular mutante de *A. thaliana* deficiente en la síntesis de esfingolípidos para explorar la función de estas moléculas en respuesta a bajas temperaturas. La línea celular, *Atlcb2b hp/lcb2a* (HP), es una mutante con una inserción en el gen *lcb2a* y presenta una horquilla de RNA inducible por la adición de metoxifenazida (MFZ), silenciando al gen *lcb2b*; ambos genes codifican las subunidades LCB2a y LCB2b, respectivamente, de la serina palmitoiltransferasa (SPT), enzima que cataliza la primera reacción de la síntesis de esfingolípidos.

A partir de plántulas de los genotipos silvestre (WT) y de la mutante HP de *A. thaliana*, se obtuvieron cultivos caulogénicos. Mediante cinéticas de crecimiento de peso fresco y el seguimiento de su morfología, se caracterizaron los cultivos de ambos genotipos. Para producir el silenciamiento génico, al medio se le añadió MFZ en diferentes concentraciones. El crecimiento de los cultivos WT y HP a 25 °C no mostró un incremento de masa significativo ni en las cinéticas de 0 a 17 días o de 0 a 56 días, sólo un desarrollo sano, pero estático. La morfología fue consistente con estos resultados y los callos no presentaron síntomas de oxidación. En el caso del callo HP, a los 56 días, el volumen del callo fue mayor que el del WT a ese tiempo, aunque su masa fue igual. Los callos WT fueron expuestos como control a la MFZ a las concentraciones de 1:250, 1:500, 1:1000 a 25 °C. El patrón de crecimiento no cambió al compararlo con los callos crecidos en ausencia de MFZ y la morfología de los callos tampoco presentó diferencias, indicando que el inductor no tuvo un efecto tóxico en los callos. En los callos del genotipo HP a 25 °C se encontró un incremento en la proliferación de los cultivos no expuestos a MFZ entre los 16 y 56 días. El crecimiento fue menor, en los expuestos a concentraciones bajas de MFZ (1:1000), entre 16 y 56 días. Estas cinéticas correspondieron a los aumentos en el volumen de los callos, si bien en el caso de los expuestos a MFZ a largos tiempos y baja concentración, los callos se oxidaron. Cuando los callos WT se crecieron a 4 °C, los patrones de crecimiento no difirieron de los observados a 25 °C, ni en ausencia ni en presencia de MFZ. La morfología de los callos coincidió con lo anterior. Con respecto a los callos HP crecidos a 4 °C, con o sin MFZ, presentaron un incremento lento y pequeño. Este crecimiento fue muy bajo en comparación con el observado a 25 °C y estuvo de acuerdo con la morfología observada, si bien estos callos no presentaron

oxidación en ningún caso. Los resultados de la línea HP sugieren que los esfingolípidos endógenos son necesarios para contender con el frío; sin embargo el poco crecimiento de los cultivos WT indica que se deben realizar más experimentación para probar esta hipótesis.

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales de la membrana plasmática

La membrana plasmática es una barrera física, semipermeable y selectiva de un tamaño aproximado de 6 a 10 nm de grosor (Megías *et al.*, 2014). Su función principal es delimitar a la célula y crear compartimentos, permitiendo llevar a cabo funciones tanto metabólicas como estructurales. Está encargada de mantener el medio interno de la célula eucarionte en condiciones favorables y, mediante la creación de gradientes iónicos, lleva a cabo las funciones de comunicación, metabolismo y transporte para preservar la vida de cada célula (Alberts *et al.*, 2010).

La membrana plasmática, la barrera física por excelencia en el mundo celular, debe su estructura a la fuerte conjunción de los diferentes elementos que la componen a través de uniones de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas y sobre todo de sus interacciones hidrofóbicas (Alberts *et al.*, 2010). Está constituida en su mayor parte por proteínas, carbohidratos y lípidos. Estos componentes, por sus características físico-químicas, le otorgan la propiedad de la fluidez, además de brindarle elasticidad y la capacidad de auto-repararse y renovarse de manera constante (Megías *et al.*, 2014). La membrana celular establece puentes de comunicación con otras células, permitiendo responder a los estímulos ambientales para su sobrevivencia. La comunicación a través de receptores asociados a enzimas es más común en células animales, sin embargo, un proceso similar ocurre en las membranas vegetales, los receptores tipo cinasa con secuencias repetidas ricas en leucina, son un ejemplo (Alberts *et al.*, 2010).

La membrana plasmática lleva a cabo el transporte de sustancias y la comunicación del medio interno con el externo y/o con otras células. La permeabilidad de la membrana depende de la polaridad de los solutos. Las moléculas hidrofóbicas permean libremente la bicapa lipídica, pero las moléculas polares y/o cargadas, lo hacen a través de proteínas especializadas que pueden ser canales, acarreadores o bombas. Energéticamente, el desplazamiento de sustancias a través de los anteriores medios, puede requerir energía o no, o sea, como transporte activo o pasivo, respectivamente (Tortora *et al.*, 2007).

1.1 Estructura y componentes de la membrana plasmática

1.1.1 Proteínas

Un importante elemento que constituye a las membranas son las proteínas. Algunas tienen función estructural y otras tienen alguna actividad como la catálisis, la unión o el reconocimiento de algún ligando o el transporte de algún soluto (Alberts *et al.*, 2010). La asociación de las proteínas a la membrana plasmática es muy diversa, permitiendo su clasificación en tres tipos. En el primer tipo se reconocen a las que pueden atravesar la bicapa lipídica, estas proteínas son llamadas transmembranales y tienen el carácter de anfifílicas, ya que cuentan con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas en las que se identifican los dominios extracelular e intracelular. El segundo tipo, son las proteínas que pueden formar parte de las membranas al estar asociadas de manera superficial gracias a la interacción por fuerzas de Van der Waals e iónicas, las cuales, al no ser uniones tan fuertes, pueden romperse con facilidad y liberar a las proteínas de la membrana. Finalmente, un tercer tipo de proteínas que se encuentran asociadas a las membranas son aquellas que están unidas a un lípido y éste se encuentra insertado en la bicapa de lípidos (Megías *et al.*, 2014; Fig.1)

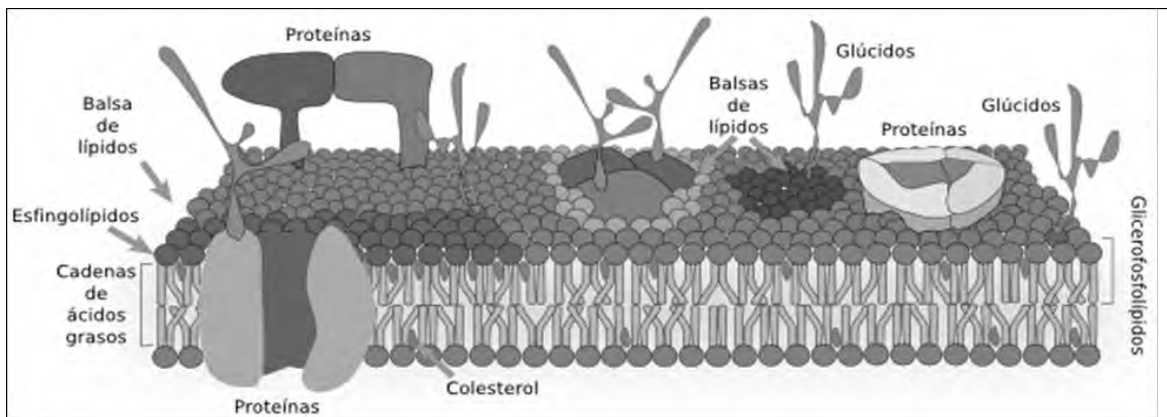


Figura 1. Componentes estructurales de la membrana plasmática. Principales componentes que estructuran la membrana plasmática y permiten su correcto funcionamiento.

1.1.2 Carbohidratos

Otros elementos importantes en las funciones membranales son los carbohidratos. Estos son abundantes en la membrana plasmática de células eucariontes y están unidos covalentemente a la parte hidrofílica de los lípidos y de las proteínas (Lodish *et al.*, 1995). Se llama glucocáliz al conjunto de glúcidos localizados en la membrana plasmática. Su

grado de complejidad se debe al tipo celular, formando una envoltura que representa entre el 2 y el 10% del peso de la membrana plasmática (Megías *et al.*, 2014). Los carbohidratos funcionan como sitios de reconocimiento y unión entre las células. En general, los carbohidratos que le constituyen son oligosacáridos (Lodish *et al.*, 1995).

La mayoría de los carbohidratos se encuentran asociados a proteínas, las cuales reciben el nombre de glucoproteínas. En este caso, los carbohidratos componentes de las proteínas integrales de membrana están ligados a dominios exoplasmáticos de estas proteínas. Algunos carbohidratos participan en la función catalítica de enzimas asociadas a membrana (Lodish *et al.*, 1995).

Los carbohidratos en los lípidos membranales están unidos de manera covalente; estos lípidos son conocidos como glucolípidos. Se encuentran unidos a la región extracelular, aunque también se encuentran en menor cantidad asociados a membranas de estructuras como el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático, siendo poco comunes en mitocondria y en los tilacoides de los cloroplastos (Lodish *et al.*, 1995).

Los glucolípidos están siempre en la cara externa de la membrana citoplasmática (Lodish *et al.*, 1995). La porción de los azúcares de los glucolípidos tiende a asociarse mediante la formación de enlaces de hidrógeno y mediante la formación de fuerzas de Van der Waals. Los glucolípidos también pueden formar parte de las balsas lipídicas (Fig.1).

1.1.3 Lípidos

Los lípidos son la forma principal de energía almacenada en la mayoría de los organismos y son constituyentes principales de las membranas celulares (Nelson y Cox, 2006). La célula vegetal contiene aproximadamente del 5 al 10 % del peso seco de lípidos y casi todo está en las membranas (Ohlrogge and Browse, 1995). Son una parte fundamental estructural de las membranas biológicas, pues actúan como segundos mensajeros, como moderadores de las actividades de otros componentes como proteínas, además de fundamentar la creación de gradientes eléctricos intracelulares y extracelulares, modulando también el potencial eléctrico de la membrana (Megías *et al.*, 2014). Todas estas importantes actividades biológicas, mantienen la integridad fisiológica y estructural de las células.

Las membranas biológicas, presentan una formación laminar que está constituida por dos capas de fosfolípidos; cada una de ellas presenta una estructura polar dirigida a la región externa de las caras intracelular y extracelular, y está en contacto con los medios acuosos a ambos lados de la membrana (Fig. 1.). La otra fase, la interna, que es no polar, mide

aproximadamente 3 nm de grosor y está compuesta por cadenas de ácidos grasos creando un ambiente hidrófobo (Lodish *et al.*, 1995); es decir, las moléculas lipídicas formadoras de la membrana plasmática son anfifílicas (Alberts *et al.*, 2010).

1.1.4 Composición de los lípidos membranales

Los lípidos que constituyen a la membrana plasmática, pertenecen a un grupo químicamente diverso de moléculas que se disuelven con facilidad en solventes orgánicos (Hopkins, 1995). Son un grupo de sustancias orgánicas químicamente heterogéneo que no se polimerizan para formar macromoléculas, suelen formar complejos con las proteínas en la célula (Wilson, 1989). Los principales lípidos formadores de membranas biológicas son glicerolípidos, esfingolípidos y los esteroides (Alberts *et al.*, 2010; Fig.1). Los dos primeros grupos contienen ácidos grasos.

En plantas, los ácidos grasos presentan cadenas de 16 a 28 carbonos de largo y pueden contener hidroxilaciones y de cero a tres dobles enlaces con la configuración *cis* o *trans* (Ohlrogge y Browse, 1995). Al parecer, ésta configuración es fundamental para mantener la fluidez y brindar flexibilidad a la cadena de ácido graso (Lodish *et al.*, 1995).

1.1.5 Síntesis de lípidos

La síntesis lipídica es un proceso muy importante para la formación y la reparación de las membranas. Su síntesis depende de la formación de su esqueleto, ya sea a partir de glicerol o de esfingosina, de la unión de los ácidos grasos a su armazón por enlaces éster o amida y de la adición de un grupo de cabeza hidrofílica y en algunos casos su modificación para la generación de un producto fosfolípido final. (Nelson y Cox, 2006). Tanto glicerolípidos como esfingolípidos contienen ácidos grasos en su estructura.

1.1.6 Glicerolípidos

Estos lípidos en su forma polar, son los constituyentes más abundantes de las membranas (Azcón-Bieto y Talón, 2000) contribuyendo a determinar con su carga las propiedades superficiales de la bicapa (Nelson y Cox, 2006). Cuentan con una estructura de dos cadenas de ácidos grasos de 13 a 19 carbonos y la mayoría con enlaces saturados, un ácido fosfórico y el glicerol (Megías *et al.*, 2014).

2. Esfingolípidos

Los esfingolípidos complejos son moléculas anfipáticas sintetizadas en el retículo endoplásmico y son componentes muy abundantes en las membranas de las plantas, en particular en la membrana plasmática y en el tonoplasto (Moreau *et al.*, 1995). Están estructurados por una cabeza polar y dos cadenas aciladas hidrofóbicas, ambas forman el esqueleto de ceramida, compuesto por un ácido graso unido por enlaces amida a la base de cadena larga (LCB). El ácido graso cuenta con 16 a 26 átomos de carbono saturados o monoinsaturados. En plantas, la base de cadena larga contiene 18 átomos de carbono y se caracteriza por tener de 2 a 3 grupos hidroxilo (Chen *et al.*, 2009; Fig.2).

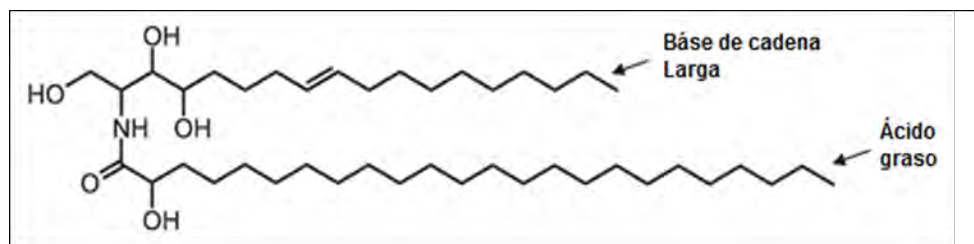


Figura 2. Ejemplo de esqueleto de ceramida. Integrado por 18 átomos de carbono característico en plantas.

2.1 Vía de síntesis de esfingolípidos

Los esfingolípidos están constituidos principalmente por una estructura de ceramida que se sintetiza en retículo endoplasmático y es transferida al aparato de Golgi por vesículas o por una proteína (Bartke y Hannun, 2009).

La síntesis de los esfingolípidos complejos comienza con la condensación de la serina y el palmitoil CoA gracias a la catálisis de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT); de esta reacción resulta la 3-ceto-dihidroesfinganina, la cual se reduce por la enzima 3-cetoesfinganina reductasa para formar dihidroesfingosina (esfinganina). La condensación de esta base de cadena larga con un ácido graso CoA, es catalizada por la ceramida sintasa, resultando en la formación de ceramida. A partir de esta reacción se da la formación de los esfingolípidos complejos como la glucosilceramida (Fig.3 A) y la inositol fosfoceramida (Fig.3 B). La reacción catalítica la lleva a cabo la glucosilceramida sintasa y en el caso de la inositol fosfoceramida, la cabeza polar se forma por la transferencia de un grupo de fosfatidil inositol, esta reacción la cataliza la enzima inositol fosfoceramida sintasa (Chen *et al.*, 2009).

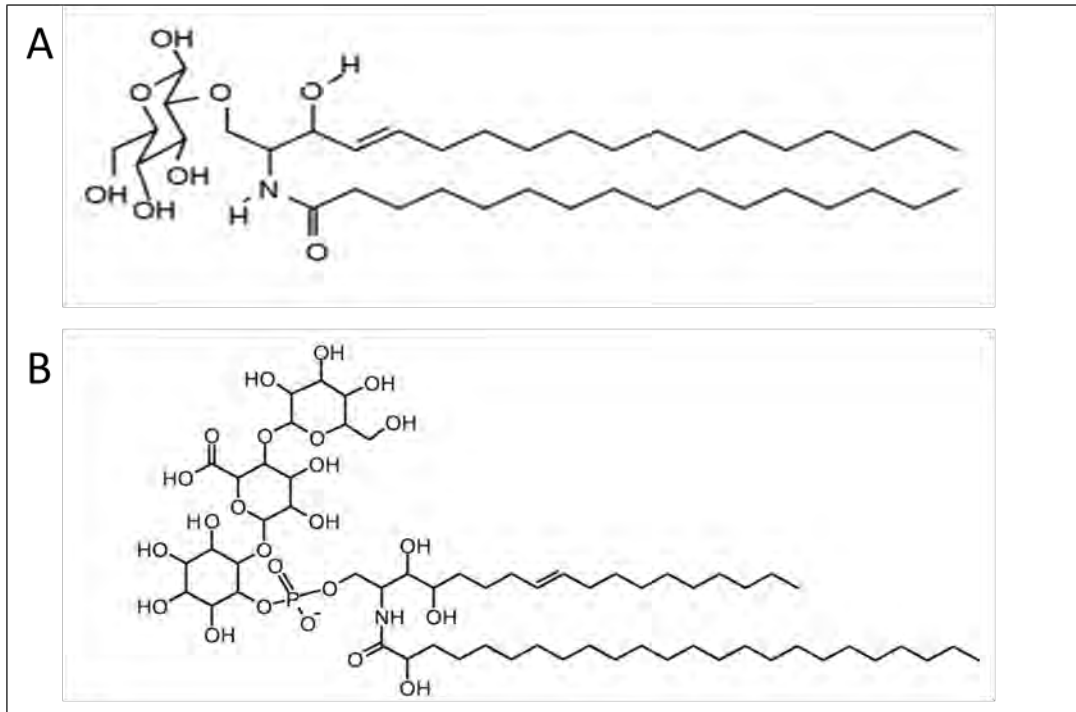


Figura 3. Estructura de dos esfingolípidos. A. Glucosilceramida.
B. Inositolfosfoceramida.

2.2 Función de los esfingolípidos

Además de la función estructural de los esfingolípidos complejos como formadores de la bicapa lipídica en plantas, también se ha reportado la formación de microdominios o balsas lipídicas que funcionan como centros de transducción de señales (Bertke y Hannun, 2009). Un ejemplo de esto es el papel que llevan a cabo estas señales en respuesta al estrés por diversos estímulos, por ejemplo, ante la pérdida de agua, pues funcionan en la señalización para la apertura y el cierre de los estomas (Chen *et al.*, 2009). Además, algunos esfingolípidos más sencillos modulan las actividades de las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasa involucradas en la regulación del crecimiento y en la diferenciación celular (Voet *et al.*, 2009). A estos últimos se les considera como elementos bioactivos que participan en las rutas de regulación y transducción de señales por la mediación de interacciones célula a célula. Se sabe que las membranas de las plantas cuentan con regiones o microdominios sumamente resistentes por las interacciones entre los esfingolípidos y los esteroides, los sitios de síntesis y de ensamblaje de estos microdominios, son el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Estos sitios están relacionados con funciones de señalización en respuesta a diferentes tipos de

estrés, transporte de sustancias intra y extracelular, así como en el metabolismo enzimático apoyando a la formación de las membranas (Chen *et al.*, 2009).

3. Membrana plasmática y estrés por frío.

El término estrés, en sentido biológico, implica un efecto adverso al organismo (Hopkins, 1995). Ante los ambientes cambiantes, a lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado estrategias muy eficientes para adaptarse, una pequeña modificación basta para provocar un cambio importante en la fisiología de estos organismos.

Los parámetros físicos (temperatura, salinidad, intensidad lumínica) a los que están expuestas las plantas de manera natural, son determinantes en el desempeño de sus funciones tales como la nutrición, la reproducción y otros procesos biológicos.

Las células vegetales han logrado responder y adaptarse ante los factores bióticos y abióticos modificando sus estructuras y funciones metabólicas. Estas respuestas de origen evolutivo, están coordinadas también por genes que se expresan para activar la maquinaria metabólica y estructural que protege a las células ante ambientes cambiantes. Por ejemplo, se ha observado que los cambios en la membrana ocasionados por la disminución de la temperatura inducen el aumento de ácidos grasos insaturados (Welti *et al.*, 2002).

El aumento en la síntesis de bases de cadena larga es otro ejemplo de respuesta a la baja temperaturas, ante lo cual, es posible observar una serie de reacciones más elaboradas, como la formación de compuestos que ayudan a las células a tolerar estos cambios térmicos, por ejemplo, la síntesis de ácido fosfatídico, compuesto que se sintetiza en los primeros minutos de exposición a la temperatura disminuida, está regulada por óxido nítrico (Cantrel *et al.*, 2011) y actúa como mediador ante la exposición al frío (Dutilleul *et al.*, 2011).

También se ha observado una disminución en la cantidad de esfingolípidos que componen a las membranas, haciéndolas más fluidas. Este aumento está relacionado también con un incremento en la síntesis de componentes insaturadas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Uemura *et al.*, 1995).

4. Daños estructurales de la membrana plasmática por bajas temperaturas.

La disminución de la temperatura ambiental produce diversos efectos en las plantas, sobre todo, si el descenso es de varios grados o si alcanza temperaturas muy bajas, sin embargo, hay especies que por sus características y gracias a sus adaptaciones, son capaces de resistir estos cambios y pueden sobrevivir a este estrés.

Algunas plantas sufren lesiones al presentar deficiencias metabólicas, la lesión puede ser temporal, logrando una gran recuperación al término del estrés; sin embargo, si el estrés es severo, puede retrasar o inhibir la floración, la formación de la semilla e incluso puede ser letal para la planta (Hopkins, 1995). En ocasiones, dependiendo de la edad, de la especie y del tiempo de exposición a baja temperatura, puede observarse clorosis o necrosis (Hopkins, 1995).

En la célula, las temperaturas por debajo de los 0 °C están asociadas con daños severos que involucran la formación de fases hexagonales dentro de la matriz lipídica de la membrana. Estas fases hexagonales son arreglos de los lípidos que dejan de formar la estructura de la bicapa. La formación de estas fases desestabiliza a la membrana y eventualmente ésta pierde su integridad (Jouhet, 2013).

5. Modificaciones estructurales en la membrana plasmática para resistir bajas temperaturas.

En las plantas sensibles al frío, la bicapa lipídica tiene un alto porcentaje de cadenas de ácidos grasos saturados. Éste tipo de membranas tiende a solidificarse en un estado cristalino a temperaturas inferiores a los 0 °C (Taiz y Zeiger, 2006).

A nivel de membranas, las propiedades físicas de los lípidos influyen notablemente en las actividades de sus proteínas integrales, ya sea enzimática, de transporte o de reconocimiento y de las que depende el metabolismo vegetal. Ante la exposición de células vegetales a bajas temperaturas, la célula cuenta con un sistema de protección en el que azúcares y proteínas se unen a los cristales de hielo en formación para evitar o retrasar su crecimiento, funcionando como proteínas anticongelantes (Taiz y Zeiger, 2006).

ANTECEDENTES

1. Aspectos generales de *Arabidopsis thaliana*

1.1 Clasificación taxonómica.

En el género *Arabidopsis*, se incluyen 9 especies (*A. thaliana*, *A. suecica*, *A. arenosa*, *A. neglecta*, *A. croatica*, *A. pedemontana*, *A. cebennensis*, *A. lyrata*, *A. halleri*) y 8 subespecies (Al-Shehbaza y O’Kane, 2002).

Arabidopsis thaliana presenta la siguiente jerarquía taxonómica:

Super reino: Eukariota
Reino: Viridiplantae
Phylum: Streptophyta
Orden: Brassicales
Familia: Brassicaceae
Tribu: Camelinae
Género: *Arabidopsis*
Especie: *Arabidopsis thaliana*

(NCBI, s.f.)

1.2 Descripción botánica.

Arabidopsis thaliana es de hábito herbáceo, su tamaño varía de los 10 a 20 cm de altura (Pierce, 2009). *A. thaliana* presenta un sistema de raíz principal con el desarrollo de raíces adventicias. La roseta basal de *A. thaliana*, característica de la primera etapa del ciclo de vida de esta planta presenta un patrón de filotaxia en espiral, los entrenudos son muy cortos (Ochando, 2005).

Del centro de la roseta se eleva un tallo erecto y también llega a presentar hojas en menor cantidad y con filotaxia en espiral, con hojas de forma lanceolada o elíptica y márgenes continuos. En la región apical del tallo, se desarrolla la inflorescencia que caracteriza a *A. thaliana*. Las flores son hermafroditas, de simetría radial, de aproximadamente 5 mm de diámetro y el acomodo del verticilo está conformado de afuera hacia adentro por cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres y dos carpelos fusionados (Álvarez-Buya *et al.*, 2010).

Los sépalos son de color verde, mientras que los pétalos son blancos, ambos órganos son espatulados. Los estambres se componen de un filamento y una antera bilobular tetrasporangiada con dehiscencia longitudinal (Drews y Koltunow, 2011).

El gineceo está compuesto por dos carpelos fusionados. La función del carpelo es incluir y proteger el desarrollo de los óvulos. El gineceo está compuesto por dos valvas separadas por un falso septo (Álvarez-Buya *et al.* 2010). Presenta de 40 a 70 óvulos por ovario. El fruto es una silicua lineal de 1 a 2 cm de largo con dos valvas separadas por una vena media. En este alargado fruto se desarrollan aproximadamente de 30 a 60 semillas elípticas de color marrón y miden de 0.3 a 0.5 mm, con cotiledones incumbentes. El estilo mide 0.5 mm y el estigma papiloso (Al-Shehbaz y O’Kane, 2002). Como es común en el grupo de las angiospermas, su ciclo de vida presenta alternancia de generaciones esporofítica y gametofítica.

1.3 Lugar de origen y condiciones ambientales de crecimiento.

Se ha ubicado como centro de origen de *A. thaliana* al sistema montañoso de Asia media y Europa, sustentando esta hipótesis por la presencia de la gran diversidad de especies relacionadas que se han encontrado en dicha región (Hoffmann, 2002).

En la actualidad, *A. thaliana*, por su carácter de organismo modelo, puede cultivarse en casi cualquier región del mundo. En cuanto a su vida silvestre, habita sitios abiertos o con previo disturbio, suelos arenosos, orillas de ríos, suelos rocosos, áreas de cultivo, entre otros. Puede encontrarse a una altura de 4250 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) y a temperaturas que van de los 18° C a los 22° C (Al-Shehbaz y O’Kane, 2002).

1.4 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

Uno de los organismos más usados en laboratorios de investigación en plantas es *A. thaliana*, pues cumple con características morfológicas, fisiológicas y genéticas, que se adecúan a las exigencias de los proyectos.

Aunque *A. thaliana* no es una especie de amplia importancia comercial como otras especies de la familia Brassicaceae, sus aportes a la investigación han sido fundamentales. Su tamaño es pequeño y va de los 10 a los 20 cm, permite el cultivo en invernaderos pudiendo mantener hasta 10 000 plantas por m², además de prestarse a la modificación de los diversos parámetros, físicos, químicos y biológicos para las diversas pruebas a las que es posible someterlas. El periodo para cubrir la totalidad de su ciclo de vida es de aproximadamente 6 semanas.

El genoma de *A. thaliana* se secuenció en su totalidad en el año 2000. Se sabe que este contiene 1.25×10^8 pb con 25,700 genes identificados ordenados en 5 pares de cromosomas (Pierce, 2009).

2. Cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales es la técnica por la que es posible mantener, propagar o desdiferenciar tejidos y organismos vegetales bajo condiciones asépticas. Se ha considerado como una herramienta biotecnológica e industrial y tiene como fundamento la capacidad totipotencial de las células.

El precedente teórico del cultivo de tejidos vegetales se centra en la teoría celular, formulada por Theodor Schwann y Matthias Schleiden en el siglo XIX en la que se contempla a la célula como una unidad fisiológica con la capacidad de llevar a cabo procesos metabólicos, responder a estímulos y además reproducirse, siendo así la célula la unidad anatómica y funcional constituyente de los seres vivos.

El cultivo de tejidos vegetales conjunta diversas técnicas en las que es posible modular de forma externa parámetros endógenos que resultan en diversas respuestas morfofisiológicas.

2.1 Medio de cultivo.

En el cultivo de tejidos vegetales, el elemento toral es el medio enriquecido de nutrientes, ya que abastecerá y contendrá al material biológico, como es el caso de las masas de callo de *A. thaliana*. Los medios aportan elementos para la producción de biomasa y así promover las etapas del ciclo de cultivo, ya sea de células u organismos.

El medio de cultivo aporta esos nutrientes que la planta no es capaz de obtener ni de sintetizar debido a la pérdida de funciones por el mecanismo autotrófico. Al cultivar *in vitro* a un organismo vegetal, éste deja de producir materia orgánica por la vía fotosintética, por lo que la adición de nutrientes en el cultivo es la única manera de mantener con vida a las células, los tejidos o la planta completa por la vía de la heterotrofia.

El empleo de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) para la preparación de medio es muy común en los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales. El medio MS presenta en su formulación la relación amonio : nitrato ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$) 1:2 (González *et al.*, 2012).

Los medios de cultivo están constituidos, principalmente, por macronutrientes, micronutrientes y compuestos orgánicos como las vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento, según la respuesta morfogénica a conseguir.

Los macronutrientes son aprovechados en forma de compuestos para su fácil absorción ya que en la naturaleza no es común encontrarlos de forma individual. Se han considerado macronutrientes al: nitrógeno, potasio, magnesio, calcio, fósforo, azufre y el silicio. Su carencia puede resultar en diversas patologías, pues son importantes en el metabolismo y en la asimilación de otros nutrientes. Al ser componentes de sustancias vitales, participando directamente en el desarrollo y en crecimiento de las plantas. Algunos se absorben como iones y, posteriormente se reducen e incorporan. Son activadores enzimáticos y permiten la tolerancia al estrés. También se pueden encontrar integrando moléculas, como segundos mensajeros o participando en funciones tan complejas como la división celular o en el desarrollo de tejidos, en la diferenciación celular o simplemente transfiriendo energía. Son importantes también en la conformación estructural de las proteínas formando estructuras terciarias.

Los micronutrientes funcionan como activadores enzimáticos (Hopkins, 1995) y son: cloro, níquel, molibdeno, boro, manganeso, sodio, zinc, cobre y hierro. Son fundamentales para los procesos metabólicos, componentes de enzimas y en algunos casos fundamentales para la movilidad de otros elementos. En el caso del hierro, es necesario emplear un compuesto quelante para su aprovechamiento gracias a la formación de complejos, para lo cual, se usa el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como quelante.

Las vitaminas y los aminoácidos se adicionan al medio de cultivo pequeñas concentraciones, de no hacerlo, se llega a presentar alguna patología.

Al medio de cultivo también se le adiciona una fuente de aminoácidos, ya que son las unidades formadoras de proteínas mediante la unión de enlaces peptídicos (Voet, 2006).

La fuente de carbono más empleada en el cultivo de tejidos vegetales es la sacarosa, ya que cubre los requerimientos fundamentales para las plantas cultivadas *in vitro* cubriendo los procesos metabólicos ante la carencia de una síntesis orgánica autónoma por la vía fotosintética.

Debido al estrés al que se someten los explantes por los procesos de la técnica del cultivo de tejidos, como la desinfección del material biológico, es común la presencia de oxidación, las coloraciones diversas en el medio por la formación de sustancias alelopáticas. El empleo de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) y polivinilpirrolidona (PVP) evita la oxidación, por acidificación o por producción de dichas

sustancias, pues el primero, es un amortiguador biológico encargado de mantener el potencial de hidrógeno en un nivel adecuado y el segundo compuesto es un adsorbente, encargado de reducir el oscurecimiento, la coloración y la posterior oxidación de los tejidos y del medio gracias a la adsorción de las sustancias alelopáticas secretadas por las células en estrés

El agua constituye la mayor proporción del medio, debe ser desionizada debido a que el agua corriente contiene gran cantidad de sales y otros elementos que pueden alterar el resultado o reaccionar ante la presencia de otras sustancias que se lleguen a adicionar.

2.2 Reguladores de crecimiento.

El crecimiento y el desarrollo de las plantas, así como diversos procesos metabólicos, reproductivos y morfofisiológicos, están modulados por los reguladores de crecimiento. Éstos se definen como, compuestos orgánicos que, en cantidades muy bajas, estimulan, inhiben o modifican, de alguna forma, los procesos fisiológicos de las plantas (Jankiewicz, 2003). Esta definición incluye a las sustancias endógenas que, producidas por la planta, resultan en una respuesta. Así también, las hay exógenas, cuyo origen es sintético y por lo tanto la aplicación es externa.

Los reguladores que se emplean para la producción y el mantenimiento de los callos y las células en suspensión son las auxinas y las citocininas. Las auxinas fueron las primeras fitohormonas en descubrirse. Se sintetizan en regiones apicales y se transportan en una ruta basipétala. Su función primordial es estimular la elongación celular y promover la dominancia apical. Las auxinas se pueden encontrar de forma natural en bajas concentraciones y, dependiendo de las condiciones, pueden ejercer en la estructura celular u orgánica diversas respuestas. De esta manera, gracias a investigaciones profundas en cuanto a las funciones metabólicas de estas sustancias, se han podido sintetizar en los laboratorios sustancias que, al ser adicionadas, resultan en respuestas morfológicas y fisiológicas que pueden regularse en función de la concentración (Jankiewicz, 2003).

Las citocininas se sintetizan principalmente en las raíces, en las hojas jóvenes y en zonas meristemáticas. Se mueven a través del xilema junto con algunos minerales y con otros compuestos, formando conjugados que resultan en respuestas fisiológicas diversas. Estos reguladores son fundamentales en los procesos de división celular y morfogénesis funcionando en sinergia con las auxinas (Taiz y Zeiger, 2006).

3. Cultivo *in vitro*.

El callo es el conjunto de células no diferenciadas en proliferación en una región herida o cortada del tejido (Smith, 2013). Está integrado por células meristemáticas. Esta característica es de gran importancia para la respuesta que se requiera ante la producción del cultivo de callo, pues su utilidad tiene diversas vertientes, obtención de metabolitos secundarios, embriogénesis somática o la organogénesis, entre muchas otras funciones. El callo está constituido por células grandes, con una vacuola muy visible y se caracteriza por tener células desorganizadas y totipotentes en su conformación, y en función de la integración de sus células, su estructura, puede ser friable o compacto.

3.1 Cinética de crecimiento de callo.

La adquisición de datos del incremento de biomasa durante los cultivos de callo y células en suspensión, es posible gracias a la disponibilidad de nutrientes en el medio y se obtiene a partir de una curva de crecimiento de tipo sigmoidea, cuyo proceso se fragmenta en 5 etapas o fases con características específicas en cada una. En la Fase 1 o lag (Figura 4), en la que las células inician la adaptación a las nuevas condiciones, se inician los procesos metabólicos para que se dé el crecimiento activo del cultivo. La Fase 2 o exponencial se caracteriza por la multiplicación celular, gracias a su correcta división. La fase 3 (lineal), no presenta decremento en el cultivo, al contrario, aunque el crecimiento es menos acelerado que en la fase 2, no se alcanza a vislumbrar un decremento poblacional importante como en la fase 4 de desaceleración, en la que el crecimiento poblacional no es tan evidente; en este caso puede darse un mantenimiento poblacional y al incrementarse en tiempo se puede denominar fase 5 o estacionaria (Smith, 2006; Fig. 4.)

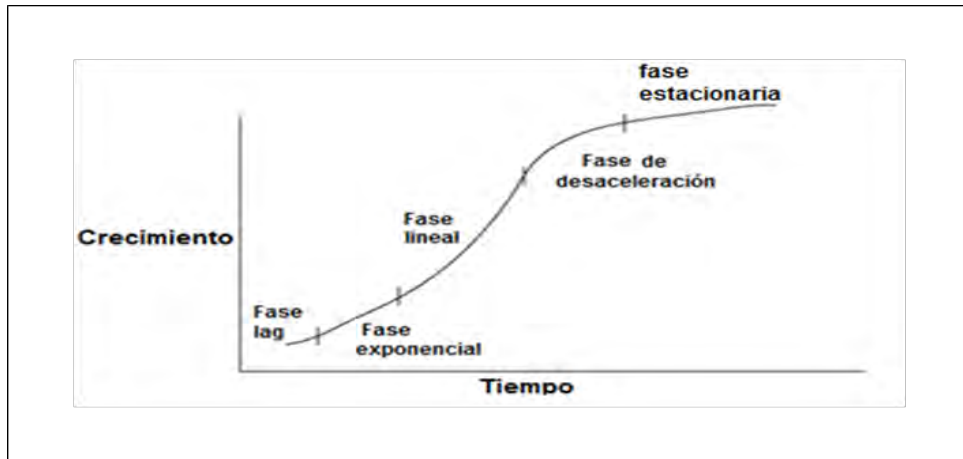


Figura 4. Curva de crecimiento del cultivo de callo. Fase lag, en la que el cultivo se establece para su proliferación. Fase exponencial, en donde se da inicio de la fase de crecimiento. Fase lineal de agrandamiento celular y disminuye la proliferación. Fase de desaceleración del crecimiento. Fase estacionaria disminuye la proliferación y se hace constante.

El periodo de crecimiento del cultivo se afecta por la disponibilidad de nutrientes en el medio, razón por la cual se debe realizar el cambio de medio con los nutrientes suficientes para la proliferación de los cultivos.

4. Los esfingolípidos en la respuesta a frío.

Como ya se mencionó, los esfingolípidos complejos son componentes estructurales de la membrana plasmática y del tonoplasto, principalmente. Las formas simples de los esfingolípidos, que son los precursores metabólicos de los esfingolípidos complejos, como lo son las bases de cadena larga, tienen función de segundos mensajeros. Tanto los esfingolípidos complejos como los simples, son importantes en la respuesta al estrés por frío en las plantas (Uemura *et al.* 2011. Dutilleul *et al.*, 2013. Cano-Ramírez, 2013).

Los esfingolípidos complejos tienen una estructura rígida debido a sus largas cadenas acílicas, a sus cadenas saturadas o con insaturaciones en *trans* y a sus cabezas polares que se asocian entre sí por puentes de hidrógeno. Esta rigidez en su conformación contribuye a modular la fluidez de la membrana, disminuyéndola. En condiciones de bajas temperaturas, los glicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides adoptan una conformación muy rígida y esto perturba la estabilidad e integridad de la membrana. Por ello, una manera de aumentar la fluidez es disminuyendo la cantidad de esfingolípidos complejos. De esta manera, los esfingolípidos complejos resultan ser un factor de control de la fluidez membranal (Uemura *et al.*, 2013. Cano-Ramírez, 2013).

Las bases de cadena larga, en particular la fitoesfingosina, aumenta sus niveles, los cuales son muy bajos en condiciones de exposición a frío. Esta subida transitoria, súbita y controlada de la fitoesfingosina corresponde a un comportamiento de segundo mensajero. En este caso, el incremento de la base produce la activación de la MPK6, que es una cinasa que pertenece a una vía de respuesta a frío que supuestamente contribuye a una mayor sobrevivencia de las células a la baja temperatura (Dutilleul *et al.*, 2011).

En el laboratorio de nuestro grupo de trabajo, se ha caracterizado la respuesta de la membrana plasmática a bajas temperaturas en diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a bajas temperaturas y luego sometidas a un reto de congelación (Cano-Ramírez, 2013). Estas líneas son mutantes en genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de esfingolípidos, en la expresión de cinasas, como la MPK3 y la MPK6, y en la generación de especies reactivas de oxígeno en el cloroplasto.

5. Características del genotipo mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (HP).

La línea mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (denominada HP), presenta deficiencias en la síntesis de esfingolípidos, pues tiene insertado un T-DNA en el gen que codifica la subunidad LCB2a de la enzima SPT. La mutante HP bajo la exposición del inductor metoxifenazida (MFZ), expresa un iRNA que promueve la degradación del mRNA que codifica la subunidad LCB2b (silenciamiento génico). Como ésta planta ya no tiene la subunidad LCB2a, con el silenciamiento de la LCB2b no se sintetiza, por lo que la SPT ya no se forma por el dímero LCB1/LCB2a, ni por el LCB1/LCB2b, con ello, se ve disminuida gradualmente la síntesis *de novo* de esfingolípidos (Dietrich *et al.*, 2008). Como ya se mencionó, la SPT es la enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de esfingolípidos, formando ceto esfinganina y a partir de ésta se continúa con síntesis de esfingolípidos complejos.

Esta línea mutante con silenciamiento inducible es muy útil para el estudio del análisis de los esfingolípidos ante las bajas temperaturas al ser comparada con las plantas silvestres.

HIPÓTESIS

Se observará una respuesta en la morfología de los callos del genotipo *Atlcb2b hp/Atlcb2a* silenciados genéticamente por la exposición a metoxifenazida e incubados a 25°C, ésta respuesta se verá retrasada en cultivos incubados a 4°C.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Observar la respuesta de los callos del genotipo *Atlcb2b hp/Atlcb2a* de *Arabidopsis thaliana* silenciados por la exposición a metoxifenazida e incubados a 25°C y a 4°C para determinar el efecto de la disminución de los esfingolípidos en la resistencia al frío.

Objetivos particulares.

- Establecer y caracterizar cultivos de callo de *A. thaliana* de los genotipos silvestre y de la mutante silenciada *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (HP).
- Determinar el efecto del inductor del silenciamiento (MFZ) en el crecimiento de los callos del genotipo HP.
- Determinar la concentración de MFZ, a la cual responden los cultivos caulogénicos de la línea HP.
- Determinar el efecto de la baja temperatura en el crecimiento y morfología de los cultivos caulogénicos de los genotipos silvestres y HP expuestos a MFZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diagrama del proceso experimental.

En el diagrama 5 se presenta el diagrama en síntesis el protocolo seguido para la realización de este trabajo.

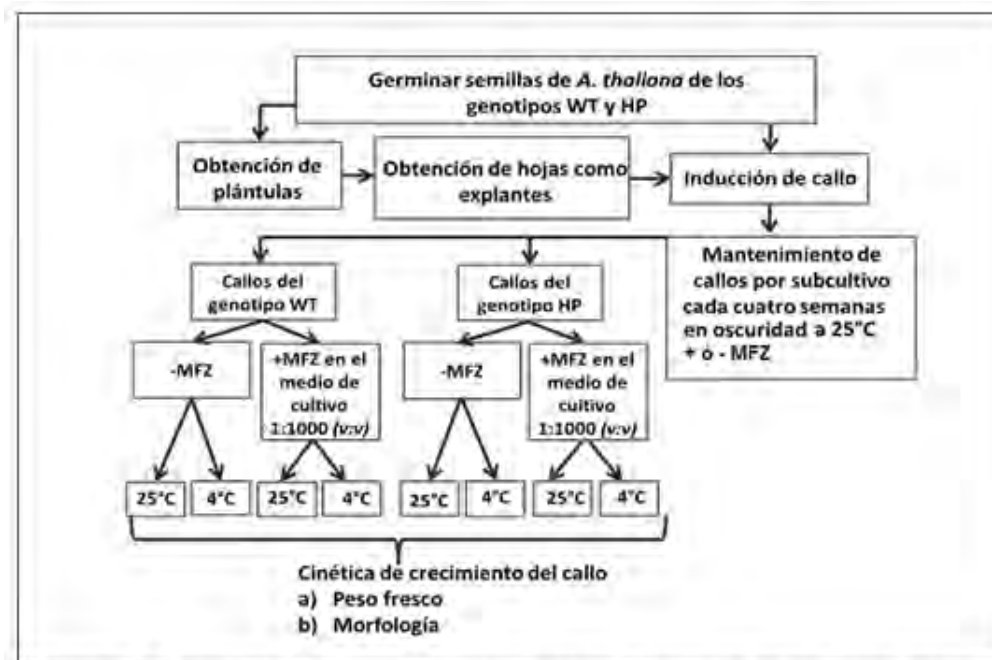


Figura 5. Diagrama del proceso experimental. Los detalles se describen en secciones posteriores.

2. Material biológico.

Se germinaron semillas en medio MS (Anexo, Tabla A1) de *Arabidopsis thaliana* del genotipo silvestre WT y de la línea mutante HP, se incubaron a 25 °C y en fotoperiodo (8 h oscuridad/16 h luz).

A las plántulas de tres semanas de edad, se les retiraron las láminas foliares y se establecieron en medio de cultivo MS adicionado con reguladores de crecimiento para la inducción del callo.

Los callos también fueron obtenidos a partir de semillas directamente puestas en el medio de cultivo adicionado con reguladores de crecimiento para la inducción de callo, en donde las semillas al ir germinando generaron tejidos/estructuras que derivaron en la formación de callos.

3. Medios de cultivo.

El medio de cultivo que se empleó se realizó con las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) en una concentración (100X), en el ANEXO se encuentra la Tabla A1, que hace referencia en detalle a las sales empleadas. Se suplementó con 3% de sacarosa, y con las auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido indol-3-acético (AIA) ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ácido naftalenacético (ANA) ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) además de la citocinina, 6-bencilaminopurina (BA) ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (ANEXO, Tabla A2). El medio de cultivo sólido se gelificó con agargel® ($8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). También se agregó el coctel de vitaminas R2 (ANEXO Tabla A3) y glicina ($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (ANEXO Tabla A4). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH 1 N o HCl 1 N según fuera necesario. Todos los medios se esterizaron en una autoclave vertical a 120°C y a $1.2 \text{ Kg}/\text{cm}^2$ de presión.

3.1 Descripción de la Metoxifenazida (MFZ).

La Metoxifenazida ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$) es el ingrediente activo (Fig. 6.) del insecticida diacilhidrazina de uso agrícola (Intrepid®) que actúa como un antagonista de la ecdizona en lepidópteros. De acuerdo a sus propiedades físicas y químicas, la MFZ es un compuesto de color blanco que en su condición concentrada en el producto Intrepid®, presenta una consistencia viscosa y muy densa, difícil de filtrar a través de membranas con poros de $0.22 \mu\text{m}$ y $0.45 \mu\text{m}$.

Debido a que su punto de fusión está en el intervalo de los 204°C a los 206.6°C fue posible esterilizarla en la autoclave a 120°C para después adicionarla en los medios de cultivo.

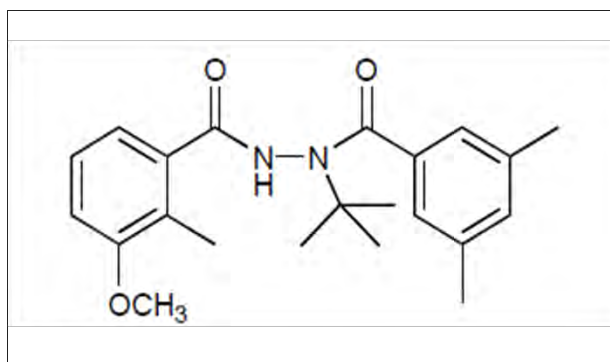


Figura 6. Estructura química de MFZ, ingrediente activo de Intrepid®

4. Desinfección y siembra de semillas *in vitro*.

Para la germinación de las semillas o la inducción de callo a partir de éstas, se empleó el protocolo de desinfección que a continuación se enuncia.

En una campana de flujo laminar y bajo condiciones de asepsia, el material que se usó, se desinfectó previamente para obtener células libres de patógeno. Se colocaron las semillas en un micro tubo y se agregó 1 ml de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% y 1 μ l de tween 20 (0.1%) agitando vigorosamente durante 20 min. Al término, se centrifugó el tubo con las semillas durante 10 s eliminando el sobrenadante con una micropipeta de 1000 μ l con punta estéril.

Se realizaron varios enjuagues con 1 ml de agua desionizada estéril (aproximadamente 5), agitando durante 30 s hasta eliminar por completo el hipoclorito de sodio y el tween 20. Después de cada enjuague, se centrifugó durante 10 s y se retiró el sobrenadante.

En el último enjuague, se observó el agua libre de burbujas generadas por la acción del tween 20, además de que fue evidente la fácil resuspensión de las semillas; en esta etapa, se retiró el sobrenadante y se agregó nuevamente agua desionizada estéril y 0.1 ml de cefotaxime, y se agitó vigorosamente.

Con una micropipeta de 200 μ l con la punta previamente cortada para facilitar el ingreso de las semillas, se tomaron alícuotas de aproximadamente 100 μ l de la suspensión de semillas, la solución con las semillas fue resuspendida continuamente para la obtención de alícuotas homogéneas. De esta manera, los 1000 μ l se distribuyeron en 10 cajas Petri de 60 x 15 mm con medio MS sólido sin hormonas para la germinación y posterior obtención de plántulas.

También se sembraron semillas desinfectadas en medio MS sólido adicionado con hormonas para la inducción de callo a partir de la germinación de las semillas.

Las cajas con las semillas se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron a 4 °C durante 48 h en condiciones de oscuridad. Al término de este periodo, se colocaron en incubación con fotoperiodo de 16 h luz /8 h oscuridad a una temperatura de 25 °C.

En el caso de la inducción a partir de plántulas, se usaron hojas de 3 semanas de edad como explantes. Las láminas foliares se retiraron del tallo, colocándose en una caja Petri con medio MS sólido adicionado con hormonas, previo al establecimiento del explante, y si las hojas eran muy pequeñas, se dividieron a la mitad y se colocaron con en contacto con el medio de cultivo.

5. Condiciones de incubación y subcultivos de callo.

Todos los cultivos de callos se subcultivaron en el medio MS en periodos de 3 a 4 semanas y se incubaron en un cuarto de ambiente controlado con fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad. La temperatura se mantuvo controlada a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los subcultivos de los callos en medio “nuevo” se realizaron en periodos de 15 a 20 días. Si en el tiempo de incubación de los cultivos se llegó a manifestar coloración café, como símbolo de oxidación, fue necesario realizar subcultivos de “emergencia” y eliminar las regiones oxidadas.

6. Cinética de crecimiento callo de los genotipos WT y HP.

En una báscula granataria dentro de la campana de flujo laminar, las muestras de callo se colocaron en una caja Petri previamente esterilizada.

La caracterización del crecimiento de los cultivos de callo de los genotipos WT y HP se determinó colocando 1 g como peso inicial de biomasa en medio sólido pesando cada tercer día en un periodo de 3 semanas, de esta manera se obtuvo cada punto de la cinética.

7. Establecimiento del callo en medio de cultivo sólido adicionado con MFZ para el silenciamiento del gen codificante de la subunidad LCB2b.

Para el silenciamiento de la subunidad LCB2b, fue necesario exponer los cultivos de callo a diferentes concentraciones de MFZ que como ya se mencionó, induce la inhibición del gen de la subunidad funcional de la enzima SPT.

Se preparó medio MS sólido (Anexo Tabla A1) al que se le adicionó MFZ en diferentes diluciones. Para ello, fue necesario realizar una dilución madre en agua desionizada a una proporción 1:10 (v:v) y esterilizando en una autoclave vertical a 120°C y a 1.2 Kg/cm^2 de presión durante 18 min. A los genotipos expuestos a MFZ, se les denominó para el caso del genotipo silvestre +WT y para los callos no expuestos del mismo genotipo –WT. De esta manera, para el caso de la línea mutante HP, al cultivo expuesto se hace referencia como +HP y los no expuestos del mismo genotipo –HP.

7.1 Adición de MFZ al medio de cultivo y cinética de crecimiento de callo expuesto a una dilución 1:250 (v:v) y 1:500 (v:v) de MFZ.

En la campana de flujo laminar, y con material previamente esterilizado, se adicionaron 12 ml de la solución madre a una probeta graduada aforando a 300 ml, obteniendo así la dilución 1:250 (v:v), con un agitador magnético y en una estufa con agitación, se homogenizó la mezcla durante 3 min y posteriormente se sirvió el medio en frascos tipo tarro adicionando 30 ml del medio con la dilución 1:250 (v:v). Se dejó gelificar durante 24 h y se llevó a cabo el establecimiento del callo.

Se adicionaron 6 ml de la solución madre descrita con anterioridad a una probeta graduada aforando a 300 ml, obteniendo así la dilución 1:500 (v:v), con un agitador magnético y en una estufa con agitación, se homogenizó la mezcla durante 3 min y posteriormente se sirvió el medio de cultivo en frascos tipo tarro adicionando 30 ml de medio de cultivo con una dilución 1:500 (v:v). Se dejó gelificar durante 24 h y se llevó a cabo el establecimiento del callo.

El seguimiento del incremento de biomasa en los cultivos de callo de los genotipos -WT, +WT y -HP, +HP, se determinó colocando 1 g de callo como peso inicial en medio sólido pesando con una báscula granataria dentro de la campana de flujo laminar, cada tercer día durante un periodo de 3 semanas, de esta manera se obtuvo cada punto de la cinética.

En el caso de los cultivos control, se adicionaron 10 ml de agua desionizada estéril a los medios de cultivo que fue servido en frascos tipo tarro agregando 30 ml de medio de cultivo, dejando solidificar durante 24 h.

Los cultivos se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C.

7.2 Adición de MFZ al medio de cultivo y cinética de crecimiento de callos -WT, +WT y - HP, + HP, a una dilución 1:1000 (v:v) de MFZ incubado a 4 °C.

Se adicionaron 3.2 ml de la solución madre a una probeta graduada aforando a 320 ml, obteniendo así la dilución 1:1000 (v:v), con un agitador magnético y en una estufa con agitación, se homogenizó la mezcla durante 3 minutos y posteriormente se sirvió el medio de cultivo en cajas Petri de tamaño 60x15 mm, adicionando 20 ml de medio de cultivo en

dilución 1:1000 (v:v), se dejó gelificar durante 24 h y se llevó a cabo el establecimiento del callo.

El seguimiento del incremento de biomasa en los cultivos de callo de los genotipos -WT, +WT y -HP,+HP, se determinó colocando 0.5 g de callo como peso inicial en medio sólido, pesando con una báscula granataria dentro de la campana de flujo laminar. El periodo de seguimiento de este ensayo fue de 56 días siendo los días 0, 8, 16, 28 y 56 los de obtención de datos.

Las condiciones de incubación en este ensayo fueron de oscuridad y en temperaturas de 25 ± 2 °C y 4 ± 2 °C.

En el caso de los cultivos control, se adicionó agua desionizada estéril a los medios de cultivo en la misma proporción en la que fue adicionado la solución madre de MFZ.

8. Análisis de datos.

Para el análisis estadístico de los datos, se empleó el programa Minitab versión17 de la compañía LEAD Technologies, Inc.

Para la caracterización de la cinética de crecimiento de peso fresco se realizó una regresión lineal.

Se realizó la prueba de ANOVA unifactorial con un intervalo de confianza de un 95%. Se empleó la prueba de Tukey para realizar la comprobación del análisis.

RESULTADOS

1. Caracterización de la cinética de crecimiento de peso fresco del cultivo de callo de los genotipos WT y HP.

Con el fin de evaluar el crecimiento de los cultivos de callo de los genotipos WT y de la línea mutante HP empleados en este trabajo, se determinó el incremento de su peso fresco mediante su cinética de crecimiento. Los resultados se muestran en la Figura 7, en la cual se observa que en el genotipo silvestre hubo un decremento importante del peso en los primeros días de cultivo y se presentó un ligero incremento hasta el día 11. El comportamiento de los callos del genotipo HP fue similar al genotipo silvestre, solo que la respuesta fue en menor grado. En ambos casos, fue posible ver un incremento muy lento de biomasa.

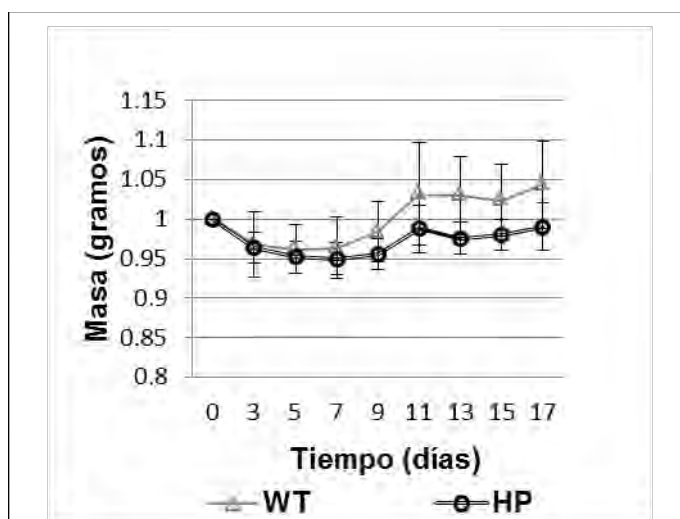


Figura 7. Cinética de crecimiento de peso fresco de callo e los genotipos WT y HP. Cada punto corresponde al promedio de n=5.

De esta metodología se hizo el seguimiento fotográfico (Fig. 8.) Es posible ver en este registro que la proliferación y la tendencia al incremento de biomasa fue lento en ambos genotipos, coincidente con la cinética de peso fresco. Morfológicamente no se detectaron grandes cambios ni en coloración, tamaño relativo o densidad, sin embargo si es destacable que eran callos friables.

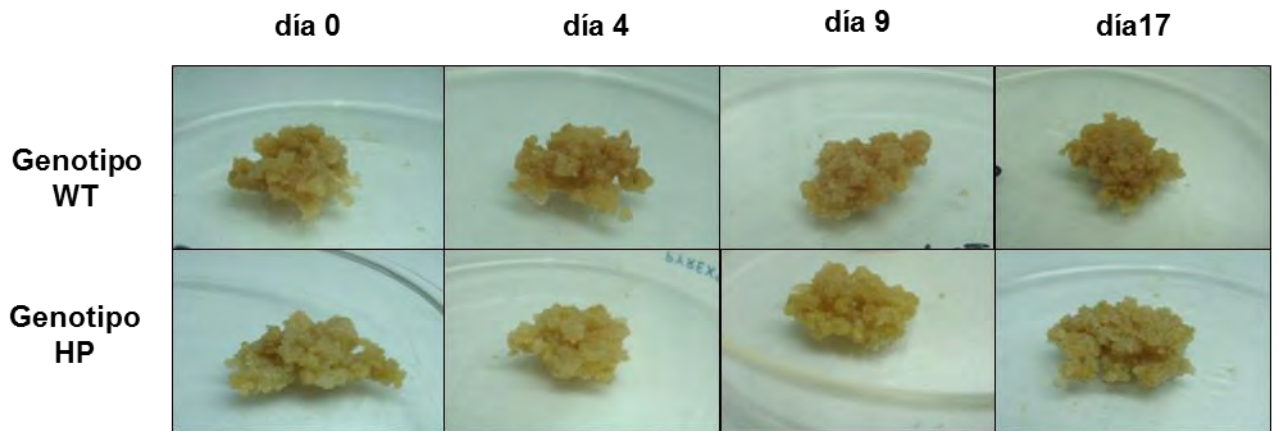


Figura 8. Registro morfológico. Callos de los genotipos WT y HP durante su cinética de crecimiento.

2. Evaluación de cultivos de callo de los genotipos –WT, +WT y -HP, +HP, a las diluciones 1:250 (v:v) y 1:500 (v:v) de MFZ.

Con el objeto de evaluar si la adición del inductor del silenciamiento, MFZ, alteraba la cinética de crecimiento de los callos, se determinó el peso fresco de los genotipos +WT y +HP a dos concentraciones de MFZ.

Con fines comparativos se juntaron las curvas correspondientes a los cultivos de ambos genotipos expuestos a las dos concentraciones de MFZ (1:250 (v:v) y 1:500 (v:v)) empleadas para inducir el silenciamiento del gen de la subunidad LCB2a, y su control sin MFZ. En la figura 9 se presentan las curvas de crecimiento de los callos, se observó una importante caída en el cultivo de callo del genotipo WT en todas las condiciones, a diferencia del cultivo de callo del genotipo –HP, en el que es evidente un incremento sustancial de peso fresco a partir de los 10 días.

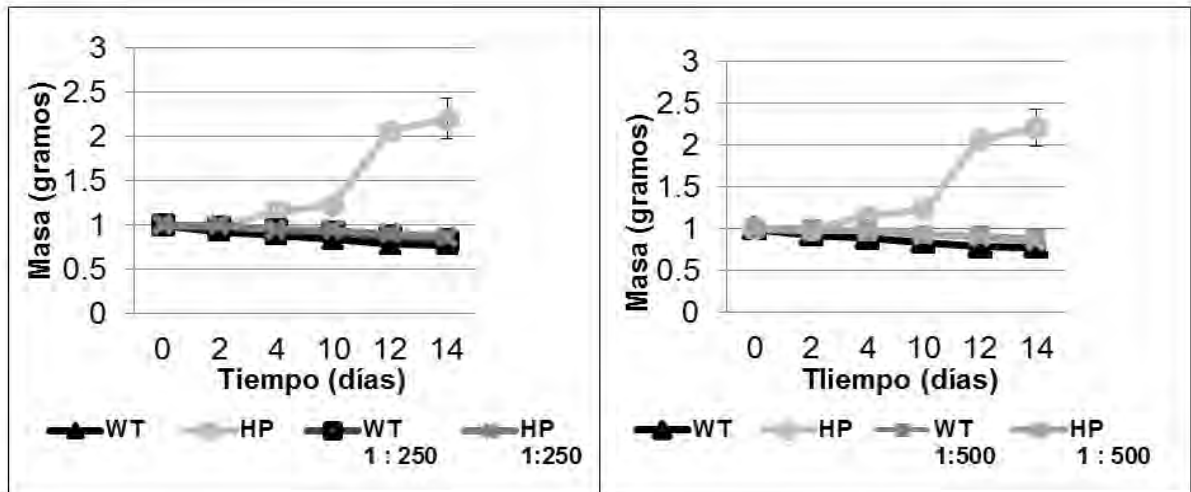


Figura 9. Cinética de crecimiento de peso fresco de los cultivos de callo WT y HP expuestos a MFZ. Cada punto corresponde al promedio de n=5.

Se realizó una prueba de estadística análisis de varianza (ANOVA) unifactorial y una comparación de medias por el método de Tukey aplicado a los resultados para determinar la existencia de diferencias significativas del crecimiento entre los genotipos WT y HP ante la exposición a MFZ.

Los datos obtenidos por el análisis de varianza $\alpha=0.05$, demostraron que en el ensayo, por lo menos una media resultó con diferencias significativas, (Fig. 10.) obteniendo $P=0$. En esta misma figura 10 se observan los intervalos de confianza arrojados por ANOVA que muestran de manera gráfica los resultados obtenidos por esta prueba, se comprobó que la diferencia significativa en este ensayo, correspondió al cultivo del genotipo –HP.

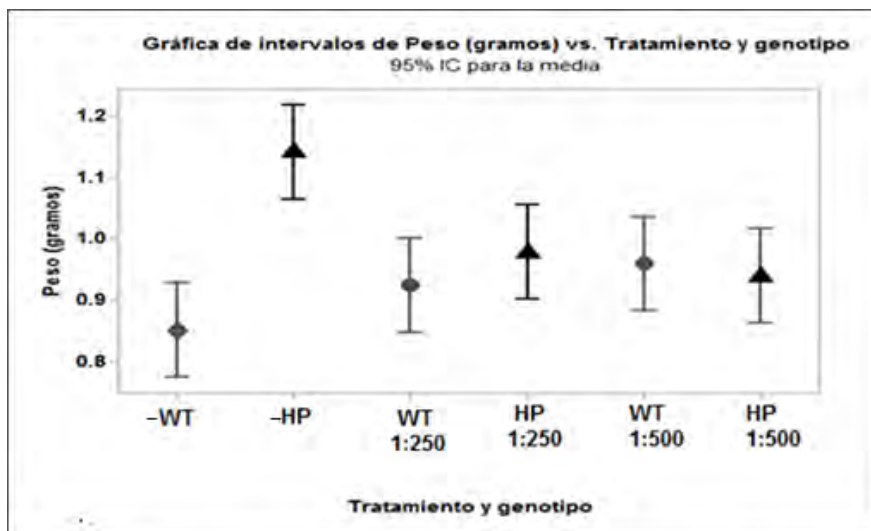


Figura 10. Intervalos correspondientes a la prueba de ANOVA. Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a los genotipos.

Como se mencionó anteriormente, se aplicó una prueba de Tukey para comprobar los resultados obtenidos por ANOVA. En la Tabla 1 se muestra la comparación en parejas de Tukey en la que es posible determinar la media que resulta significativamente diferente y que corresponde a letras diferentes.

Tratamiento y genotipo	N	Media	Agrupación
-WT	24	0.8508	B
-HP	24	1.1412	A
WT 1:250 (v:v)	24	0.9242	B
HP 1:250 (v:v)	24	0.9779	B
HP 1:500(v:v)	24	0.9388	B
WT 1:500 (v:v)	24	0.9596	B

El genotipo -HP, se mostró significativamente diferente con respecto a todos los genotipos y tratamientos (Tabla 1.) Esta misma serie de experimentos se registró fotográficamente para evaluar la morfología de los callos durante el crecimiento. En la

figura 11, se observó un cambio en el volumen (Fig. 11, columna derecha), no correspondiente a lo obtenido en la cinética de crecimiento.

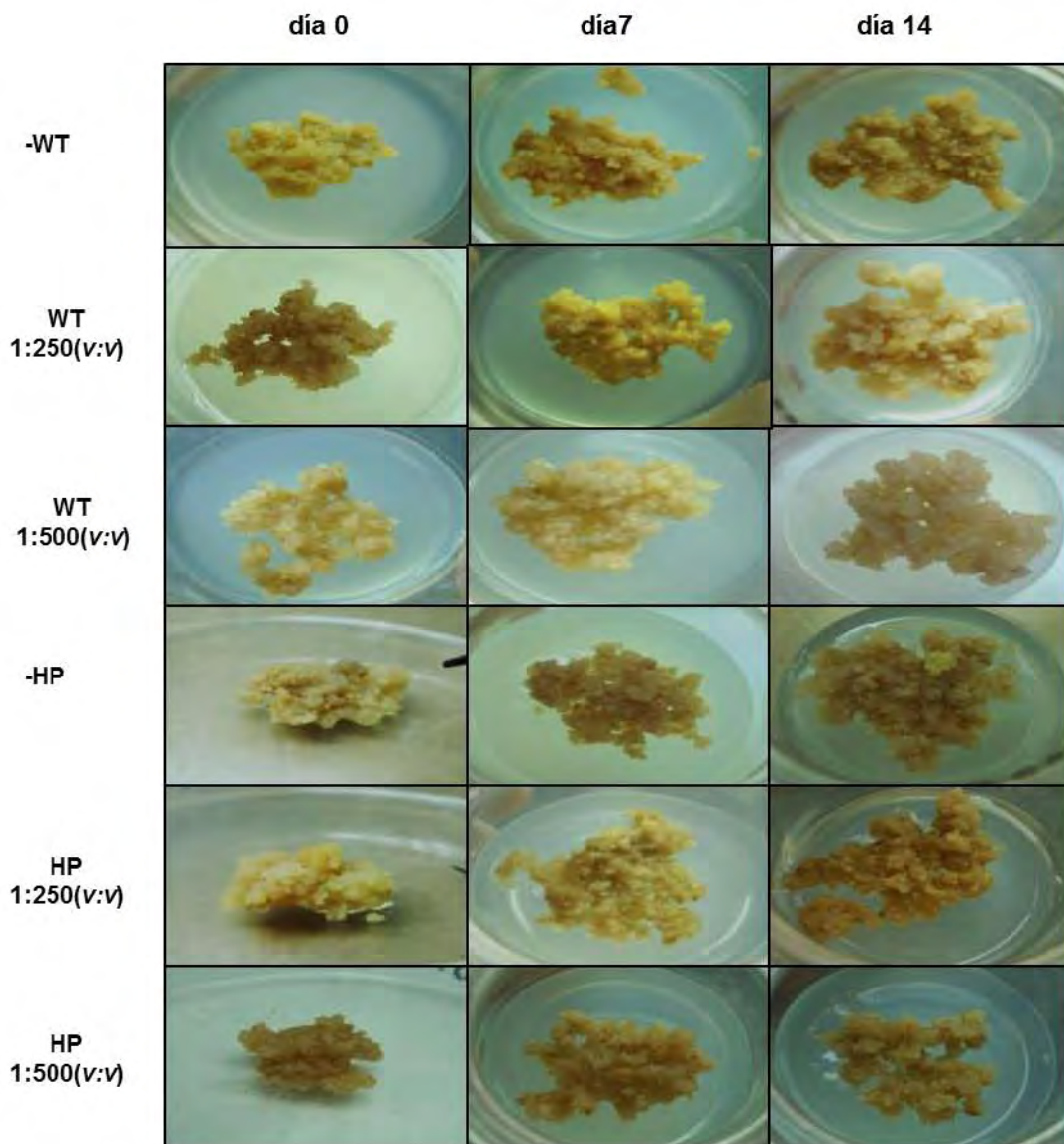


Figura 11. Registro morfológico de callos de los genotipos WT y HP. Los callos fueron expuestos a las diluciones 1:250 (v:v) y 1:500 (v:v) de MFZ durante su cinética de crecimiento.

3. Evaluación de cultivos de callo de los genotipos –WT, +WT y –HP, +HP, a una dilución 1:1000(v:v) de MFZ incubados a 25° C y 4° C.

Se realizó el seguimiento de los callos –WT, +WT y –HP y +HP, hasta los 56 días a una dilución de 1:1000(v:v) de MFZ. Además, se incubaron los callos a 25 °C como control y a 4 °C con el fin de evaluar el efecto de la baja temperatura en callos +HP silenciados.

En la figura 12, correspondiente a los callos del genotipo WT cultivados a 25 °C, no se registró incremento de biomasa, en presencia ni en ausencia de MFZ, en concordancia con los resultados anteriores.

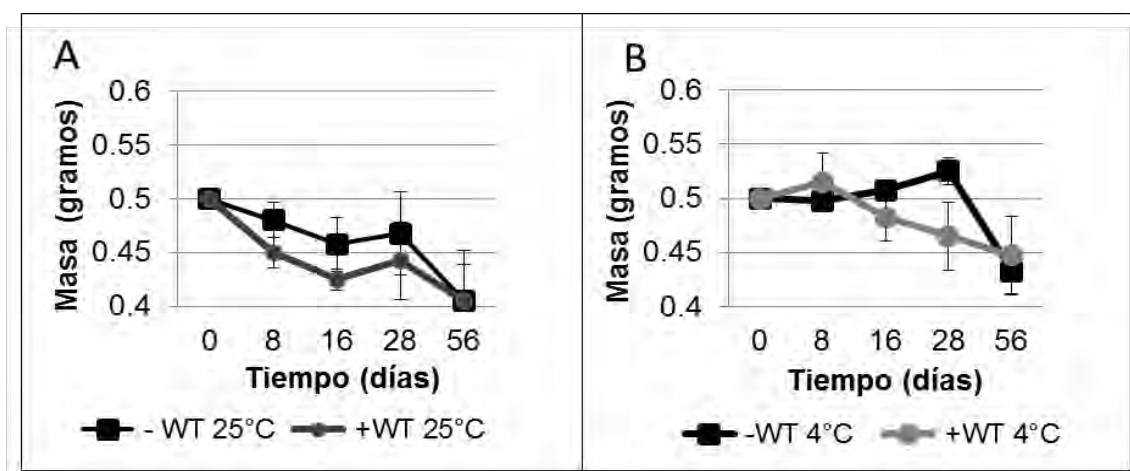


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de peso fresco de callos expuestos a la dilución 1:1000 (v:v) de MFZ. A) –WT y +WT a 25°C. B) –WT y +WT a 4°C. Cada punto corresponde al promedio de n=4.

En los cultivos incubados a 4 °C (Fig. 12.), el callo –WT, presentó un lento crecimiento con respecto al callo expuesto (+WT) pero sólo hasta los 28 días. Es difícil de explicar y se requieren más replicas

Para estos datos se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) unifactorial (en la Figura 13 se grafican sus intervalos de confianza) y una comprobación de medias por el método de Tukey. La significancia que se contempló fue de $\alpha=0.05$. Cabe señalar que el valor de $P= 0.01$ indicando que por lo menos una media fue significativamente diferente.

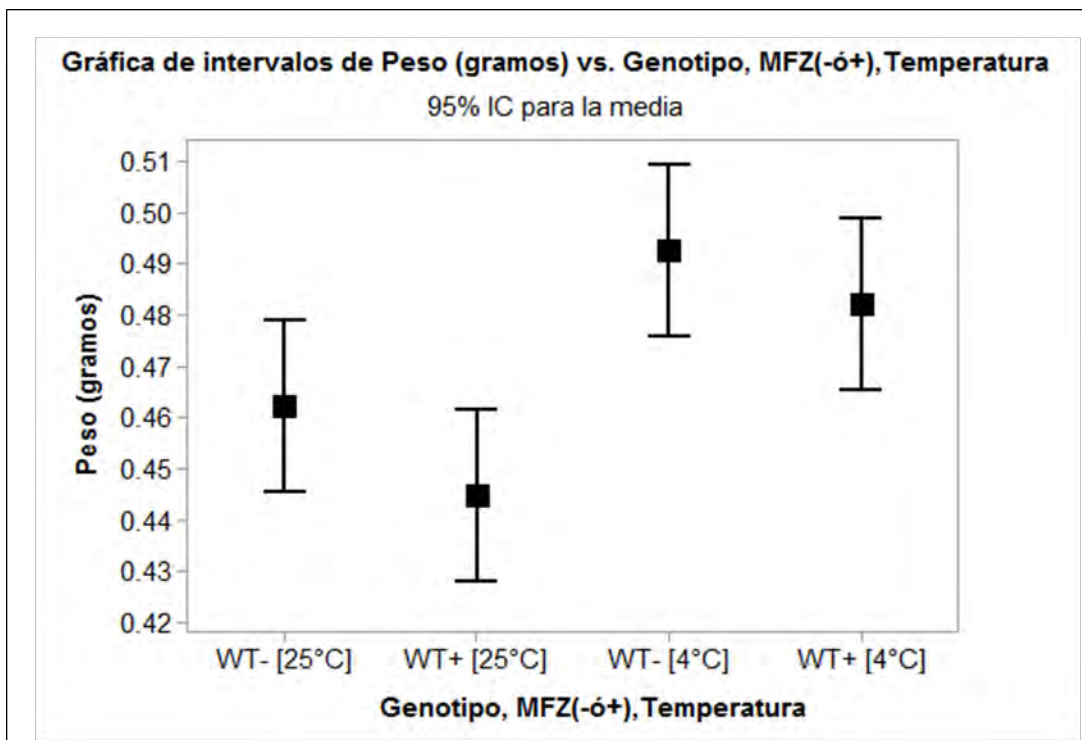


Figura 13. Intervalos de confianza correspondientes a la prueba de ANOVA. Compara medias de los entre ensayos.

En la Tabla 2; se muestra la comprobación de Tukey, donde es posible identificar que el grupo que resultó con medias significativamente diferentes, no comparten una letra.

Genotipo, MFZ (- ó +), temperatura	N	Media	Agrupación
-WT 25°C	20	0.46200	AB
+WT 25°C	20	0.44450	B
-WT 4°C	20	0.49250	A
+WT 4°C	20	0.48200	A

Con respecto al registro morfológico (Figura 14), no se observaron diferencias en cuanto a la coloración de los callos expuestos y no expuestos a MFZ, tampoco fue visible la coloración en el medio de cultivo. No se identifica un cambio visible en el volumen de los callos.

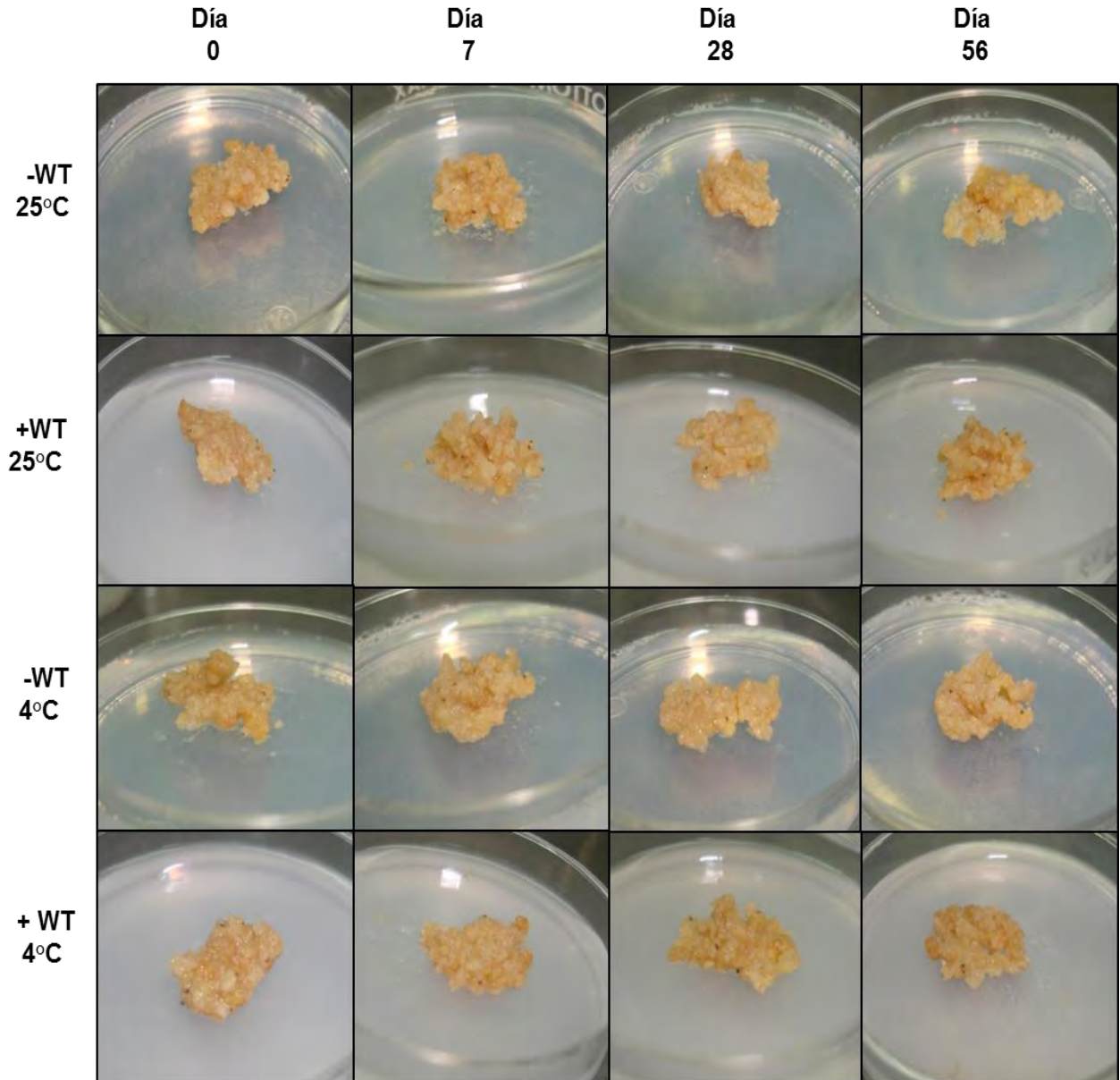


Figura 14. Registro morfológico de callos del genotipo -WT y +WT. Expuestos a la dilución 1:1000 de MFZ incubados a 25°C Y 4°C.

En la Figura 15, correspondiente a la cinética de crecimiento de los callos de genotipo HP (- y+) cultivados a 25 °C, es posible ver ambas curvas con un incremento de biomasa desde los 16 días. Sin embargo, los cultivos HP + (con silenciamiento génico) presentaron un menor aumento de biomasa que el HP- y esta diferencia fue máxima a los 56 días. Cuando se determinó el crecimiento de los callos a 4 °C (Figura 15, Panel B), ambos

cultivos presentaron un menor crecimiento a lo largo de todo el tiempo de cultivo, ambos tendieron a incrementar su biomasa.

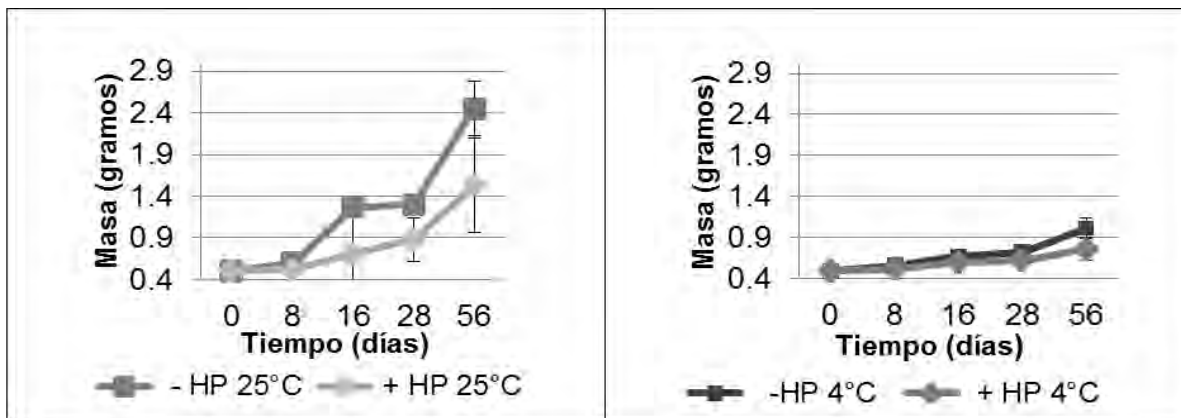


Figura 15. Cinéticas de crecimiento de peso fresco de callos expuestos a la dilución 1:1000 (v:v) de MFZ. A) -HP y +HP a 25°C. B) -HP y +HP a 4°C. Cada punto corresponde al promedio de n=4.

Como en los experimentos previamente mostrados, a este conjunto de experimentos se le realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) unifactorial y una comprobación de medias por el método de Tukey. La significancia que se contempló fue de $\alpha=0.05$. Cabe señalar que el valor obtenido de $P=0$ indicando que por lo menos una media es significativamente diferente. Esto se presenta de manera gráfica y representativa, en la Figura 16, para exponer las diferencias entre las medias obtenidas de las cinéticas de los genotipos -HP y +HP (dilución 1:1000) en función de la temperatura de cultivo. En dicha gráfica es posible observar que la diferencia significativa corresponde al cultivo no expuesto a MFZ e incubado a 25 °C.

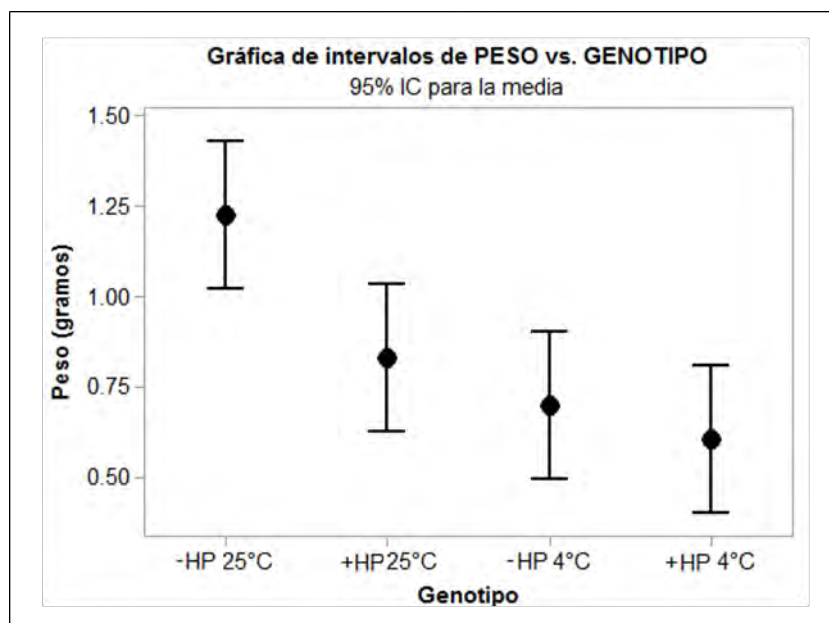


Figura 16 . Intervalos de confianza de ANOVA . Comparación de medias de los callos incubados a 25°C y 4°C del genotipo HP + y HP-

En la Tabla 3, se muestra la comparación en parejas de Tukey, en la que es posible observar las diferencias de crecimiento de los cultivos en las dos temperaturas. Fue posible corroborar la disminución en la proliferación de los cultivos a 4 °C.

Tabla 3. Comparaciones en parejas de Tukey con una confianza de 95%.			
Genotipo, MFZ (- ó +), temperatura	N	Media	Agrupación
-HP 25°C	20	1.222	A
+HP 25°C	20	0.8270	B
-HP 4°C	20	0.6975	B
+HP 4°C	20	0.6010	B

La Figura 17 corresponde al registro morfológico del genotipo HP –y + MFZ. Es importante notar que el callo del genotipo HP no expuesto a MFZ, durante los 56 días de cultivo, presentó un aumento de biomasa al igual que el callo expuesto, sin embargo, el callo expuesto a MFZ e incubado a 25 °C presentó oxidación tanto en la masa caulogénica como en el medio de cultivo.

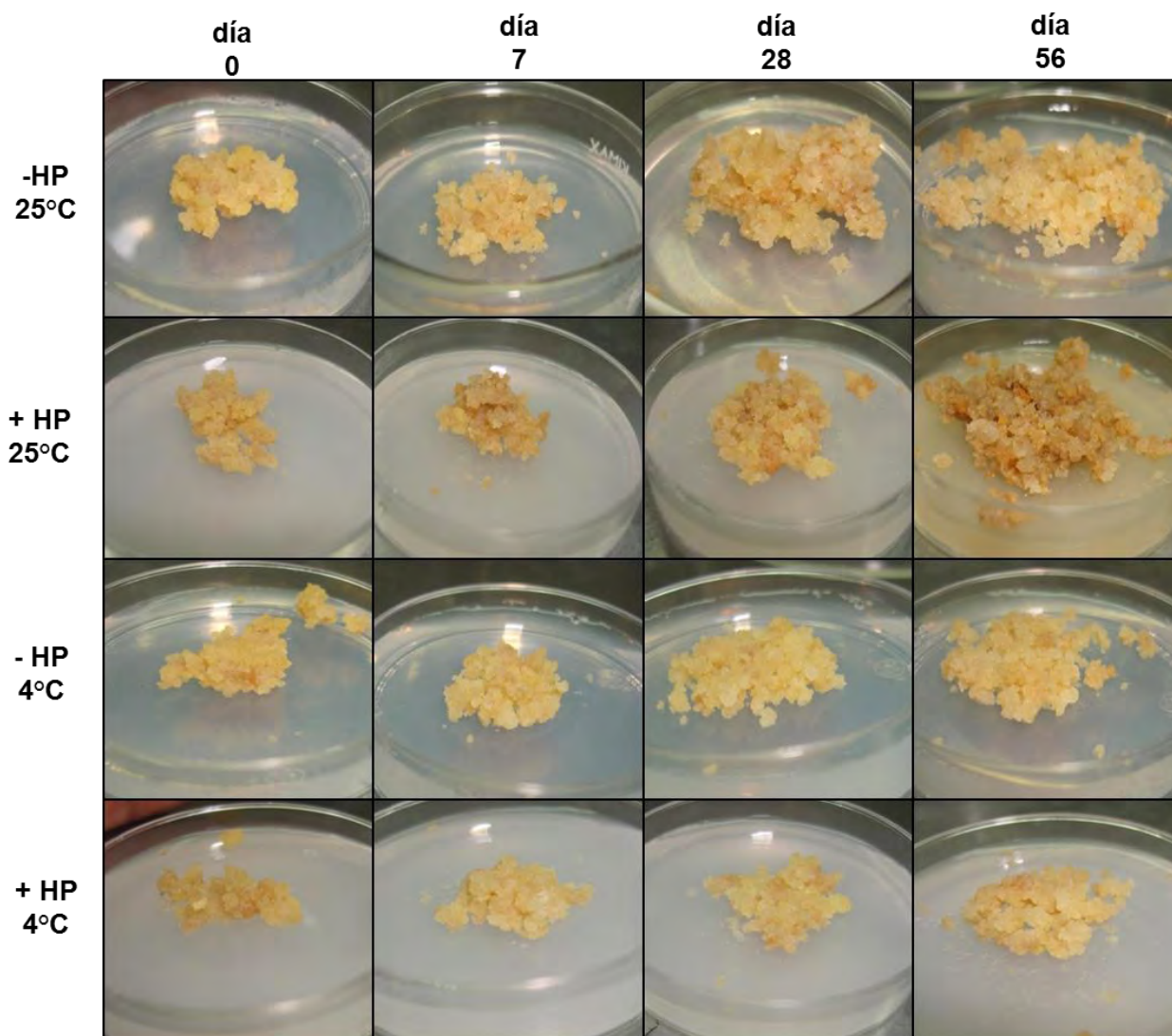


Figura 17. Registro morfológico de callos del genotipo - HP y + HP. Expuestos a la dilución 1:1000 de MFZ incubados a 25°C y 4°C.

En cuanto al callo incubado a 4 °C, en ambas condiciones (expuesto y no expuesto), no presentó oxidación, sin embargo, se observó poca proliferación en comparación con el callo incubado a 25 °C.

DISCUSIÓN

Arabidopsis thaliana se ha caracterizado desde hace aproximadamente cien años como un modelo biológico, ya que gracias a la secuenciación de su genoma ha sido posible la generación de mutantes que ayudan a dilucidar los procesos biológicos fundamentales para la vida de las plantas. Esto ha contribuido a conocer el papel de proteínas específicas y las posibles rutas que llevan a estos organismos a adaptarse a los ambientes tan diversos y característicos de nuestro planeta.

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta funcional en las áreas de la investigación, ya que permite establecer a las plantas en condiciones óptimas para su monitoreo y modificaciones de acuerdo a las condiciones requeridas, permitiendo la disponibilidad de masas celulares homogéneas en su estado de diferenciación. Según la ruta morfogénica a seguir, se han propuesto diversas metodologías para el cultivo de tejidos de *A. thaliana*, en donde lo más común es el empleo de los medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y B5 (Gamborg, 1968) (Berkla *et al.*, 2014) dentro de los sustratos nutrimentales.

En este trabajo se empleó el medio MS como medio para la germinación de las semillas. No se adicionaron reguladores de crecimiento, mientras que para la inducción y el mantenimiento de los callos, se adicionaron las auxinas AIA, 2,4-D, ANA y la citocinina BA. El papel de los reguladores de crecimiento es fundamental porque según su modulación, se determina la respuesta morfogénica; en el caso de la vía de la formación de callo (Smith, 2013), la adición de las auxinas es importante, ya que estas sustancias tienen una función esencial en el crecimiento por elongación, además de ser “vehículos” funcionales de sustancias como las citocininas que llevan a cabo la regulación de la proliferación celular, manteniendo activo su ciclo; el sinergismo entre ambos reguladores modula la inducción y la proliferación continua de las masas caulogénicas (Hopkins, 1995).

En este trabajo, para la obtención de callo del genotipo silvestre (WT) y el mutante (HP), se establecieron las láminas foliares como explantes en el medio de inducción, logrando la desdiferenciación de los tejidos a partir de la tercera semana de incubación. También se usaron las semillas germinantes en el medio adicionado con reguladores de crecimiento con la finalidad de obtener callo de los tejidos inmediatos a su emergencia. La diferencia entre ambos métodos de inducción fue la cantidad de biomasa obtenida en función del tiempo, pero en ambos casos, los callos resultantes fueron funcionales para los ensayos, presentando las características del callo típico de *A. thaliana*; es decir, con

coloración blanquecina a amarillenta, proliferos y friables en ambos genotipos inducidos. La oxidación y contaminación de los cultivos, en este caso, fue mínima y no causo ningún problema.

Caracterización de los cultivos de callo de los genotipos WT y HP

Para caracterizar los cultivos de callo de los genotipos WT y HP, se realizó la cinética de crecimiento por medio de la obtención de peso fresco y del registro fenotípico con fotografías. En los resultados obtenidos hasta los 14 días de crecimiento, se vió que en las mismas condiciones de incubación, el patrón de proliferación de ambos genotipos fue lento pero al final de la cinética, se observó un incremento en la biomasa. Este comportamiento fue el esperado, ya que hasta estos días de incubación no se había agregado la MFZ al callo HP y por tanto, éste se tenía que comportar como el control. Este aumento discreto de biomasa no fue visible en el registro morfológico obtenido por medio del seguimiento fotográfico, ya que los callos tanto WT como HP se mostraron con volúmenes, color y forma semejantes, cabe señalar que los callos de los cultivos HP mostró una apariencia con una consistencia más porosa y ligera que los correspondientes del genotipo WT.

Matemáticamente, el crecimiento de las poblaciones celulares cultivadas tanto en medio sólido como en medio líquido fue descrito por patrones de curvas sigmoideas (Smith, 2013). Para la caracterización de los cultivos de callo WT, no fue posible identificar las etapas que definen a este modelo, pues los resultados obtenidos no presentaron proliferación. La ausencia de una fase de crecimiento sostenido observada en las cinéticas de ambos genotipos pudo ocasionarse por el estrés al que se someten los cultivos al ser cambiados al medio “fresco” y que los cultivos de *A. thaliana* sean muy delicados o bien, a que el medio utilizado no es óptimo para esta especie WT. Es necesario recordar que la teoría celular establece que las células responden a los estímulos ambientales y los subcultivos implican una modificación ambiental muy agresiva en principio por la simple manipulación de las masas caulogénicas.

Cuando el seguimiento de la cinética de crecimiento se continuó hasta el periodo de 28 a 56 días, los cultivos de los callos WT – y + MFZ y los del genotipo HP – y + MFZ, tampoco mostraron un aumento en la biomasa. Sin embargo, estos mismos cultivos revelaron claramente un mayor volumen y tamaño en el registro fotográfico. Esta disparidad entre los patrones de crecimiento de aumento de masa y morfología pueden

explicarse porque se apreció una diferencia en la consistencia de ambos callos, quizás debida a la pérdida de agua, lo cual afectó los pesos registrados.

Efecto del silenciamiento génico en los cultivos de callo de los genotipos WT y HP

El proceso experimental de esta tesis implicó la adición de MFZ al medio de cultivo para inducir el silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT (Dietrich *et al.*, 2008) en los callos del genotipo HP. Por ello se determinó una dilución adecuada de MFZ para los ensayos; las dos diluciones de MFZ fueron 1:250 (v:v) y 1:500 (v:v) y su respectivo control (sin MFZ).

Estas concentraciones se utilizaron también en el genotipo WT como un control. Los cultivos del genotipo silvestre incubados en medio sin MFZ no proliferaron; este comportamiento también se presentó en los callos expuestos a ambas diluciones del inductor, sugiriendo que no fue el MFZ el que provocó un efecto tóxico en la proliferación de los cultivos. Esto fue apoyado por el hecho de que los mismos callos WT tanto control como expuestos a las dos concentraciones de MFZ presentaron la misma morfología de apariencia normal. La nula proliferación del cultivo de callo de este genotipo, que aunque no presentó crecimiento, sí se mantuvo, se posiblemente se debió a otros factores.

En contraste con los cultivos del genotipo WT, los de la mutante HP (no expuestos a MFZ), sí presentaron un incremento en su proliferación. Sin embargo, los callos expuestos a ambas concentraciones de MFZ no presentaron proliferación, el patrón de la cinética de crecimiento en ambas concentraciones de MFZ resultó ser similar. Este comportamiento puede implicar, como se esperaba, una afectación negativa del metabolismo del callo consistente en la disminución de los niveles endógenos de esfingolípidos (Dietrich *et al.*, 2008) producido por la inducción del silenciamiento. Se ha descrito que los esfingolípidos son esenciales para el funcionamiento celular (Chen *et al.*, 2008), lo cual pudo originar la reducción del crecimiento. Sin embargo, no se puede descartar que el efecto del inductor sea un efecto tóxico inespecífico independiente del silenciamiento, ya que el control fue el callo WT, pero dada la ausencia de su proliferación en ausencia de MFZ, no se puede considerar un control adecuado. Coincidente con los resultados mencionados, en el análisis estadístico realizado, el callo del genotipo -HP no expuesto a MFZ presentó diferencias significativas con respecto a todas las condiciones experimentales, incluyendo el control del genotipo silvestre de este ensayo.

La posibilidad de observar mejor el efecto de una disminución de esfingolípidos que no resulte tan drástica en el crecimiento de los callos HP, queda abierta, explorando una

exposición de los callos a un periodo más prolongado y a una mayor dilución de MFZ, y así registrar una respuesta más tenue y gradual al silenciamiento.

Efecto de la baja temperatura en los cultivos de callo en ausencia de MFZ

Es necesario considerar que en las plantas, la temperatura tiene un papel determinante en su crecimiento y desarrollo (Cortés, 1994), lo que las ha llevado, a través del tiempo y de sus adaptaciones, a diversificar sus mecanismos de respuesta de acuerdo a los gradientes térmicos. Estos mecanismos van desde lo molecular (como los factores de transcripción, síntesis de compuestos crioprotectores, expresión de genes de respuesta al estrés a bajas temperaturas, etc.) hasta lo estructural, constituyendo estrategias muy interesantes y permitiendo la adaptación a casi todos los ambientes (Gliessman, 2002).

La tolerancia al frío depende de periodos de aclimatación a bajas temperaturas, provocando modificaciones metabólicas y estructurales (Espeving *et al.*, 2012). A nivel celular, los esfingolípidos participan preponderantemente en la resistencia a las bajas temperaturas, pues participan tanto en las respuestas estructurales en las membranas (Uemura *et al.*, 1995), como en las de señalización (Dutilleul *et al.*, 2011).

En este trabajo se buscó obtener información sobre el papel de los esfingolípidos en la respuesta al frío. Para ello se exploró la respuesta de los cultivos de callo del genotipo HP silenciados a bajas temperaturas (4 °C) teniendo siempre como referencia a los callos WT. Por las razones expresadas en la sección previa, estudiamos el efecto de la temperatura en callos expuestos a MFZ, pero a una dilución más alta: 1:1000 (v:v) (MFZ : medio de cultivo) y en una exposición más prolongada (56 días de cultivo). En este experimento, el genotipo WT incubado a 25 °C tanto en las condiciones de exposición a MFZ y de no exposición al mismo, no logró proliferar, si bien se mantuvo en buen estado. Este comportamiento ya se había visto en experimentos anteriores, como ya se mencionó, sugiriendo una deficiencia fisiológica del lote del genotipo WT empleado en esta tesis. Lo anterior pudo deberse a algún factor en las condiciones de crecimiento de los cultivos y no necesariamente por un efecto causado por la adición de MFZ. Sin embargo, el registro fotográfico de este callo no reveló ningún cambio fenotípico, y de hecho morfológicamente, sí se observó un aumento en el tamaño del callo, contrastando con la ausencia de ganancia de biomasa observada durante el muestreo. Es posible explicar este fenómeno por una pérdida de líquido de los cultivos WT, pero este pudo ser un factor relacionado con algún otro requerimiento no satisfecho para este genotipo.

Los cultivos de callo -WT incubados a 4 °C presentaron un incremento en la biomasa al día 28. Es probable que en el intervalo de tiempo no monitoreado en el muestreo de obtención de la curva de crecimiento de los callos haya habido un aumento sostenido de masa, pero esas determinaciones no se realizaron por lo que no es posible inferir un efecto determinante de la temperatura sobre los cultivos en el caos de este genotipo. Cabe señalar que *A. thaliana* es una especie pionera y adaptada a temperaturas templadas. El intervalo de 29 días posteriores, correspondiente a los días 28 a 56, y en el que se observó una estrepitosa caída en la proliferación del callo, sugiere que ante una mayor exposición del cultivo a 4° C, los mecanismos de adaptación no fueron suficientes para prolongar la adaptación del cultivo, si bien fenotípicamente, no hubo cambios en la coloración, tampoco fue posible determinar un aumento en el volumen del callo, pero el callo se vio saludable.

Con respecto a la incubación de los callos del genotipo -HP a 25 °C, se observó un sustancial incremento en la biomasa, mientras que el resultado del cultivo expuesto a MFZ, resultó en una proliferación sostenida pero menor y mantenida por debajo de los valores presentados en los cultivos de callo no expuestos a MFZ. La proliferación del cultivo de callo HP a 25 °C a los tiempos largos de exposición a MFZ fue la esperada, ya que hubo una menor ganancia de biomasa con respecto al control. Esta proliferación no fue de cero, pues en este caso, se usó una concentración menor del inductor. Sin embargo, es necesario hacer hincapié en el registro fenotípico, ya que la MFZ afectó la morfología del callo presentando oxidación al igual que el medio de cultivo en comparación con el fenotipo del callo no expuesto a MFZ, que sí presentó un aumento en su volumen y masa. Esto sugiere que la condición de un silenciamiento de menor intensidad se manifestó principalmente en las características morfológicas.

En cuanto a los cultivos del genotipo mutante HP incubados a 4 °C tanto expuestos como no expuestos a MFZ, se observó un crecimiento lento y muy bajo por no más de 56 días y que fue el mismo en ambas condiciones. Fenotípicamente el efecto destacable es la ausencia de oxidación en ambas condiciones, lo cual no sucedió en los cultivos de 25 °C. Con base en lo observado, es necesario hacer referencia al trabajo a la investigación realizada por Gutiérrez-Angoa (2016), en donde la respuesta fenotípica se vio retardada en plántulas inducidas al silenciamiento del gen y aclimatadas a bajas temperaturas. Por lo tanto, la respuesta a 4 °C revela que el crecimiento se ve afectado en el genotipo HP con y sin MFZ, pero que además el silenciamiento también, por lo cual el crecimiento de +HP se comporta como el control.

En resumen, la estrategia experimental no permitió contestar la hipótesis planteada, ya que por una parte, las condiciones de crecimiento de los callos no fueron las óptimas y por otra parte, el silenciamiento a los 4 °C no se logró expresar y por tanto, no se pudo evaluar el efecto de la temperatura cuando hay una disminución de esfingolípidos endógenos por silenciamiento génico.

CONCLUSIONES

- El callo del genotipo silvestre se mantuvo viable pero no proliferó en el tiempo de cultivo estudiado.
- La metoxifenoza no tuvo ningún efecto en el crecimiento del callo del genotipo silvestre.
- El silenciamiento en el callo del genotipo HP a 25 °C produjo una disminución en su proliferación.
- A bajas temperaturas, los callos del genotipo HP con o sin silenciamiento disminuyeron su crecimiento.
- Las condiciones del bajo crecimiento del callo WT no permitieron tener una referencia adecuada para estudiar el efecto de la baja temperatura en el callo HP.

PERSPECTIVAS

- Es necesario afinar las condiciones de incubación del cultivo del genotipo WT para poder observar efectos de estrés por frío.
- Es necesario explorar concentraciones menores del inductor del silenciamiento, para permitir una viabilidad del callo HP que exprese solo una reducción pequeña de esfingolípidos y ver como ésta afecta el crecimiento del callo a baja temperatura.

REFERENCIAS

- **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2010).** Biología molecular de la célula. Ediciones Omega. Barcelona Pp. 617- 649.
- **Al-Shehbaz, I. and O'Kane, S. (2002).** Taxonomy and Phylogeny of Arabidopsis (Brassicaceae). The American Society of Plant Biologists. The Arabidopsis Book. Pp. 1-22.
- **Alvarez-Buya, E., Benitez, M., Corvera-Poire, A., Chaos, A., De Folter, S., De Buen, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Perez- Ruiz, R., Piñeyro-Nelson, A. and Sanchez-Corrales, Y. (2010).** Flower Development. The American Society of Plant Biologist. The Arabidopsis Book 8: 1-57.
- **Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2000).** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de Barcelona. Barcelona Pp. 1-11.
- **Bartke, N. and Hannun, Y. (2009).** Bioactive Sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research* 50: 91-96.
- **Berkla, B., Vera-Estrella, R. and Pantoja, O. (2014).** Growing Arabidopsis *In vitro*: Cell Suspensions, *In vitro* Culture, and Regeneration. En: *Arabidopsis Protocols*, Methods in Molecular Biology (Sanchez-Serrano, J. and Salinas, J. Eds) Pp. 53-62.
- **Cano-Ramírez, D. (2014).** Contribución de los Esfingolípidos a la Fluidez de la Membrana Plasmática de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría. Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- **Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowski, A. y Baudouin, E. (2011).** Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 189: 415-427.

- **Chen, M., Cahoon, E., Saucedo-García, M., Plasencia, J. and Gavilanes-Ruiz, M. (2009).** Plant Sphingolipids: Structure, Synthesis and Function. En: Lipids in Photosynthesis. Essential and Regulatory Functions (Wada, H. and Murata, N. Eds) Pp. 77-115.
- **Cortés, G. (1994).** Atlas Agropecuario De Costa Rica. Editorial Universidad estatal a distancia. Costa Rica Pp. 12.
- **Drews, G. and Koltunow A. (2011).** The Female Gametophyte. The American Society of Plant Biologists. The Arabidopsis Book 9: 1-24.
-
- **Dietrich, C., Han, G., Chen, M., Berg, H., Dunn, T. and Cahoon, E. (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., Zachowski, A., Baudouin, E. and Guillas, I. (2011).** Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and Arabidopsis response to chilling. *New Phytologist* 194: 181–191.
- **Espeving, T., Xu, C., Aamlid, T., DaCosta, M. y Huang, B. (2012).** Proteomic responses during cold acclimation in association with freezing tolerance of velvet bentgrass. *American Society For Horticultural Science* 137: 391–399.
- **Gliessman, S. (2002).** Agroecología: Procesos Ecológicos En Agricultura Sostenible. Turrialba. Costa Rica Pp. 64-66.
- **González, M., Mogollón, N., Alvarado, G., Giménez, A. y Capote, T. (2012).** Efecto del medio de cultivo *in vitro* y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento del cocuy (*Agave cocui* trelease). *Bioagro* 24: 39-44.
- **Gutierrez-Angoa, L. (2016).** Efecto de la aclimatación a frío en la regulación transcripcional de la serina palmitoiltransferasa de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de

Maestría. Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México Pp. 51-52.

- **Hoffmann, M. (2002).**Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.)Heynh. (Brassicaceae). *Plant Research* 29: 125-134.
- **Hopkins, W. (1995).**Introduction to Plant Physiology. John Wiley and Sons Inc. United States of America Pp. 431-435.
- **Jankiewicz, L. (2003).** Reguladores del Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas. Propiedades y Acción Vol.1. Ediciones Mundi Prensa, México.
- **Jouhet, J. (2013).** Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in Plant Science* 4: 494.
- **Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., and Darwell, J. (1995).** Molecular Cell Biology. Scientific American Books. United States of America Pp. 596-628.
- **Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. (2014).** Atlas de Histología Vegetal y Animal. La Célula. Versión virtual <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>
- **Nelson, D., y Cox, M. (2006).**Lehninger. Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona Pp. 787-829.
- **Ochando Sanchez, I. (2005).** Estudio de nuevos mutantes que alteran la actividad del meristemo y la polaridad adaxial-abaxial en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. División de Genética del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Pp. 16-25.
- **Ohlrogge, J. and Browse, J. (1995).** Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 957-970.

- **Moreau, J.J., Bessoule, S., Mongrand, E., Testet, P., Vincent, C., Cassagne C, (1995).** Lipid trafficking in plant cells. *Progress in Lipid Research*, 37: 371–391.
- **Pierce, B. (2009).** Genética, un enfoque conceptual. Editorial Médica Panamericana. España, 2009.
- **Food and Agriculture organization of the United Nations. (2008).** Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues, Italy.
- **Smith, R. (2013).** Plant Tissue Culture. 3rd Edition. Academic Press (Elsevier) United States of America Pp. 31- 40, 63-76.
- **Stryer, L. (1990).** Bioquímica. Reverte. España Pp. 553-560.
- **Taiz, L. y Zeiger, E. (2006).** Fisiología Vegetal. Universitat Jaume I Pp. 843, 1162-1172.
- **Tortora, G, Funke, B. y Case C. (2007).** Introducción a la Microbiología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Pp. 101-103.
- **Uemura, M., Joseph R., and Steponkus, P. (1995).** Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 109: 15-30.
- **Voet, D., Voet J. y Pratt, C. (2009).** Fundamentos de Bioquímica, la Vida a Nivel Molecular. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Pp. 233-278.
- **Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, B., Zhou, H., Rajashekar, C., Williams, T. and Wang, X. (2002).** Profiling membrane lipids in plant stress responses. role of phospholipase d in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 31994-32002.

- **Wilson, J. (1989).**Fundamentos de Fisiología Animal. Limusa. México Pp. 91-94.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

ANEXO

Tabla A1. Sales para elaborar medio conocido como MS (Murashige y Skoog, 1962) concentradas 100X.				
Nombre del compuesto	Fórmula	P.M (g)	Cantidades para 1L	
			Masa (mg)	Moles (Mm)
NITRATOS				
Nitrato de potasio	KNO ₃	101.108	1900	18.792
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.146	1650	20.615
SULFATOS				
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄	246.498	370	1.501
Sulfato de Manganeso	M _n SO ₄	169.01	16.9	0.0999
Sulfato de Zinc	Z _n SO ₄	287.54	8.6	0.0299
Sulfato de Cobre	Cu ₂ SO ₄	249.68	25X10 ⁻³	0.1X10 ⁻³
HALÓGENOS				
Cloruro de Calcio	CaCl ₂	147.02	170	2.993
Cloruro de Potasio	KCl	166.01	6.2	4.999
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂	237.93	25X10 ⁻³	0.105X10 ⁻³
FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO, MOLIBDENO				
Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄	138.02	170	1.249
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	61.68	6.2	0.1002
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄	241.95	250X10 ⁻³	1.03X10 ⁻³
QUELANTES				
Sulfato Ferroso	FeSO ₄	278.21	27.8	0.0999
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	372.3	37.3	0.1002

Tabla A2. Soluciones concentradas (100X) para elaborar Reguladores de Crecimiento			
Nombre del compuesto	Fórmula	P.M (g)	Cantidad para 100 ml (mg)
ácido naftalenacético (ANA)	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	186.2	10
ácido indol-3-acético (AIA)	C ₁₀ H ₉ NO ₂	225.26	10
ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221	10
6-bencilaminopurina (BA)	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225.3	10

Tabla A3. Soluciones concentradas (100X) para elaborar el cocktail de vitaminas conocido como R2				
Nombre del compuesto	Fórmula	P.M (g)	Cantidades para 1L	
			Masa (mg)	Moles (Mm)
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	100	0.555
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	0.5	4.062
PiridoxinaHCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	205.6	0.5	2.432
Tiamina HCl	C ₈ H ₁₇ N ₄ OSCl.HCl	337.3	1	2.95

Tabla A4. Soluciones concentradas (100X) para elaborar Glicina			
Nombre del compuesto	Fórmula	P.M (g)	Cantidades para 100 ml (mg)
Ácido amonoacético (glicina)	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	20