



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Caracterización de la respuesta de la raíz de diferentes ecotipos de  
*Arabidopsis thaliana* a condiciones de estrés osmótico.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Bióloga**

PRESENTA:

**VANESSA ABIGAIL ROMERO YAHUITL**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. ADRIANA GARAY ARROYO**



**CIUDAD UIVERSITARIA CD. MX. 2018**



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.

## Hoja de datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre(s)  
Teléfono  
Universidad

### 1. Datos del alumno

Romero  
Yahuitl  
Vanessa Abigail  
5510213237  
Universidad Nacional Autónoma de México

### 2. Datos del tutor

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 2. Datos del tutor

Dra.  
Adriana  
Garay  
Arroyo

### 3. Datos del sinodal 1

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
María De La Paz  
Sánchez  
Jiménez

### 4. Datos del sinodal 2

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Ulises Yunuén  
Rosas  
López

### 5. Datos del sinodal 3

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 5. Datos del sinodal 3

Dra  
María del Rocío  
Cruz  
Ortega

### 6. Datos del sinodal 4

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Octavio  
Gonzalez  
Caballero

### 7. Datos del trabajo escrito

Título

Número de páginas  
Año

### 7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de la respuesta de la raíz de diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* a condiciones de estrés osmótico.  
89 pp  
2018

## **Agradecimientos académicos.**

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas; Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Adriana Garay Arroyo.

La investigación realizada fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN203214-3; IN211516 y IN203814, la beca de Licenciatura/Titulación proyecto IN211516 y de CONACyT: 240180 a cargo de las Doctoras Berenice García Ponce de León, Elena Álvarez-Buylla, María de la Paz Sánchez y Adriana Garay Arroyo a quienes les agradecemos su apoyo.

Se agradece a Riken BRC por las semillas de los ecotipos (Sg-2, y Bu-5) que son propagadas y cuidadas a través del proyecto nacional de Bio-recursos del MEXT, Japón.

También agradecemos al Dr. Vadim Pérez por su apoyo durante los estudios de microscopía confocal en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada CMN Siglo XXI del IMSS, al técnico Gerardo Rodríguez Tapia, por su ayuda con la obtención de información climática proveniente de diversas bases de datos y herramientas SIG, a la M en C. Estephania Zluhan Martínez por su ayuda con la ejecución y adecuación de protocolos para las técnicas experimentales empleadas en este proyecto, a la Bióloga Wendy Cajero Sánchez por proporcionar las medidas de potencial osmótico de los medios de cultivo, a Laura Rodríguez y la Dra Teresa Romero, por la preparación de material de laboratorio y su auxilio en dudas técnicas durante el desarrollo de este trabajo.

Finalmente agradezco a los miembros de mi jurado de tesis, la Dra María de La Paz Sánchez Jiménez, el Dr. Ulises Yunuén Rosas López, la Dra María del Rocío Cruz Ortega y el M. en C. Octavio Gonzalez Caballero, por darme valiosos comentarios y hacerme cuestionamientos importantes para mejorar este trabajo.

## **Agradecimientos personales.**

A mi mamá, la mujer más hermosa del mundo, por ser mi compañera, mi mejor amiga y mi más grande inspiración para luchar por mis sueños, a mi querido papá, que me ha apoyado incondicionalmente y sin reservas con la única intención de verme feliz, a mi hermana Tania, por esos ratos de risas incontrolables, porque tal vez sin darse cuenta me ha inspirado a ser mejor persona cada día, a mi tía Nancy, que siempre está para mí cuando la necesito, a mis dos abuelitas, pues es una verdadera fortuna tenerlas a mi lado para compartir uno de mis primeros logros académicos con ustedes y a Broly que se ha desvelado a mi lado innumerables veces (aunque no pueda leer esto).

Mi hermosa familia, a ustedes les debo todo lo que soy ahora, los amo.

A mi tutora, la Dra Adriana Garay, por confiar en mí y apoyarme siempre, enseñándome con su ejemplo el valor de la paciencia y la perseverancia en la investigación.

A mis compañeros del laboratorio, por hacer de mi estancia en el laboratorio una de las experiencias más bonitas que he tenido, en especial al Team Adriana: Natalia, Esteph y Wendy, por brindarme su amistad y estar siempre disponibles para ayudar, de ustedes aprendí lo que es ser un verdadero equipo.

A los amigos que hice durante la carrera, que confían en mis capacidades incluso más que yo misma, aquellos que se alegran sinceramente de mis logros, gracias por estar conmigo.

Así que este no es un logro local de los últimos dos años de mi vida, son veinticuatro mil palabras, una etapa concluida, cientos de posibilidades, tres pasiones descubiertas, una ausencia que vale por mil compañías, dos lugares favoritos, mil setecientas canciones, un hermano más cerca que nunca, y cinco años de lecciones bajo el cobijo de una maravillosa universidad, por lo tanto, también quiero agradecer a mis profesores de la carrera que hicieron su labor con tanto amor, que sembraron en mí la chispa de la curiosidad y la emoción por entrar al mundo de la investigación.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1.1. <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> COMO MODELO DE ESTUDIO, SU ORIGEN Y DIVERSIFICACIÓN EN EL MUNDO. ....	7
1.2. VARIACIÓN NATURAL EN <i>ARABIDOPSIS</i> . ....	9
1.3. CONCEPTO DE ECOTIPO.....	10
1.4. VARIACIÓN GENÉTICA.....	10
1.5. LA RAÍZ COMO PRINCIPAL ÓRGANO DE ABSORCIÓN.....	12
1.6. CARACTERÍSTICAS DE LA RAÍZ, TIPOS CELULARES, REGIONALIZACIÓN EN DOMINIOS Y ZONAS DE CRECIMIENTO.....	12
1.7. PLASTICIDAD FENOTÍPICA DE LA RAÍZ ANTE DIFERENTES CONDICIONES AMBIENTALES. ....	15
1.8. HOMEOSTASIS Y OSMOREGULACIÓN COMO PROPIEDADES ESENCIALES DE LOS SISTEMAS VIVOS. ....	16
1.9. EFECTO DEL ESTRÉS OSMÓTICO EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS .....	17
1.10. ALGUNOS GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS UTILIZADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN.....	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y TRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS .....	27
5.2. MEDIO DE CULTIVO.....	27
5.3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	28
5.4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO.....	28
5.5. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LA RAÍZ A 1 DÍA DE ESTRÉS .....	28
5.6. TINCIÓN Y FIJACIÓN DE MUESTRAS .....	29
5.7. ANÁLISIS DE MICROSCOPIA .....	30
5.8. ANÁLISIS DE PCR TIEMPO REAL CUANTITATIVA .....	30
5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	31
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
6.1. SELECCIÓN DE ECOTIPOS A UTILIZAR .....	33
6.2. CONDICIONES AMBIENTALES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS 5 ECOTIPOS. ....	39
6.3. RESPUESTA DE LA RAÍZ EN CONDICIONES CONTROL .....	42
6.4. RESPUESTA DE LA RAÍZ ANTE ESTRÉS POR MANITOL.....	47
6.4.1. RESPUESTA DE LA RAÍZ A NIVEL MICROSCÓPICO.....	49
6.4.2. ANÁLISIS DE MICROSCOPIA CONFOCAL .....	55
6.5. RESPUESTA DE LA RAÍZ ANTE ESTRÉS POR NaCl .....	58
6.6. ANÁLISIS DE LOS 3 TRATAMIENTOS PARA CADA ECOTIPO.....	65
6.7. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA POR qPCR. ....	72
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>83</b>

## 1. RESUMEN

Los seres vivos están sujetos a diversas condiciones ambientales durante su desarrollo, que interactúan de manera compleja con variables internas del organismo, como factores genéticos, epigenéticos y restricciones físicas (Dávila y Álvarez., 2015), generando diferentes fenotipos en las poblaciones.

Estas variaciones fenotípicas a nivel morfológico, fisiológico y molecular le han permitido a los organismos responder adecuadamente ante las adversidades ambientales y de esta manera colonizar nuevos hábitats, dado el carácter sésil de las plantas, estas tienen sofisticados mecanismos para contender ante climas hostiles, como el estrés osmótico, cambios en el fotoperiodo, temperatura, entre otros (Mitchell Olds *et al.*, 2006 y 2007, Trontin *et al.*, 2011).

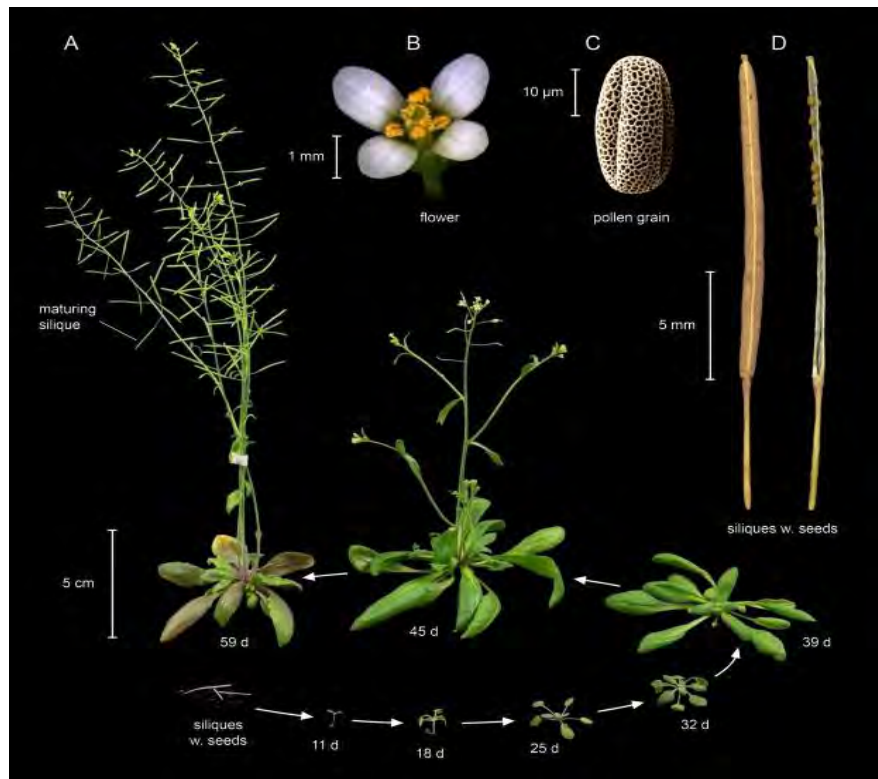
Los resultados de este estudio contribuyen a explorar la diversidad en las respuestas fenotípicas, a tanto macroscópicas, como microscópicas y genéticas de la raíz de algunos ecotipos de la especie *Arabidopsis thaliana*, colectados en diferentes partes del mundo, sometidos a condiciones de estrés osmótico y nos da un acercamiento a la naturaleza compleja de los mecanismos que regulan la tolerancia o sensibilidad del sistema radicular ante un estrés determinado.

# 1. Introducción

## 1.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio, su origen y diversificación en el mundo.

*Arabidopsis thaliana* es una planta anual de la familia de las Brassicaceae, descrita por Johannes Thal en 1577. En la actualidad se encuentra ampliamente estudiada por diversas disciplinas de la biología, como la genética, la biología molecular y celular, la fisiología, la ecología, la epigenética y la biología del desarrollo. Esto se debe a que se ha convertido en un modelo de estudio de plantas por presentar diferentes características como son: tiempo de vida corto, que tarda aproximadamente, 80 días en concluir (Figura 1), es una planta pequeña que permite que se cultive una gran cantidad de las mismas en espacios pequeños y a que puede autofecundarse, lo cual permite la conservación de líneas puras. Por otro lado, se pueden hacer cruces ya que es fácil emascularla y polinizarla con cualquier otra planta. Además, el genoma de esta planta está totalmente secuenciado desde el año 2000 (Somerville & Koornneef, 2002) y otra de las grandes ventajas de trabajar con *Arabidopsis* es que es posible conseguir semillas de todos los ecotipos disponibles en diferentes bancos de semillas, así como de las mutantes en casi todos los genes del ecotipo Columbia-0 (Col-0 de ahora en adelante) que es el más estudiado. Finalmente, el genoma de esta planta modelo es uno de los más pequeños en el mundo vegetal, mide apenas 125Mb, lo que equivale a aproximadamente 20 veces el genoma de *Escherichia coli* y 10 veces el de *Saccharomyces cerevisiae* (Marsch y Folter, 2010).





**Figura 1.** Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) en diferentes estados de desarrollo desde la planta adulta a los 59 días (A) y en estado vegetativo a los 39 días (A). (B) Flor hermafrodita de *Arabidopsis*, (C) Grano de polen y (D) Vainas de semillas maduras, una cerrada y otra abierta (tomado de Krämer, 2015).

Gracias a toda esta información y a las tecnologías de análisis genético y molecular, se han logrado enormes avances en el entendimiento de algunos mecanismos moleculares, celulares y de desarrollo en *Arabidopsis*, que se conservan en diferentes plantas bajo diferentes condiciones de crecimiento. Sin embargo, a pesar de contar con todas las facilidades de trabajar con esta especie biológica, es difícil establecer una relación clara y directa entre el genotipo y los fenotipos observados, puesto que estos últimos son resultado de la interacción de mecanismos complejos durante el desarrollo de los organismos vivos, no solo de la información contenida en el genoma (Dávila y Álvarez, 2015), por lo que es necesario seguir realizando estudios sobre la evolución de su desarrollo. Una manera de aproximarnos a entender las respuestas y adaptaciones de *Arabidopsis* a diferentes

condiciones ambientales, es usando la variación natural de esta especie que se encuentra en los diferentes ecotipos.

## **1.2. Variación natural en Arabidopsis.**

Arabidopsis es una especie originaria de Eurasia, aunque se desconoce su lugar exacto de origen; sin embargo, algunos autores sugieren que el centro de diversificación de Arabidopsis está en el sur de Suecia. Esto lo postulan basándose en estudios sobre los patrones de diversificación del genoma, que muestran que la diversidad decrece hacia el sur del país y hacia el norte de Rusia (Alonso-Blanco *et al.*, 2016). Esta planta vive en una gran variedad de hábitats, como son islas, laderas de montañas a gran altitud, bosques templados antiguos, meandros de ríos, incluso zonas semidesérticas y zonas agrícolas (Mitchell-Olds y Schmitt, 2006).

Las condiciones ambientales donde habitan las poblaciones de esta especie, han influido activamente en su historia de vida, tanto la precipitación, la humedad relativa y la temperatura de la localidad donde fueron colectadas, tienen un papel preponderante en las respuestas y los fenotipos que presenta cada población ante un estrés hídrico y uno osmótico. Estos factores ambientales afectan especialmente el crecimiento de la raíz, ya que este órgano está sujeto constantemente a cambios en la disponibilidad de agua, por lo que decidimos buscar la información sobre estos parámetros ambientales en los sitios de colecta de algunas poblaciones alrededor del mundo.

Arabidopsis presenta una interesante historia biogeográfica, se sabe que es una mezcla compleja de supervivientes de múltiples refugios glaciares y durante el holoceno, su distribución fue influida de manera considerable por la actividad humana. Esta especie muestra un patrón de distribución de menor diversidad en gradientes longitudinales que en gradientes latitudinales, es decir, su distribución geográfica ha sido más eficiente a lo largo del eje este-oeste (Francois *et al.*, 2008), lo que indica que es una especie limitada por las temperaturas y la cantidad de luz solar que reciben las latitudes donde se distribuye.

Se han reportado más de 7000 accesiones de Arabidopsis colectadas alrededor del mundo, y se han secuenciado alrededor de 1000; esta información, se encuentra disponible

en las bases de datos conocidas como “1001 Genomes”(http://1001genomes.org/) y “TAIR”( https://www.arabidopsis.org/)

### **1.3. Concepto de Ecotipo.**

El concepto de ecotipo se desarrolló en 1922 por Turesson, y se refería a la unidad ecológica producto del resultado de la respuesta genotípica de una población a un hábitat particular, mediante evidencia fisiológica, morfológica o ecológica. Sin embargo, actualmente se denomina ecotipo a una subpoblación de una especie que se caracteriza por estar adaptada a un ecosistema bien definido; esto quiere decir, que desarrolla características fenotípicas o fisiológicas específicas producto de las presiones de selección del ambiente en el cual se desarrolla. Los ecotipos son parte de una misma especie ya que es posible obtener cruces entre los mismos que tengan descendencia fértil. Específicamente, en el caso de Arabidopsis, los ecotipos son líneas endogámicas que presentan claras diferencias fenotípicas. En sentido estricto, a los ecotipos de Arabidopsis se les debería de llamar accesiones que se definen como poblaciones con claras diferencias fenotípicas que pueden estar separadas por varios kilómetros o por tan solo unos metros (y no necesariamente estar adaptadas a un ambiente como en el caso de los ecotipos). Sin embargo, y para fines de comparación con lo reportado en la literatura, se denominarán ecotipos en este trabajo a las accesiones de Arabidopsis.

Los análisis llevados a cabo con ecotipos nos permiten tener variantes naturales con adaptaciones específicas a diferentes condiciones ambientales, lo cual nos abre la posibilidad de estudiar la variación adaptativa de las poblaciones vegetales y estudiar como la variación genética se traduce en variación fenotípica.

### **1.4. Variación genética**

Los cambios en el material genético de una población o una especie, se generan principalmente por dos vías, por mutaciones espontáneas que escapan a los mecanismos de reparación del genoma durante los eventos de replicación y reparación, y por recombinaciones genéticas vía sexual. En Arabidopsis, la tasa de recombinación es apenas de 0.3%, ya que se reproduce principalmente mediante autopolinización, lo que provoca

que la variación genética de las poblaciones de esta especie se de principalmente mediante mutaciones en el genoma. (Horton *et al.*, 2012)

Las mutaciones en el material genético se generan a diferentes frecuencias dependiendo de las región en el cromosoma en donde se encuentre el material genético y se sabe que hay genomas que tienen zonas con mayor propensión a tener mutaciones (a estas zonas se les denomina “hotspots”) (Lichten and Goldman, 1995). En *Arabidopsis*, estos “hotspots” se encuentran en abundancia en transposones, pseudogenes, en el DNA intergénico y en los loci involucrados tanto en la autoincompatibilidad reproductiva (Locus S) como en la resistencia al daño (Horton *et al.*, 2012).

De manera interesante, se especula que la autopolinización que es predominante en *Arabidopsis thaliana*, probablemente surgió como resultado de los polimorfismos acumulados en los ecotipos del Locus S a lo largo de la historia evolutiva de esta especie, ya que es importante en la auto incompatibilidad. Se sabe que a partir de un ancestro de polinización cruzada, se diversificaron *A.thaliana* y *A.lyratha* (su especie hermana de polinización cruzada) hace aproximadamente 5 millones de años (Tang et al., 2007). Es muy interesante que, a pesar del tiempo que ha transcurrido desde la divergencia de estas dos especies, es posible restaurar la capacidad de autoincompatibilidad de *Arabidopsis thaliana* insertando el Locus S de *A. lyratha* en su genoma (Charleswroth y Verkemans, 2005).

A pesar de que la autopolinización reduce el flujo génico y puede conducir a un proceso de depresión endogámica, tiene efectos positivos en la colonización de nuevos territorios por no requerir de un polinizador con especificidad ecológica para que la planta pueda reproducirse y dispersarse. Este tipo de reproducción se ha asociado históricamente a especies invasoras también llamadas malas hierbas, debido a que invaden terrenos de cultivo rápidamente y, gracias a su alta competitividad, comprometen el desempeño del cultivo (Tang *et al.*, 2007).

En el genoma de los diferentes ecotipos de *Arabidopsis* podemos encontrar una gran cantidad de polimorfismos de nucleótidos, ubicados de manera diferencial a lo largo de todo el genoma. Estas variaciones naturales a nivel genético que se encuentran aisladas entre poblaciones que comparten los mismos polimorfismos, representan adaptaciones a diferentes condiciones ambientales (Mitchell-Olds y Schmidt 2006). Debido a lo anterior

se dice que las secuencias polimórficas nos dan evidencia de la expansión histórica de las poblaciones de *Arabidopsis* (Nordborg *et al.*, 2005, Schmid *et al.*, 2005).

### **1.5. La raíz como principal órgano de absorción**

La raíz representa una de las adaptaciones más importantes de las plantas terrestres para la supervivencia ya que cumple con las funciones de absorción de nutrientes, soporte de la planta y absorción de agua a pesar de que esto último también lo pueden llevar a cabo los estomas y las lenticelas. El sistema radical es sumamente plástico y tiene la capacidad de modificarse cuando responde a las diferentes condiciones ambientales, como son la temperatura del suelo, la cantidad de agua disponible en el sustrato, la interacción con microorganismos y la disponibilidad de nutrientes, entre otros. Por este motivo, la raíz de las plantas es altamente sensible a las perturbaciones ambientales y es un órgano de respuesta inmediata a variaciones climáticas y a la disponibilidad de agua. (Rasheed *et al.*, 2016)

### **1.6. Características de la raíz, tipos celulares, regionalización en dominios y zonas de crecimiento.**

La raíz es un órgano transparente y fácil de usar para el seguimiento de estudios cuantitativos porque nos permite observar células de un tipo específico en diferentes estados de desarrollo a lo largo del eje longitudinal y dar seguimiento a los diferentes patrones de proliferación y diferenciación celular durante el ciclo de vida de la planta (Taiz y Zeiger., 2006). Específicamente, el sistema radical de *Arabidopsis* se ha convertido en un excelente modelo de estudio, debido a que solo posee una capa de células por tipo celular en contraste con lo que sucede con *A. halleri*, que tiene dos capas adicionales por capa de células especializadas (De Lucas and Brady 2013; Hanikenne *et al.*, 2008); además, *A. thaliana* no tiene meristemas axilares rodeando al RAM (por sus siglas en inglés Root Apical Meristem). Estas dos características hacen que, la raíz de *A. thaliana* sea un modelo de estudio muy simple, en donde se reduce la complejidad del órgano de estudio y se facilita el análisis de las líneas celulares de la raíz a nivel microscópico.

La raíz se compone de 4 regiones claramente identificables en su eje longitudinal: La columela y la cofia lateral, el RAM, la zona de elongación y la zona de maduración celular (Figura 2). La cofia lateral y la columela forman una capa de tejido diferenciado que recubre al RAM protegiéndolo de los daños mecánicos provocados por las partículas del suelo cuando la raíz va creciendo; esta estructura es algunas veces llamada caliptra. Las células que conforman la columela tienen la capacidad de percibir estímulos gravitrópicos y secretar mucopolisacáridos para facilitar el deslizamiento de las raíces en el suelo (Taiz y Zeiger., 2006).

El RAM de la raíz primaria consta de dos dominios celulares: El dominio de proliferación que está en la punta de la raíz y se compone de células en constante división y el dominio de transición que tiene pocas células en división, ya que tiene un alargamiento importante de las mismas. En la parte central del dominio de proliferación, se localiza el Nicho de Células Troncales (NCT) con un centro organizador, que se llama centro quiescente (QC) que está rodeado de 4 grupos de células iniciales. El CQ consta de cuatro células y tiene una tasa de proliferación cercana a 0, tiene la mayor concentración de auxinas y se ha demostrado que es el encargado de mantener a las células iniciales indiferenciadas. Las células iniciales que rodean al CQ tienen una tasa de proliferación un poco más alta y es a partir de estas células que se originan los diferentes tipos celulares que componen la raíz.

Las células iniciales de los diferentes tejidos de raíz se dividen periclinalmente<sup>1</sup>, dos de ellas, además, tienen otra división anticlinal<sup>2</sup>, las que dan lugar a las células del córtex y la endodermis y las que originan a la epidermis y a la cofia lateral. Los otros dos tipos de células iniciales, que sólo se dividen periclinalmente, dan lugar a la columela y al tejido vascular. A medida que las células se dividen desde el nicho de células troncales, se van recorriendo hacia la parte distal del ápice de la raíz y entran en el dominio de proliferación donde es máxima la tasa de proliferación. Esta capacidad de dividirse, va disminuyendo de acuerdo al gradiente de concentración de auxinas (Friml 2003) en conjunto con variaciones

---

<sup>1</sup> Las divisiones periclinales dan origen a células hijas de Norte a Sur, como si estuvieran en un plano cartesiano. (Barlow et al., 2002)

<sup>2</sup> Una división en un plano anticlinal da lugar a células hijas en dirección Este- Oeste (Barlow et al., 2002)

en el cambio de estado o abundancia de factores químicos y físicos que rigen las tasas de proliferación celular (Barrio *et al.*, 2013)

Hacia arriba del dominio de proliferación se encuentra el dominio de transición que es el sitio en donde las células adquieren capacidades fisiológicas necesarias para entrar a la zona de elongación; esta zona se compone de entre 10 y 15 células que se dividen poco y comienzan a alargarse, aumentando su tamaño de, aproximadamente, 8.5 $\mu$ m a 35  $\mu$ m. Después del dominio de transición se encuentra la zona de elongación que es en donde las células tienen duplicación del ADN pero no división celular; a este proceso genético se le llama endoreduplicación o endociclo y este comportamiento celular normalmente ocurre en tejido diferenciado. En esta zona las células se elongan aceleradamente antes de pasar a un estado diferenciado en donde las células adquieren sus características finales; a esta última zona se le conoce como zona de maduración y es fácilmente identificable porque las células de la epidermis desarrollan el primer pelo radicular (Figura 2).

Haciendo un corte transversal de la raíz primaria, podemos observar que se trata de un cilindro organizado en 4 capas concéntricas de células, en la capa exterior encontramos la epidermis, después se encuentra el córtex, le sigue la endodermis y justo en el centro se encuentra el tejido vascular, rodeado de las células del periciclo, que son las células donde se originan las raíces laterales.

En la morfogénesis y el desarrollo del sistema radicular, existe una regulación constante entre los procesos ligados de proliferación y de diferenciación celular. Estos dos procesos, que son los que permiten el desarrollo de cualquier órgano, son interdependientes; es decir, las células que se alargan provienen de la zona meristemática y la zona meristemática depende de que las células se desplacen a la zona de alargamiento para poder seguir produciendo más células. Además, la proliferación y diferenciación celular están afectados por factores externos e internos como son los gradientes de concentraciones hormonales, diferentes estímulos ambientales y algunos factores físicos como la expansión y la contracción celular; éstos últimos dos factores dependen de los procesos de turgencia, de las diferentes etapas de desarrollo de la planta y de la cantidad de agua disponible en el medio y dentro del tejido radical. (López-Bucio *et al.* 2003)

## **1.7. Plasticidad fenotípica de la raíz ante diferentes condiciones ambientales.**

La plasticidad fenotípica es la función que describe la producción de diferentes fenotipos a partir de un mismo genotipo cuando éste se expone ante diferentes condiciones ambientales. Esta plasticidad puede ser a nivel fisiológico o morfológico y puede tener diferente magnitud (Núñez-Farfán *et al.*, 2004). Se ha visto que la relación genotipo y fenotipo no se establece de manera lineal debido a que éstos últimos dependen de la interacción de redes de regulación genética que se modifican por diferentes factores ambientales y de desarrollo. (Dávila y Álvarez., 2015) Por lo anterior, podemos decir que la plasticidad fenotípica representa una modificación en el mapeo entre el genotipo y el fenotipo y que es uno de los sustratos sobre el cual actúa la selección natural, por ello es importante estudiarla.

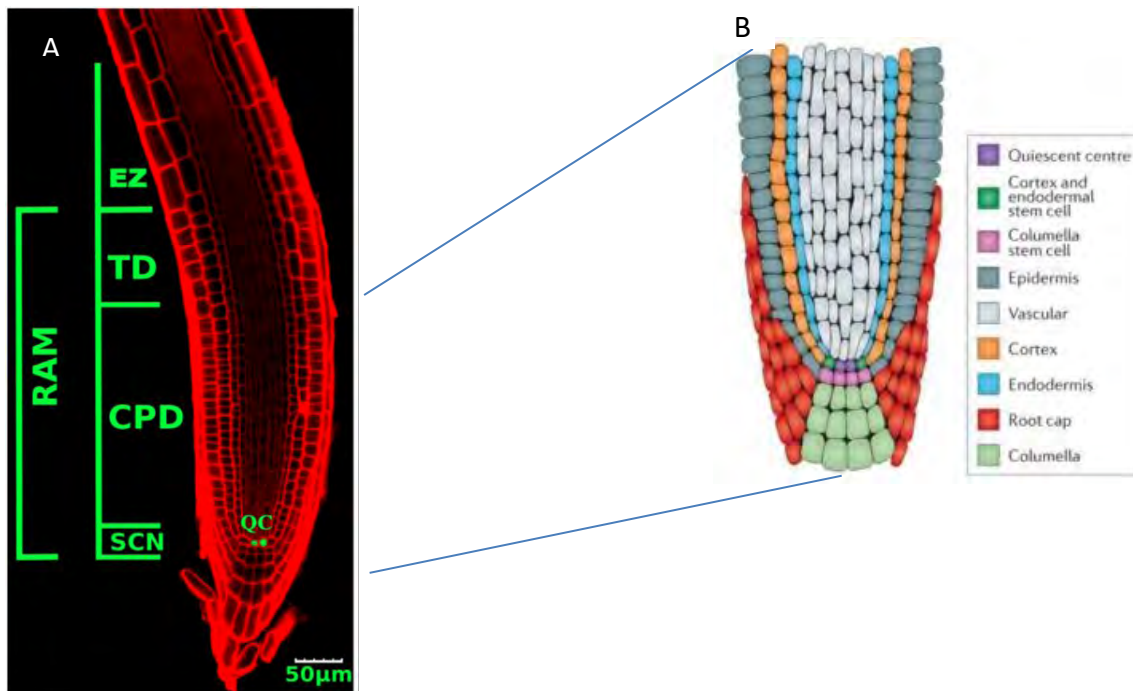
Para medir la plasticidad se puede realizar un análisis de normas de reacción en donde un mismo ecotipo es expuesto a diferentes condiciones ambientales y, además, se puede comparar la respuesta entre ecotipos. En el caso de los ecotipos de *Arabidopsis*, que son genotipos variables de una misma especie adaptados a diversas condiciones ambientales, podemos encontrar variaciones en la respuesta a la tolerancia a diferentes condiciones ambientales. Específicamente, nos interesó analizar la plasticidad y cómo se alteró el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* en condiciones de estrés osmótico y si esta respuesta provino de un proceso de selección en los diferentes ecotipos. De ser cierto esto último, esperaríamos que aquellos ecotipos originarios de ambientes con déficit hídrico tuvieran mayor tolerancia a una condición de estrés osmótico. Finalmente, queremos entender si la amplitud de la variabilidad fenotípica, ha sido un rasgo importante para la tolerancia a ambientes con baja disponibilidad de agua.



## 1.8. Homeostasis y osmoregulación como propiedades esenciales de los sistemas vivos.

Los organismos vivos, son estructuras disipativas termodinámicamente abiertas, que intercambian materia, energía e información con el ambiente externo (Prigogine y Kondepudi 1998). Este intercambio bidireccional provoca la necesidad de una regulación de las condiciones internas respecto a las externas por parte del sistema vivo, para economizar la mayor energía posible, a esta regulación la conocemos como homeostasis. Los mecanismos homeostáticos se encargan de autorregular las condiciones internas del organismo con respecto a los cambios ambientales, alterando la regulación de temperatura, las concentraciones de iones dentro de las células, la presión, entre otras

La osmoregulación es el mecanismo homeostático encargado de mantener un equilibrio entre la cantidad de solutos internos del organismo y los solutos contenidos en el ambiente. Debido a que los solutos se encuentran disueltos en el agua, una manera de equilibrar los potenciales osmóticos es mediante el movimiento del agua de la siguiente manera: el flujo



**Figura 2.** A) Dominios de la raíz de *Arabidopsis* (Barrio et al., 2013) en donde se observa el RAM compuesto de 2 dominios: el dominio de proliferación (CPD) en donde se encuentra el nicho de células troncales y el dominio de transición (TD). Arriba del RAM se localiza la zona de elongación (EZ) en donde las células tienen un crecimiento exponencial. B) Organización celular del meristemo de *Arabidopsis* en donde se pueden ver los diferentes tipos celulares y únicamente dos grupos de células iniciales (Sparcks et al 2013).

de agua se mueve en un gradiente positivo referente a la concentración de solutos; es decir, de la zona de menor concentración de solutos hacia la zona de mayor concentración. De modo que cuando una célula se encuentra en una solución hipotónica<sup>3</sup> la célula absorbe agua para equilibrar la concentración de solutos y, cuando una célula se encuentra en una solución hipertónica<sup>4</sup> el agua del citosol se mueve hacia afuera, para equilibrar la cantidad de solutos disueltos en el exterior.

Un cambio abrupto en las condiciones de disponibilidad de agua en el medio donde se desarrollan las plantas, provocado por alta salinidad en el suelo y baja precipitación o congelamiento, puede provocar alteraciones en las condiciones fisiológicas que tienden a alterar el equilibrio osmótico de la planta, provocando una situación de estrés hídrico.

### **1.9. Efecto del estrés osmótico en el desarrollo de las plantas**

Una condición de estrés se genera cuando los cambios ambientales provocan una alteración en el equilibrio homeostático, que resulta en un impacto en el crecimiento y en la biomasa de un organismo (Shao *et al.* 2008) y se ha visto que la sequía es el factor que más afecta el crecimiento y la productividad de las plantas. Sin embargo, algunas plantas superiores han desarrollado mecanismos de tolerancia tanto morfológicos como fisiológicos ante el estrés osmótico provocado por la sequía o déficit hídrico; estas respuestas dependen de la duración, de la intensidad del estrés y del momento del desarrollo en el cual ocurren. A nivel morfológico, ante una condición en donde baja la disponibilidad del agua, ocurre una pérdida de turgor en las células de toda la planta y, ante la baja presión de turgencia, se suprime la elongación celular (Hsiao 1973). En estas condiciones, la parte aérea, experimenta una reducción en el potencial hídrico de las hojas y disminuye la absorción de CO<sub>2</sub> debido a un cierre estomático lo que, trae como consecuencia, que baje la tasa fotosintética. Durante exposiciones prolongadas a una condición de sequía, la planta experimenta cambios en su biomasa y se altera la relación entre el crecimiento de la parte aérea y de la raíz de tal forma que, mientras que la raíz continúa su crecimiento, este disminuye en la parte aérea (Noctor *et al.*; 2003).

---

<sup>3</sup> Solución que tiene menor número de solutos en el ambiente exterior que en el interior celular.

<sup>4</sup> Solución que tiene mayor cantidad de solutos en el medio exterior que en el interior celular.

A nivel fisiológico, ante el déficit de agua, se produce síntesis de ácido abscísico (ABA) que tiene un papel activo en el cierre de los estomas (Wilkinson y Davies 2002) y que activa una gran cantidad de genes que son importantes para contender con este tipo de estrés, como los que se abordan en la siguiente sección de esta introducción. El ABA, es una hormona vegetal reguladora del crecimiento de brotes y raíces que, ante diferentes tipos de estrés ambiental, como frío, calor, sequía, y de manera especial en respuesta a alta salinidad en el suelo o a deshidratación, aumenta su concentración en los tejidos y regula una gran cantidad de genes que le permiten a la planta contender con ésta situación de estrés (Gomez *et al.*, 1988 y Hubbard *et al.*, 2010).

Por otro lado, a nivel bioquímico y como resultado del estrés por falta de agua, se generan especies reactivas de oxígeno (ERO) que, en ciertas concentraciones, son muy tóxicas y pueden dañar estructuras y biomoléculas importantes para las células como la membrana celular o el material genético. Al mismo tiempo, se incrementa significativamente la presencia de defensas de tipo enzimático y no enzimático, como pigmentos accesorios, para disminuir la abundancia de éstas ERO (Reddy *et al.*, 2004). Otra de las respuestas tempranas de las plantas para combatir el estrés osmótico es la acumulación y síntesis de solutos compatibles, u osmolitos, que pueden ser de naturaleza iónica, como el  $K^+$ , compuestos nitrogenados, como algunos aminoácidos (glicina, serina y glutamato) y, finalmente, azúcares como la sacarosa, los polioles, o el pinitol (Tamura *et al.*, 2003).

A nivel molecular, la respuesta a éste estrés ambiental es regulada por dos vías principales, las que son dependientes de la presencia de ABA, y las que son independientes de ésta. Para ayudar a la planta a contender contra ambientes desfavorables, la vía de ABA regula genes que ayudan a que se dé un ajuste osmótico, a que se retome el crecimiento de brotes y de la raíz, a la compartimentalización iónica y al cerrado o apertura de estomas (Versules *et al.*, 2006). Entre los genes que se regulan por ABA encontramos factores de transcripción, genes que codifican proteínas que ayudan a tolerar el estrés, como son las proteínas LEA (por sus siglas en inglés Late Embriogenesis Abundant), enzimas requeridas en la desintoxicación por acumulación de EROs y otras proteínas que funcionan en la transducción de señales como cinasas y fosfatasas.

## **1.10. Algunos genes implicados en la respuesta a estrés utilizados en esta investigación.**

A nivel transcripcional se han detectado dos grandes grupos de genes que se activan en respuesta a estrés abiótico, como cambio osmótico, sequía alta salinidad o frío; el primero de ellos protege directamente las estructuras celulares e implica la producción de sustancias osmoprotectoras como las proteínas LEA y los osmolitos compatibles, así como algunas chaperonas y algunas enzimas que se sintetizan en respuesta a la desecación. El segundo grupo está integrado principalmente por factores de transcripción que regulan la expresión genética y por otras proteínas que funcionan en la vía de transducción de señales, que incluyen cinasas y otras proteínas receptoras (Shinozaki *et al.*, 2007).

Con la idea de que las variaciones genéticas que se encuentran en los diferentes ecotipos se asocian con su adaptación a condiciones ambientales locales, en la siguiente sección, se darán las características de algunos genes que están involucrados en la respuesta tanto a estrés osmótico como a iónico y que se analizaron para ver sus niveles de expresión en el ecotipo Col-0, por ser de los principales involucrados en la respuesta a estos dos tipos de estrés.

- **LEA 4-5 (AT5G06760)**

Las proteínas LEA se caracterizan por ser proteínas intrínsecamente desordenadas ya que carecen total o parcialmente de una estructura tridimensional bien definida (Tompa, 2002). Son proteínas que poseen alto contenido de glicina y alto índice de hidrofiliidad por lo que las podemos clasificar como hidrofílicas (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). En plantas superiores, estas proteínas se acumulan en grandes cantidades durante la última etapa de la formación de la semilla (de ahí su nombre de LEA, Late Embryogénesis Abundant) y también en tejidos vegetativos durante situaciones de estrés hídrico. Se ha demostrado que estas proteínas forman parte importante de las respuestas adaptativas ante la escasez de agua en diferentes taxones procaríotas y eucariotas y que, dado su carácter hidrofílico, actúan como protectores de estructuras celulares y moléculas importantes, formando una capa de hidratación ante la pérdida de agua a nivel celular (Hoekstra *et al.*, 2001). Se ha visto que los genes que codifican para estas proteínas, se expresan en diversos tipos de

plantas superiores, en bacterias como *Bacillus subtilis* y *Deinococcus radiodurans*, en cianobacterias, en nematodos, rotíferos, entre otros (Goyal *et al.*, 2005, Stacy *et al.*, 1998). Es muy interesante que, haciendo un análisis en la página de los 1001 genomas, las proteínas LEA abordadas en este estudio presentan pocos polimorfismos, en secuencias codificantes dentro del genoma de todos los ecotipos registrados, pues los ecotipos más polimórficos presentan solo 4 modificaciones como máximo (<http://signal.salk.edu/atg1001/3.0/gebrowser.php>)

Esta proteína pertenece al grupo 4, de 9 grupos existentes en la clasificación de proteínas LEA de acuerdo a sus similitudes a nivel de secuencia genética (Battaglia *et al.*, 2008), las LEAs de este grupos son interesantes porque son las más diversas, pues los productos génicos difieren mucho en tamaño e índice de hidropatía (Hundertmark & Hinch, 2008), pero comparten una región amino-terminal conservada de 70 a 80 residuos de aminoácidos que probablemente se ordenan en una estructura de alfa hélice (Dure, 1993). Se ha estudiado la expresión de LEA4-5 en *Arabidopsis* y se vio altos niveles de acumulación durante la embriogénesis tardía, en semillas secas, en tejidos vegetativos sometidos a NaCl 150 y 200mM y ABA 100mM durante un tratamiento de 12 horas de exposición. Además, acumulación del transcrito es menor que la acumulación de la proteína lo que sugiere que la proteína es muy estable probablemente debido a una modificación postraduccional (Reyes *et al.*, 2010).

Finalmente, esta reportado que, cuando este gen esta sobreexpresado, no existe un mayor porcentaje de germinación bajo estrés osmótico y por ABA, pero si una mayor recuperación ante deshidratación por falta de riego en parte aérea tanto en hojas como en brotes florales y axilares (Reyes *et al.*, 2010).

- ***COR-15A (AT2G42540.2)***

*COR15A*, (Cold Regulated) es otro gen que codifica para una proteína tipo LEA que también se agrupa con las LEA del grupo 4 por poseer propiedades estructurales y funcionales relacionadas, a pesar de no presentar el dominio Pfam característico (Hundertmark & Hinch, 2008). El gen se induce por ABA exógeno y se sugiere que está implicado en la respuesta a estrés abiótico por frío y por sal; sin embargo, en condiciones de sequía su expresión no es significativamente diferente a la que presenta en condiciones control (Wilhem y Thomashow 1993). Además, se sabe que este gen está implicado en conferir tolerancia al estrés por congelamiento, en rangos de  $-4.5^{\circ}\text{C}$  a  $-7^{\circ}\text{C}$  en protoplastos aislados (Steponkus 1998). A pesar de que en esta investigación no analizamos el estrés por frío, es un tipo de estrés que disminuye la disponibilidad de agua, y como consecuencia, un aumento en la concentración de solutos intercelulares que provocan estrés osmótico en la planta, además hay estudios donde ha visto inducida la expresión de *COR15A* bajo condiciones de estrés osmótico a 300mM con Manitol y salino con 200Mm con NaCl

La proteína codificada por el gen *COR15A* tiene una masa de aproximadamente 9kDa y presenta un péptido de señal para su localización en cloroplasto (Nakayama *et al.*, 2007). *COR15a* y su homólogo *COR15b*, se caracterizan por tener una estructura desordenada en condiciones normales de crecimiento igual que el resto de las proteínas LEA. Sin embargo, se ha demostrado en estas dos proteínas que, ante situaciones de estrés, adquieren una configuración tridimensional en hélices alfa anfipáticas que protege las membranas celulares y que se pierde al volver al estado de hidratación (Navarro *et al.*, 2016). A pesar de que son desordenadas en condiciones óptimas de crecimiento, no lo son cuando la planta está sometida a un estrés hídrico lo cual podría generar que haya una fuerte presión de selección ante los cambios. Por otro lado, se ha visto que, esta proteína, también ayuda a estabilizar a los liposomas durante la congelación, previniendo la fusión de fosfolípidos ante la pérdida de turgencia por falta de agua (Hand *et al.*, 2011, Thalhammer *et al.*, 2014).

Finalmente, se ha reportado que la sobreexpresión de *COR15A*, mejora la tolerancia al frío y reduce la propensión de los fosfolípidos presentes en las membranas celulares (como la dioleilfosfatidiletanolamina) a transitar de su fase lamelar a su fase hexagonal. Esto evita

que se dañen las membranas celulares en las plantas que están creciendo en estrés por congelación, ya que aumenta la temperatura de transición estructural de estos fosfolípidos (Steponkus *et al.* 1998).

### ***AREB-1 (AT1G45249)***

Otro grupo de factores transcripcionales (FT) que participan en la respuesta a estrés mediados por ABA, son los de tipo bZIP, que pertenecen a la familia AREB. En *Arabidopsis* se encuentran más de 75 miembros divididos en 10 familias de acuerdo al proyecto REGIA (Regulatory Gene Initiative in *Arabidopsis*) y se ha demostrado que participan en la regulación de diferentes procesos celulares (Jakoby *et al.*, 2002). Algunos de estos FT se unen a elementos llamados ABRE (por sus siglas en inglés ABA Response Element) una vez que están fosforilados. La caja ABRE tiene una región conservada, llamada núcleo ACGT, que puede estar contenida en cajas de tipo A, C y G dependiendo de las bases de nucleótidos circundantes al núcleo ACGT (Fujita *et al.*, 2011). Las proteínas AREB tienen un dominio conservado con dos regiones importantes para interactuar con el DNA: la primera es de tipo básica con cerca de 16 residuos de aminoácidos. La segunda región del dominio, tiene 7 leucinas y otros aminoácidos hidrofóbicos que crean una hélice anfipática que le ayuda a interactuar con el DNA (Jakoby *et al.*, 2002).

Dentro del grupo de los FT AREB, el que es más inducido por sequía vía ABA, es AREB1, por lo que es interesante estudiarlo (Bensmihen *et al.*, 2002; Jakoby *et al.*, 2002; Kim *et al.* 2004). Este FT es también conocido con el nombre de *ABF2*, *Abscisic Acid Responsive Element-Binding Factor 2*, que se induce en raíces y tejidos vasculares de las hojas bajo condiciones de falta de agua y presencia de ABA (Fujita *et al.*, 2011). Se sabe que regula genes como *RD29B* (Uno *et al.*, 2000), genes tipo LEA (*AIL1*, *KIN2* y *RAB18*) donde *AIL1* (*ABA induced LEA*) es un gen tipo LEA inducible por ABA; *KIN2* (*Protein Kinase 2B*), que es un gen que codifica para una proteína cinasa inducible por estrés por frío y *RAB18* (*Responsive to ABA 18*) codifica para una proteína dehidrina que se expresa en respuesta al estrés por sequía (TAIR) y 4 genes reguladores implicados en la respuesta a estrés abiótico en *Arabidopsis*: *HIS1-3* (*Histone H1-3*), *AIA1* (*ABA induced AAA ATPase*), *GBF3* (*G box binding factor*) y *RD20* (*Responsive to desiccation 20*) (Fujita *et al.*, 2005). *HIS1-3* codifica para una histona que se expresa en respuesta a deshidratación y por

presencia de ABA; *AIA1* codifica para un gen ATPasa inducible por ABA; *GBF3* codifica para una proteína de unión bZIP que responde a ABA y, *RD20*, codifica para una proteína de unión a calcio y el gen es inducido por tratamiento con NaCl.

La sobreexpresión de *AREB1* da tolerancia a la desecación y sensibilidad a ABA y los mutantes de pérdida de función de *AREB1* presentan una mayor tolerancia a tratamiento con ABA exógeno y poca tolerancia bajo estrés por sequía (Fujita *et al.*, 2005).

- ***DREB26 (AT1G21910.1)***

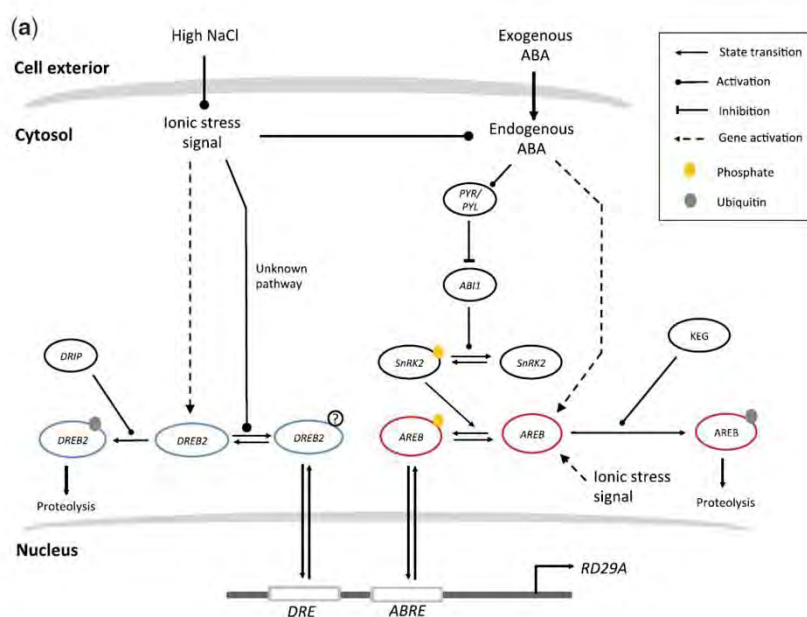
Otros de los FT que se inducen en condiciones de baja disponibilidad de agua, son los genes DREB, por sus siglas en inglés Dehydration Responsive Element Binding Factor. Estos FT pertenecen a la familia ERF/AP2 (Ethylene-Responsive Factor/APETALA2), se unen a una secuencia en el ADN conocida como caja DRE y requieren de ser activados post traduccionalmente para ser funcionales (Quin *et al.*, 2008; Sakuma *et al.*, 2006). Específicamente, el FT DREB26 se expresa en el núcleo y es regulado bajo estrés por sal y sequía y su expresión confiere tolerancia a estos dos tipos de estrés abiótico (Krishnaswamy *et al.*, 2010). Las líneas que sobre expresan este gen muestran un fenotipo de plantas deformadas en condiciones control; sin embargo, no presentan alteraciones en el fenotipo en condiciones de estrés por sequía y estrés salino (Krishnaswamy *et al.*, 2010). Además, es interesante que la proteína codificada por este gen se elimina por proteólisis dependiente de ubiquitinación por medio de las ubiquitin-ligasas DRIPs (DREB Interactin Protein) (Quin *et al.*, 2008) (Figura 3).

- ***RD29A (At5g52310)***

*RD29A (Responsive to Dehydration 29A)* es un gen inducido en varias especies de plantas como son, soya, arroz y Arabidopsis, en tratamientos de estrés por NaCl, frío, ABA exógeno y sequía (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1993). Este gen codifica para una proteína hidrofílica de 78kDa, que desafortunadamente no se ha podido caracterizar, pero se piensa que puede tener función en la respuesta ante diferentes tipos de estrés abiótico (Msanne *et al.*, 2011). Este gen presenta cajas ABRE así como DRE por lo que se piensa que también se regula por la vía independiente de ABA (Zimmermann *et al.*, 2004; Yamaguchi-



Shinozaki, 2000 y Nakashima *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha comprobado que los genes *RD29A* y *RD29B* se inducen por una vía que involucra cascadas de señalización de MAP kinasas (Hua *et al* 2006). Además, cuando la planta está creciendo en condiciones óptimas de crecimiento, la expresión de *RD29A* se reprime por medio del dominio AREB de las proteínas *KEG* (*Keep on going*) (Chen *et al* 2013) (Ver Figura 3). Cuando la planta se encuentra creciendo en condiciones favorables, se elimina la proteína codificada por este gen mediante proteólisis dependiente de ubiquitinación, por medio de ubiquitin-ligasas, como son las DRIPs para DREB2 (Quin *et al.*, 2008) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la vía de señalización vía DREB en respuesta a NaCl a la izquierda y vía AREB en respuesta a ABA a la derecha. El estrés por NaCl y por ABA exógeno activan la cantidad de DREB2 y a AREB2 por medio de dos rutas: i) una enzimática que modifica postraduccionalmente a estos dos factores de transcripción y ii) aumentando la expresión de los mismos. Además, tanto DREB2 como AREB, son proteínas sujetas a degradación por ubiquitinación dependiente de DRIP y KEG respectivamente. Tomado de Lee *et al.*, (2017).

## 2. Justificación

La tolerancia al estrés osmótico y al estrés iónico-osmótico, provocado por la carencia de agua y el exceso de sales en el suelo, representan dos de los grandes retos que la agricultura enfrenta en la actualidad. Entender las bases moleculares y genéticas que subyacen los mecanismos de resistencia a estrés osmótico o estrés salino de ciertas poblaciones de plantas es fundamental para poder avanzar en el entendimiento de la relación genotipo, ambiente y fenotipo y, eventualmente, para generar estrategias de tolerancia en diferentes plantas.

El trabajo presentado en este estudio se llevó a cabo en ecotipos de la planta de *Arabidopsis*, la planta modelo utilizada para hacer estudios de biología molecular y de evolución del desarrollo debido a que existen poblaciones naturales que se han adaptado a crecer bajo diferentes condiciones ambientales.

### Preguntas experimentales

¿Qué tanto influyen los factores ambientales en la respuesta de los ecotipos a condiciones de estrés osmótico?

¿Qué papel desempeñan algunos factores genéticos, de cada uno de los diferentes ecotipos, en la determinación de la respuesta a estrés osmótico?

## 3. Hipótesis

- Los ecotipos provenientes de sitios con menor precipitación y/o menor humedad relativa serán los menos afectados a nivel radicular por una situación de estrés osmótico
- Los ecotipos provenientes de lugares con características climáticas similares tendrán respuestas similares al mismo tipo de estrés.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

- Estudiar las diferentes estrategias de respuesta a estrés osmótico y estrés iónico-osmótico, que presentan las raíces de 5 ecotipos de *Arabidopsis thaliana*

#### **4.2.Objetivos particulares**

- Evaluar el crecimiento y el desarrollo de la raíz primaria de 5 ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, Cvi-0, Bu-5, Sha-1 y Sg-2) por medio de cinéticas de crecimiento en condiciones control y en condiciones de estrés osmótico.
- Analizar si existe una relación entre el ambiente de la zona de colecta de cada uno de los ecotipos en condiciones naturales (como la precipitación, la humedad relativa y la temperatura media) y ver si hay una relación con el crecimiento de la raíz primaria bajo condiciones de estrés osmótico.
- Analizar, mediante microscopía, el desarrollo de las células del córtex de la raíz primaria para determinar cómo se alteran las tasas de proliferación y diferenciación celular debido al estrés iónico y osmótico en cada uno de los cinco ecotipos.
- Medir la expresión genética de algunos de los factores involucrados en la tolerancia a estrés osmótico, en el ecotipo de referencia Col-0, y estudiar los polimorfismos de estos genes presentes en los ecotipos estudiados en este trabajo, en la base de datos de los 1001 genomas de *Arabidopsis*.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Material biológico y tratamiento de las semillas**

Para la realización de esta investigación se utilizaron 15 ecotipos, de los cuales se seleccionaron 5 para continuar con el estudio a fondo, (Bu-5, Col-0, Cvi-0, Sg-2 y Sha-1) la compañía Riken BRC nos vendió las semillas de los ecotipos (Sg-2, y Bu-5) que son propagadas y cuidadas a través del proyecto nacional de Bio-recursos del MEXT, Japón. Los 3 ecotipos restantes (Col-0, Sha-1 y Cvi-0) fueron proporcionados por la Dra María de la Paz Sánchez del Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología UNAM. Las semillas fueron desinfectadas con una solución 20% de cloro comercial más 1µl de Tween 20 (Agdia®) durante 13 minutos en agitación constante y enjuagadas con agua estéril 4 veces. Posterior a la desinfección, las semillas fueron almacenadas a 4°C durante un lapso que fue de 4 hasta 7 días en completa oscuridad para sincronizar su germinación. En todos los casos se utilizaron cajas de Petri cuadradas de 12 cm con 80ml de medio sólido para germinar las semillas y crecerlas en los diferentes tratamientos, detallado en la siguiente sección.

### **5.2. Medio de cultivo**

Se utilizó como base mineral el medio de cultivo MS (1962) 0.2X para proporcionar las condiciones control, se adicionó a este medio con manitol 300mM (Sigma-Aldrich®) para el tratamiento en condiciones de estrés osmótico y con NaCl 100mM (Sigma-Aldrich®) respectivamente para inducir estrés salino-osmótico.

El medio MS 0.2X se preparó como se describe a continuación:

- Sacarosa (Sigma Aldrich) al 1% p/v
- 0.0005g/ml de M.E.S. monohidratado (Sigma Aldrich)
- 0.00088g/ml de M.S (Murashige y Skoog MP Biomédicals).
- El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.6 con KOH 1M.
- Para solidificar se añadió 1% p/v de Agar (Becton Dickinson).
- Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos
- Finalmente se llenaron cajas de Petri con 80ml de medio de cultivo

### **5.3. Condiciones de crecimiento**

Las semillas se germinaron y las plantulas crecieron tanto en condiciones control como en condiciones de estrés en cámaras climáticas de cultivo Percival a 24°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad con una intensidad luminosa de 800 a 1000 luxes, o de 16 a 20 mm/m<sup>2</sup> de fotones

### **5.4. Cinética de crecimiento**

Después de germinar las semillas y crecer las plantulas en medio MS0.2X durante 5 días, cuando las raíces contaban con una longitud entre 1 y 2 cm, se cambiaron a condiciones de estrés iónico-osmótico (NaCl 100mM), osmótico (manitol 300mM) y a condiciones MS (control), para marcar el crecimiento diario en centímetros de la raíz primaria, se marcó la longitud radical en la caja a la misma hora, durante 6 días posteriores al cambio de medio de cultivo.

Las raíces fueron medidas con el Software Fiji Image J (Schindelin *et al.*, 2012) y graficadas con el software GraphPadPrism (Motulsky *et al.*, 2007). Para seleccionar los 5 ecotipos para trabajar en esta investigación se cuantificó la disminución del crecimiento diario ante situaciones de estrés con respecto a su crecimiento en medio MS in vitro (que representó las condiciones favorables de crecimiento al 100%).

Posteriormente se realizaron tres replicas biológicas de cinética de crecimiento para analizar solamente los 5 ecotipos elegidos llegando a una n experimental de más de 40 plantas para cada una en los 3 tratamientos

### **5.5. Análisis microscópico de la raíz a 1 día de estrés**

Se analizaron plantulas de 6 días de edad crecidas in vitro en medio MS por 5 días y posteriormente sometidas a 28h en condiciones de estrés osmótico y estrés iónico y osmótico con sus respectivas plantulas en condiciones control. Después de crecer en los diferentes tratamientos, las plantas fueron teñidas con una modificación al método de tinción con Pseudo Schiff descrito por Truernit *et al.* (2008) y las modificaciones de montaje en portaobjetos reportadas por Dubrovsky *et al.* (2000) para su posterior análisis. Con la ayuda de un microscopio Olympus Bx60 se capturaron imágenes en serie del plano medio longitudinal de la raíz, con énfasis en las células del córtex, y con microscopía

confocal para observar las células del NCT y de la columela, utilizando el Software Fiji-Image J. Para cada raíz, se obtuvieron las longitudes celulares del córtex desde el CQ hasta 20 células después del inicio de la zona de maduración. Estos datos se utilizaron para identificar como se afectan las tasas de proliferación y diferenciación de los diferentes ecotipos en las dos condiciones de estrés probadas (manitol 300mM y NaCl 100mM).

Se midieron los diferentes parámetros celulares que se enlistan a continuación: 1) el número de células en los diferentes dominios, 2) la longitud de cada uno de los mismos 3) la distancia del centro quiescente al primer pelo radical, 4) los tamaños críticos que alcanzan las células al salir de cada dominio del RAM y entrar al siguiente. Casi todos éstos parámetros, excepto la longitud de las células completamente alargadas, fueron obtenidos gracias al algoritmo de múltiples cambios estructurales para el análisis de los perfiles de longitudes celulares en las raíces de *Arabidopsis* reportado por Pacheco-Escobedo *et al.* (2016). Para determinar el tamaño de las células completamente alargadas, en condiciones control y con NaCl, se tomaron las 10 células posteriores a la célula cortical número 6 a partir de la aparición del primer pelo en la epidermis de la raíz. Para el caso de las raíces sometidas a estrés por manitol, se tomaron las longitudes de 10 células posteriores a la célula 6 al terminar la cicatriz característica de la que hablaré con más detalle en los resultados. (Cajero-Sánchez *et al.*, 2018).

## **5.6. Tinción y fijación de muestras**

El método de Pseudo Schiff consistió en colocar las plántulas en una solución fijadora de metanol 50% v/v y ácido acético 10% v/v durante 18h a 4°C. Posteriormente, se lavaron las plántulas cuidadosamente con agua y se añadió 1ml de Ácido periódico 1% v/v durante 40 minutos a 40°C. Después de un lavado con agua destilada, se incubaron a temperatura ambiente con Reactivo de Schiff (metabisulfito de sodio 100mM, HCL 0.15N PI 100µg/mol) con KI (yoduro de potasio) por una hora y media. Posteriormente se retiró el reactivo y se colocaron las plántulas en 1ml de una solución de DMSO 2% v/v con glicerol 30% v/v y se dejaron un fin de semana, y posteriormente fueron montadas en portaobjetos con yoduro de sodio (NaI), donde fueron aclaradas para ser observadas al microscopio.

## **5.7. Análisis de microscopía**

Las preparaciones de las raíces teñidas se observaron en un microscopio Olympus® Bx60 adaptado a una cámara Evolution MP COLOR Media Cybernetics®, que proyecta las imágenes a un ordenador mediante el uso del software Image ProInsight®. Se tomaron fotografías más detalladas de los meristemos radicales de las mismas preparaciones mediante microscopía confocal. Las fotografías tomadas en ambos microscopios se analizaron con el Software Fiji Image J® (Schindelin *et al.*, 2012) para cuantificar la longitud de las células del cortex de la raíz a partir del centro quiescente y el área de las células de la columela.

## **5.8. Análisis de PCR tiempo real cuantitativa**

Para analizar la expresión de los genes que participan en la respuesta a estrés osmótico/iónico y estrés osmótico, se obtuvieron entre 160 y 240 plantas por cada réplica experimental para tres tratamientos (MS, manitol 300mM y NaCl 100mM del ecotipo de referencia, Col-0). Se crecieron las plántulas durante 5 días y posteriormente se sometieron a 24 horas de estrés. El tejido biológico utilizado para el análisis de expresión, fue todo el sistema radical a partir del hipocótilo, recolectado con cuidado para causar el menor estrés mecánico posible. Las muestras se congelaron en tubos Eppendorf® con nitrógeno líquido y la extracción de RNA, se llevó a cabo con el kit de extracción de RNA Zymo Research® siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se midió la cantidad de RNA obtenido por muestra con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), corroborando su integridad y calibrando la cantidad de RNA en las muestras mediante geles de electroforesis. Se utilizaron las muestras de RNA calibradas para sintetizar cDNA mediante una reacción de PCR por duplicado para cada muestra usando la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante y llegando a un volumen final de 20µl.

Para realizar las PCR cuantitativas se utilizó el cDNA sintetizado anteriormente a una concentración de 5ng/µl realizando 3 réplicas por cada muestra de cDNA y se hizo la reacción de PCR con SYBRGreen Master MIX (Thermo Fisher®). Las corridas se

realizaron en un equipo StepOnePlus (Applied Biosystems®) y se dieron 45 ciclos para la amplificación de cada gen a probar y 40 ciclos para la amplificación de los normalizadores *UPL7*, *PDF2* y *RNAH*. Los resultados obtenidos fueron analizados con el algoritmo online Real-time PCR Miner (Zhao y Fernald 2005) y después del análisis de los valores de CT, la expresión relativa de cada uno de los genes, se calculó usando el método DDCT con el software qBase+ (Biogazelle).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados en las RT-PCRs

Nombre del Gen	Locus ATG	Nombre del Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
RD29A	At5g52310	RD29A_PA_qF	CTGATGAGGTGAAGCCAGAA
		RD29A_PA_qR	GAGCCAAGTGATTGTGGAGA
COR15A	AT2G42540.2	COR15A_PA_qF	AACGAGGCCACAAAGAAAGC
		COR15A_PA_qR	CCCAATGTATCTGCGGTTTC
AREB1	AT1G45249	AREB1_VR_qF	TACACCGTGGAGCTTGAAGC
		AREB1_VR_qR	TCCGTCTCCTGATTCTTTTGC
LEA4-5	AT5G06760.1	LEA4.5_VR_qF	AGGAAAAGGCGGAGAAGATG
		LEA4.5_VR_qR	TTCTGCATCTCAGCTTGATTG
DREB26	AT1G21910.1	DREB26_VR_qF	CTCCATTCAATTACTCTCCTC
		DREB26_VR_qR	CTCCAAAGCGGAATGTCAGC

### 5.9. Análisis estadístico.

Los gráficos mostrados en esta tesis fueron analizados con el software estadístico GraphPad Prism 5 y Statistics mediante pruebas de ANOVA 1 vía con tres niveles (tres tratamientos) y tres bloques (réplicas experimentales). En los análisis de cinéticas de crecimiento se aplicó un test de Tukey que nos ayuda para hacer comparaciones en parejas y contra nuestro modelo de referencia Col-0.

Para los análisis de cuantificaciones celulares, se realizó una prueba T no paramétrica de tipo Mann Withney para detectar significancia en la diferencia de medias. Esta misma prueba fue realizada para comparar la respuesta de cada uno de los ecotipos ante los 3 tratamientos usados en esta investigación.



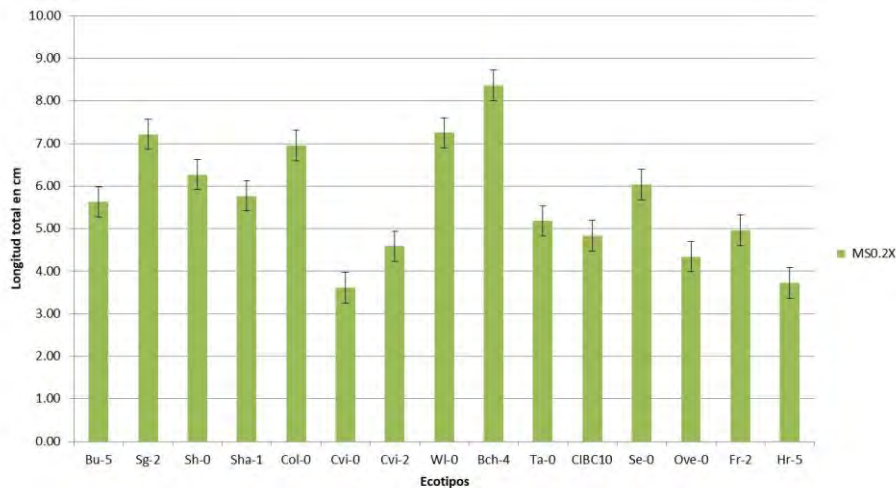
Se analizaron las áreas celulares de las células de las diferentes filas de células diferenciadas de la columela. Este análisis se llevó a cabo con fotografías tomadas con microscopía confocal, midiendo las células con el software image J, y se realizó una prueba de Barlett de comparación de varianzas y una prueba de Mann Withney no paramétrica para comparar las medias entre las medidas celulares de plantas crecidas en condiciones control (MS) y en estrés osmótico (con manitol 300mM) para cada ecotipo.

## 6. Resultados y Discusión

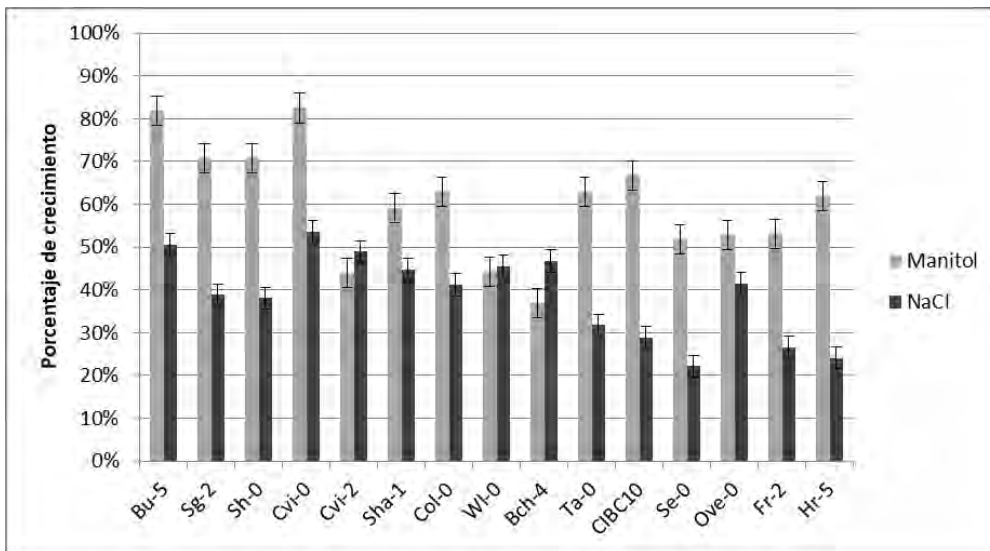
### 6.1. Selección de ecotipos a utilizar

Para seleccionar los 5 ecotipos utilizados, se realizó un estudio preliminar, llevando a cabo cinéticas de crecimiento de 15 diferentes ecotipos en condiciones de estrés osmótico por manitol 300mM y estrés salino por NaCl 100mM. Es interesante notar que, en condiciones control, los 15 ecotipos tienen una cinética de crecimiento diferente y terminan con longitudes radicales que van de casi 4 a más de 8 centímetros (ver Figura 4); esto sugiere que hay variaciones naturales en cuanto al crecimiento de la raíz primaria de los diferentes ecotipos, a pesar de que las semillas utilizadas provienen de plantas que llevan varias generaciones creciendo en condiciones favorables. También es interesante notar la plasticidad de cada población natural que se refleja en la variación en el tamaño final de la raíz de las diferentes plantas analizadas (Figura suplementaria 1).

Como los ecotipos tienen diferente longitud de crecimiento en la raíz primaria en condiciones control (MS), para poder hacer comparaciones entre los mismos, se calculó el porcentaje de crecimiento bajo estrés con respecto a su desempeño en MS para cada uno de ellos (Figura 5 y Tabla 2).



**Figura 4.** Longitud total de la raíz primaria en cm de los 15 ecotipos analizados en el estudio preliminar bajo condiciones control con medio de cultivo MS 0.2x



**Figura 5.** Porcentaje de crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés con NaCl 100mM (marcado en barras color gris oscuro) y 300mM de manitol (barras gris claro) con respecto a su longitud radicular en condiciones control (100%).

Como se puede ver en la Figura 5 y en la Tabla 2, hay mucha variación en la respuesta a las dos condiciones de estrés que aplicamos, siendo la condición de estrés iónico/osmótico por NaCl la más severa, excepto en el caso de los ecotipos Cvi-2 Wl-0 y Bch-4, que parecen afectarse más por e manitol que por el NaCl.

Para entender cuál de los dos tipos de estrés (el estrés osmótico o el iónico) es más relevante cuando las plantas crecen en 100mM de NaCl, se midió el potencial osmótico de diferentes concentraciones de manitol (100, 200 y 300mM), de 100mM NaCl y de MS 0.2X como control. Los medios de cultivo de condiciones control, tienen un potencial osmótico de -0.135 Mpa, mientras que un medio de cultivo con manitol 300mM tiene un potencial osmótico de -0.824 MPa, que al ser más negativo provoca que el agua que se encuentra dentro de las células se mueva hacia el exterior, y un medio de cultivo con NaCl 100mM tiene un potencial osmótico de -0.540MPa (casi lo mismo que un medio de cultivo con manitol 100mM, cuya presión osmótica es de -0.587MPa). Por lo anterior, intuimos que el estrés provocado por los iones de  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  es muy dañino para el crecimiento de la raíz primaria de la mayoría de los ecotipos de Arabidopsis por el estrés de tipo ionico más que por un estrés osmótico.

**Tabla 2.** Porcentajes de crecimiento de la raíz primaria correspondientes a la figura 5, ordenadas de mayor a menor, para los tratamientos de estrés y las condiciones control.

Ecotipo	Longitud en MS	Crecimiento en manitol		Longitud en manitol	Crecimiento en NaCl		Longitud en NaCl
Bu-5	5.63 cm	Bu-5	82%	4.60 cm	Bu-5	51%	3.91cm
Sg-2	7.21 cm	Sg-2	71%	5.10 cm	Sg-2	39%	2.84 cm
Sh-0	6.27 cm	Sh-0	71%	4.43 cm	Sh-0	38%	1.64 cm
Cvi-0	3.61 cm	Cvi-0	83%	2.03 cm	Cvi-0	54%	0.89 cm
Cvi-2	4.58 cm	Cvi-2	44%	2.01 cm	Cvi-2	49%	1.33 cm
Sha-1	5.77 cm	Sha-1	59%	3.40 cm	Sha-1	45%	1.76 cm
Col-0	6.95 cm	Col-0	63%	4.37cm	Col-0	41%	2.38 cm
Wl-0	7.25cm	Wl-0	44%	3.20 cm	Wl-0	45%	2.80 cm
Bch-4	8.36cm	Bch-4	37%	3.08cm	Bch-4	47%	3.29cm
TaO	5.18 cm	Ta-0	63%	3.25 cm	Ta-0	32%	1.30 cm
CICB10	4.83 cm	CIBC10	67%	3.22 cm	CIBC10	29%	1.39 cm
SeO	6.03 cm	Se-0	52%	3.12 cm	Se-0	22%	0.80 cm
Ove-O	4.34 cm	Ove-0	53%	2.28 cm	Ove-0	42%	2.58 cm
Fr2	4.91 cm	Fr-2	53%	2.60 cm	Fr-2	27%	1.93 cm
Hr5	3.72 cm	Hr-5	62%	2.30 cm	Hr-5	24%	1.80 cm

En la Figura 5 y en la Tabla 2 podemos notar que, en condiciones de crecimiento utilizando manitol 300mM, los ecotipos Sg-2 y Cvi-0 se ven menos afectados que el resto en el crecimiento de la raíz primaria; sin embargo, en esta condición de estrés, hay ecotipos cuyas raíces se afectaron mucho ante este tipo de estrés, pues tienen un porcentaje de crecimiento menor al 50% (Cvi-2, Bch-4 y Wl-0) un porcentaje muy parecido al que presentan en estrés por sal (NaCl 100mM)

. En el caso del tratamiento con el estrés por 100mM de NaCl, los ecotipos que menos se afectaron crecieron entre un 40-50% (Cvi-0 y Bu-5) con respecto al control y los que más se afectaron crecieron entre un 20 y un 30% (Fr-2, Hr-5 y Se-0). Esto ya sugiere que, efectivamente, existen ecotipos cuyo crecimiento de la raíz primaria se ve afectado diferencialmente en estas dos condiciones de estrés. En los siguientes párrafos vamos a justificar la selección de los 5 ecotipos utilizados.

El ecotipo Columbia (Col-0,) proveniente de Landsberg Alemania (NASC), tuvo un desempeño promedio de crecimiento ante condiciones de estrés (Figura 5 y Tabla 2) y por ello fue utilizado como modelo de referencia para compararlo con el mayor o menor crecimiento del resto de los ecotipos a los diferentes tratamientos. Esto lo decidimos ya que ha sido el ecotipo más empleado para estudios de biología molecular, evolución y genética del desarrollo. Debido a esto último, se tiene bien caracterizada su respuesta ante diferentes tipos de estrés, a nivel fenotípico, genético, molecular y fisiológico.

El ecotipo Cvi-0 de las islas Cabo Verde, también fue elegido para continuar con el estudio porque es el ecotipo en el que se observó menos afectado el crecimiento de la raíz primaria en ambos tratamientos de estrés (Figura 5 y Tabla 2). Es un ecotipo particularmente interesante ya que se ha reportado en la literatura que está adaptado a ecosistemas aislados, por pertenecer a una población relictiva (Alonso-Blanco *et al.*, 2016) separado por una barrera de aguas oceánicas que impide el poco flujo génico con otros ecotipos del continente africano (Lobin 1983). Este ecotipo presenta particularidades fenotípicas, como el hecho de ser de raíz corta, tener una arquitectura radical distinta a Col-0 y una capa extra de células iniciales de columela (Aceves-García *et al.*, 2016), además presenta una respuesta estomática diferente a la que presenta Col-0, ante diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> (Li *et al.*, 2006) debido a que sus células guardan altas cantidades de osmolitos, como el malato, el Cl<sup>-</sup> y el K<sup>+</sup> (Schroeder and Hagiwara, 1989). Estos autores reportan que el malato junto con el Cl<sup>-</sup>, son los responsables de la apertura estomática y que, cuando se acumulan, se inhibe el cierre estomático que se activa con el eflujo de K<sup>+</sup>. Esto indica que este ecotipo posee mecanismos particulares para regular sus respuestas fisiológicas al ambiente como es, en este caso, el intercambio de gases (Li *et al.*, 2006). Por otro lado, hay otros estudios que reportan que, bajo diferentes condiciones de estrés, Cvi-0 acumula altas cantidades de jasmonato, ácido salicílico y ABA (Brosché *et al.* 2010). Esto es interesante ya que el ABA es una hormona clave en la respuesta a estrés por falta de agua y, el ácido salicílico, junto con el jasmonato, son compuestos reguladores de la respuesta ante estrés biótico y estrés causado por heridas mecánicas (Vivanco *et al.*, 2005). Este ecotipo posee diferentes estrategias para contender con un ambiente de déficit hídrico ya que tiene incrementada la expresión de genes en respuesta a ABA en condiciones de baja humedad con respecto a lo que sucede en Col-0 y regula de manera diferente el

cierre estomático bajo éstas condiciones de estrés (Monda *et al.*; 2011). Finalmente este ecotipo ha sido estudiado en este laboratorio ante las condiciones que se probarán en este estudio y resultó ser más tolerante ante estrés osmótico por manitol que el ecotipo Col-0 (Aceves-García *et al.*, 2016)

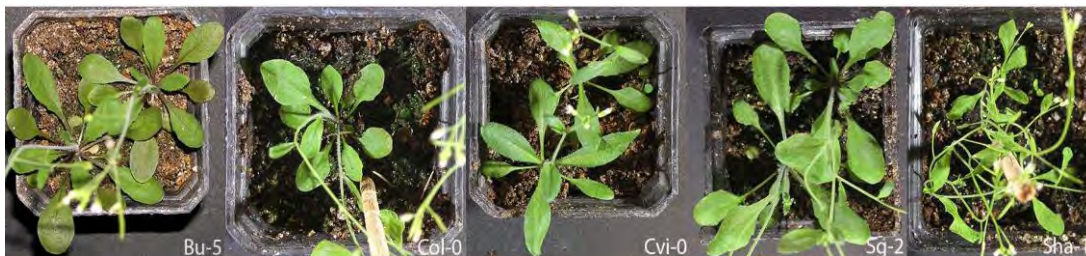
El ecotipo Bu-5 (de nombre Buchslag), fue colectado en Burgahun Rhön Alemania, y lo elegimos porque es el segundo ecotipo en donde se afectó menos el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés iónico-osmótico (Figura 5 y Tabla 2). Bu-5 esta reportado como uno de los 5 ecotipos (de 350) que toleraron altas concentraciones de NaCl (500mM) en plantas de 3 semanas de edad trasplantadas a sistrato y sometidas a este estrés durante 35 días (Katori *et al.*, 2010).

El ecotipo Sg-2 proveniente de St.Georgen Alemania, fue colectado a una altitud de 417 metros sobre el nivel del mar en tierras agrícolas en donde se han hecho tratamientos con agroquímicos. Nos pareció un ecotipo interesante para seguir con su caracterización porque, además de que fue el tercero que menos se afectó en el tratamiento con manitol y mostró una tolerancia media en el tratamiento con NaCl 100mM, es el ecotipo que presentó la mayor longitud de raíz en los tratamientos de estrés (Figura 5 y Tabla 2).

Finalmente, el último ecotipo que escogimos fue Sha-1 (Shakhdara) que proviene de una región semiárida de Tajikistán, Asia. Este ecotipo fue colectado en una región cercana a ríos y, a pesar de que el sitio donde fue colectado tiene una precipitación media de 900mm en primavera y en verano escasea la lluvia, se reporta en la literatura que no tiene un periodo de floración bien establecido. Ha sido caracterizado como de floración temprana por Johanson *et al.* (2000) pero, por otro lado, este ecotipo crece en sitios en donde se presenta la temperatura ambiental más alta y la segunda más baja en el año, respecto al resto de los ecotipos. Sha-1 fue un ecotipo en el cual el crecimiento de la raíz primaria se afecta menos en NaCl que en manitol, como si fuera tolerante a estrés salino (Figura 5 y Tabla 2). Sin embargo, es interesante estudiarlo ya que la ubicación geográfica de donde fué colectado, presenta fluctuaciones climáticas abruptas a lo largo del año. Finalmente, es el único ecotipo disponible proveniente de Asia.

Tomando en cuenta que cada ecotipo está adaptado a las condiciones ambientales del entorno donde fueron colectadas sus semillas, las condiciones adecuadas para el desarrollo reproductivo son distintas y los tiempos de floración varían ligeramente entre ecotipos. Esto

se ha visto reflejado en la regulación específica de diferentes genes que responden a condiciones externas e internas y que regulan la transición del meristemo vegetativo a meristemo de inflorescencia (Simpson y Dean, 2002). Está reportado que los ecotipos Cvi-0 y Sha-1 son de floración temprana ya que tienen una delección del gen de *FRIGIDA*, (*FRI*), que es un gen que está implicado en la determinación del tiempo de floración por vernalización debido a que induce a *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) y FLC es un FT que reprime la expresión de dos genes que promueven la floración (*FT* y *SOC1*) (Johanson *et al.*, 2000).



**Figura 6.** Fenotipo de la parte aérea de los 5 ecotipos en etapa de floración con 26 días de edad. Se pueden ver diferencias en la morfología de las hojas de roseta dependiendo del ecotipo.

En la Figura 6 se puede observar la diferencia fenotípica en las hojas de roseta de los 5 ecotipos utilizados; Bu-5, Col-0 y Sg-2 tienen las hojas más redondeadas que las de Cvi-0 y Sha-1. Por otro lado, Sg-2 es el ecotipo que tiene las hojas más largas y, en una amplia roseta y Sha-1 presenta las hojas de roseta más delgadas. En la figura 7 se encuentran las localizaciones geográficas de los ecotipos utilizados.








**Figura 7.** Distribución geográfica de más de 7000 ecotipos de *Arabidopsis thaliana*. En rojo se muestra la distribución geográfica de la especie y en puntos amarillos el sitio de origen de los ecotipos utilizados (Modificado de Krämer y Hagemann, 2015).

## 6.2. Condiciones ambientales y distribución geográfica de los 5 ecotipos.

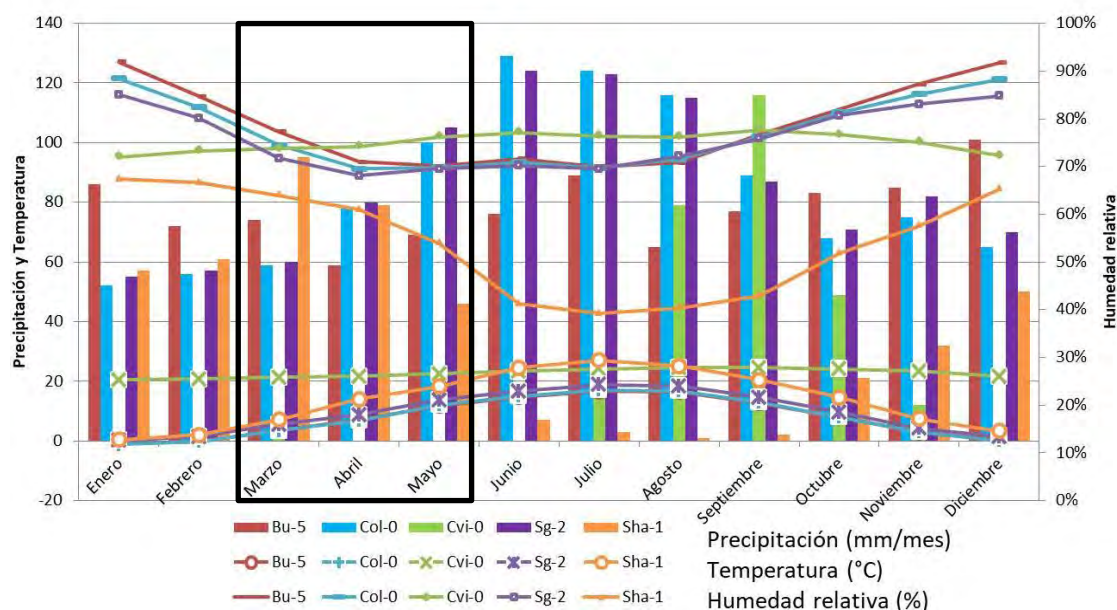
Como se puede ver en la Tabla 3, el ecotipo proveniente del lugar con mayor precipitación anual es Sg-2, seguido por Col-0, Bu-5 y Sha-1 y Cvi-0 que es el ecotipo que crece en lugares con menos precipitación. Con respecto a las condiciones de humedad relativa en los sitios de colecta, podemos ver que Bu-5 proviene de la zona de mayor humedad (78.41%), seguido por Sg-2 (76%), Cvi-0 (75%), Col-0 (70%) y Sha-1 (54%).

**Tabla 3** Condiciones climáticas anuales de los sitios en donde naturalmente crecen los ecotipos utilizados para este estudio. Coordenadas obtenidas de TAIR e información climática de <http://worldclim.org/version2> humedad relativa de <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/quickwms/climate.htm>

Ecotipo	Origen	Coordenadas	Precipitación	Humedad Relativa	Temp mínima	Temp máxima	Fotografía GPS Localidad.
<b>Bu-5</b>	Burghaun/ Rhön Alemania	50.5°N, 9.5°E 250msnm	936 mm/año	78.41%	-0.8°C	16.7°C	
<b>Col-0</b>	Columbia Landsberg, Alemania.	47.984°N 10.8719°E 200msnm	1011 mm/año	69.5%	-1.1°C	16.8°C	
<b>Cvi-0</b>	IslasCabo Verde	15.110°N, 23.610°O 1200msnm	281 mm/año	75%	20.4°C	24.6°C	
<b>Sg-2</b>	St.Georgen/ Alemania	47.667°N, 9.5°E 250msnm	1029 mm/año	76%	0.1°C	18.8°C	
<b>Sha-1</b>	Tajikistan	38.500°N, 68.350°E 3400msnm	454 mm/año	54.13%	0.4°C	27.1°C	



Además, las condiciones ambientales por mes, indican que el sitio en donde crece el ecotipo Sha-1 es el que tiene menor humedad relativa ambiental ya que, de Mayo a Octubre, disminuye tanto la humedad relativa como las precipitaciones. Finalmente, y a pesar de que el sitio donde se colectó Cvi-0 no tiene mucha precipitación de agua, la humedad relativa es alta durante todo el año, (aproximadamente de un 75%) y posiblemente esto influya en su tolerancia ante un estrés iónico-osmótico y osmótico (Figura 8).



**Figura 8.** Condiciones ambientales (humedad relativa, precipitación y temperatura) de los sitios donde fueron colectados los 5 ecotipos utilizados. La precipitación está dada en mm/mes representada con barras de diferentes colores que corresponden a cada uno de los ecotipos. La humedad relativa y la temperatura en °C están graficados con líneas; los meses que corresponden a la primavera están marcadas con el rectángulo negro.

Se sabe que la mayoría de los ecotipos de *Arabidopsis* son de floración anual y que ésta ocurre durante los meses de Marzo, Abril y Mayo (Krämer, 2015). Por este motivo, y a pesar de que las condiciones ambientales varían durante todo el año, lo que ocurre durante esos meses es de vital importancia para la sobrevivencia y reproducción de esta planta, por lo que se decidió poner una tabla adicional con la información de la humedad relativa y la precipitación de esos meses (Tabla 4). Como en el rectángulo negro de la Figura 8, durante estos meses la humedad relativa de todos los ecotipos es alta y las precipitaciones

relativamente abundantes a excepción del sitio en donde crece Cvi-0 que durante casi todo el año es normal que se mantenga cercana a cero. Por otro lado y como se puede ver en el Tabla 4, las condiciones de crecimiento en donde se encontraron estos 5 ecotipos son contrastantes tanto en la temperatura, que va de 7.56°C (para el ecotipo Bu-5) hasta 21°C (para el ecotipo Cvi-0) como en la precipitación, que va de 0 mm/mes (para el ecotipo Cvi-0) a 82 mm por mes (para el ecotipo Sg-2). También es interesante notar que la humedad relativa no varía tanto en estos sitios de crecimiento aunque cabe destacar que el ecotipo Cvi-0 se colectó en el sitio en donde la humedad relativa es la más alta durante todo el año, pero la precipitación es la más baja lo cual podría compensar la disponibilidad de agua en este sitio.

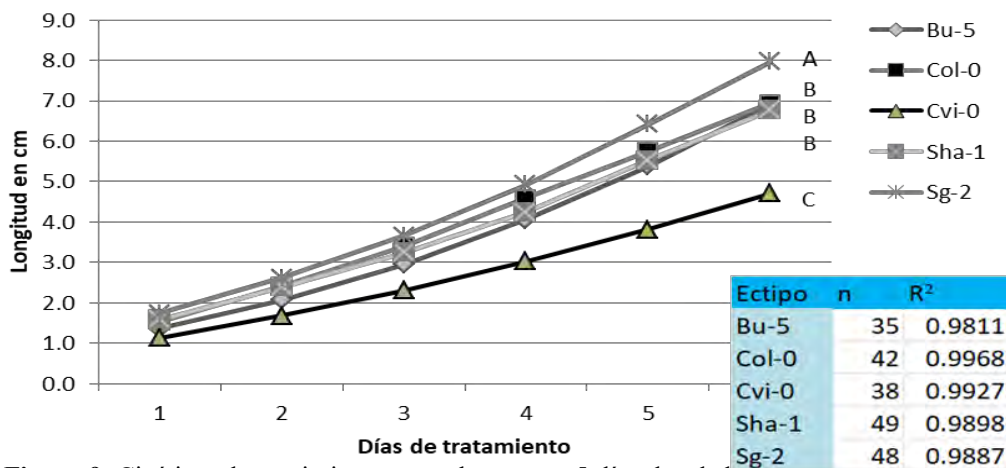
**Tabla 4.** Promedio de la precipitación, humedad relativa y temperatura durante la primavera en zonas de colecta de los 5 ecotipos estudiados. Datos provenientes de: [/worldclim.org/version2](http://worldclim.org/version2)

<b>Ecotipo</b>	<b>Precipitación</b>	<b>Humedad relativa</b>	<b>Temperatura</b>
<b>Bu-5</b>	67mm/mes	72.8%	7.56°C
<b>Col-0</b>	79mm/mes	71.3%	7.5°C
<b>Cvi-0</b>	0mm/mes	74.7%	21.8°C
<b>Sg-2</b>	82mm/mes	69.7%	9.4°C
<b>Sha-1</b>	73mm/mes	59.6%	13.16°C

### 6.3. Respuesta de la raíz en condiciones control

Los resultados de los análisis de crecimiento de la raíz primaria aquí mostrados se derivan de tres replicas experimentales. Las gráficas que muestran estos resultados se encuentran en las Figuras suplementarias 3, 5 y 7. Por otro lado, las fotos de todas las cinéticas de crecimiento que se utilizaron en los análisis presentados en esta tesis se encuentran en las Figuras suplementarias 2, 4 y 6.

La cinética de crecimiento de las raíces crecidas en condiciones control, se muestran en la Figura 9. Podemos observar que Sg-2 es el ecotipo que presenta la raíz primaria más larga oscilando entre los 8 y los 9 cm en condiciones control a 11 días post siembra (dps). En contraste, el ecotipo de raíz primaria más corta es Cvi-0 que, en condiciones control, alcanza como máximo los 6 cm, pero su promedio se mantiene en 4.66 cm a los 11 dps. Por otro lado, Sha-1, Bu-5 y Col-0 presentan longitudes que varían de los 6.5 a los 8 cm (Figura 9). Finalmente, se obtuvo un promedio de longitud de las raíces medidas en condiciones control para los tres ensayos a los 11 dps y, de mayor a menor son: Sg-2 (8.0cm), Col-0 (6.95cm), Bu-5 (6.96cm), Sha-1 (6.76cm) y Cvi-0 (4.7cm) además el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  al ser cercano a cero nos indica que las tendencias lineales graficadas son consistentes con la variedad de puntos medidos.



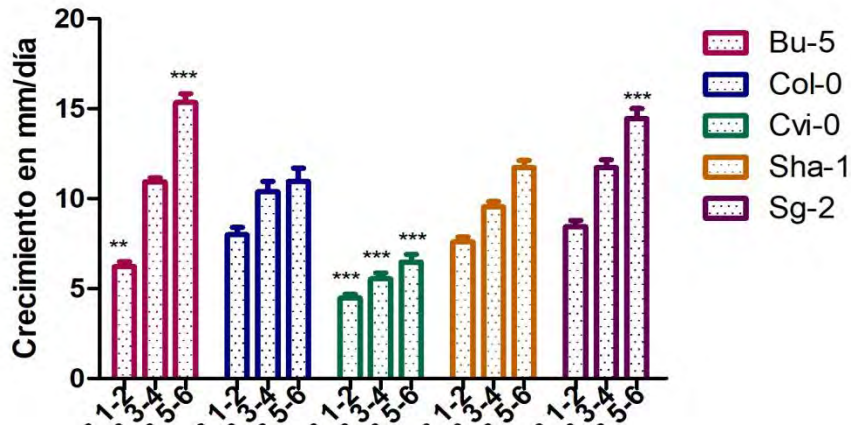
**Figura 9.** Cinéticas de crecimiento para plantas con 5 días de edad más 6 días de tratamiento en medio MS, 3 réplicas. Los experimentos se analizaron con una ANOVA  $P < 0.001$ . En el recuadro de la derecha abajo se marca el número de plantas utilizadas para cada ecotipo y el coeficiente  $R^2$

Los fenotipos de las plántulas crecidas en condiciones control se muestran en la Figura 10 y podemos ver que el ecotipo Cvi-0 tiene la parte aérea más pequeña y se caracteriza porque la raíz crece inclinada y es significativamente más corta que la de los otros ecotipos. Por otro lado, el ecotipo Sg-2 se caracteriza fenotípicamente por tener una parte aérea un poco más grande que el resto de los ecotipos además de una raíz primaria más larga.

Mediante el monitoreo del crecimiento de la raíz primaria cada 24h, obtuvimos la tasa de crecimiento diario durante los 6 días de tratamiento en mm/día. En medio MS, el crecimiento de la raíz primaria por cada día de cultivo incrementa de manera exponencial conforme pasan los días, aunque todos los ecotipos presentan la misma tendencia ascendente en el crecimiento, el ecotipo Cvi-0 tuvo una tasa de crecimiento significativamente menor que Col-0 (ver Figura 11)



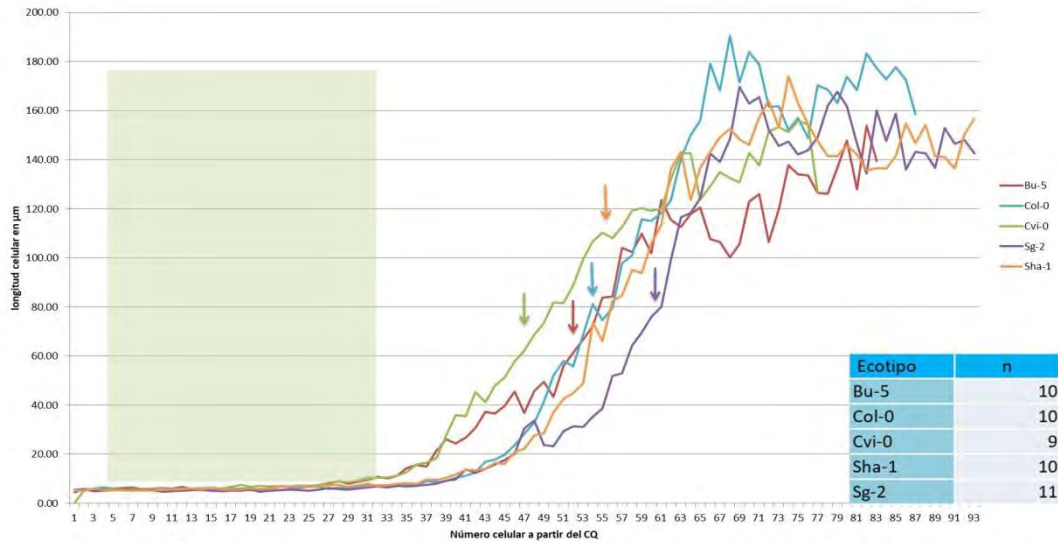
**Figura 10.** Fenotipos representativos de plántulas de los 5 ecotipos estudiados en este trabajo durante 11 días crecidos bajo condiciones control con medio de cultivo MS 0.2X.



**Figura 11.** Tasa de crecimiento de plántulas de los 5 ecotipos durante 24 horas en tres diferentes momentos de la curva de crecimiento en medio MS 0.2X (control). El análisis de ANOVA se usó con una  $P < 0.001$  (\*\*\*) ,  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.05$  (\*) y se hizo con respecto al ecotipo de referencia Col-0.

### 6.3.1. Respuesta de la raíz a nivel microscópico ante condiciones control

En condiciones control de crecimiento se puede observar una clara tendencia al aumento de la longitud celular conforme uno se va alejando del CQ (ver Figura 18). La parte inicial de la curva no muestra diferencias en las longitudes celulares ya que las células del dominio de proliferación del RAM no varían tanto de tamaño (sólo lo duplican antes de dividirse y, el tamaño promedio de éstas células es de 5-10  $\mu\text{m}$ ) (ver Figura 18). Después del dominio de proliferación, se encuentra el dominio de transición en donde ya hay un incremento en la longitud celular. Terminando la zona meristemática, encontramos la zona de elongación (ver en la Figura 18 las flechas para cada ecotipo) en donde se puede distinguir que hay un aumento exponencial en la longitud de las células. Finalmente, las células llegan a una longitud máxima de 150-200  $\mu\text{m}$  en la zona de maduración (aunque este valor oscila en los diferentes ecotipos) que se puede ver en la Figura 18, en donde ya no hubo un cambio en el tamaño de las mismas.

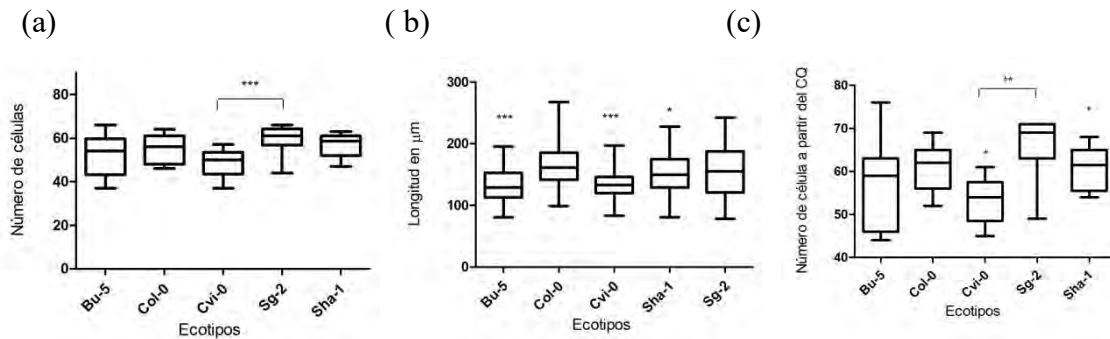


**Figura 18.** Longitudes celulares de la fila de células del córtex a partir del CQ en condiciones control. La parte del RAM comprende tanto el dominio de proliferación (que está en color verde) como el dominio de transición (el final de este dominio está indicado con flechas). Posteriormente se encuentra la zona de elongación y, donde se acostaba la curva de crecimiento, la zona de maduración. En el recuadro de la derecha abajo se marca el número de plantas utilizadas para cada ecotipo.

Con éstos datos de longitudes celulares se usó un algoritmo (Pacheco-Escobedo *et al.*, 2016) para obtener diferentes parámetros de cuantificaciones celulares que nos permiten identificar como se afectan los dos parámetros que influyen en el crecimiento de la raíz primaria (tasa de proliferación y de diferenciación celular). Cuando hacemos una comparación entre ecotipos encontramos que el ecotipo Cvi-0 tiene menos células en el RAM que los otros ecotipos y la diferencia es estadísticamente significativa únicamente con respecto a Sg-2, (ver Figura 19a) debido a que tiene pocas células en su dominio de proliferación (Ver figura suplementaria 8b); sin embargo, el tamaño de su meristemo es igual que el de todos los ecotipos debido al número de células presentes en el dominio de transición, y el tamaño en micrómetros del TD (Ver figura suplementaria 8c y 8e). Por otro lado, los ecotipos Bu-5 y Cvi-0 tienen las células totalmente alargadas más cortas mientras que Col-0 y Sg-2 las tienen estadísticamente iguales. Finalmente, encontramos diferencias significativas entre ecotipos en cuanto al número de células a partir del CQ, a la que aparece el primer pelo radical; las células de la epidermis de los ecotipos Sg-2 y Sha-1 se diferencian más lejos del CQ que Col-0, y en Cvi-0 hay una diferenciación de las células de

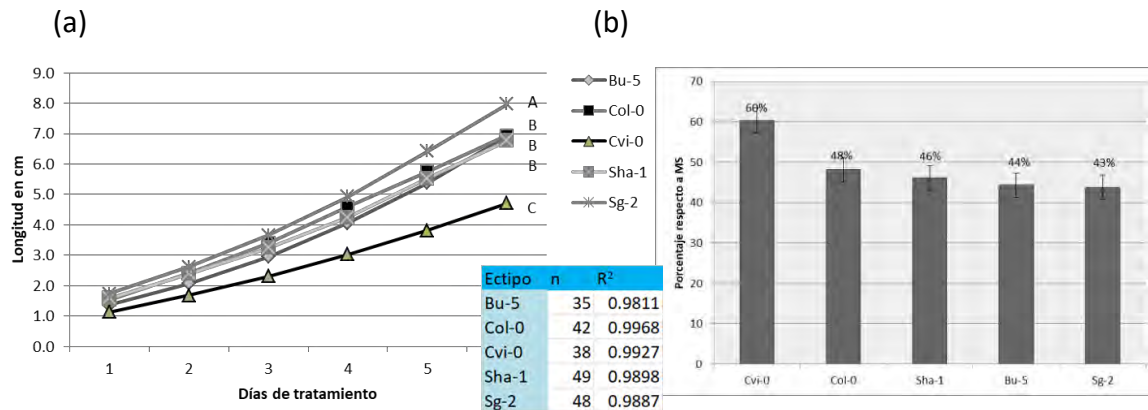
la epidermis más cercanas al mismo, entre los ecotipos Sg-2 y Cvi-0 la diferencia de medias es mayor que respecto a Col-0(ver Figura 19).

El resto de los datos medidos presentan una gran variación poblacional, pero la significancia estadística no es la suficiente para que los valores de las medias sean diferentes entre ecotipos (ver Figura Suplementaria 8)



**Figura 19.** Parámetros celulares cuantitativos de raíces de los cinco ecotipos crecidas en condiciones óptima de crecimiento. a) Número de células en el RAM, b) Longitud de las células diferenciadas totalmente alargadas, c) Número de célula a partir del CQ a la que aparece el primer pelo radicular. Se hizo una prueba T de tipo Mann Whitney, los asteriscos indican diferencia significativa respecto a Col-0, las diferencias entre otros ecotipos están señaladas con una barra que une los ecotipos involucrados.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) la longitud de las barras en cada gráfico indica los valores mínimos y máximos de la muestra.  $n =$  indicada en el recuadro de la figura 18.

## 6.4. Respuesta de la raíz ante estrés por manitol



**Figura 12.** a) Cinéticas de crecimiento de plántulas de 5 días transferidas por 6 días a medio adicionado con manitol 300mM. Se utilizó ANOVA con una  $P < 0.001$ . En el recuadro de la derecha abajo se marca el número de plantas utilizadas para cada ecotipo. b) Porcentaje de crecimiento de la raíz de cada ecotipo en medio adicionado con manitol 300mM respecto a su crecimiento en condiciones control, producto del promedio de una n experimental mencionada en el recuadro de a) y con barras de error.

Para analizar el impacto del estrés osmótico a nivel fenotípico tomamos una fotografía representativa de lo observado en los tres ensayos experimentales realizados (Figura 13). Como se puede ver en esta Figura, la parte aérea de 4 de los ecotipos tiene un cambio de coloración en las hojas que va de verde a un tono morado y amarillo que podría representar que la parte aérea no está recibiendo el aporte de nutrientes del medio de cultivo por efecto de la situación de estrés que representa la presencia de altas concentraciones de manitol en el medio. Es interesante notar que, en el ecotipo Cvi-0, las hojas se siguen viendo verdes sugiriendo que ésta planta no percibe, como una condición de estrés, el medio en el cual está creciendo.



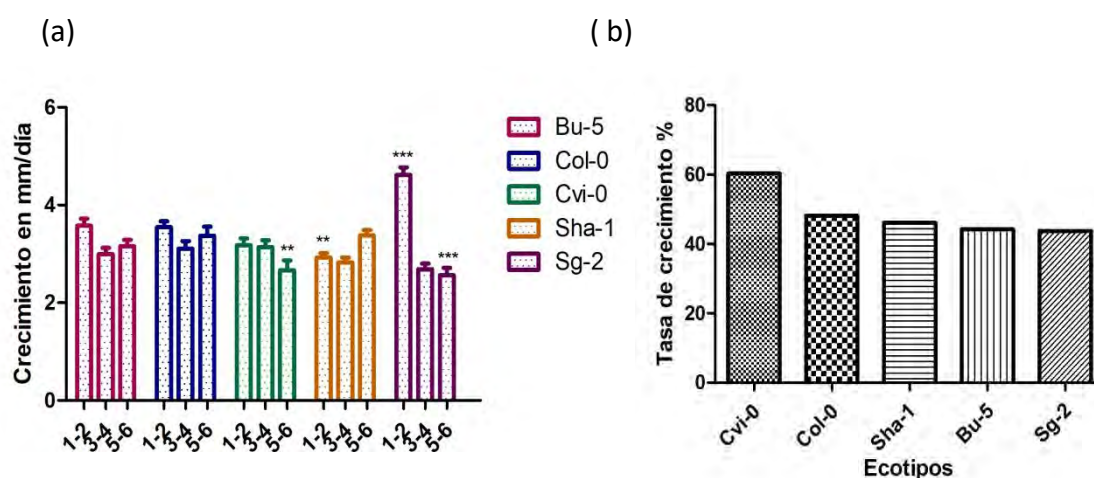


**Figura 13.** Fenotipos observados en las plántulas de los ecotipos crecidos en medio de cultivo adicionado con manitol 300mM. Las plántulas se crecieron por 5 días en condiciones control y se transfirieron 6 días al tratamiento de estrés.

En las figuras anteriores se observa cómo se afecta el crecimiento y la tasa de crecimiento de la raíz primaria cuando las plantas se crecen en un medio con estrés osmótico (300mM de manitol). En estas condiciones de estrés, la velocidad de crecimiento disminuye en lugar de aumentar como sucede cuando están creciendo en condiciones control de crecimiento; este patrón se observa en cuatro de los cinco ecotipos ya que, en Sha-1, hay una ligera recuperación, que no es significativa, en la tasa de crecimiento del día 5 al 6 de tratamiento (ver Figura 14a). Además, y con respecto al porcentaje de la tasa de crecimiento presentado en la Figura 14b, podemos decir que se sigue el mismo patrón que encontramos en las cinéticas de crecimiento para los 5 ecotipos (ver Figura 12b) ya que el ecotipo Cvi-0 es el que presenta una velocidad de crecimiento mayor al final del tratamiento y Sg-2 es el ecotipo que se ve más afectado al final de este.

El tratamiento de estrés osmótico en donde se adiciona al medio MS 0.2X manitol 300mM, restringe significativamente el crecimiento de la raíz primaria provocando que la longitud de la misma solo llegue a un 50%, en promedio, con respecto al crecimiento en condiciones control. Por consiguiente, se puede observar que las cinéticas de crecimiento difieren poco entre sí, y disminuye la pendiente (Figura 12a). Las plantas del ecotipo Sg-2 sometidas a este tipo de estrés siguen teniendo la raíz primaria más larga y el ecotipo Cvi-0 la raíz más corta; sin embargo, cuando se analizan los porcentajes de crecimiento con

respecto al control, se puede ver que la situación de estos dos ecotipos se invierte siendo el ecotipo en el que se afecta menos el crecimiento de la raíz primaria Cvi-0 y el que se afecta más Sg-2 (Figura 12b). Los otros tres ecotipos (Col-0, Sha-1 y Bu-5) tienen un porcentaje de crecimiento muy parecido e intermedio entre Cvi-0 y Sg-2. Para estimar el efecto del tratamiento con manitol en la longitud de la raíz primaria de los diferentes ecotipos, se obtuvo el porcentaje de crecimiento en este tratamiento respecto al desempeño radical en condiciones control (que sería el 100%).



**Figura 14.** a) Tasa de crecimiento de la raíz primaria en mm/día. Se utilizó una ANOVA para los análisis estadísticos con una  $P < 0.001$  (\*\*\*) ,  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.05$  (\*) respecto a Col-0. b) Porcentaje de la tasa de crecimiento en manitol comparada con los valores obtenidos en condiciones control del día 5 al día 6 de tratamiento.

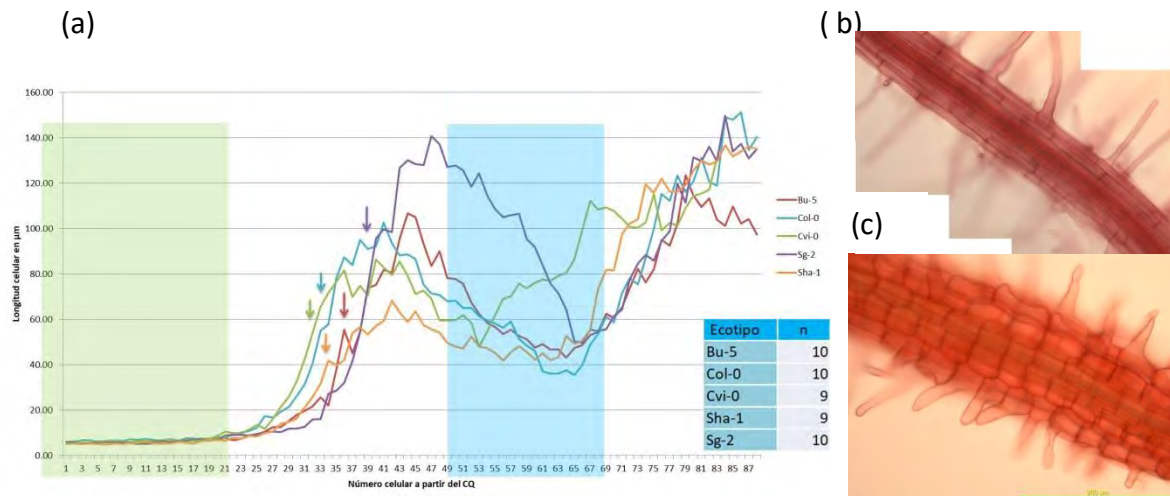
#### 6.4.1. Respuesta de la raíz a nivel microscópico.

A continuación se mostrarán los datos obtenidos al llevar a cabo el análisis cuantitativo de células del córtex desde el CQ hasta 20 células después del primer pelo en cada una de las condiciones de crecimiento probadas.

Se realizaron las mismas mediciones en las raíces tratadas con manitol 300mM por 24h. Los resultados se muestran en la Figura 20a, donde se observan los promedios de las longitudes de las células del cortex de las raíces de los cinco diferentes ecotipos desde el CQ hasta 80-90 células dependiendo del ecotipo, en el recuadro de esta misma figura se

encuentra la cantidad de plantas utilizadas, que son las mismas raíces a las que se les aplicó el análisis del algoritmo de Pacheco-Escobedo.

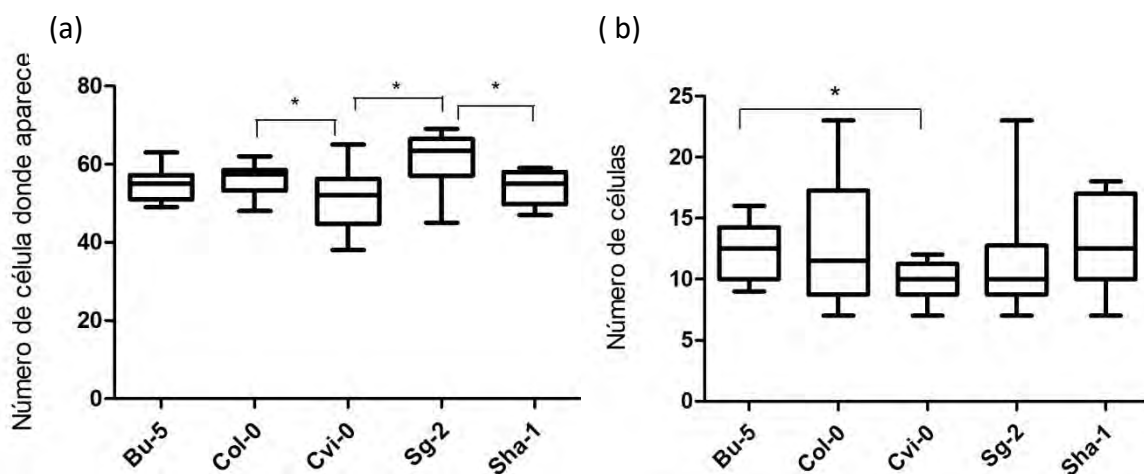
Si se comparan estos datos con los que se presentaron para las longitudes celulares en condiciones control (ver Figura 18) se puede ver que hay un dominio de proliferación más corto (sombreado en color verde). Además, en todos los ecotipos se puede observar una curva descendente después de, aproximadamente, la célula 40, que está indicando una zona de células con menor longitud y que se encuentra resaltada en la Figura 20 con una sombra de color azul. En nuestro laboratorio le hemos denominado a esta región, la zona de la "cicatriz", que se encuentra entre el dominio de transición celular y la zona de elongación. La cicatriz se presenta siempre que las raíces se crecen en una concentración alta de un osmolito (tanto manitol como NaCl) y las células de la misma se caracterizan porque se ensanchan adquiriendo una forma más cuadrada que cilíndrica (que es la que normalmente tienen las células de la raíz en esa zona). Las células de la cicatriz miden entre 20 y 50  $\mu\text{m}$  y, aunque el fenotipo de la cicatriz varía dependiendo del ecotipo, tiene una forma característica con pelos radicales que se puede ver en la Figura 20b. Finalmente, hemos observado que la cicatriz está seguida por una zona de células sin pelos.



**Figura 20.** a) Longitudes celulares de la fila de células del córtex a partir del CQ hasta la célula 87. En condiciones de estrés es más difícil delimitar las diferentes zonas y dominios de la raíz por lo que únicamente estamos destacando en verde el dominio de proliferación y en azul la zona de la cicatriz. b) Imagen de la zona donde aparece la cicatriz en una raíz del ecotipo Bu-5 sometido a condiciones control b) Imagen de una cicatriz característica que se genera en plántulas (correspondiente al ecotipo Bu-5) que están sometidas a un tratamiento de 24 horas en medio de cultivo MS 0.2X adicionado con manitol 300mM.

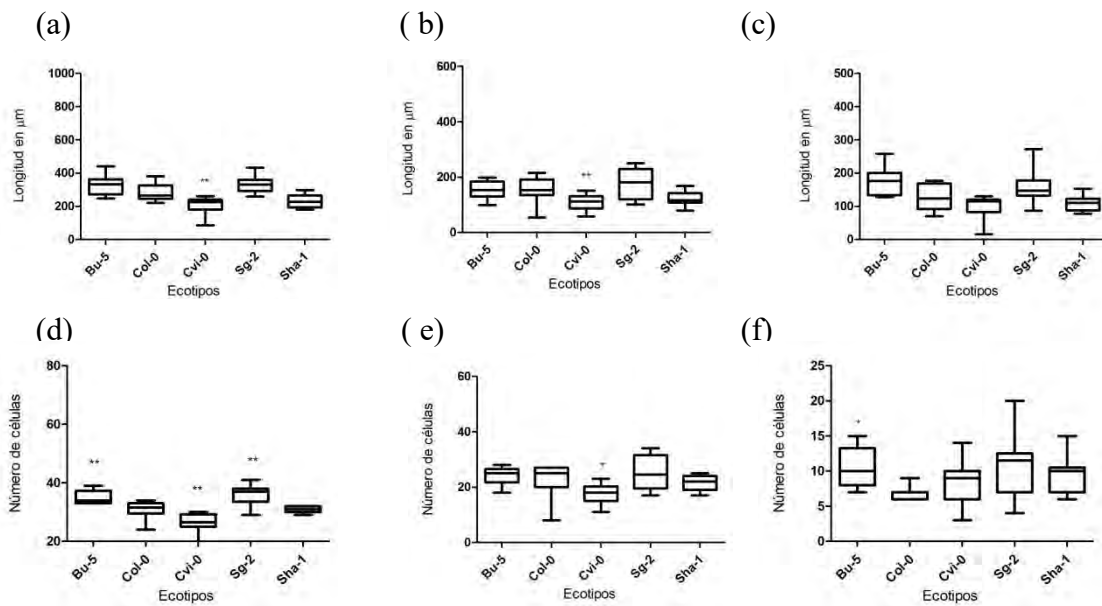
Haciendo un análisis del sitio en donde se observa y del número de células que conforman la cicatriz, encontramos que la cicatriz del ecotipo Sg-2 se encuentra más retirada del CQ, y está significativamente más lejos del RAM que en Cvi-0; a su vez esta última tiene la cicatriz más cerca del RAM que Col-0. Por otro lado, la cantidad de células que tiene la cicatriz oscila entre 7 y 22 para todos los ecotipos analizados y aparece en la célula número 50 o 60 a partir del CQ dependiendo del ecotipo que se esté estudiando. El número de células en la cicatriz es significativamente diferente sólo entre los ecotipos Bu-5 y Cvi-0 y no varía entre los ecotipos Col-0, Sha-1 y Sg-2 (ver Figuras 21y Suplementaria 9).

Como se puede ver en las Figuras 22 y 23, se redujo considerablemente la variabilidad de la respuesta tanto en la longitud de la raíz primaria como en casi todos los parámetros de cuantificaciones celulares de las raíces de plántulas de diferentes ecotipos crecidas bajo éstas condiciones de estrés osmótico.



**Figura 21.** a) Célula, contada a partir del CQ en donde se inicia la cicatriz de plántulas crecidas en manitol 300mM de cada uno de los 5 ecotipos. b) Número de células en la cicatriz, empezando con aquella célula que es cuadrada y mide más de 20  $\mu$ m y menos de 50  $\mu$ m. Se hizo una prueba T de tipo Mann Whitney para llevar a cabo los análisis estadísticos y los asteriscos indican la diferencia significativa señalada con una barra que une los ecotipos involucrados.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*), la longitud de las barras en cada gráfico indica los valores mínimos y máximos de la muestra.  $n =$  indicada en la figura 20

Por otro lado, todos los ecotipos presentaron una disminución promedio de 41% en el número de células de la zona del meristemo cuando las plantas crecieron en una condición de estrés osmótico; además, en estas condiciones de crecimiento, el tamaño de esta zona disminuyó aproximadamente en un 58% respecto a su crecimiento en MS0.2X (ver Tabla 5).



**Figura 22.** Cuantificaciones celulares de la raíz de plántulas crecidas en manitol<sub>300mM</sub> de los cinco ecotipos. Longitud en  $\mu\text{m}$  del a) RAM; b) Dominio de Proliferación; c) Dominio de transición; Número de células en el d) RAM; e) Dominio de Proliferación y f) Dominio de transición. Se hizo una prueba T de tipo Mann Whitney para llevar a cabo los análisis estadísticos, los asteriscos indican diferencia significativa respecto a Col-0  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) la longitud de las barras en cada gráfico indica los valores mínimos y máximos de la muestra.  $n =$  indicada en la figura 20

En la Figura 22 se muestran las diferencias entre ecotipos en el número y longitud de las células del RAM y de sus dominios. Podemos ver en las Figuras 22a y 22d que Cvi-0 tiene el meristemo más pequeño y con menos células debido al tamaño y cantidad de células presentes en el dominio de proliferación; por otro lado en la Figura 22d vemos que Bu-5 y Sg-2 tienen más células que Col-0, mientras que Sha-1 y Col-0 no son significativamente diferentes entre sí.

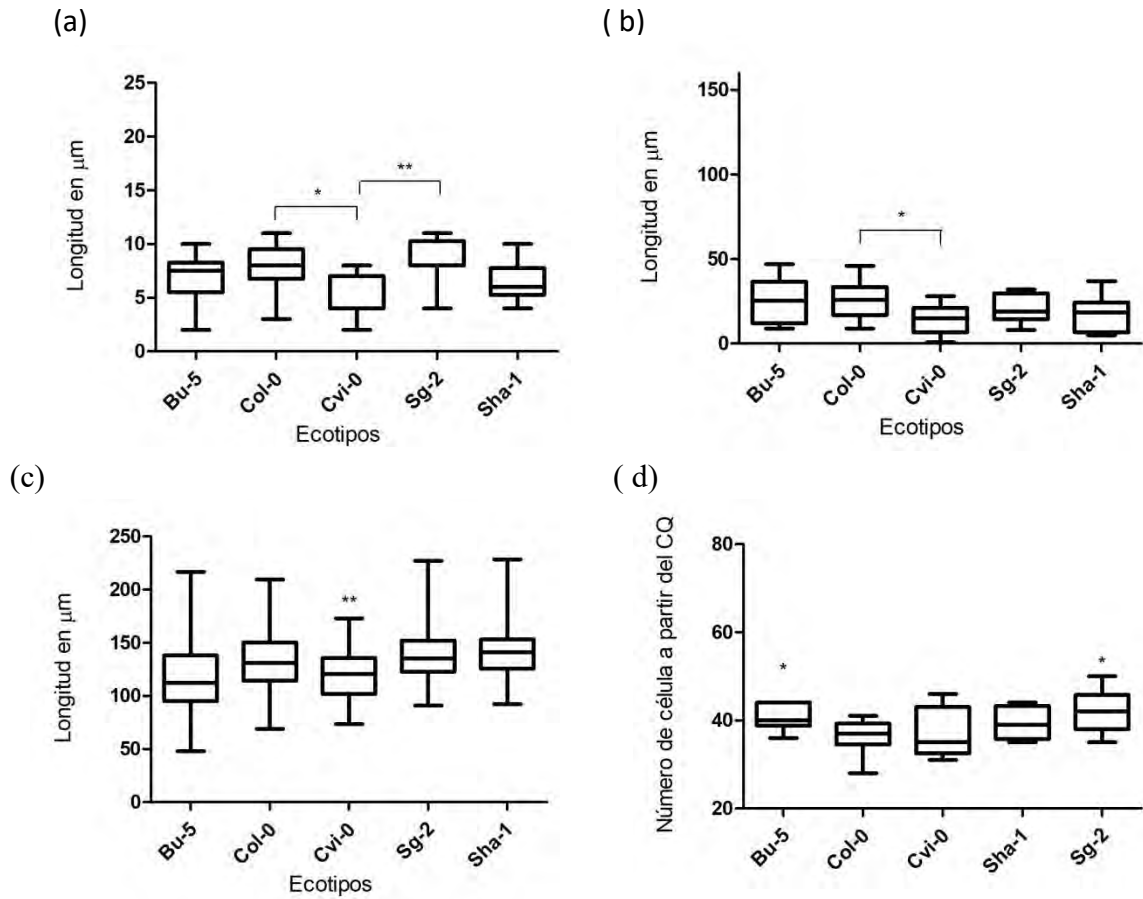
También, se calcularon los tamaños críticos que alcanzan las células al pasar del PD al TD. Como se puede ver en el la Tabla 5 y en la Figuras 23a y b, Cvi-0 es el ecotipo que

presenta las células más cortas al salir del dominio de proliferación sugiriendo que sus células entran más rápido al dominio de transición. De manera interesante observamos que el tamaño crítico de las células de plántulas crecidas en condiciones de estrés osmótico que salen del dominio de transición a la zona de elongación, si se ven afectadas si las comparamos con el tamaño crítico observado en las plantas crecidas en condiciones control (ver Tabla 5).

Encontramos en la Figura 23c, Cvi-0 y Bu-5 tienen las células diferenciadas significativamente más cortas que Col-0, mientras que Sha-1 y Sg-2 no tienen diferencias significativas entre sí. En la figura 23d se observa más detalladamente la distancia en número de células a partir del CQ a la que aparece el primer pelo radical en manitol 300mM. Los resultados estadísticos muestran que en el ecotipo Sg-2 aparece más lejos el primer pelo que en Col-0 y los ecotipos Bu-5, Cvi-0 y Sha-1 son estadísticamente iguales al ecotipo Col-0

**Tabla 5.** Se muestra el porcentaje de disminución del número de células y del tamaño en el RAM y sus diferentes dominios bajo el tratamiento con manitol 300mM respecto a sus condiciones control. Además, se puede ver el porcentaje de disminución en los tamaños críticos de las células al transitar de PD a TD, y de TD a ZE, la distancia del CQ al primer pelo y el tamaño de las células completamente alargadas en manitol con respecto a las condiciones control en MS. Cada color representa un ecotipo y están ordenados de los más afectados (hasta arriba) a aquellos menos afectados (hasta abajo) Los datos con asterisco indican un aumento en el parámetro medido bajo condiciones de estrés.

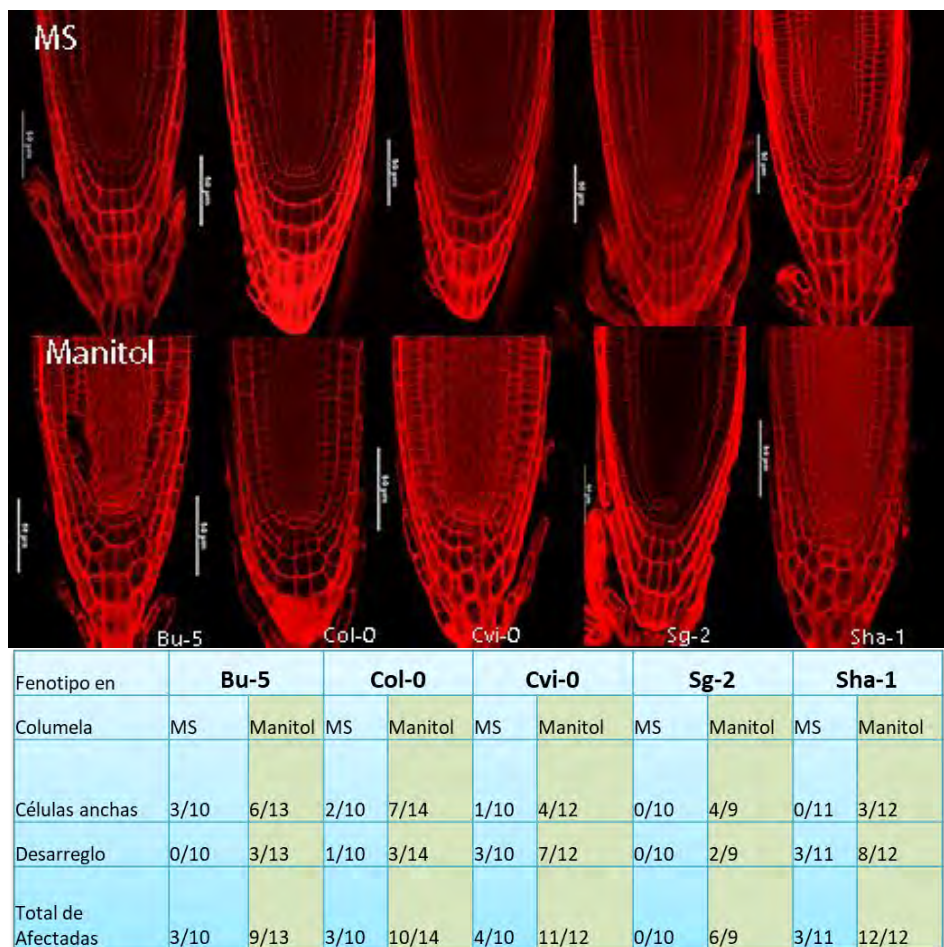
Ecotipos	Número de células en el RAM	Tamaño del RAM	Número de células en el PD	Tamaño del PD	Número de células en el TD	Tamaño del TD	Tamaño crítico PD-TD	Tamaño crítico TD-EZ	Distancia del QC al primer pelo	Tamaño de las células completamente alargadas
Cvi-0	47.26	68.1%	54.25%	64.4%	21.1%	71.3%	29.6%	71.0%	40.7%	18.8%
Col-0	44.20	66.9%	53.64%	61.4%	6.7%	70.9%	27.8%	70.6%	40.0%	12.6%
Sha-1	45.33	55.4%	51.50%	53.5%	4.7%	58.2%	26.9%	69.9%	29.9%	9.8%
Sg-2	38.11	54.4%	48.29%	51.8%	*2.9%	57.4%	*2.6%	63.2%	29.4%	7.3%
Bu-5	33.52	48.7%	42.42%	49.8%	*7.4%	45.7%	*5.7%	55.5%	28.7%	5.1%



**Figura 23.** Cuantificaciones celulares de la raíz primaria de plántulas creciendo en manitol 300mM a) Longitud máxima alcanzada por las células que salen del dominio de proliferación, b) Longitud máxima de las células que salen del dominio de transición, c) Tamaño de las células completamente alargadas y d) Número de célula, a partir del CQ, en donde aparece el primer pelo radicular. Se hizo una prueba T de tipo Mann Whitney para llevar a cabo los análisis estadísticos y los asteriscos sin barras indican diferencia significativa respecto a Col-0; por otro lado, las diferencias entre los otros ecotipos están señaladas con una barra que une los ecotipos comparados.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) la longitud de las barras en cada gráfico indica los valores mínimos y máximos de la muestra.  $n =$  indicada en la figura 20

### 6.4.2. Análisis de microscopía confocal

Debido a que se disminuía el número de células en el meristemo en nuestras condiciones de estrés probadas en este trabajo y a que el tamaño del RAM se puede alterar por el número de células que entran al dominio de proliferación, decidimos analizar la morfología del NCT en nuestras condiciones de estrés.

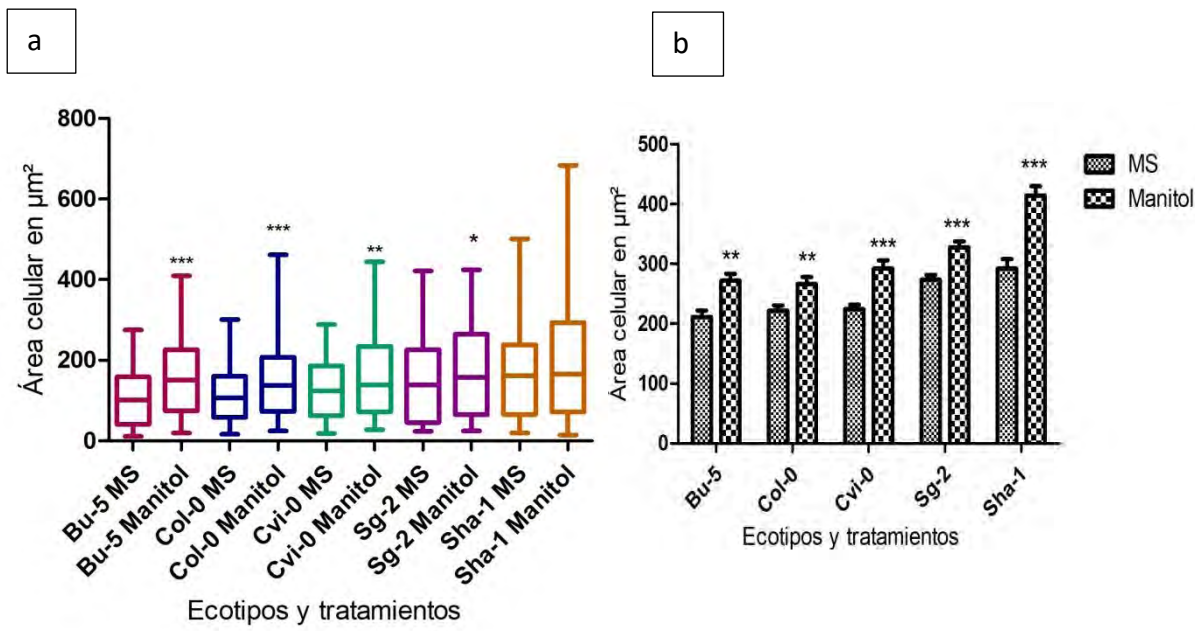


**Figura 32.** a) Fotografías de microscopía confocal de las puntas de la raíz de los 5 ecotipos utilizados en este trabajo en condiciones control y en manitol 300mM. b) Cuantificaciones de diferentes parámetros de las células de la columela, el numerador indica el número de raíces en donde se observa el fenotipo y el denominador el número de raíces analizadas.



Como se puede ver en la Figura 32, todos los ecotipos mostraron diferencias fenotípicas en cuanto a la organización y la forma de las células de la columela comparando el tratamiento con estrés con condiciones control. También se puede ver que las células diferenciadas de la columela de las plantas control son rectangulares, alargadas y uniformes; en cambio, las células de la columela crecidas en condiciones de estrés osmótico se ven más anchas y, en algunos casos, con desarreglos evidentes. Para confirmar lo observado cualitativamente, se midieron las áreas celulares de cada fila de la columela para todos los ecotipos en ambos tratamientos (ver Figura 33).

Debido a la dificultad en analizar las filas de células de la columela en condiciones de estrés osmótico, se realizó una prueba estadística de Bartlett a las poblaciones celulares de cada ecotipo para comprobar si tenían realmente la misma varianza entre ellas. El resultado de todas las comparaciones de varianzas de Bartlett realizadas fueron positivos; es decir, la varianza de las áreas celulares de la columela en las raíces con manitol fue mayor a la varianza del área celular de células de columela en MS para casi todos los ecotipos, excepto para Sg-2 que tuvo varianzas casi idénticas en ambos tratamientos. También se realizó una prueba de comparación de medias no paramétrica de Mann Whithney para comprobar que las células de la columela bajo estrés por manitol tiene áreas mayores que las células de la columela en MS, porque la distribución de los datos obtenidos de áreas celulares se comportaban de manera no-normal según la prueba de Bartlett. Los resultados que fueron significativamente diferentes se muestran con asteriscos en las gráficas de la Figura 33. Finalmente, se hizo un análisis por filas y vimos que, en la fila 5 de la columela, el aumento de área celular fue estadísticamente significativo para todos los ecotipos (Figura 33b).



**Figura 33.** a) Gráfico que muestra el área de las células de todas las filas de la columela para cada ecotipo en condiciones control y estrés osmótico con manitol 300mM. b) Áreas celulares de la quinta fila de la columela de cada ecotipo. Para llevar a cabo el análisis estadístico, se llevo a cabo una prueba de Bartlett y los asteriscos representan diferencias en las comparaciones de medias ANOVA de una vía  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)).

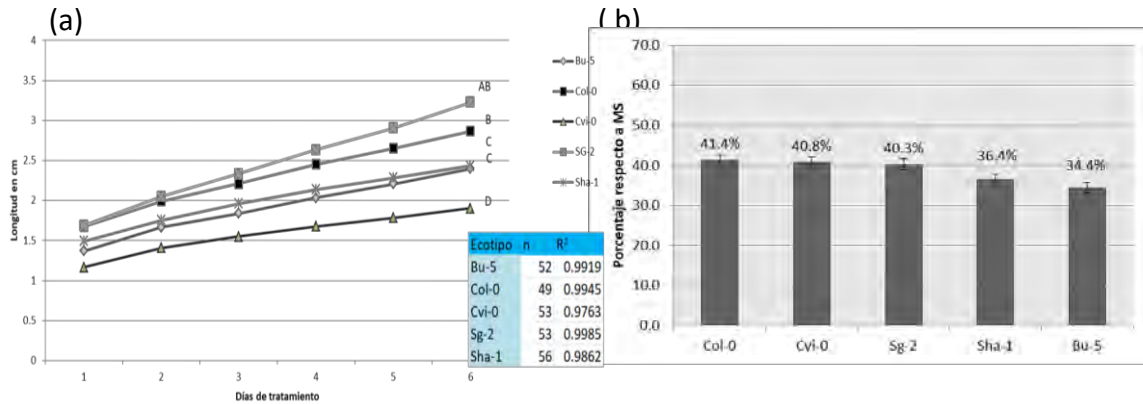
En cuanto a la organización y tamaño de las células de la columela en condiciones de estrés por manitol, se observaron diferencias estructurales en todos los ecotipos, ya sea un aumento en el área celular de la columela o una desorganización de las filas que la conforman. Este dato nos parece muy interesante porque la estructura del ápice de la raíz está delimitada por factores físicos y químicos que regulan la proliferación y diferenciación celular (Barrio *et al* 2013) por lo que es probable que el cambio en la organización de la misma se deba a presiones mecánico-elásticas como consecuencia del estrés osmótico del medio (Uyttewaal *et al.*, 2012). Sin embargo, hace falta más investigación al respecto pues lo presentado en esta tesis es solo un primer acercamiento de los efectos del estrés osmótico sobre la estructura de las células de la columela.

Los ecotipos Cvi-0 y Sg-2 mostraron diferentes estrategias para contender ante el estrés osmótico por manitol, sin embargo provienen de lugares con condiciones ambientales muy diferentes.

## 6.5. Respuesta de la raíz ante estrés por NaCl

Se realizaron análisis de cinética de crecimiento para evaluar el desempeño radical de los ecotipos en medio de cultivo adicionado con NaCl 100mM (Figura 15a). Al igual que lo que observamos en el tratamiento con manitol 300mM, el ecotipo Sg-2 obtuvo la mayor longitud radical mientras que el ecotipo Cvi-0 presentó una longitud radical significativamente menor al resto de los ecotipos en estas condiciones de estrés. Las longitudes alcanzadas en este tratamiento fueron aún menores que con el tratamiento de manitol 300mM debido al estrés generado por los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (ver apartado de Selección de Ecotipos a utilizar). Para observar el impacto del tratamiento por NaCl en las plantas, también se analizaron los porcentajes de crecimiento de la raíz primaria respecto a su longitud en condiciones control sin estrés (Figura 15b). En este caso, se afectó el crecimiento de la longitud de la raíz de manera muy similar en los ecotipos Col-0, Cvi-0 y Sg-2 (los dos últimos habían sido reportado como sensibles a NaCl 500mM en plantas adultas (Katori *et al.*, 2010). Por otro lado, el ecotipo en donde se afecta más el crecimiento de la raíz primaria cuando se crece en NaCl, es Bu-5, que estaba reportado por el mismo estudio de Katori *et al.* (2010) como uno de los ecotipos tolerantes a estrés provocado por NaCl.

En la Figura 16 se muestra una fotografía con los fenotipos representativos de los diferentes ecotipos sometidos al tratamiento de estrés salino/osmótico con NaCl 100mM. Se puede ver que hay una drástica reducción del tamaño de la raíz primaria respecto al crecimiento observado en el tratamiento control (comparar con la Figura 10). Curiosamente, el ecotipo en donde se afecta más el crecimiento de la raíz primaria en medio con NaCl 100mM fue Bu-5 (uno de los 5 ecotipos reportados que resisten 500mM de NaCl). Se puede ver en la Figura 16 que este estrés afecta, además, el crecimiento de raíces laterales y la viabilidad de las hojas del ecotipo Cvi-0.



**Figura 15.** a) Cinéticas de crecimiento de plántulas de 5 días transferidas por 6 días a medio adicionado con NaCl 100mM. Se utilizó ANOVA con una  $P < 0.001$ . En el recuadro de la derecha abajo se marca el número de plantas utilizadas para cada ecotipo. b) Porcentaje de crecimiento de la raíz de cada ecotipo en medio adicionado con manitol 300mM respecto a su crecimiento en condiciones control, producto del promedio de una n experimental mencionada en el recuadro de a) y con barras de error.

Por otro lado, la raíz en donde se afectó menos el crecimiento de la raíz primaria por el tratamiento con NaCl fue la de Col-0 que presenta raíces laterales al igual que el ecotipo Sg-2. Finalmente, tanto Sg2 como Bu-5 mantuvieron hojas verdes hasta el final del tratamiento (ver Figura 16).

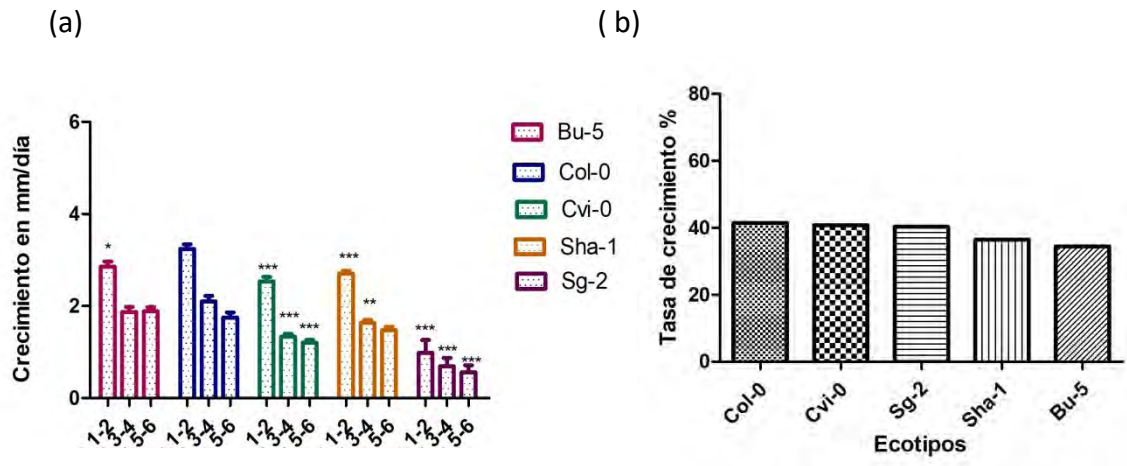
En general, el tratamiento con estrés iónico-osmótico provocó tanto un enroscamiento en los cotiledones como en las primeras hojas verdaderas así como una pérdida de coloración verde que varía dependiendo de la sensibilidad de los ecotipos.



**Figura 16.** Fenotipos observados en las plántulas de los ecotipos crecidos en medio de cultivo adicionado con NaCl 100mM. Las plántulas se crecieron por 5 días en condiciones control y se transfirieron 6 días al tratamiento de estrés.

Al evaluar cómo se afecta la tasa de crecimiento bajo el tratamiento con NaCl, encontramos que existe una tendencia a la disminución conforme avanza el tratamiento (ver Figura 17a). Se puede observar en esta gráfica también que el ecotipo Sg-2 tiene un valor significativamente superior de crecimiento en mm/día en las 3 mediciones respecto a Col-0, e incluso presenta una ligera pero significativa recuperación del día 5 al día 6 de tratamiento. Por el contrario Cvi-0 y Sha-1 mostraron valores significativamente menores que Col-0 en su tasa de crecimiento diario. Finalmente, el comportamiento de Bu-5 fue muy parecido al del Col-0 en las tres mediciones.

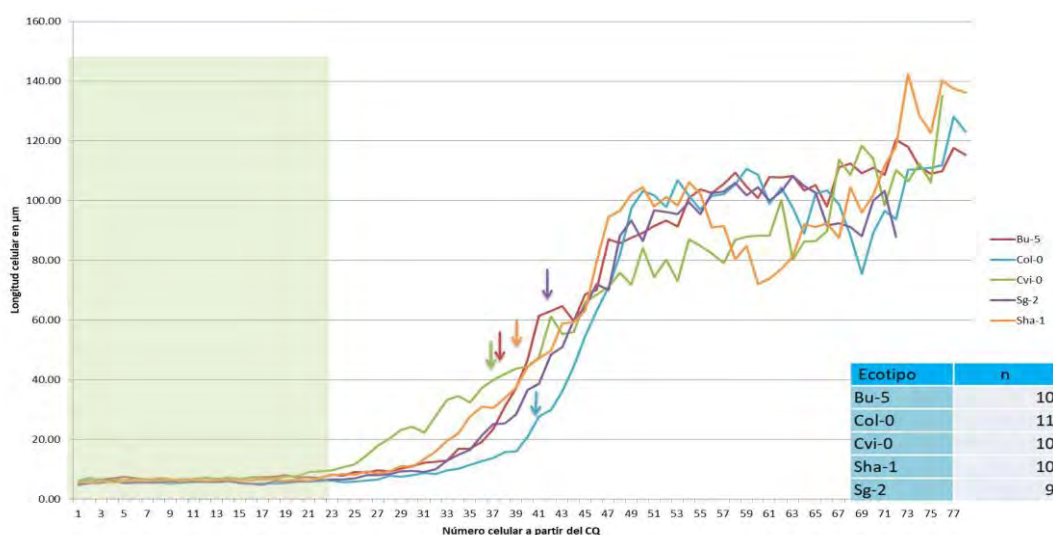
Cuando se compararon los valores del crecimiento diario en NaCl respecto a lo obtenido en condiciones control para cada ecotipo, se encontró algo que concuerda con lo dicho anteriormente y es que la velocidad de crecimiento de la raíz de Sg-2 se afectó menos que el resto de los ecotipos (a pesar de haber disminuido cerca de un 80%). Finalmente, el ecotipo más afectado fue Sha-1 (ver figura 17b).



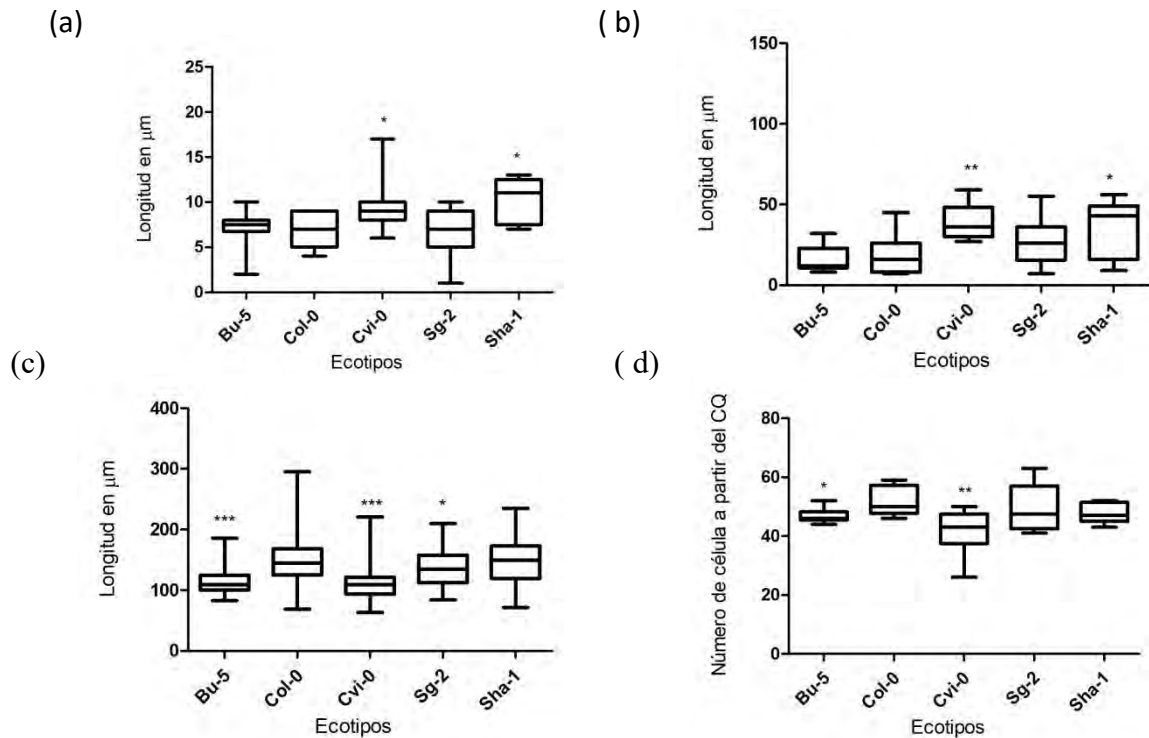
**Figura 17.** a) Tasa de crecimiento de la raíz primaria en mm/día. Se utilizó una ANOVA para los análisis estadísticos con una  $P < 0.001$  (\*\*\*),  $P < 0.01$  (\*\*) y  $P < 0.05$  (\*) respecto a Col-0. b) Porcentaje de la tasa de crecimiento en medio MS adicionado con manitol comparada con los valores obtenidos en condiciones control del día 5 al día 6 de tratamiento.

### 6.5.1. Respuesta de la raíz ante estrés por NaCl a nivel microscópico

En la Figura 24 podemos observar la cinética de las longitudes celulares de las plantas de los diferentes ecotipos crecidas en condiciones de estrés iónico-osmótico. En la parte sombreada de color rosa está señalado el dominio de proliferación y, con flechas, se indica el final del dominio de transición y del RAM. Como se puede ver en la Figura 24, el cambio del RAM a la Zona de Elongación, es prematuro con respecto a lo que se observó en condiciones control (comparar con Figura 18) indicándonos que el meristemo es más pequeño en estas condiciones de estrés. También es interesante notar que la variación en el número de células del RAM es muy poca entre ecotipos y dentro de cada uno de ellos (ver Figuras 24 y Suplementaria 10a). Por otro lado, sí hay variaciones en cuanto a las longitudes máximas alcanzaron por las células del cortex en las diferentes etapas de desarrollo, el tamaño máximo que alcanzan las células al salir del PD al TD principalmente de los ecotipos Sha-1 y Cvi-0. También se puede ver que los ecotipos Bu-5, Sg-2 y Col-0, son esencialmente iguales entre sí (ver Figura 25a).



**Figura 24.** Longitudes celulares de la fila de células del cortex a partir del CQ bajo el tratamiento con NaCl 100mM. La zona verde marca el dominio de proliferación y el final del dominio de transición está marcado con flechas de diferente color para los diferentes ecotipos.



**Figura 25.** Cuantificaciones celulares de la raíz primaria de plántulas creciendo en NaCl 100mM a) Longitud máxima alcanzada por las células que salen del dominio de proliferación, b) Longitud máxima de las células que salen del dominio de transición, c) Tamaño de las células completamente alargadas y d) Número de célula, a partir del CQ, en donde aparece el primer pelo radicular. Se hizo una prueba T de tipo Mann Whitney para llevar a cabo los análisis estadísticos y los asteriscos sin barras indican diferencia significativa respecto a Col-0; por otro lado, las diferencias entre los otros ecotipos están señaladas con una barra que une los ecotipos comparados.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) la longitud de las barras en cada gráfico indica los valores mínimos y máximos de la muestra.  $n =$  indicada en la figura 24

Como se puede ver en la Figura 25, los ecotipos Cvi-0 y Sha-0 presentan longitudes celulares mayores que Col-0 cuando transitan a la Zona de Elongación (ver Figura 25b). Por otro lado, la longitud de las células diferenciadas es menor en los ecotipos Cvi-0, Bu-5 y Sg-2 que en Col-0 y Sha-1 (ver Figura 25c). En la Figura 25d vemos que la distancia a partir del CQ de la célula que presenta el primer pelo es menor en estrés por NaCl que en condiciones control para los 5 ecotipos (comparar con Figura 19c). Hay que destacar que la célula en donde se presenta el primer pelo está más cerca del RAM en el ecotipo Cvi-0 y Bu-5 y es estadísticamente igual entre los ecotipos Col-0, Sg-2, y Sha-1.

Al igual que en condiciones de estrés por manitol (Tabla 5) y para poder comparar con facilidad el cambio en los diferentes parámetros medidos en condiciones control y en el



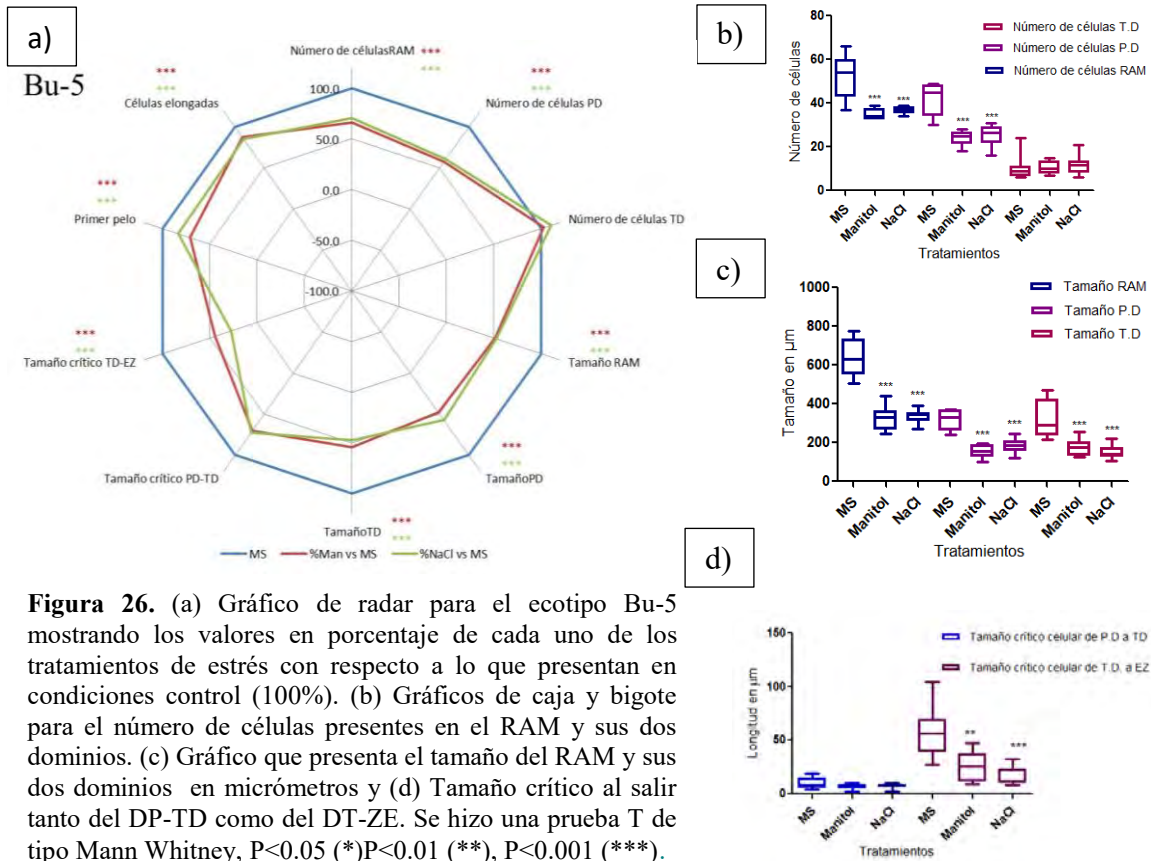
tratamiento con NaCl 100mM, se realizó una comparación porcentual de la disminución en tamaño y número de células respecto a los datos obtenidos en condiciones control (ver Tabla 6).

**Tabla 6.** Porcentaje de disminución del número de células y del tamaño en el RAM y sus diferentes dominios bajo el tratamiento con NaCl 100mM respecto a sus condiciones control. Además, se puede ver el porcentaje de disminución en los tamaños críticos de las células al transitar de PD a TD y de TD a ZE, la distancia del CQ al primer pelo y el tamaño de las células completamente alargadas en manitol con respecto a las condiciones control en MS. En cada una de las filas, los ecotipos están ordenados de aquellos en donde se afectó más el parámetro con respecto a lo sucedido en condiciones control (hasta arriba) a aquellos menos afectados (hasta abajo) Los datos con asterisco indican un aumento en el parámetro medido bajo condiciones de estrés.

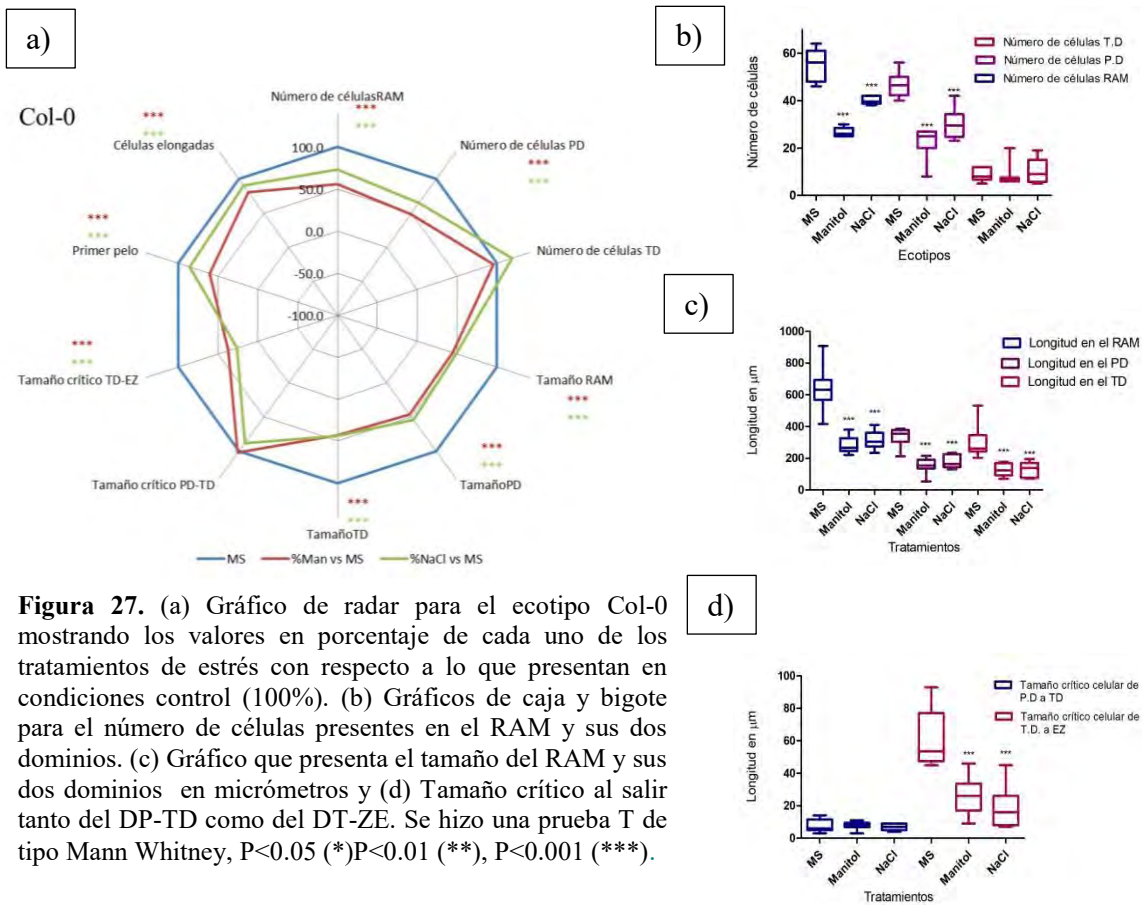
Ecotipos	Número de células en el RAM	Tamaño del RAM	Número de células en el PD.	Tamaño del PD.	Número de células en el TD.	Tamaño del TD.	Tamaño crítico PD-TD	Tamaño crítico TD-EZ	Distancia del QC al primer pelo	Tamaño de las células completamente alargadas
Sha-1	31.8%	52.9%	42.4%	50.8%	27.6%	58.1%	27.6%	73.6%	28.0%	14.6%
Sg-2	33.1%	50.9%	39.6%	46.0%	18.9%	56.3%	18.7%	72.5%	22.2%	11.3%
Bu-5	29.7%	47.5%	35.2%	42.4%	*10.7%	52.6%	11.5%	62.8%	18.2%	11.3%
Col-0	26.8%	44.4%	34.8%	38.5%	*18.4%	49.0%	*21.3%	42.4%	16.7%	9.8%
Cvi-0	24.2%	33.1%	22.9%	18.4%	*18.6%	45.3%	*27.8%	27.5%	14.7%	5.1%

Finalmente, y para facilitar la comparación entre todos los parámetros celulares que fueron medidos en la raíz primaria de plántulas crecidas en las diferentes condiciones de crecimiento, se llevaron a cabo gráficos de radar para cada uno de los ecotipos comparando los dos tratamientos probados en este estudio con los datos obtenidos en condiciones control (100% serían los valores en MS0.2X). Para resaltar algunos de los parámetros obtenidos, se incluyeron tres gráficos que expresan el número de células presentes en el RAM y en cada uno de sus dominios, así como el tamaño de estos y la longitud máxima (o tamaño crítico) que alcanzan sus células al salir de cada dominio; del PD al TD y del TD a la ZE.

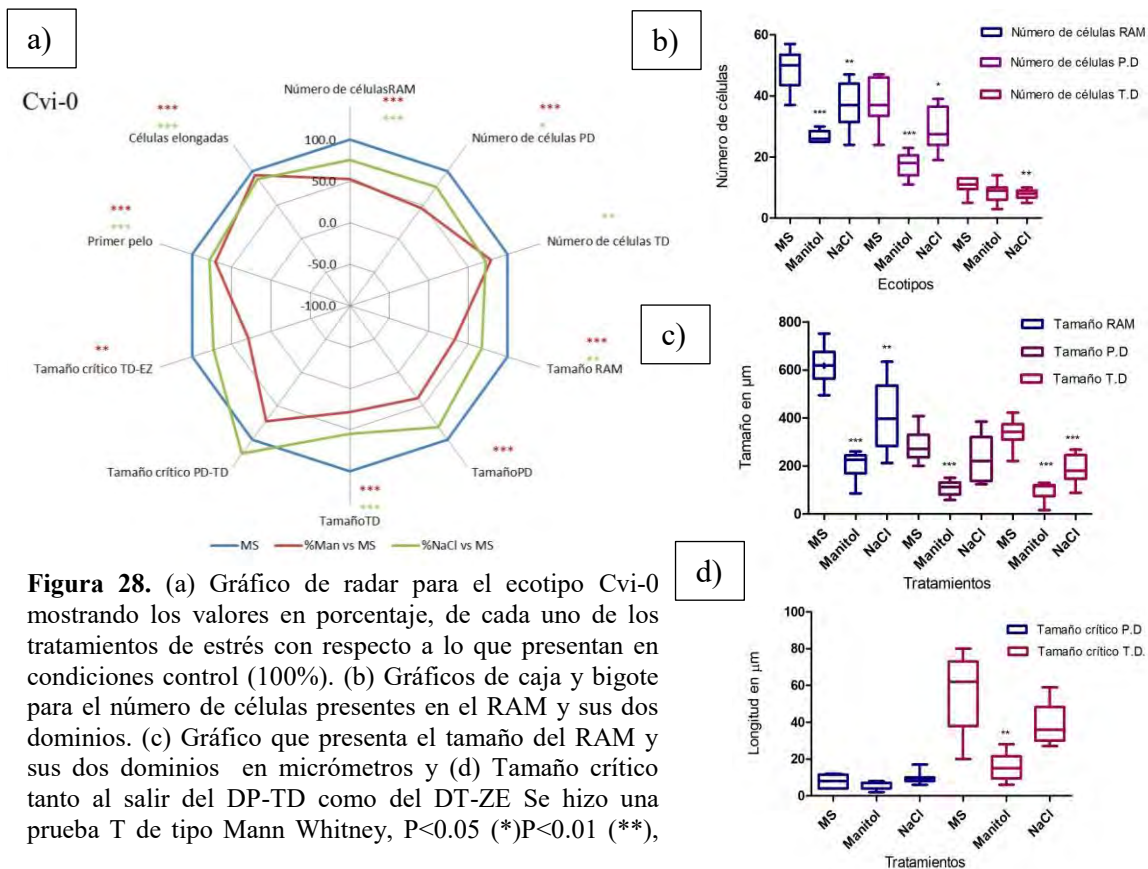
## 6.6. Análisis de los 3 tratamientos para cada ecotipo



Como se puede ver en la Figura 26, existe una disminución significativa del número de células del RAM que se explica por la disminución que se ve en el dominio de proliferación para el caso del ecotipo Bu-5. Por otro lado, el dominio de transición se mantuvo con la misma cantidad de células tanto en condiciones de estrés como en control. Todos los demás parámetros se modificaron por estrés y cabe resaltar que, como se puede ver claramente en la Figura 26, son muy parecidas la respuesta bajo estrés por NaCl y estrés por manitol a pesar de que el crecimiento total de la raíz se afecta diferencialmente en estas dos condiciones de estrés. En manitol se afecta drásticamente el crecimiento de la raíz primaria (Tabla 5) mientras que en NaCl no es tan drástico el efecto (Tabla 6).



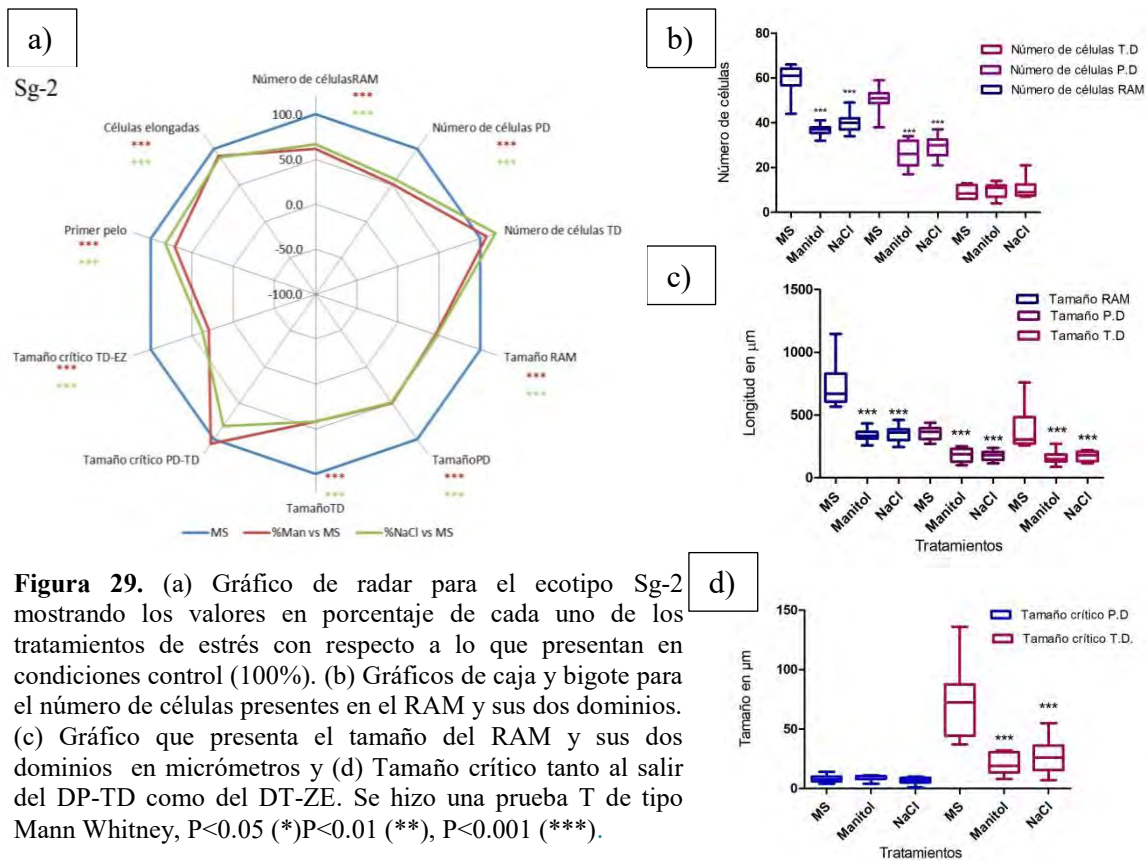
En Col-0 (nuestro ecotipo de referencia) se ve un efecto más fuerte cuando crece en condiciones de estrés osmótico si lo comparamos con el estrés iónico-osmótico sugiriendo que este ecotipo podría tener algún tipo de regulación de NaCl que no conocemos. En este ecotipo no cambiaron fueron el número de células en el dominio de transición y el tamaño crítico de las células cuando transita de PD a TD con respecto a las raíces medidas en condiciones control, pero el tamaño de los dominios del RAM disminuyó alrededor de un 50% en los dos tratamientos estresantes.



El ecotipo Cvi-0 crece en condiciones naturales en un ambiente con poca precipitación y alta temperatura, pero con una humedad relativa alta. De manera interesante vimos que es el ecotipo en donde se afectó menos la longitud de la raíz primaria bajo estrés por manitol. En cuanto al metistemo, su desarrollo se afectó más que el ecotipo Col-0 por el tratamiento con manitol 300mM y se observó una diferencia en algunos parámetros como el tamaño de los dominios del meristemo y longitudes críticas celulares cuando se compara con los parámetros obtenidos en el tratamiento con NaCl 100mM. A diferencia de los dos ecotipos anteriores, la raíz primaria del ecotipo Cvi-0 estuvo significativamente menos afectada en casi todos los parámetros celulares (excepto tres) cuando se sometió a un estrés iónico-osmótico que cuando se pone en presencia de manitol (Figura 28). Por otro lado, Cvi-0 fue el ecotipo en donde inhibió más significativamente el número de células en el RAM y en el dominio de proliferación cuando creció en manitol (Tabla 5). Consecuentemente con su respuesta fenotípica y en relación al crecimiento de la raíz primaria en estrés iónico-

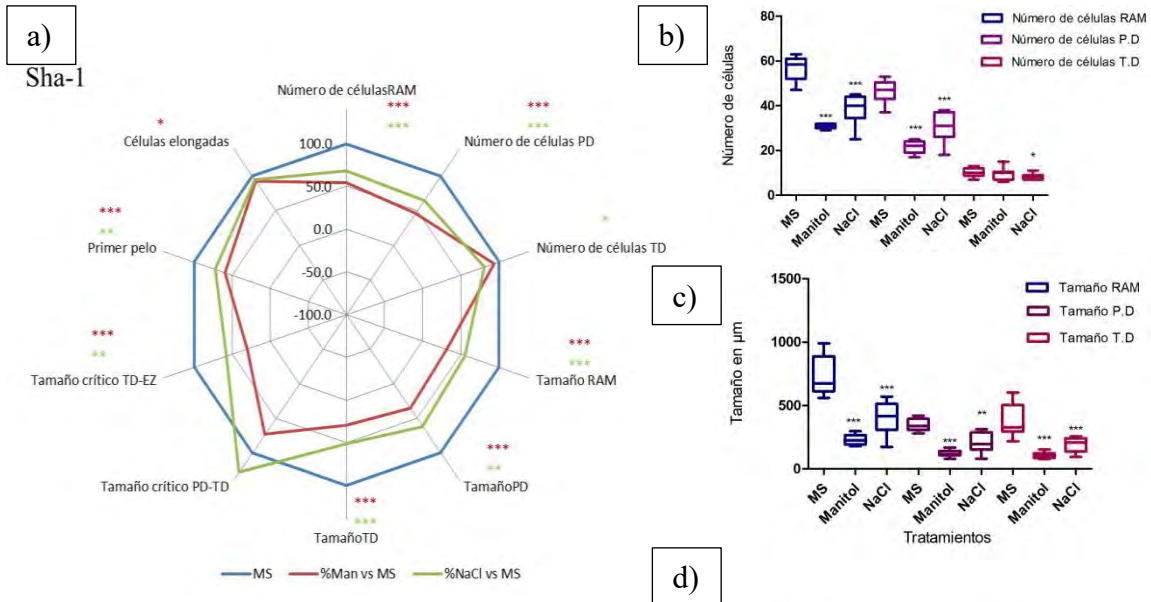
osmótico con NaCl 100mM (Figura 15b), se observó menor efecto en el número de células en el RAM y en el dominio de proliferación (Tabla 6).

Este ecotipo es el segundo menos afectado en longitud total y tasa de crecimiento en NaCl 100mM. Por otro lado, y en concordancia con lo anterior, es el ecotipo en el que menos se afecta el tamaño y longitud de las células del RAM en éstas condiciones de estrés.



**Figura 29.** (a) Gráfico de radar para el ecotipo Sg-2 mostrando los valores en porcentaje de cada uno de los tratamientos de estrés con respecto a lo que presentan en condiciones control (100%). (b) Gráficos de caja y bigote para el número de células presentes en el RAM y sus dos dominios. (c) Gráfico que presenta el tamaño del RAM y sus dos dominios en micrómetros y (d) Tamaño crítico tanto al salir del DP-TD como del DT-ZE. Se hizo una prueba T de tipo Mann Whitney,  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Los datos del ecotipo Sg-2 mostraron que los parámetros celulares se afectaron de manera similar cuando las plántulas crecieron en NaCl y manitol (ver Figura 29). En ambas condiciones de estrés hubo un efecto tanto el número de células en el RAM como en el dominio de proliferación. Es interesante notar que, en NaCl, fue el ecotipo en donde hubo un efecto másnotorio en el número de células en el RAM y el tamaño de sus dominios. Al igual que con el resto de los ecotipos, no se vio el efecto en el tamaño crítico celular al salir del dominio de proliferación, pero si al salir del dominio de transición.



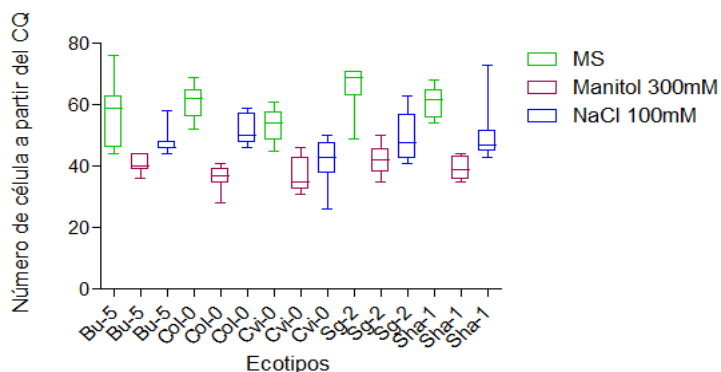
**Figura 30.** (a) Gráfico de radar para el ecotipo Sha-1 mostrando los valores en porcentaje de cada uno de los tratamientos de estrés con respecto a lo que presentan en condiciones control (100%). (b) Gráficos de caja y bigote para el número de células presentes en el RAM y sus dos dominios. (c) Gráfico que presenta el tamaño del RAM y sus dos dominios en micrómetros y (d) Tamaño crítico tanto al salir del DP-TD como del DT-ZE. Se hizo una prueba T de tipo Mann Whitney,  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Encontramos que, en el ecotipo Sha-1, el número de células en el RAM y en el dominio de proliferación disminuyeron significativamente con ambos tipos de estrés, pero en mayor medida bajo estrés por manitol (Tabla 5). En cuanto al tamaño del RAM y sus dominios, se puede ver que este ecotipo, junto con Cvi-0, fueron los ecotipos que menos se afectaron con el tratamiento por NaCl. Por otro lado, el tamaño máximo alcanzado por las células al salir del TD se afectó significativamente, pero en mayor medida por el estrés causado por el manitol, el ecotipo Sha-1 es el que menos disminución tuvo de sus células totalmente alargadas y diferenciadas (Figura 30).

En las secciones b, c y d de las figuras 26, 27, 28, 29 y 30 figuras están los gráficos de caja y bigote para el tamaño y número de células en el RAM y en sus dos dominios y el tamaño crítico tanto al salir del DP-TD como del DT-ZE. Esto nos ayuda a observar la variación y plasticidad en cada uno de éstos parámetros en la respuesta de cada uno de los ecotipos antes dos factores de estrés. Se puede sugerir que el tratamiento con manitol 300mM de 24h afectó en mayor medida el número de células y la longitud en  $\mu\text{m}$  del RAM que el tratamiento con NaCl 100mM para los ecotipos Col-0, Cvi-0 y Sha-1 y no hubo diferencia con los dos tratamientos en los ecotipos Bu-5 y en Sg-2.

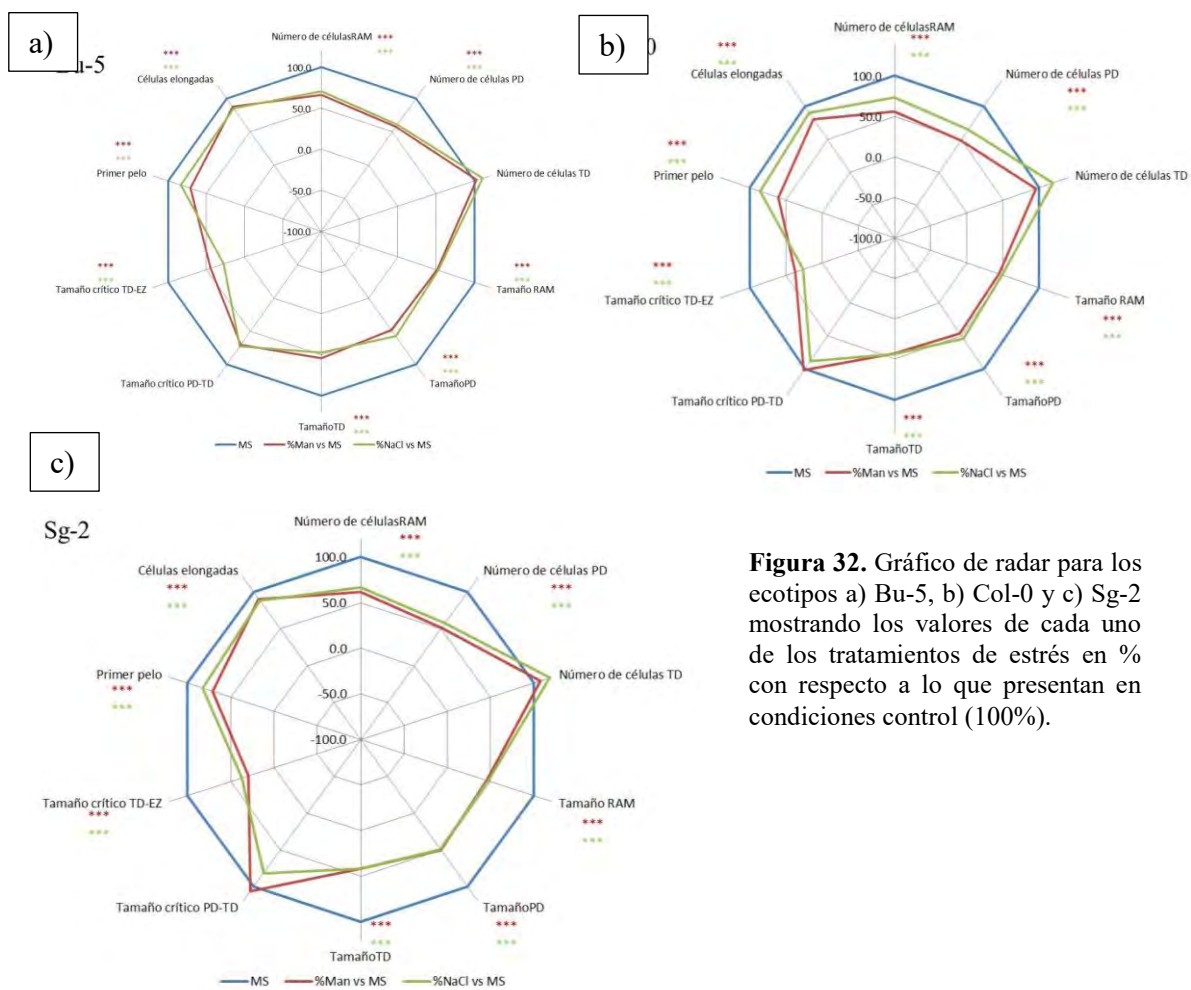
También se pudo observar que no importa si el tratamiento de estrés se da con manitol o con NaCl, los tamaños críticos de las células del PD no fueron significativamente diferentes con respecto a sus tamaños presentados en las células del tratamiento control, sugiriendo estos resultados que puede haber un mecanismo muy robusto en el tamaño de las células o que ya son tan pequeñas que no se pueden acortar más, estas van de  $5\mu\text{m}$  a  $10\mu\text{m}$ .

Por otro lado, en la figura 31 mostramos que el primer pelo radical apareció siempre más cerca del CQ en ambas condiciones de estrés y, lo hizo aún más cerca cuando las plantas se crecieron en estrés por manitol. Esto probablemente se debe a presiones mecánicas y/o fisiológicas que se dan con éste estrés osmótico tan fuerte y que obligan a las células de la epidermis a sacar pelos radicales aún sin que esto necesariamente indique diferenciación.



**Figura 31.** Gráfico que ilustra el número de la célula epidérmica a partir del CQ en la que aparece el primer pelo de la epidermis. En verde se muestran las medidas correspondientes al tratamiento en MS0.2X; en rosa las correspondientes a someter a las plántulas a un estrés por manitol y en azul las mediciones obtenidas cuando se crecen las plántulas en NaCl.

Finalmente notamos que hay un patrón similar en los ecotipos provenientes de Alemania Bu-5, Col-0 y Sg-2, en cuanto a cómo se afectan los parámetros del meristemo bajo condiciones de estrés iónico-osmótico y osmótico (ver Figura 32). Cabe decir que, las condiciones climáticas en las que crecen estos tres ecotipos, son muy similares en temperatura y humedad relativa. (Tabla 3).



**Figura 32.** Gráfico de radar para los ecotipos a) Bu-5, b) Col-0 y c) Sg-2 mostrando los valores de cada uno de los tratamientos de estrés en % con respecto a lo que presentan en condiciones control (100%).



## 6.7. Analisis de la expresión genética por qPCR.

Para tener una correlación entre los fenotipos observados en respuesta a condiciones de estrés, se midió la expresión relativa de diferentes genes que están implicados en la respuesta a estrés osmótico. Como se puede ver en las Figuras 34a y b, hay un aumento considerable en la expresión de dos genes que codifican para proteínas LEA (COR15A y LEA4-5) bajo ambos tipos de estrés en raíces del ecotipo Col-0. La expresión de estos genes no se había visto anteriormente en raíces y es interesante que sea igualmente alta tanto en la parte aérea de la plántula como en la raíz.

Se ha reportado que COR15A se inducía considerablemente en estrés por frío, ABA exógeno y estrés osmótico (Wilhem y Tomashow 1993). En este trabajo demostramos que el transcrito de COR15A se acumula 40 veces más bajo estrés osmótico dado por manitol 300mM y 6 veces cuando se aplicó un estrés con NaCl que comparada con la expresión en plantas crecidas en condiciones control.

Cuando analizamos la expresión del gen que codifica para la proteína LEA4-5 también observamos que ocurre un aumento drástico en los niveles de expresión con ambos factores de estrés. En condiciones control la expresión es cercana a cero y en las plantas con estrés por manitol fue 13 veces mayor mientras que fue 8 veces mayor bajo estrés por NaCl.

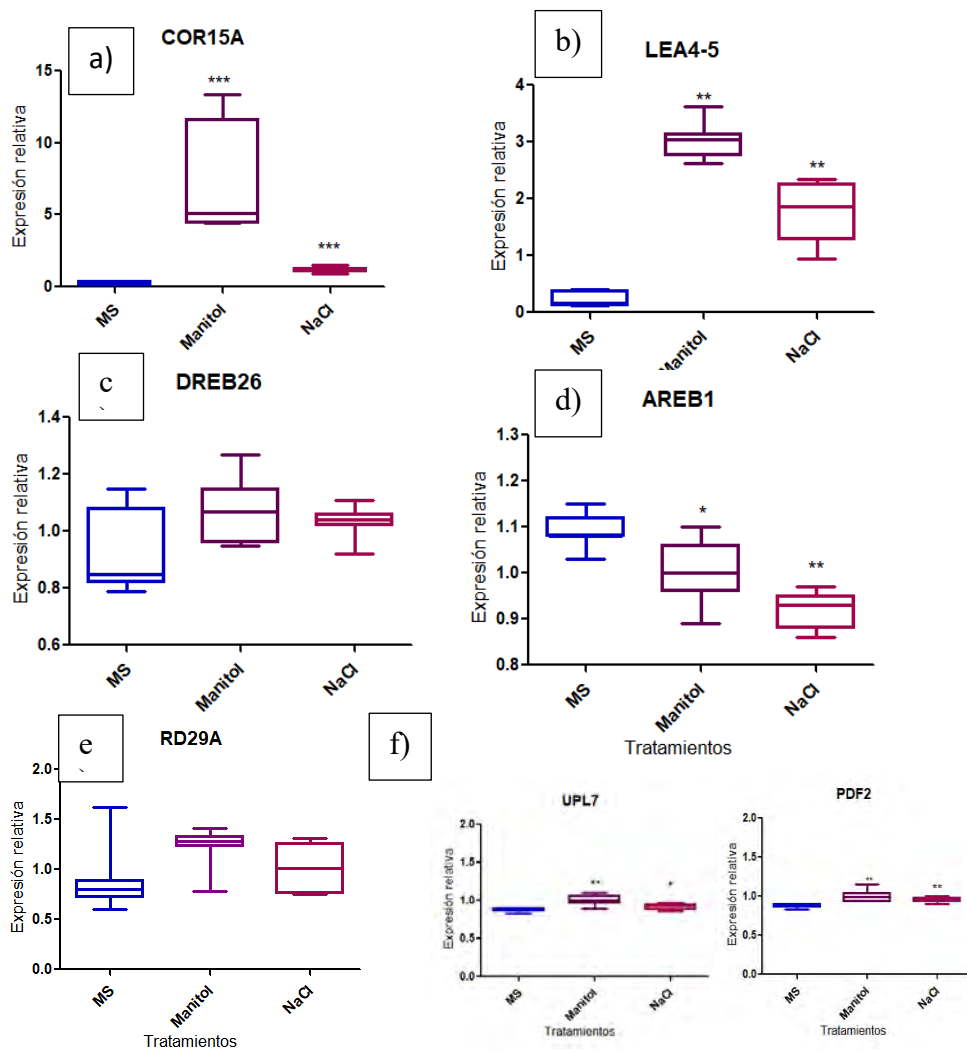
De manera contraintuitiva encontramos que el nivel del transcrito del factor transcripcional AREB1 disminuyó en la raíz de las plantas sometidas a estrés, un 7.6% y 15% para manitol y NaCl respectivamente (ver Figura 34d). Esperábamos una alta expresión de este gen debido a que se sabe que el estrés por NaCl y por manitol provocan acumulación de ABA y este es un gen que responde a ABA. Sin embargo, también está reportado que AREB1 es reprimido por el factor de transcripción AtNAP, (gen de la familia NAC), que es expresado en raíces de plántulas tratadas bajo estrés por lo que la baja expresión que encontramos podría deberse a la represión causada por este FT (Seok *et al.*, 2016).

También vimos la expresión relativa de DREB26, otro gen que se sabe se induce bajo condiciones de estrés osmótico. En la Figura 34c podemos observar que la expresión de este gen aumentó un 17% en el tratamiento con manitol 300Mm y un 12% en el tratamiento con NaCl.

Por último, la expresión de RD29A aumenta en un 37% bajo el tratamiento por manitol y un 12% bajo estrés por NaCl.

Por datos encontrados en la literatura, se esperaba que la expresión de DREB26 y de RD29A aumentara bajo las condiciones de estrés utilizadas en este trabajo. Curiosamente, el aumento que observamos no fue estadísticamente significativo y esto se podría deber a una serie de razones, al tiempo en el que fue medida la expresión, al tejido utilizado o al momento de desarrollo de las raíces. Para poder contestar esto, habría que hacer experimentos en diferentes condiciones de crecimiento y en plántulas en distintos momentos de su desarrollo.

Finalmente, nos pareció interesante ver los polimorfismos de estos genes en los ecotipos probados en este trabajo. Tanto COR-15 como LEA4-5 tienen una tasa de polimorfismos baja en los ecotipos aquí analizados, no existen polimorfismos que modifiquen aminoácidos en los exones de COR15, y hay un polimorfismo en la secuencia codificante de LEA4-5 para el aminoácido serina en el ecotipo Sg-2. Por otro lado, el gen de AREB1 presenta al menos un polimorfismo en todos los ecotipos; en Bu-5, Cvi-0, Sg-2 y Sha-1 existe la misma sustitución de metionina, el ecotipo Cvi-0 tiene una sustitución de valina además del cambio mencionado y el ecotipo Sha-1 una tirosina. En el caso de DREB26 solo hay un polimorfismo de leucina en la secuencia de Cvi-0. Finalmente, RD29A es el gen más polimórfico, los ecotipos Bu-5, Cvi-0, Sg-2 y Sha-1 presentan un polimorfismo de leucina en común, además de este cambio, Sha-1 tiene una modificación en alanina, Bu-5 presenta dos polimorfismos extra, en ácido aspártico y serina, el ecotipo Sg-2 presenta tres polimorfismos extra en asparagina, ácido glutámico e isoleucina. Todos estos cambios suceden en la región codificante del gen.



**Figura 34.** Expresión relativa de varios genes en las raíces de plantas del ecotipo Col-0 crecidas en condiciones control (MS0.2X), con 300mM de manitol y con 100mM de NaCl. (a) COR15-A; (b) LEA4-5, (c) DREB26, (d) AREB1 y (e) RD29A. (f) Normalizadores usados en este estudio. Se realizó una prueba T de tipo Mann Whitney,  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

## 7. Conclusiones

- El tamaño del RAM y sus dominios disminuyen significativamente en todos los ecotipos probados en este trabajo en ambas condiciones de estrés, cuando se comparan con el control.
- La diferenciación celular de la epidemis ocurre más cerca del meristemo bajo ambos tratamientos estresantes en todos los ecotipos.
- El estrés osmótico por manitol 300mM provoca más daños al RAM que el estrés por NaCl 100mM.
- El estrés iónico causado por NaCl 100mM inhibe en mayor medida la longitud total radical que el estrés por manitol.
- Cvi-0 es el ecotipo que menos se afecta en cuanto a la longitud total radical y su tasa de crecimiento en manitol 300mM; sin embargo, su capacidad proliferativa se ve severamente afectada por éstas condiciones de estrés.
- A pesar de que Sg-2 ha sido el más afectado en cuanto a tasa de elongación y longitud total de la raíz, es el ecotipo en donde el meristemo se afecta menos ante el estrés provocado con manitol 300mM y las células de su columela se mantienen mejor organizadas bajo este tipo de estrés.
- Los ecotipos aquí estudiados que provienen de lugares con temperatura y humedad relativa similares, presentan respuestas similares ante el mismo estrés, como Sg-2, Col-0 y Bu-5.
- Aunque Bu-5 fue reportado como tolerante ante el estrés por NaCl en parte aérea, su raíz se afecta severamente ante estrés por NaCl.
- El ecotipo en donde vimos que se afectó más tanto la longitud de la raíz primaria, como todos los parámetros de cuantificaciones celulares fue Sha-1.

## 8. Referencias

- Aceves-García P, Álvarez-Buylla ER, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Muñoz R., Sánchez-Jiménez MP (2016) Root Architecture Diversity and Meristem Dynamics in Different Populations of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. 7:858.
- Aliniaefard, Sasan, and Uulke Van Meeteren. Natural Variation in Stomatal Response to Closing Stimuli among *Arabidopsis Thaliana* Accessions after Exposure to Low VPD as a Tool to Recognize the Mechanism of Disturbed Stomatal Functioning. *Journal of Experimental Botany*, vol. 65, no. 22, Sept. 2014, pp. 6529–6542
- Alonso-Blanco, C., Andrade, J., Becker, C., Bemm, F., Bergelson, J., Borgwardt, K. M. M., Zhou, X. (2016). 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 166(2), 481–491.
- Artus N.N., Uemura M., Steponkus P.L., Gilmour S.J., Lin C., Thomashow M.F., (1996) Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 13404–13409
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S., and Thomashow, M.F., (1994). The 5'- region of *Arabidopsis thaliana* cor 75a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*. 24, 701-713
- Barlow, P. W., Brain P., Powers J. (2002) Estimation of Directional Division Frequencies in Vascular Cambium and in Marginal Meristematic Cells of Plants. *Cell Proliferation*, vol. 35, no. 1, pp. 49–68.
- Bensmihen, S., Rippa, S., Lambert, G., Jublot, D., Pautot, V., Granier, F., Giraudat, J., Parcy, F. (2002) Homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell*, 14, 1391–1403
- Barrio, R. A., Romero-Arias, J. R., Noguez, M. A., Azpeitia, E., Ortiz-Gutiérrez, E., Hernández-Hernández, V., Álvarez-Buylla, E.R. (2013). Cell Patterns Emerge from Coupled Chemical and Physical Fields with Cell Proliferation Dynamics: The *Arabidopsis thaliana* Root as a Study System. *PLoS Computational Biology*, 9(5), 1–12.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo Y., Garcíarrubio A., Campos F., Covarrubias A.A., (2008) The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*, vol. 148, no. 1, pp. 6–24.
- Bergelson, J. (2012). Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide *Arabidopsis thaliana* accessions from the RegMap panel. *Nature Genetics*, 44(2), 212–6.
- Brosché, M., Merilo E., Forian M., Pechter P., Puzõrjova I., Brader G., Kangasjärvi J., Kollist H. (2010) Natural Variation in Ozone Sensitivity among *Arabidopsis Thaliana* Accessions and Its Relation to Stomatal Conductance. *Plant, Cell & Environment*, vol. 33, no. 6, pp. 914–925.
- Charlesworth, D., Vekemans, X., Castric, V., & Glémin, S. (2005). Plant self-incompatibility systems: a molecular evolutionary perspective. *New Phytologist*, 168(1), 61-69.
- Cajero Sánchez W., García-Ponce B., Sánchez M.D.L.P., Álvarez-Buylla E.R., Garay-Arroyo A. (2018) Identifying the transition to the maturation zone in three ecotypes of *Arabidopsis*

thaliana roots, *Communicative & Integrative Biology*, 11:1e1395993

Charlesworth, D., Vikemans X., Castric V., Gélmin S. (2005) Plant Self-Incompatibility Systems: a Molecular Evolutionary Perspective. *New Phytologist*, vol. 168, no. 1, June, pp. 61–69.

Chen, Y.T., Liu, H., Stone, S. and Callis, J. (2013) ABA and the ubiquitin E3 ligase KEEP on GOING affect proteolysis of the Arabidopsis thaliana transcription factors ABF1 and ABF3. *Plant Journal*. 75: 965–976

Close, T. J., & Lammers, P. J. (1993). An Osmotic Stress Protein of Cyanobacteria Is Immunologically Related to Plant Dehydrins. *Plant Physiology*, 101(3), 773-779.

Dávila Valderrain J., Álvarez Buylla E.R. (2015). Esquemas de causación lineales en biología postgenómica : la subliminal y conveniente suposición del mapeo uno a uno entre genotipo y fenotipo, *Interdisciplina* 3, no 5 (2015): 61-76

De Lucas M., Brady S.M., (2013) Gene Regulatory Networks in the Arabidopsis Root. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 16, no. 1, pp. 50–55.

Dure L (1993) Structural motifs in LEA proteins. In TJ Close, EA Bray, eds, *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*. American Society of Plant Physiologists, pp 91–103

Dure L., Crouch M., Harada J.J., Ho T., Mundy J., Quatrano R.S., Thomas T.L., Sung Z.R., (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12

Dubrovsky, Joseph G., Doerner P.W., Colón-Carmona A., Rost T.L. (2000) Pericycle Cell Proliferation and Lateral Root Initiation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, vol. 124, no. 4, Jan., pp. 1648–1657.,

Francois O, Blum MG, Jakobsson M, Rosenberg NA. 2008. Demographic history of european populations of Arabidopsis thaliana. *PLOS Genetics* 4:e1000075

Friml, J. (2003) Auxin transport – shaping the plant. *Current Opinion Plant Biology* 6, 7–12

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., *et al.* (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 3470–3488.

Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124(4), 509–525.

Garay-Arroyo A., Colmenero-Flores J.M., Garcarrubio A., Covarrubias A.A. (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry* 275: 5668–5674

Gomez J, Sanchez-Martinez D, Stiefel V, Rigau J, Puigdomenech P, Page`sm. (1988) A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine- rich protein. *Nature* 334, 262–264.

Goyal K., Walton L.J., Tunnacliffe A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* 388:151-157

Hall, J.L., Flowers, T.J. (1973) The effect of salt on protein synthesis in the halophyte *Suaeda maritima*. *Planta* 110, 361–368.

- Hand, S. C., Menze, M. A., Toner, M., Boswell, L., & Moore, D. (2011). LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annual Review of Physiology*, 73(1), 115-134.
- Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D., and Kraemer, U. (2008). Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* 453: 391–395.
- Hoekstra F., Golovina E., Buitink J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Science* 6:431:438
- Hsiao, T.C. (1973). Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 519-570.
- Horton, M. W., Hancock, A. M., Huang, Y. S., Toomajian, C., Atwell, S., Auton, A., Mulyati N.W., Platt A., Sperone F.G.Vilhjalmsson B.J. (2012). Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide *Arabidopsis thaliana* accessions from the RegMap panel. *Nature Genetics* 44:212–216.
- Hua, Z., Yang, X., & Fromm, M. E. (2006). Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active *Arabidopsis* MAPKK or MAPK proteins. *Plant, Cell and Environment*, 29(9), 1761-1770.
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes and Development* 24, 1695–1708.
- Hundertmark, M., & Hinch, D. K. (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*, *BioMedCentral Genomics* 22, 1–22.
- Hye-Yeon S., Dong-Hyuk W., Nguyen L.V., Huong T.T., Vaishali N.T., Muhammad Muntazir S. Lee S.Y. (2002) *Arabidopsis* AtNAP Functions as a Negative Regulator via Repression of AREB1 in Salt Stress Response. *Planta*, vol. 245, no. 2, 2016, pp. 329–341
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., & Zhu, J. K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell*, 9(11), 1935–49.
- Ivanov, Victor B., and Joseph G. Dubrovsky. (2013). Longitudinal Zonation Pattern in Plant Roots: Conflicts and Solutions. *Trends in Plant Science*, vol. 18, no. 5, pp. 237–243.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F.; bZIP Research Group. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*. 7, 106–111.
- Johanson, U., J. West, C. Lister, S. Michaels, R. Amasino, and C. Dean. (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* 290:344–347
- Katori, T., Ikeda, A., Iuchi, S., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Maehashi, K., Taji, T. (2010). Dissecting the genetic control of natural variation in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of Experimental Botany*, 61(4), 1125-1138.
- Kim, S., Kang, J.Y., Cho, D.I., Park, J.H., and Kim, S.Y. (2004). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant Journal*. 40, 75–87.
- Kim, S., Plagnol, V., Hu, T. T., Toomajian, C., Clark, R. M., Ossowski, S., Nordborg, M. (2007).

Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 39(9), 1151-1155.

Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 2015(4), 1–13.

Krishnaswamy, S., Verma, S., Rahman, M.h., & Kav, N.N. (2010). Functional characterization of four APETALA2- family genes. (RAP.6, RAP.6L, DREB19 and DREB26) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 75(1-2), 107-127.

Lambert, G., Jublot, D., Pautot, V., Granier, F., Giraudat, J., Bensmihen, S., Rippa, S., Parcy, F. (2002). The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell* 14, 1391– 1403.

Lee, S. Y., Boon, N. J., Webb, A. A. R., & Tanaka, R. J. (2017). Synergistic Activation of RD29A Via Integration of Salinity Stress and Abscisic Acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology*, August, 2147–2160.

Li P, Sioson A, Mane SP, Ulanov A, Grothaus G, Heath LS, Murali TM, Bohnert HJ, Grene R (2006) Response diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes in elevated [CO<sub>2</sub>] in the field. *Plant Molecular Biology* 62:593–609

Lichten, M. & Goldman, A.S. (1995). Meiotic recombination hotspots. *Annu. Review Genetics*. 29, 423–444

Lobin, W. (1983). The occurrence of *Arabidopsis thaliana* in the Cape Verde Islands. *Arab. Inf. Ser.arabidopsis.org* 20, 119–123

Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., and Herrera-Estrella, L. (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion Plant Biology* 6: 280–287.

Marsch Martínez N. y Stefan de Folter (2010) *Arabidopsis thaliana*: Un “pequeño” gran genoma. *Genómicas Hoy*.

Mitchell-Olds, T., & Schmitt, J. (2006). Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in *Arabidopsis*. *Nature*, 441(7096), 947–52.

Mitchell-Olds, T., Willis, J.H., and Goldstein, D.B. (2007). Which evolutionary processes influence natural genetic variation for phenotypic traits? *Nature Reviews Genetics* 8: 845–856.

Monda, K., Negi, J., Iio, A., Kusumi, K., Kojima, M., Hashimoto, M., Sakakibara, H., and Iba, K. (2011). Environmental regulation of stomatal response in the *Arabidopsis Cvi-0* ecotype. *Planta* 234: 555–563.

Msanne, J., Lin, J., & Stone, J. M. (2011). Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes. *Planta*, 97–107.

Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* 149, 88–95

Nakayama K., Okawa K., Kakizaki T., Honma T., Itoh H., Inaba T. (2007) *Arabidopsis* Cor15am is a chloroplast stromal protein that has cryoprotective activity and forms oligomers. *Plant Physiology* 144: 513–523

Navarro-Retamal, C., Bremer, A., Alzate-Morales, J., Caballero, J., Hinch, D. K., González, W., & Thalhammer, A. (2016). Molecular dynamics simulations and CD



spectroscopy reveal hydration-induced unfolding of the intrinsically disordered LEA proteins COR15A and COR15B from *Arabidopsis thaliana*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(37), 25806-25816.

Noctor, G. Foyer, C.H. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiology Plantarum*. 355–364

Nordborg, M. *et al.* (2005) The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology* 3, e196

Núñez-Farfán J., Fornoni, J., Valverde P.L., 2004. Population variation in the cost and benefit of tolerance and resistance against herbivory in *Datura stramonium*. *Evolution* 58 : 1696-1704.

Prigogine, I., & Kondepudi, D. (1998). Modern thermodynamics. *From heat engines to dissipative structures* pp. New York:Willey 424-434

Pacheco-Escobedo, M. A., Ivanov V.B., Ransom-Rodríguez I., Arriaga-Mejía G., Ávila H., Baklanov I. A., Pimentel A., Corkidi G., Doerner P., Dubrovsky J.G., Álvarez-Buylla E.R., Garay-Arroyo A. (2016) Longitudinal Zonation Pattern In *Arabidopsis* root Tip Defined by a Multiple Structural Change Algorithm. *Annals of Botany*: pp.1-14

Qin F, Sakuma Y, Tran LS, *et al.* (2008). *Arabidopsis* DREB2A interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *The Plant Cell* 20, 1693–1707.

Quinn, J. A. (1978). Plant Ecotypes: Ecological or Evolutionary Units? *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 105(1),

Rasheed S., Bashir K., Matsui A., Tanaka M., Seki., M. (2016) Transcriptomic analysis of soil-grown *Arabidopsis thaliana* roots and shoots in response to drought stress. *Frontiers in plant science* 7:180.

Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161(11), 1189-1202. doi:10.1016/j.jplph.2004.01.013

Reyes, L., Olvera-carrillo, Y., Campos, F., Garcarrubio, A., Covarrubias. (2010). Functional Analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins Reveals Their Relevance in the Adaptive Response during Wate. *Plant Physiology*, 154(September), 373–390.

Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat stress-responsive gene expression. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 103, 18822–18827

Schmid, K. J., Ramos-Onsins, S., Ringys-Beckstein, H., Weisshaar, B. & Mitchell-Olds, T. (2005) A multilocus sequence survey in *Arabidopsis thaliana* reveals a genome-wide departure from a neutral model of DNA sequence polymorphism. *Genetics* 1601–1615

Schroeder JI, Hagiwara S (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338:427–430

Seok, Hye-Yeon., Who D.H., Nguyen L.v., Hong t., Tran T., Vaishali N., Tarte N., (2016) *Arabidopsis* AtNAP Functions as a Negative Regulator via Repression of AREB1 in Salt Stress Response. *Planta*, vol. 245, no. 2 pp. 329–341

Shao, H., Chu, L., Jaleel, C. A., & Zhao, C. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical

changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331(3), 215-225.  
doi:10.1016/j.crv.2008.01.002

Shen B., Jensen R.G., Bohnert H.J. (1997) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targetting mannitol biosynthesis to chloroplast. *Plant Physiology* 113:1177-1183.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 217–223.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Gene networks involved in drought stress tolerance and response. *Journal of Experimental Botany* 58, 221–227.

Simpson GG, Dean C (2002) Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time? *Science* 296: 285–289

Somerville, C., & Koornneef, M. (2002). A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), 883-889.

Stacy RAP, Aalen RB. (1998) Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of Group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, 206:476-478

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 of USA* 95:14570-14575

Tamura T., Hara K., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H. (2003) Osmotic Stress Tolerance of Transgenic Tobacco Expressing a Gene Encoding a Membrane-Located Receptor-Like Protein from Tobacco Plants. *Plant Physiology* 131 pp. 454-462

Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Castelló de la Plana: Publicaciones de la Universitat Jaume I, Servei de Comunicació i Publicacions.

Tang C., Toomajian C., Sherman-Broyles S., Plagnol V., Guo Y.L., Hu TT, Clark R.M., Nasrallah J.B., Weigel D., Nordborg M. (2007). The evolution of selfing in *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5841), 1070–1072.

Thalhammer, A., Bryant, G., Sulpice, R., & Hinch, D. K. (2014). Disordered Cold Regulated15 Proteins Protect Chloroplast Membranes during Freezing through Binding and Folding, But Do Not Stabilize Chloroplast Enzymes in Vivo. *Plant Physiology*, 190-201.

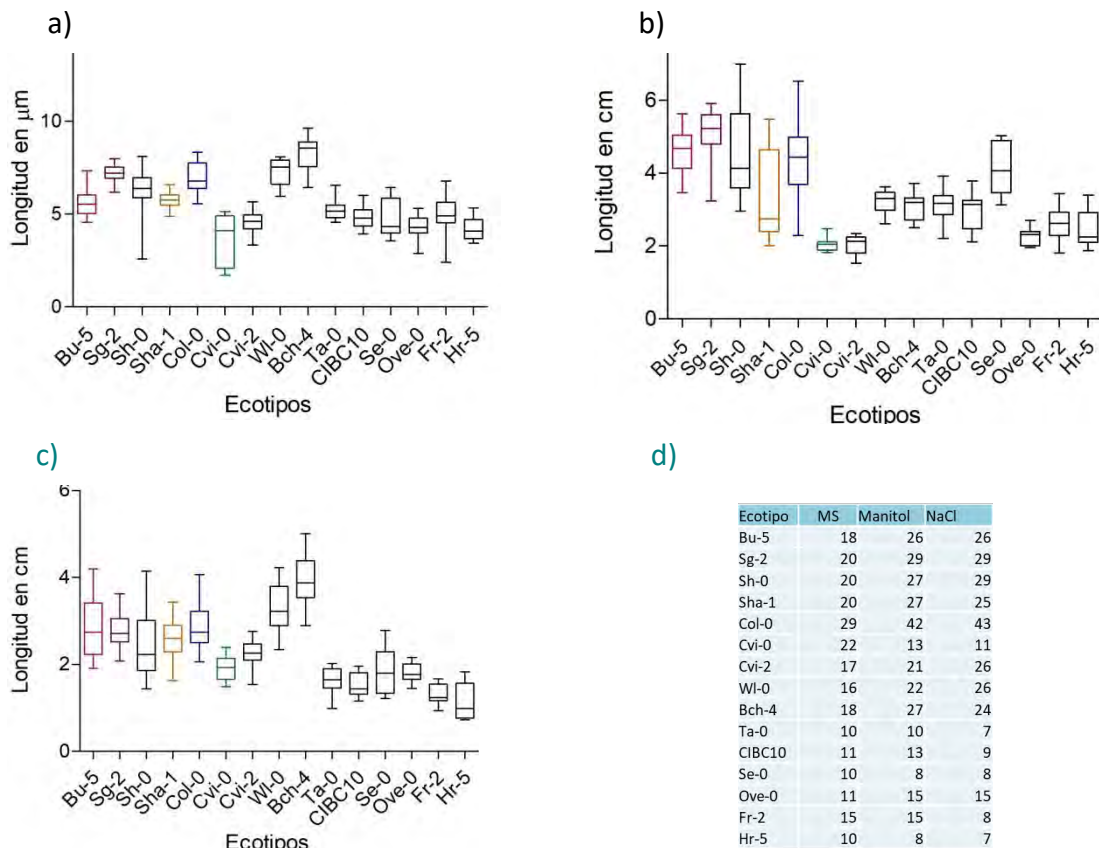
Thalhammer, A., Bryant, G., Sulpice, R., Hinch, D. K., Planck, M., Plant, M., Germany, A. T. (2017). Folding of intrinsically disordered plant LEA proteins is driven by glycerol - induced crowding and the presence of membranes *The FEBS Journal* January  
doi:10.1111/febs.14023

The 1001 genomes consortium (2016) 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*, *Cell* 166, 481–491 July 14, 2016 Published by Elsevier Inc












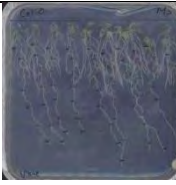



Tompa P., Banki P., Bokor M., Kamasa P., Kovacs D., Lasanda G., Tompa K. (2006) Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects. *Biophysics Journal* 91:2243-2249

- Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(10), 527-533.
- Trontin, C., Tisné, S., Bach, L., & Loudet, O. (2011). What does Arabidopsis natural variation teach us (and does not teach us) about adaptation in plants? *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 225-231. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.024
- Truernit E., Bauby H., Dubreucq B., Grandjean O., Runions J., Barthelemy J., Palauqui J.C. (2008). High-resolution whole-mount imaging of threedimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20,1494–1503
- Turesson, G. 1922 The species and the variety as ecological units. *Hereditas* 3: 100-113.
- Tzvi, T., Wang, W., Arie, A. (2000). Genetic transformation of *Populus* toward improving plant performance and drought tolerance. *Molecular Biology of Woody Plants Forestry Sciences*, 135-160.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 97: 11632–11637.
- Uyttewaal, M., Burian, A., Alim, K., Landrein, B., Borowska-Wykręt, D., Dedieu, A. Hamant, O. (2012). Mechanical Stress Acts via Katanin to Amplify Differences in Growth Rate between Adjacent Cells in Arabidopsis. *Cell*, 149(2), 439-451.
- Verbelen, J.P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., & Baluska, F. (2006). The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signaling & Behavior*, 1(6), 296–304.
- Verlues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 45(4), 523–539.
- Vivanco J.M., Cosio E. Loyola-Vargas V.M., Flores H. (2005) Mecanismos químicos de defensa en las plantas *Investigación y Ciencia* Febrero pp.68-75
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany*, 100(4), 681-697.
- Wilhelm, K. S., Thomashow, M. F. (1993). Arabidopsis thaliana cor15b, an apparent homologue of cor15a, is strongly responsive to cold and ABA, but not drought. *Plant Molecular Biology*, 23(5), 1073–1077.
- Wilkinson S., Davies W.J. (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ*, 25 pp. 195-21
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1993. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration-stress in Arabidopsis thaliana. *Molecular and General Genetics* 238, 17–25
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136:2621–2632

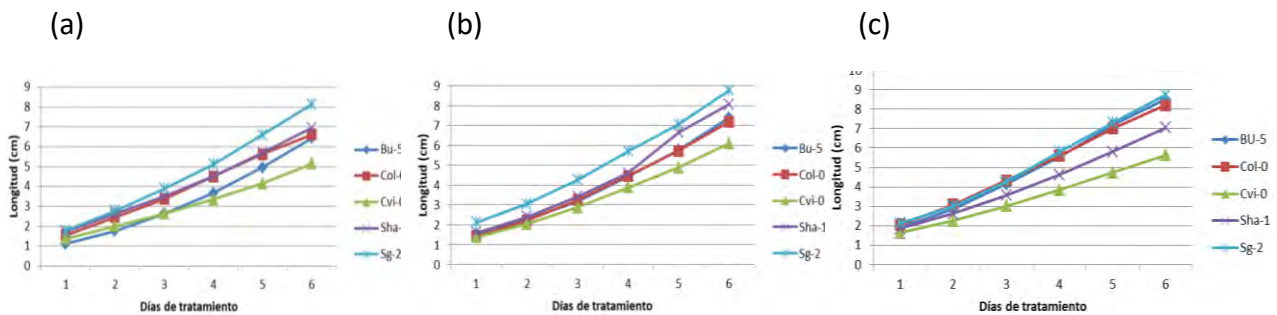
## Anexo



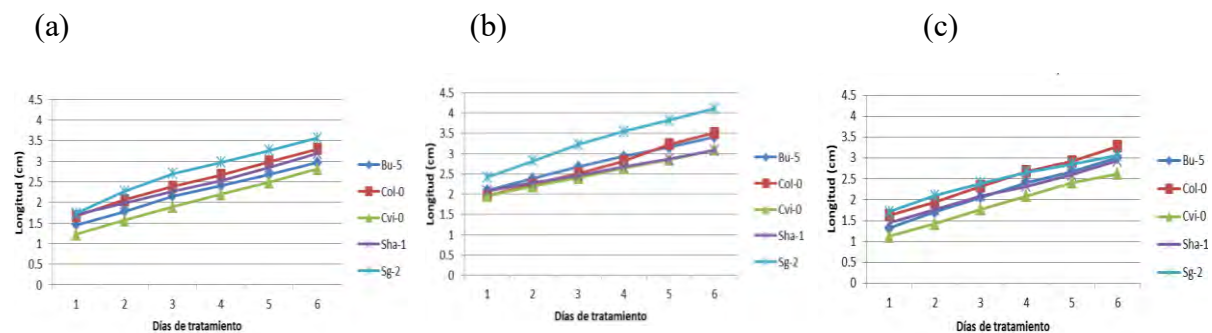
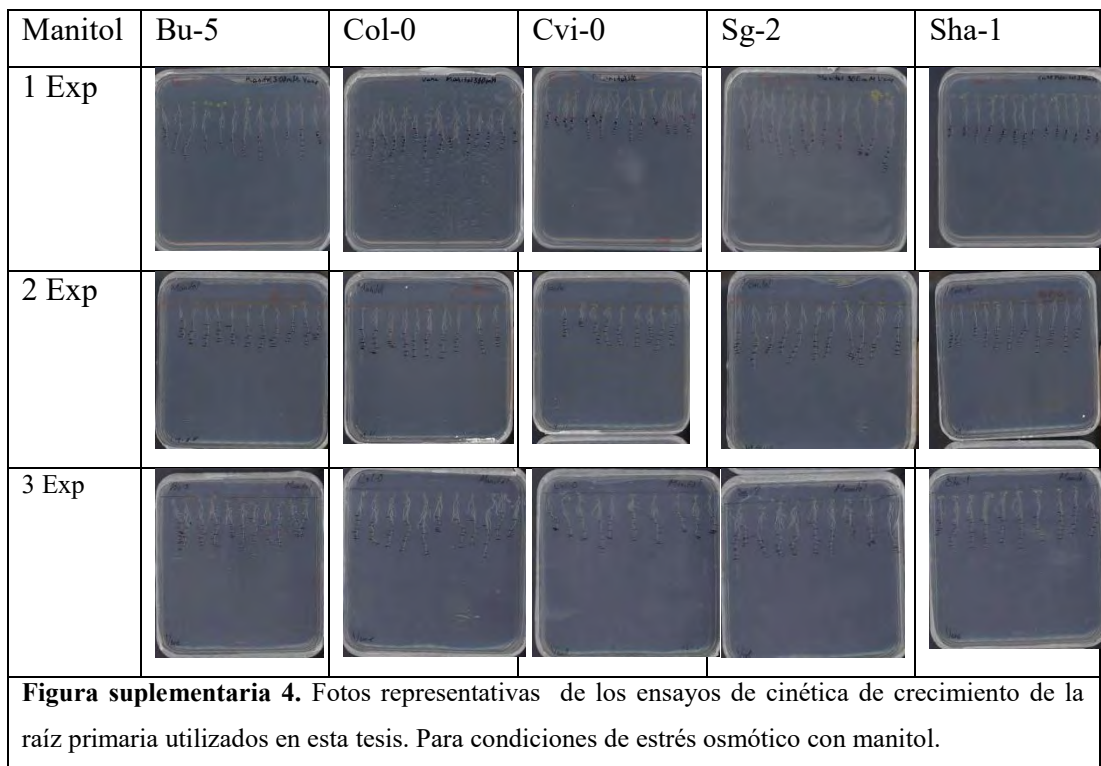
**Figura Suplementaria 1.** Gráficos de caja y bigote para las longitudes totales de la raíz primaria de 15 ecotipos, germinados y crecidos en medio MS durante 5 días y trasplantados a medios de cultivo con diferentes condiciones de crecimiento por 6 días. a) Condiciones control con medio MS 0.2X; b) Condiciones de estrés osmótico con manitol 300mM; c) Condiciones de estrés iónico-osmótico con NaCl 100mM y d) Número de raíces utilizadas para este experimento.

MS	Bu-5	Col-0	Cvi-0	Sg-2	Sha-1
1 Exp					
2 Exp					
3 Exp					

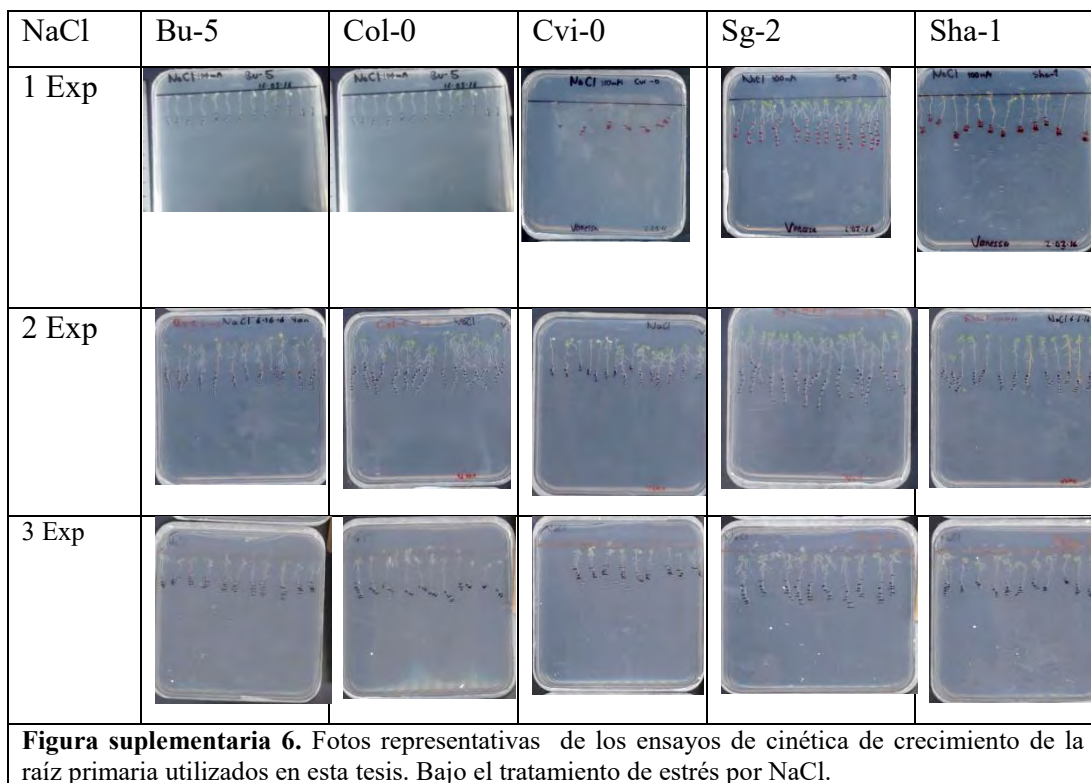
**Figura suplementaria 2.** Fotos representativas de los ensayos de cinética de crecimiento de la raíz primaria utilizados en esta tesis. Para condiciones control con MS.



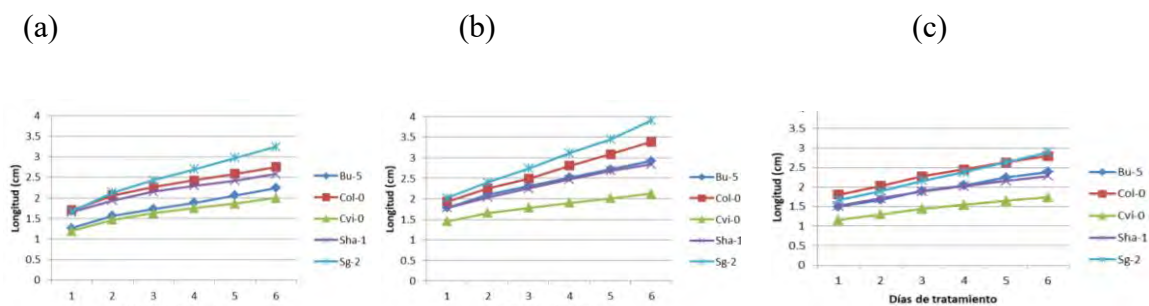
**Figura suplementaria 3.** Cinéticas de crecimiento correspondientes a cada ensayo en condiciones control, con medio MS. a) Gráfica del primer ensayo, realizado durante el mes de Junio. n=52 b) Ensayo 2, realizado en Noviembre. n=90 c) Tercer ensayo, realizado en Enero. n=77



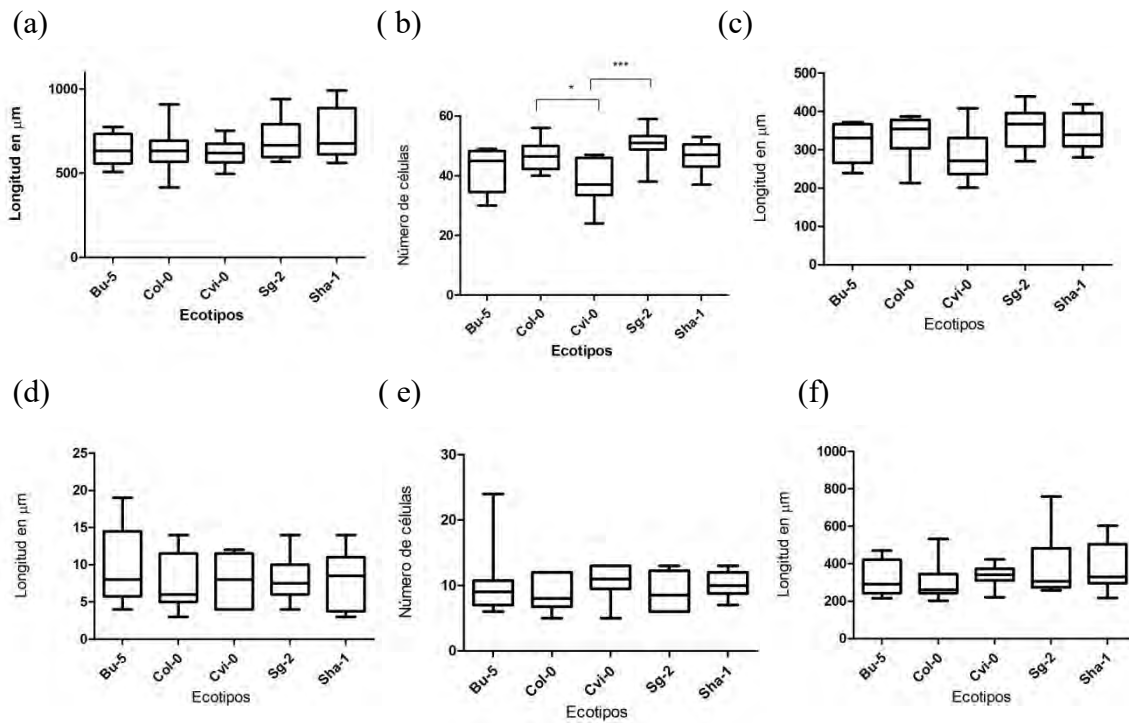
**Figura Suplementaria 5.** Cinéticas de crecimiento de 6 días correspondientes a los 3 ensayos realizados en condiciones de estrés osmótico con manitol 300mM. Estas plantas se crecen por 5 días en condiciones control y luego se transfieren al tratamiento con estrés osmótico. a) Primer ensayo (n=57); b) Segundo ensayo, (n=103) y c) Tercer ensayo (n=99).



**Figura suplementaria 6.** Fotos representativas de los ensayos de cinética de crecimiento de la raíz primaria utilizados en esta tesis. Bajo el tratamiento de estrés por NaCl.

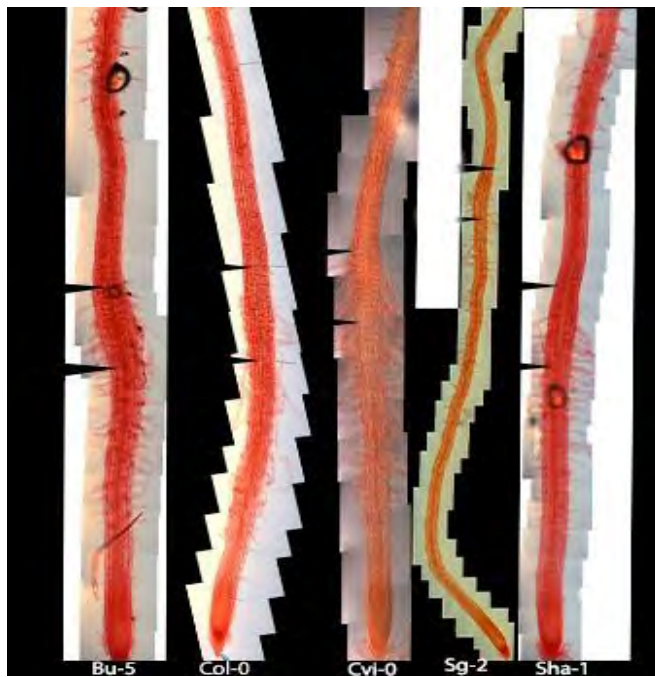


**Figura Suplementaria 7.** Cinéticas de crecimiento de 6 días correspondientes a los 3 ensayos realizados en condiciones de estrés iónico-osmótico con NaCl 100mM. Estas plantas se crecen por 5 días en condiciones control y luego se transfieren al tratamiento con estrés iónico-osmótico. a) Primer ensayo (n=65); b) Segundo ensayo, (n=96) y c) Tercer ensayo (n=92).

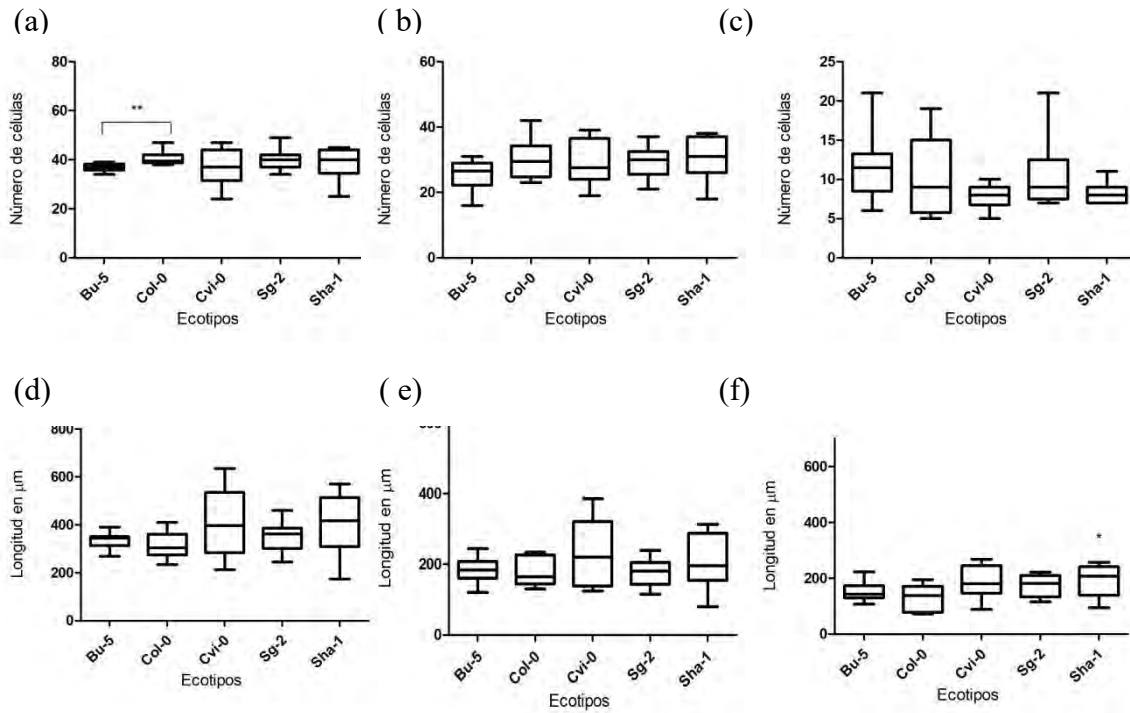


**Figura Suplementaria 8.** Parámetros celulares de la raíz primaria medidos en condiciones control. (a) Longitud del RAM ( $\mu\text{m}$ ); (b) Número de células del DP; (c) Longitud del DP ( $\mu\text{m}$ ); (d) Tamaño crítico del DP-DT; (e) Número de células en el DT; (f) Tamaño del DT ( $\mu\text{m}$ ). Para llevar a cabo los análisis estadísticos se hizo una prueba T de tipo Mann Whitney y los asteriscos sin barras indican diferencia significativa respecto a Col-0. Las diferencias entre los otros ecotipos están señaladas con una barra que une los ecotipos comparados con una  $P < 0.05$  (\*)  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)





**Figura Suplementaria 9.** Fotografía de microscopia confocal (40X) en donde se ven los fenotipos de las cicatrices (delimitadas con flechas negras) de cada ecotipo cuando crecen las plántulas por 24 horas en medio con manitol 300mM.



**Figura Suplementaria 10.** Parámetros celulares de la raíz primaria medidos en condiciones de estrés iónico-osmótico con NaCl 100mM. (a) Longitud del RAM ( $\mu\text{m}$ ); (b) Número de células del DP; (c) Longitud del DP ( $\mu\text{m}$ ); (d) Tamaño crítico del DP-DT; (e) Número de células en el DT; (f) Tamaño del DT ( $\mu\text{m}$ ). Para llevar a cabo los análisis estadísticos se hizo una prueba T de tipo Mann Whitney y los asteriscos sin barras indican diferencia significativa respecto a Col-0. Las diferencias entre los otros ecotipos están señaladas con una barra que une los ecotipos comparados con una  $P < 0.05$  (\*)  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)