



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Facultad de Química**

**Respuestas mediadas por miembros de la familia eIF4E al estrés  
por temperatura en *Arabidopsis thaliana***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Biol. MARLON ADRIAN PULIDO TORRES

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova. Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Jorge Nieto Sotelo. Instituto de Biología, UNAM  
Dra. Sobeida Sánchez Nieto. Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Abril, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# ÍNDICE

<b>1. DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS</b>	<b>4</b>
<b>2. RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>3. ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>4. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>9</b>
<b>5. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
5.1 CAMBIO CLIMÁTICO	11
5.2 TOLERANCIA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS POR TEMPERATURAS EXTREMAS	11
5.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL POST-TRANSCRIPCIONAL	14
5.4 <i>eIF4E</i> EN EL PROCESO DE TRADUCCIÓN	14
5.5 ISOFORMAS DEL FACTOR <i>eIF4E</i> Y FUNCIONES DIFERENCIALES	16
5.6 PAPEL DE LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN LA INFECCIÓN POR VIRUS	18
<b>6. ANTECEDENTES</b>	<b>19</b>
<b>7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>22</b>
<b>8. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>9. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>23</b>
<b>10. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>23</b>
<b>11. MÉTODOS</b>	<b>23</b>
11.1 CULTIVO DE PLANTAS	23
11.2 EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA	24
11.3 LÍNEAS MUTANTES UTILIZADAS	24
11.4 DETERMINACIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES MEDIANTE ANÁLISIS DE ALTA RESOLUCIÓN DE FUSIÓN (HRM)	26
11.5 PCR PUNTO FINAL	26
11.6 PCR EN TIEMPO REAL	26
11.7 PROTOCOLO DE ESTRÉS POR CONGELAMIENTO	27
11.8 PROTOCOLO DE ESTRÉS POR CALOR	29
<b>12. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
12.1 COMPROBACIÓN DE MUTANTES.	33
12.2 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE MUTANTES DE DIFERENTES ISOFORMAS DE <i>eIF4E</i> EN SU RESPUESTA AL ESTRÉS POR CONGELAMIENTO	38
12.3 ANÁLISIS MOLECULAR DE LA RESPUESTA A FRÍO EN AUSENCIA DE 4EHP	41

*12.4 ANÁLISIS DE TERMOTOLERANCIA EN LÍNEAS MUTANTES PARA DIFERENTES ISOFORMAS DE eIF4E.* 43

<b>13.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>14.</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>59</b>
<b>15.</b>	<b>PERSPECTIVAS.</b>	<b>60</b>
<b>16.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>61</b>
<b>17.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>70</b>

**1. DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**  
**DEDICATORIA**

A mi familia por su apoyo incondicional y su amor infinito.

A mis amigos por acompañarme en este camino.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACyT) de México para la realización del posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Se agradece el financiamiento por parte del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica PAPIIT-UNAM IN214118 e IN218921, así como de la Facultad de Química-UNAM PAIP 5000-9118.

Se agradece el uso de las instalaciones de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII)-Facultad de Química y el apoyo técnico de Jorge Herrera-Díaz para la realización de los experimentos de PCR en tiempo real.

## 2. RESUMEN

Las proteínas de la familia eIF4E de unión al extremo 5'cap de los mRNAs maduros son un importante blanco regulatorio en el control del inicio de la traducción y los procesos de infección viral en plantas. En este trabajo se exploraron las respuestas mediadas por las isoformas de esta familia bajo condiciones de estrés por temperaturas extremas en *Arabidopsis thaliana*. Es conocido que las isoformas canónicas eIF4E y eIF(iso)4E tienen un cierto grado de redundancia funcional, pero poseen especificidad en el reclutamiento de poblaciones de transcritos. En cuanto a la respuesta a estrés abiótico se ha reportado que la sobreexpresión de eIF(iso)4E confiere a las plantas una resistencia mayor al congelamiento y su ausencia provoca susceptibilidad. Por otra parte, mediante transformaciones transitorias en protoplastos se observó que la isoforma no canónica de clase dos, 4EHP, forma parte de agregados citoplasmáticos que cambian en tamaño y número en respuesta a diferentes tipos de estrés. Esto sugiere que 4EHP puede tener un papel en la regulación postranscripcional de RNAs mensajeros.

Se ha reportado que modificaciones puntuales sobre el gen eIF4E, que resultan en cambios de aminoácidos particulares, otorgan en diferentes especies de plantas resistencia a la infección por potyvirus, lo cual representa una herramienta de uso biotecnológico en la agricultura. Sin embargo, falta una exploración más detallada del comportamiento de estas líneas mutantes bajo condiciones de estrés abiótico, como son las temperaturas extremas.

Los resultados del análisis que se desarrolló en este trabajo indicaron que la ausencia de las isoformas canónicas, eIF4E o eIF(iso)4E, provoca susceptibilidad en las plantas cuando estas son sometidas al reto congelante por primera vez (no aclimatadas). Esta respuesta varía según el estadio de desarrollo de la planta, siendo mayor la susceptibilidad en plantas jóvenes de cinco semanas. Por otro lado, la ausencia de la isoforma de clase II, 4EHP, afectó de manera significativa tanto la respuesta basal al estrés por congelamiento, como el proceso de aclimatación a 4°C, resultando en mayor susceptibilidad a bajas temperaturas. En ausencia de 4EHP se mantiene la inducción de la expresión de los genes marcadores de estrés por frío *COR15A* y *TCF1*, sin embargo, los niveles de acumulación de *TCF1* fueron menores con respecto a plantas silvestres. En cuanto a la respuesta a estrés por altas temperaturas, la ausencia de cualquiera de las isoformas canónicas eIF4E o eIF(iso)4E no afectó de manera significativa la viabilidad y crecimiento las plantas con respecto a las silvestres. Sin embargo, de manera interesante, la línea carente de 4EHP fue capaz de responder mejor el estrés por altas temperaturas cuando fue sometida a un proceso previo de aclimatación, ya que las plantas mostraron un crecimiento con mayor similitud al observado en condiciones no estresantes. Por último, se encontró que las modificaciones en el alelo sintético de eIF4E que le otorgan resistencia a potyvirus no afectan su respuesta a estrés por altas temperaturas.

### 3. ABREVIATURAS

Se presenta el significado de las abreviaturas en español

<b>3'UTR</b>	Región no traducible 3'
<b>3D</b>	Tridimensional
<b>4EHP</b>	Proteína homóloga de eIF4E
<b>4E-T</b>	Proteína transportadora núcleo-citoplasma de eIF4E
<b>5'UTR</b>	Región no traducible 5'
<b>ABRE</b>	Elemento de respuesta a ácido abscísico
<b>APX</b>	Ascorbato peroxidasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CYVV</b>	Virus del mosaico del trébol
<b>COR</b>	Genes regulados por frío
<b>CTR</b>	Repeticiones de C
<b>DCP</b>	Enzima que remueve 5'Cap en RNA
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>DRE</b>	Elemento de respuesta a deshidratación
<b>DREB</b>	Proteína de unión a elementos de respuesta a deshidratación
<b>eIF</b>	Factor de inicio de la traducción eucarionte
<b>HRM</b>	Análisis de alta resolución de fusión
<b>HS</b>	Choque térmico
<b>HSG</b>	Granulo de estrés por calor
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>LMV</b>	Virus del mosaico de la lechuga
<b>miRNA</b>	microRNA



<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MS</b>	medio de cultivo Murashige y Skoog
<b>PABP</b>	Proteína de unión a poli A
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBs</b>	Cuerpos de procesamiento
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PIC</b>	Complejo de pre-inicio de la traducción
<b>PVMV</b>	Virus del moteado del chile
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RBP</b>	Proteínas de unión a RNA
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>T-DNA</b>	DNA de transferencia del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<b>TEV</b>	Virus del jaspeado del tabaco
<b>TuMV</b>	Virus del mosaico del nabo
<b>uORF</b>	Marco abierto de lectura río arriba
<b>VPg</b>	Proteína viral unida al genoma
<b>WT</b>	Silvestre

#### 4. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- **Figura 1.** Representación esquemática del inicio de la traducción en eucariotas
- **Figura 2.** Representación tridimensional de la proteína eIF4E.
- **Figura 3.** Fenotipo de tres líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* expuestas a congelamiento SIN aclimatación.
- **Figura 4.** Imagen que representa la ubicación de las mutaciones introducidas en el alelo sintético *eIF4E\_R* en la estructura tridimensional predicha de la proteína.
- **Figura 5.** Organización de siembra de líneas *4EHP\_KO*, *eIF4E\_KO*, *eIF(iso)4E\_KO*, *eIF4E\_OE* y WT para plantas de 5 semanas.
- **Figura 6.** Protocolo para evaluar la tolerancia basal a estrés por congelamiento.
- **Figura 7.** Escala de grado de daño fenotípico para plantas de 5 semanas sometidas a estrés por congelamiento y después de una semana de recuperación.
- **Figura 8.** Protocolo para evaluar la tolerancia adquirida al estrés por congelamiento.
- **Figura 9.** Escala de grado de daño fenotípico para plantas de 7 semanas sometidas o no a un proceso de aclimatación por una semana adicional previo al congelamiento y 4 semanas de recuperación.
- **Figura 10.** Protocolo de estrés para evaluar la tolerancia basal al calor.
- **Figura 11.** Fotografías de plántulas con diferentes fenotipos post-recuperación del estrés por calor.
- **Figura 12.** Protocolo 1 para evaluar termotolerancia adquirida.
- **Figura 13.** Protocolo 2 para evaluar la termotolerancia adquirida.
- **Figura 14.** Criterio de clasificación de fenotipos para plántulas de 14 días de crecidas basado en el número de hojas verdes expandidas (incluye cotiledones).
- **Figura 15.** Confirmación de *eIF4E\_KO*.
- **Figura 16.** Confirmación de *eIF(iso)4E\_KO*.
- **Figura 17.** Confirmación de *4EHP\_KO*.
- **Figura 18.** Confirmación de *eIF4E\_R*.
- **Figura 19.** Tolerancia basal al Congelamiento.
- **Figura 20.** Tolerancia Adquirida al Congelamiento.
- **Figura 21.** Niveles de expresión relativa de los genes *COR15A*, *TCF1* y *DREB1A* en respuesta a frío para WT y *4EHP\_KO*.
- **Figura 22.** Niveles de expresión relativa de los genes *eIF4E* y *eIF(iso)4E* en plantas WT y mutante *4EHP\_KO*.
- **Figura 23.** Tolerancia Basal al Calor.
- **Figura 24.** Tolerancia Adquirida al Calor.
- **Figura 25.** Crecimiento control de plantas para el protocolo 2 de tolerancia adquirida al calor.
- **Figura 26.** Tolerancia Adquirida Calor (protocolo 2).
- **Figura 27.** Isoformas de la familia eIF4E en respuesta a estrés por bajas temperaturas.

- **Tabla 1.** Fondo genético de las líneas utilizadas en el proyecto.
- **Tabla 2.** Lista de oligonucleótidos utilizados para confirmar cada uno de los alelos mutantes de *A.thaliana* por PCR punto final y HRM.
- **Tabla 3.** Lista de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de qPCR.

## **5. INTRODUCCIÓN**

### **5.1 CAMBIO CLIMÁTICO**

La población humana ha incrementado de manera dramática en el último siglo. Según el más reciente informe de la Organización de las Naciones Unidas, en los últimos 12 años hemos crecido hasta alcanzar los 7,6 millardos de habitantes y se estima que para el 2050 se llegue a la cifra de 11,2 millardos (UN, 2017). Este ritmo de crecimiento acelerado trae consigo incontables problemas para el planeta de consecuencias irreparables, como lo es el aumento de la temperatura de la tierra resultado del incremento en los gases de efecto invernadero, el cual se estima que será de entre 2 y 6 °C para el final de este siglo (IPCC, 2013).

Con esta realidad han surgido varios desafíos tanto a nivel social como económico. Algunos de los más urgentes son la correcta administración de recursos naturales, la disminución en el uso de combustibles fósiles, el adecuado manejo de desechos y garantizar la seguridad alimentaria para la población en crecimiento. Esta última se ve especialmente afectada debido a que la agricultura es uno de los sectores que está en mayor riesgo con el surgimiento de eventos climáticos extremos, como temporadas anómalas de calor o frío, largas e intensas, o épocas de lluvia y sequía muy fuertes, siendo especialmente vulnerables los países de la zona tropical (Barlow *et al.*, 2015).

Estas condiciones abióticas adversas generan estrés sobre las plantas, provocando una alteración en el desarrollo y rendimiento normal de los cultivos (Cramer *et al.*, 2011), afectando significativamente la producción agrícola alrededor del mundo. Las pérdidas económicas globales en tres de los principales cultivos (maíz, trigo y cebada) atribuidas al cambio climático, se estiman en aproximadamente cinco millares de dólares por año (Stevanović *et al.*, 2016). Estas cifras hacen apremiante la búsqueda de estrategias desde todos los sectores del conocimiento humano para enfrentar y plantear soluciones a este escenario. Así pues, en este trabajo se pretende aportar conocimiento sobre procesos moleculares en las plantas que son importantes para lidiar con cambios de temperatura del ambiente, como lo es la regulación de la expresión genética mediada por los factores de la familia eIF4E.

### **5.2 TOLERANCIA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS POR TEMPERATURAS EXTREMAS**

Dada su naturaleza sésil, las plantas son incapaces de moverse para huir o buscar refugio, como lo hacen los animales en respuesta a situaciones desfavorables. Por esto se ven obligadas a adaptarse a la aparición de condiciones adversas en el medio en el que están creciendo. Así pues, son estos cambios en el ambiente uno de los principales factores que afecta su distribución geográfica y la principal causa de disminución en la productividad agrícola. Es primordial conocer cómo perciben las plantas su medio y los mecanismos moleculares que subyacen a las respuestas ante estímulos estresantes (Kotak *et al.*, 2007; Zhu, 2016).

Entre los daños que causan las temperaturas extremas sobre las plantas se encuentran daños a la membrana plasmática y cambios en la osmolaridad celular, así como la modificación de propiedades catalíticas de las enzimas por eventos de desnaturalización y aumento en los niveles de estrés oxidativo, entre otros (Zhu, 2016). Por consiguiente, las estrategias de tolerancia ocurren a diferentes niveles biológicos: a nivel de organismo, mediante la reducción en tasas de crecimiento, disminución de tasa fotosintética y cambio en la actividad fisiológica; a nivel subcelular, mediante modificaciones en la expresión de genes o la generación de metabolitos específicos. Juntos, estos eventos le permiten a la planta contender con los daños causados por factores de estrés (Rao *et al.*, 2006).

### **Estrés por temperaturas bajas**

Bajo temperaturas congelantes, la disponibilidad de agua para las células vegetales se ve afectada a causa de la formación de cristales en los apoplastos, produciendo un efecto similar a la deshidratación. Asimismo, se ve comprometida la fluidez de los fosfolípidos de membrana, provocando rigidez (Sangwan *et al.*, 2002). En estas condiciones, las plantas generan grandes cantidades de ROS (del inglés *reactive oxygen species*) que, junto con cascadas de señalización mediadas por segundos mensajeros (como el  $\text{Ca}^{2+}$ ), llevan a la inducción de la expresión de ciertos genes, como los denominados COR (del inglés *cold responsive*). Las proteínas COR juegan un papel crítico en la respuesta de aclimatación, actuando como atenuantes de los daños ocasionados por el estrés por frío, participando en la protección de enzimas previniendo su agregación e inactivación, y en el mantenimiento de la integridad de membrana bajo condiciones congelantes (Thomashow, 1999; Thalhammer & Hinch, 2013).

*Arabidopsis thaliana* es un organismo modelo para estudios en plantas, útil debido a su rápido ciclo de vida, alta tasa proliferativa, fácil manipulación y la amplia disponibilidad de recursos genéticos para su estudio como las colecciones de mutantes. Además, su genoma es pequeño en comparación a otras angiospermas y está secuenciado por completo (Krämer, 2015). Esta es una especie que crece en zonas templadas, por lo que presenta una respuesta de tolerancia a las bajas temperaturas propias de periodos invernales. Es bajo estas condiciones que las plantas pueden llevar a cabo un proceso de aclimatación que les permite superar temperaturas bajo cero y continuar con su ciclo de vida (Xiong *et al.*, 2002).

En *Arabidopsis thaliana* se han reportado cambios en el perfil transcripcional del genoma entre el 4 y 20 % como respuesta a condiciones de congelamiento (Hannah *et al.*, 2005). La mayoría de los genes inducidos por bajas temperaturas contienen secuencias reguladoras en su promotor, tales como elementos de respuesta a deshidratación (DRE), de repeticiones C (CRT) y de respuesta a ácido abscísico (ABRE), los cuales son reconocidos por factores de transcripción inducidos en frío. Acorde a esto, se ha encontrado que la sobreexpresión de los factores de transcripción (de unión a elementos DRE y CRT) resulta en la inducción de genes de respuesta a frío, proporcionando así un incremento en la tolerancia a congelamiento (Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Los factores transcripcionales de la familia DREB (unión a DRE) se han identificado en

varias especies vegetales terrestres sometidas a bajas temperaturas, incluyendo a *Arabidopsis thaliana*, lo que indica la importancia de estas proteínas en la respuesta a estrés por frío (Mizoi *et al.*, 2012).

Además de los factores transcripcionales ya mencionados, se ha demostrado que factores de las familias MYB1R, R2R3 y MYB3R son cruciales en la respuesta a estrés abiótico (Rosinski & Atchley, 1998). En *Arabidopsis* existen 198 genes que codifican para proteínas pertenecientes a estas familias y que se relacionan con el control del ciclo celular, el metabolismo secundario y la señalización hormonal. Se ha reportado que la sobreexpresión de algunos de ellos, como *HOS10*, *OSMYB3R-2* en *Arabidopsis thaliana*, aumentan la tolerancia a estrés por bajas temperaturas (Yadav, 2009).

### **Estrés por temperaturas elevadas**

En el otro extremo, temperaturas mayores a 30°C (Heat shock, HS) afectan a las plantas alterando su desarrollo y crecimiento, comprometen el alargamiento de raíz, crecimiento de hojas, porcentaje de germinación, establecimiento de plántulas, tasa de floración y obtención de semillas. Similar al efecto provocado por bajas temperaturas, se ven afectados procesos fisiológicos y moleculares como fotosíntesis, respiración, disponibilidad de agua y producción de metabolitos, así como la estabilidad de la membrana y el plegamiento de proteínas (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Sin embargo, los procesos moleculares de respuesta a calor difieren en algunos aspectos de los observados en congelamiento. En este caso, las proteínas de choque térmico (HSPs) tienen una gran relevancia para deshacer agregados proteicos y proteger de la desnaturalización de proteínas provocada por altas temperaturas. Además, el sistema de respuesta involucra cambios a nivel de expresión de genes para garantizar la síntesis proteica, entre las que se encuentran, las enzimas de respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS-scavenging), y aquellas asociadas al mantenimiento de la estabilidad de la membrana celular (Kotak *et al.*, 2007; Swindell *et al.*, 2007).

Al igual que ocurre con las proteínas DREB en estrés hídrico y por congelamiento, en diferentes especies de plantas superiores se han identificado al menos 20 tipos de HSPs conservadas, lo que sugiere que la diversificación de estas proteínas obedece a la adaptación de las plantas terrestres ante condiciones de estrés por calor (Waters *et al.*, 1996).

Las proteínas de choque térmico tienen tamaños de entre 10 a 200 kDa y, según su peso molecular, se han clasificado en cinco familias principales: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, y pequeñas HSPs. Varias de ellas actúan como chaperonas, protegiendo o renaturalizando proteínas afectadas durante el HS, o bien previniendo la agregación y posterior pérdida de su función (Ohama *et al.*, 2017). Sin embargo, es importante mencionar que no todas las proteínas reportadas como HSPs tienen actividad chaperona. Un ejemplo de esto es la proteína codificada por el gen *HOT3*, inducido por altas temperaturas que corresponde al factor de inicio de la traducción 5B (eIF5B), el cual

participa en la unión de la subunidad ribosomal al RNA mensajero. Se han reportado mutantes de *hot3* con un fenotipo hipersensible a temperatura (Salomé, 2017).

Finalmente, bajo condiciones estresantes se induce la producción de especies reactivas de oxígeno, que son compuestos altamente tóxicos y capaces de oxidar diversas biomoléculas, pudiendo incluso inducir la muerte celular. A manera de respuesta de contención ante las ROS, la planta promueve la síntesis de enzimas neutralizantes como ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) (Suzuki & Mittler, 2006).

### **5.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL POST-TRANSCRIPCIONAL**

Además del control a nivel transcripcional, en plantas existen otros mecanismos de regulación de la expresión de genes que cobran gran importancia ante temperaturas extremas, ya que permiten un rápido ajuste en las proteínas necesarias en la contención del estrés. Entre estos, se encuentran el “splicing” alternativo, la estabilidad y la traducción de los transcritos celulares. El 20 % de los genes de *A.thaliana* está sujeto a splicing alternativo incluyendo a aquellos que juegan un papel importante en la regulación de la fotosíntesis y la floración, entre otros. Se ha reportado que varios genes están expuestos a splicing dependiente de estrés; por ejemplo, el transcrito COR15 sufre splicing alternativo cuando se expresa a bajas temperaturas. Otro mecanismo de control es el que llevan a cabo los miRNAs, pequeñas secuencias de RNA que pueden hibridar con transcritos, seleccionándolos a través de complementariedad de bases y promoviendo su degradación o reprimiendo su traducción. Algunos miRNAs se sobreexpresan o reprimen en respuesta a frío, sugiriendo así que ejercen una regulación sobre sus correspondientes transcritos blanco (Sunkar, 2010).

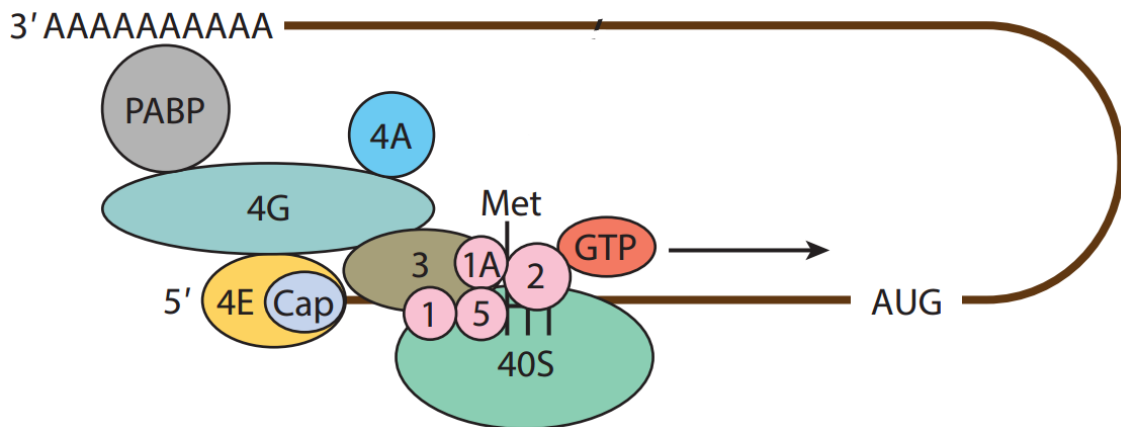
Una vez transcritos los mRNAs, el reclutamiento de estos a los ribosomas es importante para completar la expresión y permitir la acumulación de las proteínas pertinentes. Bajo condiciones estresantes existe una modificación global en la síntesis de proteínas y un aumento en la traducción de aquellos transcritos que corresponden a genes de tolerancia al estrés. Sin embargo, este nivel de regulación se ha explorado con menor intensidad en plantas que la regulación transcripcional. Para propiciar estos cambios a nivel de traducción de requiere la participación de factores de traducción, secuencias específicas en los transcritos, proteínas de unión a RNA, así como de la maquinaria traduccional y la disponibilidad energética. El mecanismo de reclutamiento de mensajeros para iniciar la traducción ocurre mediante el reconocimiento de su extremo 5'cap por parte de los factores eIF4E, en tanto que ciertas características del RNA mensajero, tales como la estructura secundaria de la secuencia 5' no traducida (5'UTR), la distancia hasta el codón de inicio o la composición de nucleótidos afectan de manera diferencial la unión de las proteínas que conforman la maquinaria del inicio de la traducción (Kawaguchi *et al.*, 2004).

### **5.4 eIF4E EN EL PROCESO DE TRADUCCIÓN**

Una vez sintetizado el mRNA, su traducción en eucariotas ocurre en cuatro fases: iniciación, elongación, terminación, y reciclaje del ribosoma (Villa & Fraser 2014). Uno

de los pasos más importantes en la regulación es el control del inicio de la traducción (Alberts *et al.*, 2008), proceso complejo que necesita de un gran número de proteínas.

En el inicio debe ocurrir la activación del mRNA mediante su reconocimiento por parte del factor de inicio eIF4E. El reconocimiento es por el extremo 5' cap, elemento que junto con la cola poli A en el extremo 3' se encargan de proteger al transcrito de la degradación en el citoplasma (Gallie, 1991). Además de unir el 5' cap, este factor se asocia con otras proteínas propiciando de este modo el reclutamiento de toda la maquinaria de traducción. El complejo de unión a 5' cap (eIF4F) consta de tres subunidades: eIF4E (proteína que reconoce la estructura 5' cap), eIF4A (helicasa DEAD box) y eIF4G (andamio molecular). Este último une directamente a los factores eIF3, eIF4E, eIF4A y PABP (proteína de unión a poli A), propiciando la circularización del mensajero, protegiéndolo y permitiendo el posterior reciclaje de la maquinaria para otro ciclo de traducción (O'Leary *et al.*, 2013; Martinez Silva & Dinkova, 2010) (Figura 1).

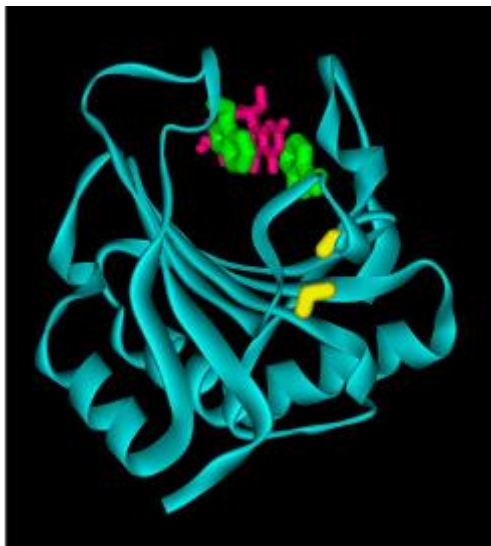


**Figura 1. Representación esquemática del inicio de la traducción en eucariotas.** Se observa la proteína de unión a cap (eIF4E) asociada a la subunidad de andamiaje (eIF4G) que a su vez se une con las proteínas 4A y PABP permitiendo la circularización del mensajero y el reclutamiento del complejo de pre-inicio (PIC). Tomada de Wang, 2015.

La proteína eIF4E tiene un plegamiento en forma de L y reconoce la estructura 7-metilguanosa (m7GpppN) uniéndola entre dos triptófanos conservados en el sitio activo (Matsuo *et al.*, 1997) (Figura 2). Se propone que la función que desempeña esta proteína consiste en asegurar que la subunidad 40S ribosomal se una al extremo 5' del mRNA, a través de eIF4G, y se logre la remoción de conformaciones inhibitorias que se encuentren en esta región por la acción de eIF4A (Villa y Fraser, 2014). Acorde a la secuencia que separa el 5' cap del codón de inicio del marco abierto de lectura (5'UTR), la probabilidad de que todos los mRNAs sean sustratos del ribosoma no es la misma. Los transcritos favorecidos presentan características intrínsecas que determinan mayor eficiencia de su traducción. Por ejemplo, la presencia de marcos de lectura abiertos río arriba del ORF principal (uORFs) puede afectar el inicio de la traducción corriente abajo del codón AUG, mientras que la estructura secundaria adoptada por el transcrito (como los tallo-asa)



pueden llegar a bloquear su reconocimiento. Asimismo, los mRNA presentan sitios de reconocimiento de proteínas de unión a RNA (RBPs) o de pequeños RNAs que pueden llegar a inhibir o promover la traducción, de manera independiente al reconocimiento de la estructura 5'cap (Merchante *et al.*, 2017).



**Figura 2. Representación tridimensional de la proteína eIF4E.** Diagrama de Richardson que ilustra la estructura 3D de la proteína eIF4E del trigo, en verde se representan los residuos de Trp que interactúan con el extremo 5'cap, representado en magenta por una molécula de m7GDP. Tomado y modificado de Monzingo *et al* 2007.

Una vez establecido el complejo eIF4F, se promueve el anclaje del complejo de pre-inicio 43S (PIC) que contiene la subunidad pequeña del ribosoma y el complejo ternario eIF2/tRNA<sup>met</sup>/GTP. Este último, junto con los factores eIF1 y eIF1A, escanean el mRNA en dirección 5'-3' en busca del codón de inicio AUG. Cuando se reconoce el codón de inicio, se forma el complejo 48S, ocurre su disociación y se da paso al ensamblaje del ribosoma completo 80S que continúa las etapas siguientes de elongación y terminación (Dever, 2002).

### 5.5 ISOFORMAS DEL FACTOR eIF4E Y FUNCIONES DIFERENCIALES

Además del papel que juega en el inicio de la traducción, el factor eIF4E también participa en la regulación de otros procesos, como son el control de exportación a citoplasma de mRNAs específicos, mediante el reconocimiento de estructuras ubicadas en el extremo 3' UTR llamadas elementos sensibles a 4E (Strudwick & Borden 2002), o la estabilidad de mensajeros y el tráfico de su localización entre diferentes complejos ribonucleoprotéicos como gránulos de estrés y cuerpos de procesamiento (Weber *et al.*, 2008).

La mayoría de los eucariontes poseen más de un gen codificante para eIF4E determinando la presencia de diversas isoformas. Todas las isoformas conservan el dominio de unión a 5'cap y varios residuos de Trp, aunque su afinidad por la estructura y formas modificadas de esta (caps modificados) pueden variar. Los residuos correspondientes al Trp 43 y 56

del eIF4E de humano, pueden presentar cambios entre las isoformas, lo que ha permitido clasificar a los factores en tres grupos:

La clase I conserva Trp 43 y 56 del eIF4E de humano y al menos una isoforma de esta clase está presente en plantas, animales y hongos. A esta clase pertenecen las isoformas eIF4E y eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana* (Joshi *et al.*, 2005). Los niveles de expresión de estas isoformas difieren entre tejidos. Por ejemplo, el factor eIF4E se expresa de manera ubicua mientras que eIF(iso)4E se expresa abundantemente en tejidos en desarrollo como raíz (Rodríguez *et al.*, 1998). Una gran parte de estudios en plantas ha abordado el papel de estas isoformas durante la infección por virus, ya que algunas mutaciones proporcionan resistencia al patógeno. Este tema se desarrollará más adelante.

La clase II posee sustituciones en ambos residuos, Trp 43 y 56 del eIF4E de humano, por residuos hidrofóbicos como Tyr, Phe o Leu. A esta clase pertenece la denominada “novedosa proteína de unión a cap” o nCBP que se descubrió en 1998 en *Arabidopsis thaliana* (Ruud *et al.*, 1998). Ortólogos de esta clase se encuentran en animales y algunos hongos, por lo que su denominación actual generalizada es 4EHP. Estas proteínas pueden unirse a la estructura 5'cap, pero su afinidad por eIF4G y otras proteínas es variable, dependiendo de la especie. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, 4EHP puede interactuar *in vitro* con eIF4G o con su isoforma eIF(iso)4G (Ruud *et al.*, 1998). Se ha encontrado que algunos miembros de clase II no pueden formar complejos de inicio eIF4F funcionales, sino que actúan como inhibidores de la traducción, por lo que se ha propuesto que esta familia, en lugar de participar activamente en la promoción de la síntesis proteica, puede ejercer regulación a otros niveles, incluyendo estabilidad o localización subcelular de transcritos (Cho *et al.*, 2005; Joshi *et al.*, 2005).

Por último, los miembros de la clase III se diferencian porque sólo el Trp 56 del eIF4E de humano está sustituido por una Cys o Tyr. En ratón se ha reportado que interactúa de forma débil con el 5'cap en comparación con las isoformas canónicas de la clase I. Es por esto que se cree que miembros de esta familia deben estar más relacionados con la inhibición de la traducción dependiente de reconocimiento del extremo 5'cap (Joshi *et al.*, 2005); miembros de esta clase no se han descrito en plantas.

*Arabidopsis thaliana* posee, dentro de la clase I, tres genes parálogos de eIF4E (*eIF4E*, *eIF4E1b*, *eIF4E1c*), el factor eIF(iso)4E y el factor de clase II 4EHP (Patrick & Browning, 2012). Los factores eIF4E1b, eIF4E1c y 4EHP tienen la capacidad de interactuar con el extremo 5'cap, con afinidad variable, así como con factores 4G; aunque su capacidad para promover la traducción *in vitro* es pobre (Ruud *et al.*, 1998; Patrick *et al.*, 2014). Debido a sus bajos niveles de expresión, se ha propuesto que no funcionan como factores generales de traducción, sino que están asociados a órganos y estados de desarrollo muy específicos. Por ejemplo, eIF4E1b se sobre-expresa en polen y embriones en desarrollo (Patrick *et al.*, 2014).

## 5.6 PAPEL DE LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN EN LA INFECCIÓN POR VIRUS

Los virus de plantas utilizan diferentes proteínas del hospedero para llevar a cabo su ciclo de vida, aprovechándose de la maquinaria celular para realizar su proceso de infección. Las plantas son capaces de reconocer esta propagación y desplegar una respuesta activa (denominada *hypersensitive response*) que involucra un reconocimiento de ligandos patógeno-específicos, seguido de un despliegue de señalización que termina en el establecimiento de una resistencia ante dicho patógeno (Martín *et al.*, 2003).

Las plantas también pueden tener una “resistencia recesiva”, que consiste en la imposibilidad de los virus de continuar su ciclo de vida, debido al impedimento de reconocimiento de la maquinaria celular por mutaciones en ciertos genes clave de la planta (Ruffel *et al.*, 2002). Un ejemplo ampliamente estudiado es la familia de Potyvirus (incluye varios virus causantes del moteado de las hojas, i.e. PVMV, CMV, entre otros), que posee una cadena simple de RNA positivo con una proteína viral (VPg) unida covalentemente al extremo 5' de su genoma y una cola poli-A en el 3'. Su RNA se traduce en una larga poliproteína que sufre un proceso de maduración por proteasas virales. Este virus es capaz de competir activamente por las proteínas de la maquinaria de traducción y con los mRNAs del hospedero, pues VPg interacciona con eIF4E y/o eIF(iso)4E (Robaglia & Caranta, 2006); la especificidad de esta interacción depende de componentes del virus y del hospedero.

La presencia de mutaciones en los factores eIF4E es suficiente para otorgar a la planta resistencia a varios potyvirus. Dependiendo de cada especie, la mutación de eIF4E o eIF(iso)4E hace que la proteína VPg pierda la capacidad de interactuar con ellas generando así una planta resistente al virus (Wittmann *et al.*, 1997). En las mutantes naturales de los factores eIF4E/eIF(iso)4E resistentes a potyvirus, no se ve afectada la función traduccional, ya que la VPg viral interacciona con un dominio diferente a los residuos de unión a 5'cap de los mensajeros o al sitio de interacción con eIF4G/eIF(iso)4G, permitiendo sus interacciones naturales. Por otra parte, mutantes nulas para eIF(iso)4E obtenidas en *Arabidopsis thaliana* adquieren resistencia a la infección por TuMV (virus del mosaico del nabo), LMV(virus del mosaico de la lechuga) y TEV (virus del grabado del tabaco), sin prevenir la infección por CYVV (virus del mosaico del trébol) (Lellis *et al.*, 2002; Duprat *et al.*, 2002); mientras que plantas mutantes para eIF4E son resistentes a la infección por CYVV (Sato *et al.*, 2005). Sin embargo, también se ha observado que algunas especies de potyvirus pueden reclutar ambas isoformas, por lo que la resistencia se asocia a mutaciones en los dos genes, como es el caso del PVMV (virus del moteado del chile) en el pimiento (Ruffel *et al.*, 2006).

El papel exacto de las proteínas eIF4E en la infección por potyvirus no se ha dilucidado completamente, aunque se sabe que la mayoría de mutaciones que confieren la pérdida de reconocimiento a VPg corresponden a aminoácidos dispuestos en clúster en regiones externas, vecinas al dominio de unión a 5'cap (Robaglia & Caranta, 2006). Los estudios sugieren que la interacción eIF4E/eIF(iso)4E-VPg puede tener un papel en la traducción

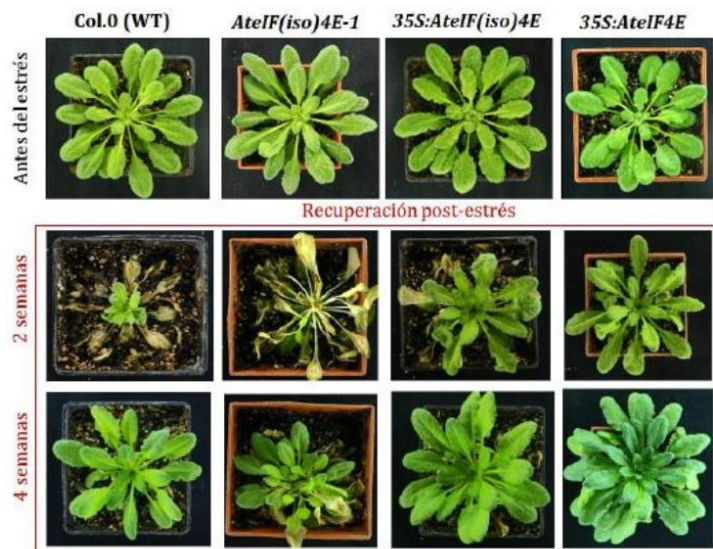
del RNA viral, en el secuestro de la maquinaria traduccional o incluso en el movimiento del virus a larga distancia en la planta (Gao *et al.*, 2004; Wang y Krishnaswamy, 2012; Contreras-Paredes *et al.*, 2013; Dinkova *et al.*, 2016).

## 6. ANTECEDENTES

Una distinción importante en la maquinaria de traducción en las plantas, en especial de plantas con flor, y en la de otros eucariotas, es en la presencia de las dos isoformas canónicas de clase I: eIF4E y eIF(iso)4E. Estas isoformas, junto con las isoformas del factor 4G, eIF4G y eIF(iso)4G pueden formar complejos distintos (eIF4F y eIF(iso)4F), para promover la traducción selectiva de poblaciones específicas de mRNAs durante el crecimiento y el desarrollo (Browning, 2015).

Con el fin de explorar el papel de las diferentes isoformas en el proceso de traducción, en nuestro grupo de trabajo se ha utilizado la línea mutante nula para eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana* (*Ateif(iso)4e-1*), que no presenta un fenotipo alterado evidente durante el crecimiento, excepto la ya documentada resistencia a algunos potyvirus (Duprat *et al.*, 2002). Esta mutante presenta mayores niveles de la isoforma eIF4E que plantas silvestres, sugiriendo cierta compensación de las funciones de la isoforma faltante, acorde a su papel parcialmente redundante. Sin embargo, a nivel molecular se encontró que la traducción de ciertos mRNA estaba alterada en condiciones de crecimiento normal. Entre los transcritos afectados en su traducción se encontraron los correspondientes a genes expresados en raíz y a proteínas del sistema endomembranal (Martínez-Silva *et al.*, 2012).

Ya que varios de los transcritos alterados en su traducción en *Ateif(iso)4e-1* correspondían a genes de respuesta a estrés por frío, se estudió el comportamiento de la mutante bajo estrés por congelamiento, junto con líneas sobreexpresoras de eIF(iso)4E o de eIF4E (Salazar-Díaz, 2017). Se observó que la sobreexpresión otorgaba a las plantas mayor resistencia al congelamiento en ausencia de aclimatación, mientras que *Ateif(iso)4e-1* presentó un fenotipo de susceptibilidad (Figura 3). Posteriormente, se encontró que la exposición a baja temperatura (4°C) por una semana (aclimatación) estimula la expresión de ambos factores canónicos en WT, además de un aumento en la formación de polisomas, lo que se puede interpretar como un incremento en la síntesis de proteínas en respuesta a la aclimatación (Salazar-Díaz, 2017).



**Figura 3.** Fenotipo de tres líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* expuestas a congelamiento SIN aclimatación. *AteIF(iso)4E-1* (mutante nula para eIF(iso)4E), *35S:AteIF(iso)4E* (sobreespresora de eIF(iso)4E), *35S:AteIF4E* (sobreespresora de eIF4E). Plantas de 8 semanas (fotoperíodo corto) fueron expuestas a estrés por congelamiento (-20°C). Tomada de Salazar, 2017.

En el laboratorio también se ha estudiado la función de la isoforma clase II de *Arabidopsis thaliana*, nCBP (recientemente renombrada como 4EHP). El transcrito de 4EHP, al igual que eIF4E, se expresa de manera ubicua en todos los tejidos; sin embargo, es especialmente abundante en la raíz. A nivel de proteína, 4EHP se encuentra mayoritariamente en botones florales (Hidalgo, 2007). Utilizando una línea mutante nula para 4EHP se encontraron fenotipos que afectan el tiempo de floración, la senescencia y la respuesta a estrés osmótico (León, 2016). Las plantas mutantes para 4EHP presentaron un mayor número de hojas de roseta, hojas caulinares, inflorescencias y silicuas, fenotipo acompañado de un retraso en la floración de aproximadamente 10 días en fotoperíodo de día largo (León, 2016).

Aunque casi todos los reportes sobre el papel de factores eIF4E en infección por virus en plantas se concentran en eIF4E y eIF(iso)4E, recientemente se encontró que 4EHP es necesaria para que virus de la familia Potexvirus puedan moverse entre las células y así extender la infección. Plantas mutantes para 4EHP disminuyen la expresión de dos proteínas necesarias para el movimiento del virus, posiblemente participando en su traducción y/o en la estabilidad del mensajero limitando así la propagación del mismo sin afectar su replicación (Keima *et al.*, 2017). Dada esta posible función, no asociada directamente a la síntesis de proteínas, en el laboratorio se abordó el papel de 4EHP mediante la exploración de su distribución celular.

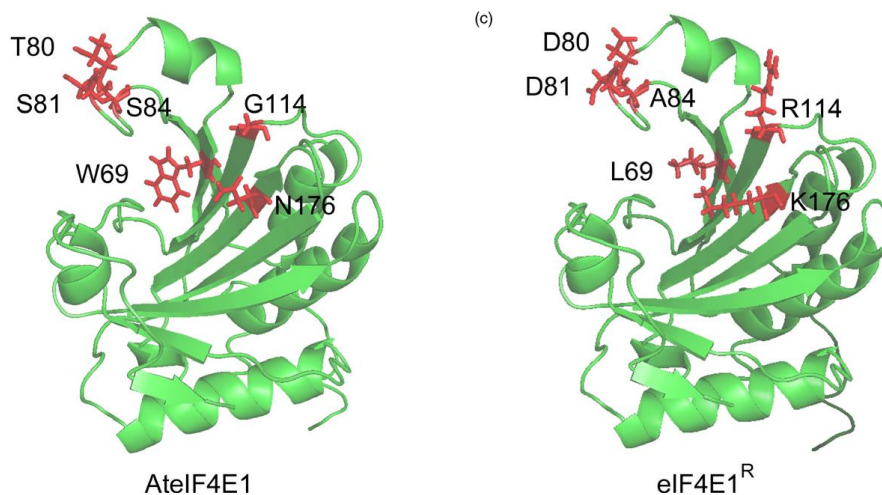
En protoplastos de hojas de *Arabidopsis thaliana*, la proteína 4EHP presenta una distribución citoplasmática diferencial, ya que forma asociaciones de tipo gránulo. En

condiciones de estrés por hipoxia, 4EHP co-localiza con la proteína DCP1 (Decapping 1) asociada a degradación de mRNAs en cuerpos de procesamiento (PBs). En altas temperaturas, 4EHP también co-localiza con la proteína HSP17 en gránulos de choque térmico, sugiriendo un posible papel en la estabilidad de mRNAs o asistencia a la actividad chaperona de HSPs (León, 2018). Estos hallazgos proponen que 4EHP puede estar actuando mediante mecanismos de regulación diferentes al control directo sobre la síntesis de proteínas. Surge entonces el cuestionamiento de si la falta de esta isoforma afectará negativamente la capacidad de *Arabidopsis thaliana* de tolerar las temperaturas estresantes.

Como se explicó, los virus reconocen proteínas del hospedero para continuar con su ciclo de vida, y mutaciones en los genes del hospedero que codifican para estas proteínas pueden otorgar a la planta una resistencia. Tomando en cuenta este hecho, nace la posibilidad de editar de manera artificial los propios genes de la planta para inducir cambios en cómo esta interactúa con su medio ambiente, como es el caso de la interacción planta-virus (Baltes y Voytas, 2015).

Se ha reportado que la falta de eIF4E o de eIF(iso)4E está asociada con la adquisición de resistencia a ciertos potyvirus, pero la pérdida de ambas, con el fin de incrementar el espectro de resistencia, es letal (Callot y Gallois, 2014). Debido a esto, se ha realizado la búsqueda de mutaciones que otorguen resistencia a la infección por virus sin perder la funcionalidad de estas proteínas en la célula. Basándose en el análisis de mutaciones naturales de eIF4E en cultivares resistentes a potyvirus, se han encontrado modificaciones en aminoácidos localizados en regiones diferentes a las necesarias para la interacción con el 5'cap de mRNAs. Con esta idea, se propuso generar plantas resistentes a infecciones virales a través del diseño de alelos sintéticos funcionales de eIF4E, mediante la introducción de mutaciones puntuales que simulen a los alelos resistentes encontrados en la naturaleza (Bastet *et al.*, 2017).

Bastet y colaboradores en el 2018, construyeron un alelo sintético de eIF4E (eIF4E\_R) en *Arabidopsis thaliana* mediante la introducción de seis mutaciones no sinónimas obtenidas de la comparación de la variabilidad alélica de cultivares resistentes a CYVV (virus de la vena amarilla del trébol) del chícharo (*Pisum sativum*) (Figura 4). Evaluaciones de la complementación de la doble mutante, (fondo genético nulo para eIF4E y eIF(iso)4E que es letal) con el alelo sintético, restableció la viabilidad, además de mantener la resistencia adquirida al potyvirus CYVV. Adicionalmente, esta línea no se ve afectada por otros potyvirus como WMV (virus del mosaico de la sandía), lo que demostró un incremento en el espectro de resistencia. Por otro lado, debido a que las plantas complementadas no poseen el alelo funcional para eIF(iso)4E, obtienen además la capacidad de ser resistentes a otros virus que utilizan a eIF(iso)4E para la infección (Bastet *et al.*, 2018). Si bien estas modificaciones puntuales en el eIF4E no corresponden a residuos encargados del reconocimiento del extremo 5'cap de mensajeros maduros, no se ha evaluado cómo responderán las plantas portadoras del alelo sintético cuando al ser expuestas a un estrés por temperatura extrema.



**Figura 4. Imagen que representa la ubicación de las mutaciones introducidas en el alelo sintético *eIF4E\_R* en la estructura tridimensional predicha de la proteína. Se indican la ubicación de los aminoácidos en el alelo WT (izquierda) y su cambio en el alelo sintético (derecha). Tomado de Bastet *et al.*, (2018).**

## 7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia de las plantas a cambios súbitos de temperatura, que ocurren principalmente en ausencia de una aclimatación apropiada, es una característica deseable para enfrentar los problemas que acarrea el cambio climático para los sistemas agrícolas y la seguridad alimentaria. Para la búsqueda de soluciones y estrategias es necesario entender con mayor detalle los mecanismos que operan en las plantas cuando están expuestas a temperaturas estresantes. Si bien se han caracterizado varios genes asociados a estrés por temperatura, no se conoce a profundidad cómo operan las respuestas de aclimatación dependientes de la regulación traduccional y específicamente de la participación diferencial de factores asociados a esta. Estudios globales de expresión encontraron una función selectiva de las isoformas eIF4E y eIF(iso)4E en la traducción específica de mRNAs involucrados en la tolerancia a bajas temperaturas (Martínez-Silva *et al.*, 2012). A pesar de la parcial redundancia de estos factores para la sobrevivencia de la planta en condiciones normales, podría esperarse que la falta de alguna de estas isoformas repercuta en la respuesta molecular al estrés. Por otro lado 4EHP se ha visto reclutado a agregados citoplasmáticos en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico (León 2018) por lo que es de interés explorar si se ve afectada la respuesta de tolerancia a temperaturas extremas en plantas carentes de esta isoforma. Finalmente, si bien el uso de alelos sintéticos de eIF4E resistentes a virus es prometedor para cultivos afectados por estos patógenos (Bastet *et al.*, 2018), no se sabe si podría haber un efecto negativo en la respuesta de tolerancia a temperaturas nocivas en la planta portadora de dicho alelo.

## 8. HIPÓTESIS

- Los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E, así como la isoforma 4EHP participan en la regulación de la expresión genética en respuesta a estrés por temperatura en *Arabidopsis thaliana*, por lo que la ausencia de alguna de estas afectará su respuesta de tolerancia a temperaturas extremas.
- La mutante con el alelo sintético de eIF4E que le confiere resistencia a potyvirus no debería estar afectada en la respuesta de aclimatación a estrés por temperatura en *Arabidopsis thaliana*, debido a que las modificaciones no involucran el sitio de unión a cap.

## 9. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de eIF4E, eIF(iso)4E, 4EHP y el alelo sintético de eIF4E (eIF4E\_R) en la respuesta a estrés por temperaturas extremas.

## 10. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el fenotipo de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* para las diferentes isoformas de eIF4E en respuesta a estrés por congelamiento.
- Analizar el efecto de la ausencia de isoformas de eIF4E en la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés por frío, en las líneas mutantes con respuesta fenotípica diferencial.
- Implementar un protocolo de estrés por altas temperaturas para las líneas mutantes de las diferentes isoformas de eIF4E.
- Identificar las líneas mutantes que presentan una respuesta diferencial mayor en las condiciones de temperatura extrema.

## 11. MÉTODOS

### 11.1 CULTIVO DE PLANTAS

**Desinfección y siembra de semillas:** Las semillas se pusieron en un tubo de microfuga y se agregó 1mL de hipoclorito de sodio al 2%, 1µL de Tween 20 (concentración final de 0.1 %) y se agitó vigorosamente por 20 min. Posteriormente el tubo se centrifugó por 10s y se eliminó el sobrenadante, se hacen 5 lavados con 1 mL de agua destilada estéril, agitando por 20 segundos cada vez; al terminar el lavado se resuspenden las semillas en 100 µL de agua estéril. Las semillas se sembraron en cajas de Petri con medio MS o bien



en macetas con sustrato estéril (mezcla de sustrato “Sunshine”, Agrolita y vermiculita en proporciones 3:1:1 respectivamente). Las cajas o macetas se incubaron en oscuridad a 4°C por 48 horas (período de estratificación), se pasaron a cámara de crecimiento a 22°C con fotoperíodo de día corto (8h luz, 16h oscuridad) o de día largo (16h luz, 8h oscuridad), dependiendo del ensayo realizado. Las condiciones se indican de manera específica en las figuras correspondientes.

**Propagación de plantas y obtención de semilla:** Se usaron plantas sembradas en tierra, crecidas a 22°C y fotoperiodo estacional en el invernadero hasta los 30 o más días (dependiendo del fenotipo de algunas mutantes), momento en el que comenzaba la floración. Posteriormente se esperó la maduración de las semillas, aproximadamente tres semanas para su recolección. Para comprobar las mutaciones se realizó la recolección de tejido vegetal (hojas) a los 30 días de crecimiento para la extracción de DNA, utilizando el kit DNAeasy Plant Mini Kit de Qiagen.

## 11.2 EXTRACCIÓN DE RNA Y SINTESIS DE cDNA

Para la extracción de RNA total a partir de tejido de hojas frescas, se utilizó el método de fenol/cloroformo, acorde al protocolo del reactivo TRIzol LS Reagent. Para todas las extracciones se verificó la integridad del RNA mediante un gel de agarosa al 1,5%. Después, las muestras fueron tratadas con DNAsa RQ1 según el protocolo de RQ1 RNase-free DNase de Promega, en un volumen final de reacción de 20 µL. Posteriormente, las muestras fueron purificadas en las columnas del sistema RNA Clean and Concentrator de Zymo Research. Finalmente, se realizó la síntesis de cDNA según el protocolo para la enzima ImProm-II Retrotranscriptasa (Promega).

## 11.3 LÍNEAS MUTANTES UTILIZADAS

Se utilizaron seis líneas mutantes del ecotipo Columbia 0 (Col-0) de *Arabidopsis thaliana*. La línea homocigota nula del factor eIF4E (*eIF4E\_KO*) (SALK145583) proviene de la inserción de T-DNA en el primer intrón de este gen, en un fondo genético cum-1 el cual posee un codón de paro prematuro en el primer *exón* (Sato *et al.*, 2005); donada por el grupo del Dr Jean-Luc Gallois, INRA, Francia. La línea mutante nula de la isoforma eIF(iso)4E (*eIF(iso)4E\_KO*) que posee la inserción de un elemento dSpm en el segundo *exón* de este gen (Duprat *et al.*, 2002) fue donada por el laboratorio del Dr. Christophe Robaglia de la UNM, Francia. Las líneas mutantes complementadas con el alelo sintético de eIF4E y la línea control (*eIF4E\_R* y *eIF4E\_GENO*) (Bastet *et al.*, 2018) fueron donadas al laboratorio por el Dr. Jean-Luc Gallois, INRA, Francia. La línea mutante homocigota nula de nCBP (*4EHP\_KO*) (SALK- 131503.32.70) es producto de la inserción de T-DNA en el cuarto *exón* del gen y adquirió del banco de mutantes SALK, TAIR. En la Tabla 1 se ilustra el genotipo de cada una de las líneas mutantes utilizadas en este proyecto.

MUTANTE/ALELO	eIF4E	eIFiso4E	4EHP
<i>eIF4E_KO</i>			
<i>eIF(iso)4E_KO</i>	↑ ↑ ↑		
<i>4EHP_KO</i>			
<i>eIF4E_KO/eIF(iso)4E_KO</i>	☠	☠	☠
COMPLEMENTADAS			
<i>eIF4E_R</i>	Sintético		
<i>eIF4E_GENO</i>	eIF4E		

**Tabla 1. Fondo genético de las líneas utilizadas en el proyecto.** El color verde indica la presencia del alelo silvestre, el color rojo representa alelo knock-out en homocigosis. Las flechas apuntando arriba indican una sobreexpresión del alelo detectada en la línea mutante. La calavera significa que la línea mutante es letal. *eIF4E\_R*, es un línea que expresa el alelo sintético de eIF4E (mutaciones puntuales que promueven resistencia a infección por potyvirus) en el fondo genético de la doble mutante *eIF4E\_KO/eIF(iso)4E\_KO*; *eIF4\_GENO*, es la línea mutante de eIF4E complementada con el alelo silvestre de eIF4E.

Oligonucleótidos utilizados para la confirmación de las líneas mutantes.		
Alelo Mutante	Nombre	Secuencia
<i>eIF4E_KO</i>	Z-2014	TTCCATTGTTTTCCAATGCTC
	Z-2015	GAAACAAACCTCTGGGGAAG
	LBb1	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
<i>eIF(iso)4E_KO</i>	4E2KOS	TTGACCCAATAGAGTCCAGAAAT
	4E2KOA	CTTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG
	4E4KO2A	CTCTCCAATCAAAGCCATCAACTA
<i>4EHP_KO</i>	LP-AtnCBP	GGTTTTGCGAATTTGTTTAGAT
	RP-AtnCBP	TCTCACCTGATGGTCAGAAGC
	LBa1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
<i>Alelo sintético eIF4E (PCR)</i>	Z3774-F-A	TTCGATAATCCTGCTGTGAAATCGAAACAAGACGA
	Z-2014	TTCCATTGTTTTCCAATGCTC
<i>Alelo sintético eIF4E (HRM)</i>	4E Exon1 Fw	CGAGAGGAAGTACATTAGTTTGG
	RPA4E	AATGGGATCTTCTAATCCCC

**Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados para confirmar cada uno de los alelos mutantes de *Arabidopsis thaliana* por PCR punto final y HRM.** Se indica el alelo mutante, el nombre del oligonucleótido y la secuencia.

#### 11.4 DETERMINACIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES MEDIANTE ANÁLISIS DE ALTA RESOLUCIÓN DE FUSIÓN (HRM)

El ensayo de HRM se realizó en el CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, utilizando el siguiente mix de reacción a 10 µL de volumen final: 5 µL de Máster Mix Sso Advanced Universal SYBR-Green supermix, Oligonucleótidos a concentración final de 300 nM, 1 µL de DNA genómico a 150 ng y agua desionizada estéril, hasta completar los 10 µL. El programa de amplificación utilizado consiste en desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, amplificación por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos y 60°C por 30 segundos, seguido de un análisis de Melting de 60 a 95°C con intervalos de análisis de 0.1°C. Se obtiene un archivo PCRdata (.pcrd) que se analiza en el programa Precision Melt Analysis Software. Las secuencias de cebadores utilizados para las reacciones de HRM se muestran en la Tabla 2 y su localización en el gen se muestra en la Figura 18A.

#### 11.5 PCR PUNTO FINAL

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Veriti Thermal Cycler, de Applied Biosystems. La mezcla de reacción se realizó de la siguiente manera: KAPA Taq ReadyMix de KAPA Biosystems 5 µL, DNA 1 µL (50 ng), oligonucleótido Fw 0.3 µL, Oligonucleótido Rv 0,3 µL (0.2 µL da cada uno cuando se utilizan tres cebadores en la reacción), agua 3.4 µL para un volumen final de 10 µL. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de pre-desnaturalización de 2 min a 95°C, desnaturalización de 95°C por 30 s, alineamiento 60°C por 30 s y una extensión a 72 °C por 2 min, y finalizando con ciclo de extensión final de 8 min a 72 °C. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1,3 %, en solución TAE 1X, teñido con bromuro de etidio y visualizados en un ChemiDoc. Lo cebadores utilizados para las reacciones de PCR punto final se muestran en la Tabla 2.

#### 11.6 PCR EN TIEMPO REAL

Las qPCRs para evaluar los niveles de transcritos de interés convertidos a cDNA se realizaron en un equipo Applied Biosystems Fast 9500 Real-Time PCR empleando el kit Maxima SYBR Green/Rox (Thermo Scientific). El programa en el termociclador fue: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s y 63°C por 1 min, seguido por un análisis final para obtener una curva de desnaturalización de 60-95°C. La cuantificación de la expresión relativa de los genes se hizo usando el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001) utilizando a Actina como gen normalizador y WT en condiciones control como referencia.

Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de qPCR		
Gen	No. de Acceso	Secuencia
<i>COR15A</i>	At2g42540	FW: AGGAGGAGAAAGGAAAAGAAGCC
		RV: AAGACCCTACTTTGTGGCATCC
<i>TCF1</i>	At3g55580	FW: GTATGACGACCACCAGCAGCAAC

		RV: CAGTCTGACAACATTGACCTCTCGG
<i>DREB1A</i>	At4g25480	FW: TGAGATGCCGAGTTTGTGG
		RV: ATTCCACTGTACGGACGGAAG
<i>eIF4E</i>	At4g18040	FW: AAGAACGCTTACACCGCTTG
		RV: TCAACACTAGCAAAGACAGACTG
<i>eIF4(iso)4E</i>	At5g35620	FW: GGAGAAACAACCACACAAGCTC
		RV: CCCAAAAATCTTCGACGGTGTC

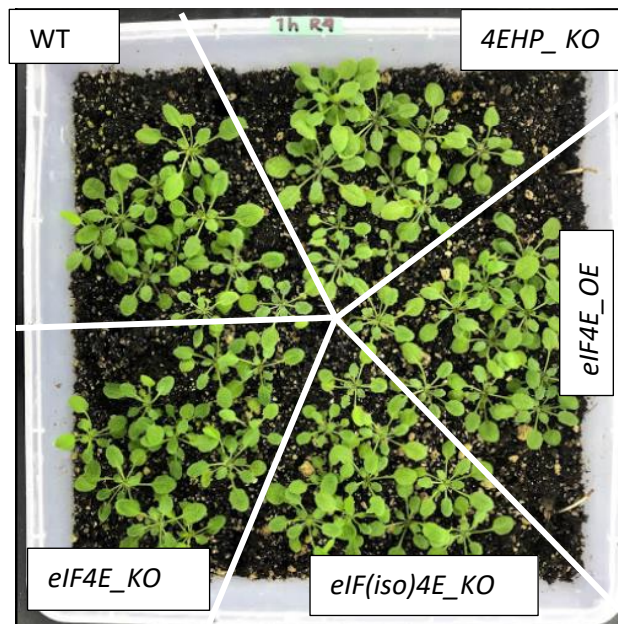
**Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de qPCR.** Se indica el nombre del gen, el número de acceso TAIR y la secuencia .

### 11.7 PROTOCOLO DE ESTRÉS POR CONGELAMIENTO

Todas las plantas utilizadas en estos ensayos fueron crecidas en sustrato en una cámara a 22°C bajo régimen de luz de día corto (8h luz y 16h oscuridad). Es importante resaltar que se analizaron las plantas a dos edades diferentes al momento de tratamiento con frío: cinco semanas post-siembra o siete semanas post-siembra. Los protocolos de estrés fueron diferentes para cada grupo de plantas y se explican en detalle a continuación:

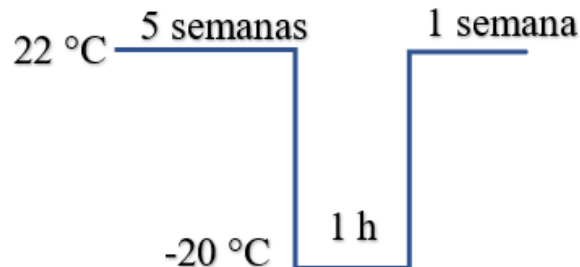
#### Tolerancia basal al congelamiento (plantas de 5 semanas)

Con el objetivo de evaluar la respuesta fenotípica de líneas mutantes (*4EHP\_KO*, *eIF4E\_KO*, *eIF(iso)4E\_KO* y *eIF4E\_OE* (sobre-expresora) al estrés por congelamiento, se crecieron un promedio de 10 plantas por cada línea y WT, en una misma maceta cuadrada de 25 x 25 cm, organizadas siempre de esta manera:



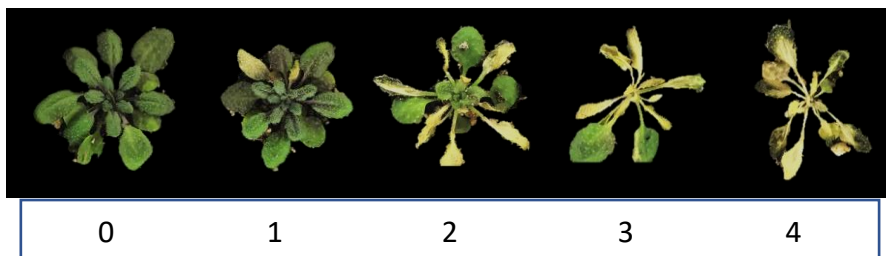
**Figura 5. Organización de siembra de líneas *4EHP\_KO*, *eIF4E\_KO*, *eIF(iso)4E\_KO*, *eIF4E\_OE* y WT para plantas de 5 semanas.** Las semillas se sembraron en una única maceta dispuestas en la orientación indicada.

A las 5 semanas post-siembra (fase de luz en el fotoperíodo), las macetas se sometieron a choque por congelamiento en un refrigerador a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Después, las plantas se pasaron de nuevo a cámara de crecimiento a  $22^{\circ}\text{C}$ , se dejan recuperar por 1 semana y se registra el fenotipo. El esquema de estrés se muestra en la Figura 6.



**Figura 6. Protocolo para evaluar la tolerancia basal a estrés por congelamiento.** Se ilustra el tiempo de crecimiento, de recuperación y la temperatura a la que fueron sometidas las plantas.

Para el análisis fenotípico de plantas sometidas a estrés por congelamiento se realizó una clasificación numérica acorde al grado de afectación que presentaban las plantas después de la recuperación, **escala de grado de daño** (Figura 7). Dicha escala consistió en valores 0-4 dependiendo de la proporción de hojas dañadas. El grado **0** representa a plantas intactas que no muestran hojas dañadas; **1**, cuando la planta presenta muerte en una o dos de las hojas (10-20%); **2**, cuando las hojas afectadas son tres o más (40-50%), **3** corresponde a plantas con alrededor de 80% de daño, en las que solo 1 o 2 hojas conservan el color verde y el mayor grado de afectación es el **4**, que representa la muerte total de la planta.



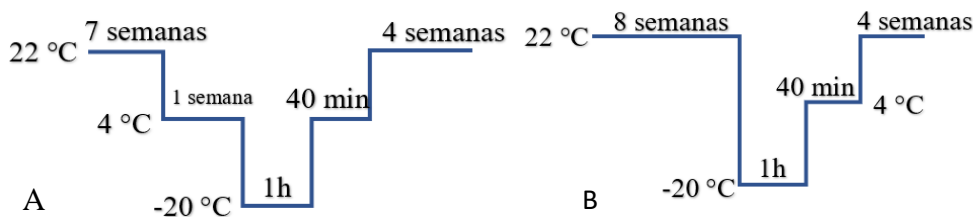
**Figura 7. Escala de grado de daño fenotípico para plantas de 5 semanas sometidas a estrés por congelamiento y después de una semana de recuperación.** La foto muestra plantas representativas para cada una de las cinco categorías fenotípicas descritas.

Se realizó la clasificación de cada una de las plantas después del tiempo de recuperación según esta escala, y el análisis se muestra en resultados.

#### **Tolerancia adquirida al congelamiento (plantas de 7 semanas)**

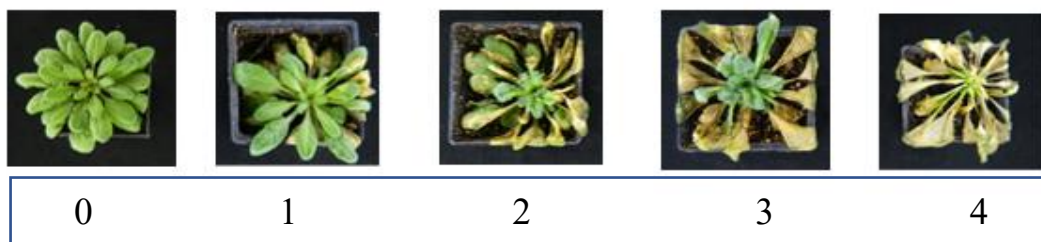
Se sembraron 20 plantas en sustrato, cada una en maceta individual, de cada una de las líneas evaluadas (*4EHP\_KO*, *eIF4E\_KO*, *eIF(iso)4E\_KO*, *eIF4E\_OE*) y WT, para un

total de 100 plantas. Se dejaron crecer en una cámara de crecimiento a 22°C, bajo un fotoperíodo de día corto (8h luz,16h oscuridad) durante 7 semanas y posteriormente se dividieron en dos grupos, 10 plantas fueron sometidas a un período de aclimatación a 4°C en el cuarto frío en estantes con fotoperíodo de día corto por una semana; las 10 restantes permanecieron a 22°C por el mismo tiempo. Posteriormente, todas las plantas fueron sometidas a congelamiento de -20°C por una hora en un refrigerador, llevadas a una recuperación de 40 minutos a 4°C, y posteriormente fueron regresadas a la cámara de crecimiento a 22°C en donde se dejaron recuperar durante 4 semanas (Figura 8).



**Figura 8. Protocolo para evaluar la tolerancia adquirida al estrés por congelamiento.** Se ilustran los cambios de temperatura, tiempos de crecimiento y recuperación de plantas aclimatadas a 4°C (A), y no aclimatadas (B).

Pasadas las cuatro semanas de recuperación, se registró el fenotipo de las plantas estableciendo una **escala de grado de daño** (0-4) de manera similar a la previamente establecida para las plantas de 5 semanas, con la salvedad que estas plantas presentaron un mayor número de hojas, y la distinción de las hojas dañadas corresponden fundamentalmente a hojas de mayor edad (Figura 9).



**Figura 9. Escala de grado de daño fenotípico para plantas de 7 semanas sometidas o no, a un proceso de aclimatación por una semana adicional previo al congelamiento y 4 semanas de recuperación.** Se muestra una foto representativa de cada una de las cinco categorías fenotípicas descritas.

Se realizó la clasificación de cada una de las plantas después del tiempo de recuperación según esta escala, y el análisis se muestra en la sección de resultados.

### 11.8 PROTOCOLO DE ESTRÉS POR CALOR

Para este ensayo se utilizaron plántulas sembradas en Medio MS (25mL de Murashige y Skoog, 0,8% agar y 1% sacarosa) en cajas de Petri de 90 x 15 mm, estratificadas a 4°C

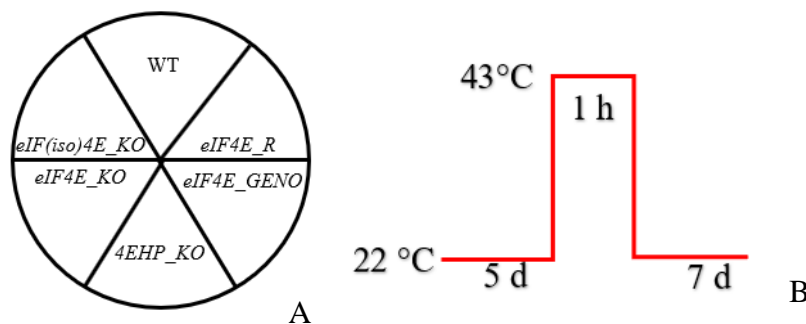


por 48 horas y crecidas en cámara a 22°C bajo condiciones de día corto (8h luz, 16h oscuridad).

Las cajas con plántulas crecidas por los tiempos indicados se introdujeron en una bolsa de plástico roja para residuos biológicos y fueron sumergidas completamente en un baño termostático Cole Parmer Polystat circulator, bajo las condiciones de temperatura indicadas en cada protocolo. La temperatura fue verificada durante los tratamientos con un termómetro de mercurio.

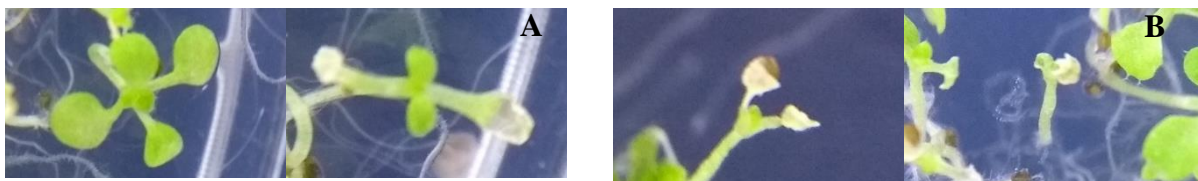
### Termotolerancia basal

Con el fin de evaluar la respuesta basal de las diferentes líneas mutantes al estrés por calor, se realizaron ensayos preliminares de exploración para encontrar la temperatura a la cual se podían observar respuestas diferenciales de las líneas (Anexo 4). Finalmente, se seleccionó el protocolo mostrado en la Figura 10 para realizar múltiples réplicas biológicas y análisis de termotolerancia basal. En este caso, además de las líneas mutantes utilizadas para los experimentos de estrés por congelamiento, se incluyeron *eIF4E-R\_KO* y *eIF4E\_GENO*. Plántulas de 5 días se sometieron a 43°C durante una hora y posteriormente llevadas a recuperación en la cámara de crecimiento a 22°C durante siete días.



**Figura 10. Protocolo de estrés para evaluar la tolerancia basal al calor.** A) Esquema que muestra el área en la que se sembró cada una de las líneas mutantes en la misma caja Petri. B) Se ilustran los tiempos y cambios de temperatura aplicados.

Posterior a la semana de recuperación se registró el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas expandidas de cada una de las líneas evaluadas, siguiendo la guía mostrada a continuación:



**Figura 11. Fotografías de plántulas con diferentes fenotipos post-recuperación del estrés por calor.** A) Se muestran los fenotipos de resistencia que se pueden presentar: plántulas intactas con cotiledones íntegros y hojas verdaderas expandidas (izquierda) y

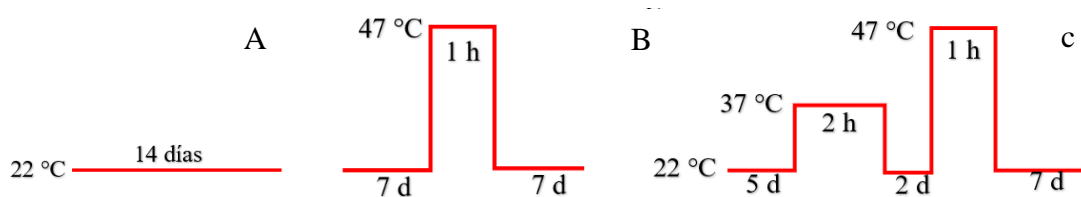
plántulas que a pesar de presentar daños en los cotiledones mostraron hojas verdaderas expandidas sanas (derecha). **B**) se ilustran los fenotipos de susceptibilidad que se observaron: plántulas con daño en los cotiledones y sin surgimiento de hojas verdaderas (izquierda), plántulas con daño y caída de todas las hojas (derecha).

El registro de fenotipos de daño de cada una de las plantas de las líneas mutantes se analiza y presenta en la sección de resultados.

### Termotolerancia adquirida

Se siguieron dos protocolos diferentes para los ensayos de termotolerancia adquirida al calor. En ambos, se continuó utilizando la distribución espacial de líneas mostrada en la Figura 10.

Para el **Protocolo 1**, plántulas de 5 días fueron sometidas a una aclimatación de 37°C por dos horas, posteriormente se recuperaron por 2 días a 22°C, y luego se retaron a un choque térmico de 47°C por una hora, finalmente se dejaron recuperar por una semana a 22°C. Como controles se utilizaron plántulas sin tratamiento de estrés y plántulas no aclimatadas (7 días), sometidas directamente al choque térmico (Figura 12). Se registró el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas expandidas acorde al criterio mostrado en la Figura 11.



**Figura 12. Protocolo 1 para evaluar termotolerancia adquirida.** A) crecimiento de plántulas control, sin retos de temperatura, abarcando el período total de plántulas con termotolerancia adquirida. B) tratamiento de plántulas que no son aclimatadas, sometidas al choque térmico a 7 días de crecimiento. C) tratamiento de aclimatación al que se someten las plántulas a 5 días de crecimiento y después de 2 días de recuperación (total 7 días) sometidas a choque térmico.

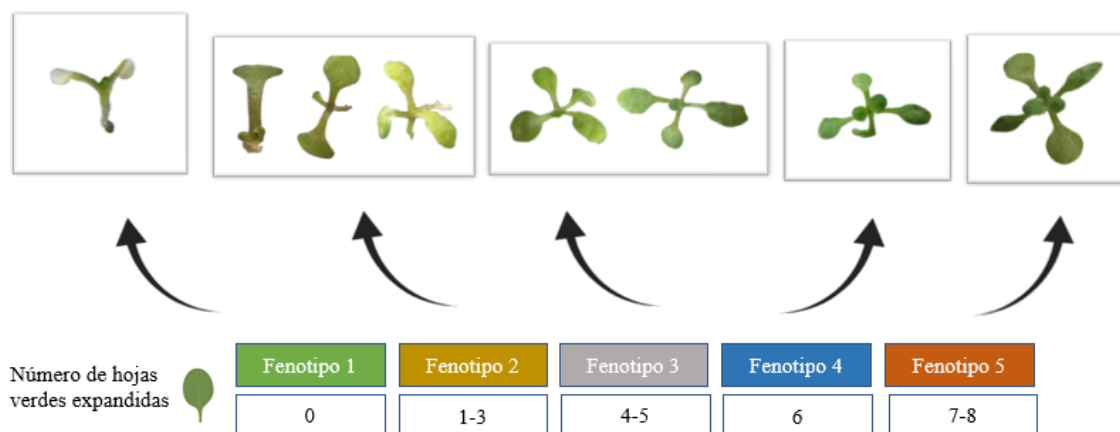
Para el **Protocolo 2** se siguió el procedimiento reportado por Fernández-Bautista y colaboradores en el 2018 (Figura 13). A diferencia de los ensayos previos, en este protocolo las plántulas fueron crecidas en orientación vertical bajo fotoperíodo de día largo (16 h de luz con 8 h de oscuridad) por tres días al momento de someterlas a una temperatura de aclimatación de 38 °C por tres horas. Posteriormente fueron llevadas a 22°C por dos días, y el choque térmico se realizó a 45°C por 100 minutos, seguido por un tiempo de recuperación de nueve días a 22°C:





**Figura 13. Protocolo 2 para evaluar la termotolerancia adquirida.** A) crecimiento de plántulas control, sin retos de temperatura, abarcando el período total de plántulas con termotolerancia adquirida. B) tratamiento de aclimatación al que se someten las plántulas a 3 días de crecimiento y después de 2 días de recuperación (total 5 días) sometidas a choque térmico (Fernández-Bautista *et al.*, 2018).

Posterior al tiempo de recuperación se clasificaron los fenotipos observados dependiendo del número de hojas verdes expandidas (**se incluyen los cotiledones**), el criterio se ilustra en la Figura 14. Aunque se realizó la estratificación en todos los experimentos, hay cierta variabilidad en el número de hojas que presentaron las plantas control. El Fenotipo 4 (6 hojas) fue el más representativo para cualquiera de las líneas utilizadas en el crecimiento control.



**Figura 14. Criterio de clasificación de fenotipos para plántulas de 14 días de crecidas.** Basado en el número de hojas verdes expandidas (**incluidos cotiledones**). Las plántulas se clasifican en 5 fenotipos de F1 a F5, en cada uno se indica el número de hojas verdes expandidas que le corresponde. Arriba se muestra la fotografía de cómo luce la plántula en cada caso.

El registro de fenotipos de afectación propuesto para los dos protocolos de cada una de las plantas de las líneas mutantes se analiza y muestra en la sección de resultados.

## 12. RESULTADOS

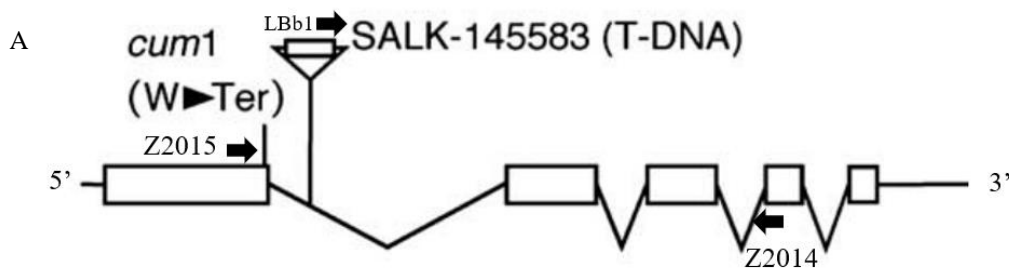
### 12.1 COMPROBACIÓN DE MUTANTES.

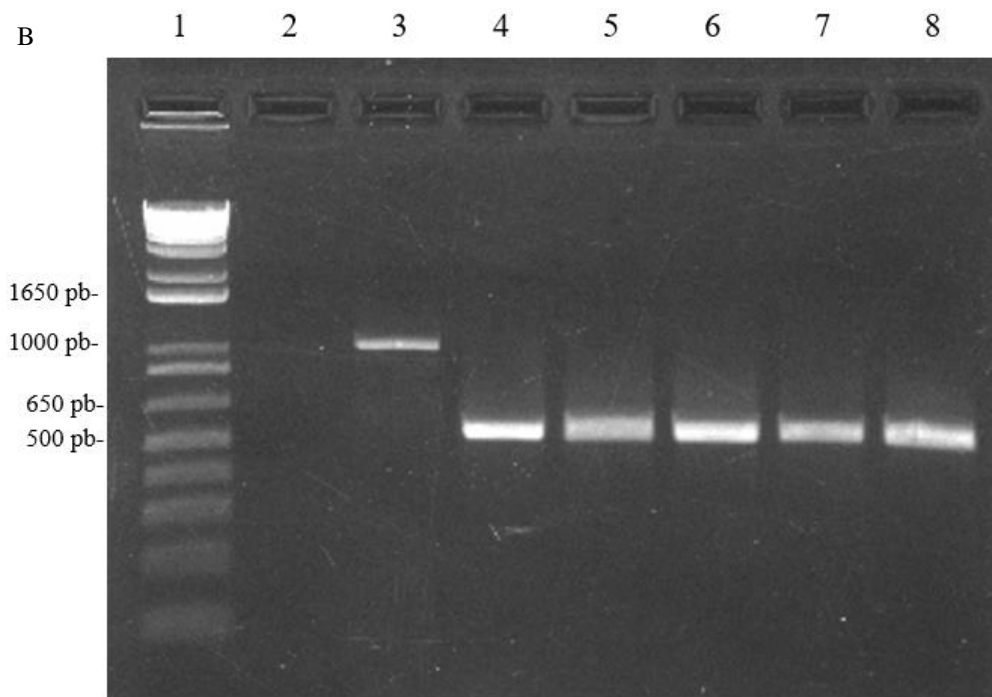
Con el fin de asegurarse que las plantas utilizadas en los experimentos tuvieran el fondo genético deseado se llevaron a cabo los siguientes experimentos para su confirmación:

La estrategia utilizada para la confirmación de las líneas mutantes de la colección SALK (4EHP\_KO y eIF4E\_KO) consistió en el uso de tres oligonucleótidos (Tabla 2), de los cuales dos flanquean la zona de inserción de la secuencia de T-DNA y el otro se encuentra sobre la propia secuencia (Figuras 15A y 17A). De esta manera al utilizar los tres oligos en una reacción de PCR se van a poder apreciar dos tamaños de fragmentos: Si se trata de un alelo WT, el fragmento tiene el tamaño correspondiente a la distancia entre los cebadores que mapean en el gen, si es un alelo mutante, el tamaño corresponderá a la distancia entre el cebador sentido y el ubicado sobre la secuencia de T-DNA. En cuanto a las mutantes por inserción de dSpm (*eIF(iso)4E\_KO*) la estrategia fue similar, en este caso se diseñaron tres oligonucleótidos: dos de ellos flanqueando la inserción y uno sobre la secuencia del elemento dSpm (Figura 16A). Para la confirmación de la línea *eIF4E\_R* por PCR en tiempo final se construyó un oligonucleótido específico para una mutación puntual del alelo sintético del exón 1 y se evaluó la presencia o ausencia de amplificación utilizando como par un oligonucleótido en contrasentido, posteriormente se volvieron a confirmar las candidatas usando la estrategia de HRM sobre el amplicón del exón 1.

#### Confirmación de *eIF4E\_KO*

Se realizó una reacción de PCR de tres oligonucleótidos con DNA genómico de cinco plantas candidatas a ser *eIF4E\_KO*, y se visualizó el resultado en un gel de agarosa (Figura 15B).



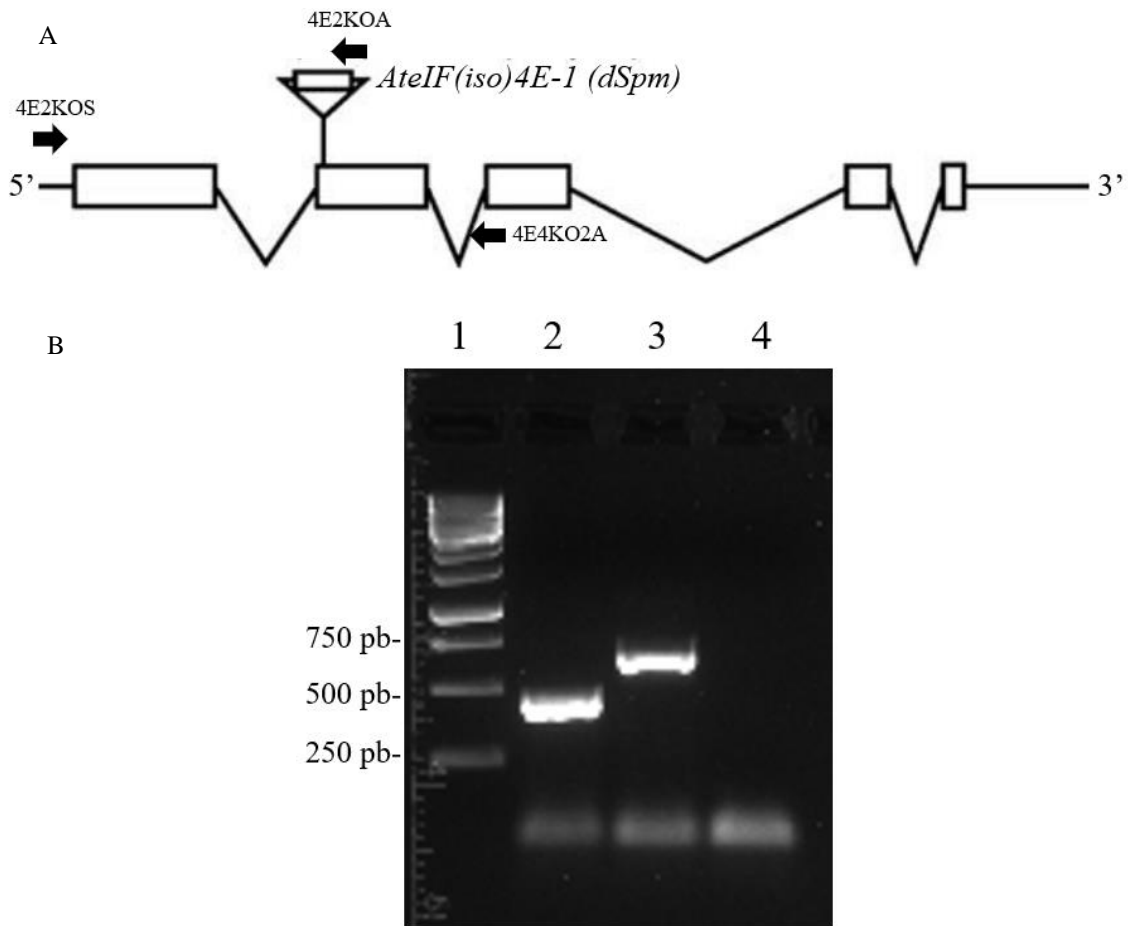


**Figura 15. Confirmación de *eIF4E\_KO*.** A) Representación esquemática del gen *eIF4E\_KO* con la inserción del T-DNA y la ubicación de los oligonucleótidos Z2014, Z2015 y LBb1, tomado y modificado de Sato *et al.*, 2005. B) Amplificación de cinco muestras de DNA de diferentes plantas candidatas a ser mutantes homocigotas nulas para *eIF4E* utilizando el mix de tres cebadores. Carriles: 1, Marcador de peso molecular. 2, Control negativo. 3, DNA de planta WT. (4-8) Amplicones de DNA de cinco plantas candidatas a ser *eIF4E\_KO*

Como se puede observar, las cinco plantas candidatas *eIF4E\_KO* presentaron un amplicón más pequeño que el obtenido en la línea WT, de un poco más de 500 pb, correspondiente a los cebadores LBb1 y Z2014, lo que indica que poseen la inserción de T-DNA en su genoma. El hecho de que no se hayan amplificado dos bandas significa que son plantas homocigotas para la inserción. Por otro lado, tal como se esperaba, en el control se ve una banda de cerca de mil pares de bases para WT, correspondiente al amplicón del par de cebadores Z2015 y Z2014, lo que representa la ausencia de la inserción de T-DNA en la muestra. Las plantas confirmadas fueron propagadas.

#### **Confirmación de *eiF(iso)4E\_KO***

Se realizó una reacción de PCR de tres oligonucleótidos en DNA genómico de una planta candidata a ser *eiF(iso)4E\_KO* y se visualizó el resultado en un gel de agarosa (Figura 16B).

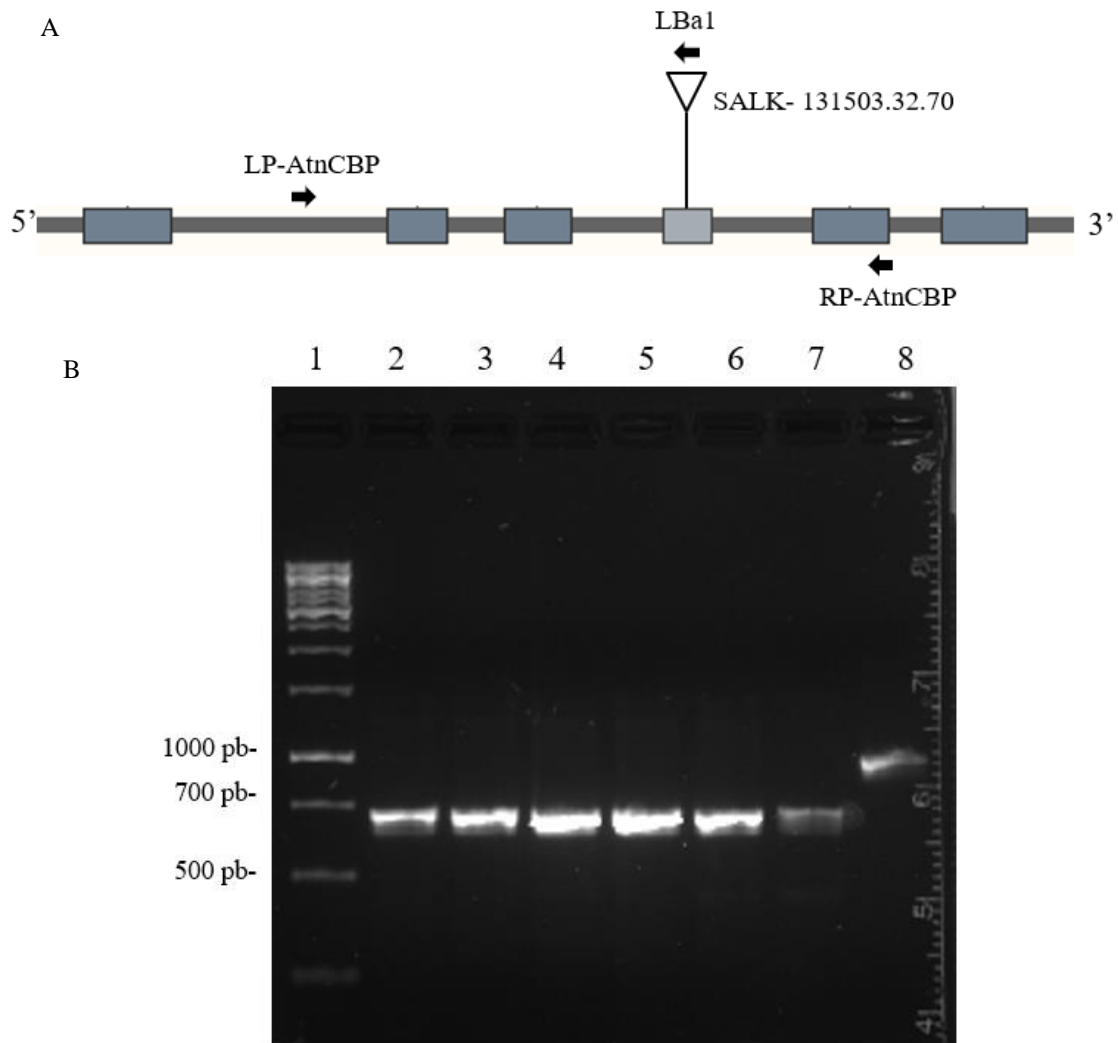


**Figura 16. Confirmación de *eIF(iso)4E\_KO*.** A) Representación esquemática del gen *eIF(iso)4E\_KO* con la inserción del elemento dSpm y la ubicación de los oligonucleótidos 4E2KOS, 4E2KOA y 4E4KO2A, Tomado y modificado de Sato *et al.*, 2005. B) Amplificación del DNA de una planta candidata de la línea mutante *eIF(iso)4E* y el DNA de una planta WT, utilizando el mix de tres cebadores. Carriles: 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, amplicón de una muestra de DNA de planta candidata a ser *eIF(iso)4E\_KO* .3, amplicón de una muestra de DNA de una planta WT. 4, Control negativo.

Para la muestra de la candidata a ser mutante nula de *eIF(iso)4E* se obtuvo la amplificación de un fragmento cercano a las 500 pb correspondiente a los cebadores 4E2KOS+ 4E4KO2A, por el contrario, para la línea WT utilizada como control se aprecia un amplicón de cerca de 700 pb correspondiente a los cebadores 4E2KOS + 4E2KO2A, los cuales flanquean la región de inserción del elemento dSpm. Estos resultados indican que la candidata *eIF(iso)4E\_KO* es homocigota para la inserción. Las plántulas confirmadas fueron propagadas.

### Confirmación de *4EHP\_KO*

Se realizó una reacción de PCR de tres oligonucleótidos en DNA genómico de una planta candidata a ser *4EHP\_KO* y se visualizó el resultado en un gel de agarosa (Figura 17B).



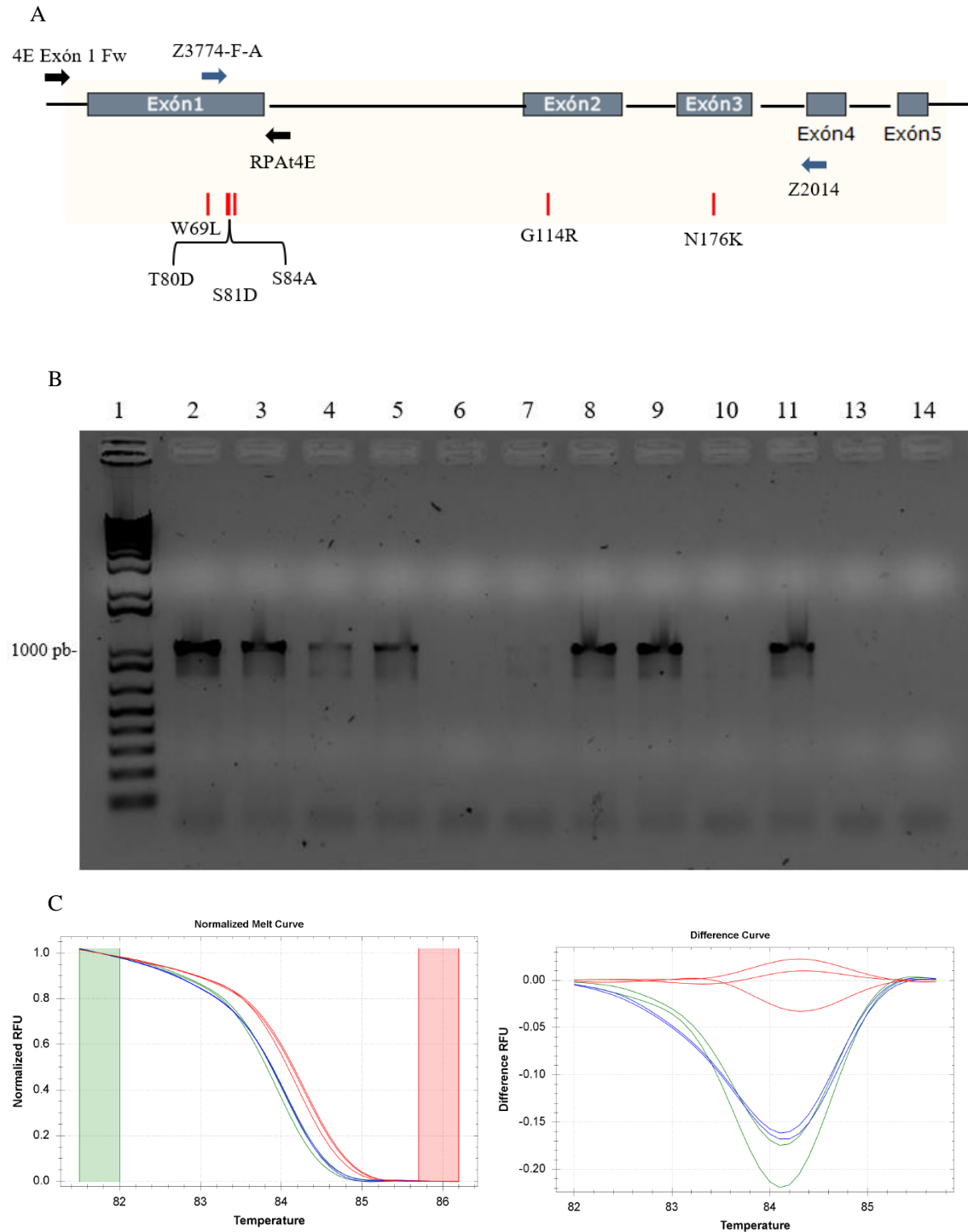
**Figura 17. Confirmación de *4EHP\_KO*.** A) Representación esquemática del gen *4EHP* con la inserción de T-DNA y la ubicación de los oligonucleótidos LP-AtnCBP, RP-AtnCBP y LBa1. B) Resultado de PCR de seis muestras de DNA de plantas candidatas de *4EHP\_KO* y una muestra de DNA WT utilizando el mix de tres cebadores. Carriles: 1, Marcador de peso molecular. 2-7, amplicones de DNA de seis plantas candidatas a ser *4EHP\_KO*. 8, amplicón de una muestra de DNA de una planta WT.

Como se puede ver en el gel de agarosa, el cebador LP-AtnCBP junto con LBa1 que está ubicado sobre la secuencia del T-DNA insertado, dan lugar a un amplicón más pequeño cercano a los 700 pb para las seis plantas candidatas de la línea *4EHP\_KO* mientras que para el caso de la línea WT utilizada como control que no posee la inserción, se obtuvo un fragmento más grande cercano a los 1000 pb correspondiente a los cebadores LP-AtnCBP y RP-AtnCBP. Se confirmó así el estado homocigoto de las candidatas. Las plántulas confirmadas fueron propagadas.

#### Confirmación de *eIF4E-R*

Se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para la detección del alelo sintético sobre DNA de la planta mutante candidata y sobre una muestra WT;

posteriormente se confirmó la identidad mediante un análisis de HRM del primer exón del gen:



**Figura 18. Confirmación de *eIF4E\_R*.** A) Representación esquemática del gen *eIF4E-R* y la posición de los oligonucleótidos utilizados para su confirmación. Las barras rojas representan las mutaciones puntuales, indicando en cada caso el cambio de aminoácido. En flechas azules se representan los oligonucleótidos utilizados para amplificar específicamente una región del alelo sintético, Z3774-F-A se alinea con la mutación puntual correspondiente al cambio T80D, el oligonucleótido Z2014 alinea sobre una

secuencia WT del gen. En flechas negras se indican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del Exón 1 sintético analizado posteriormente por HRM. **B)** Resultado de PCR utilizando los oligonucleótidos Z3774-F-A+ Z2014. Carriles: 1, Marcador de peso molecular. 2-11 Amplicones de DNA de diez plantas candidatas a ser *eIF4E\_R*. 13, Amplicón de una muestra de DNA de una planta *eIF4E\_KO*. 14, Amplicón de muestra de DNA de un planta WT. **C)** Análisis de HRM: Curva de desnaturalización normalizada de las muestras de DNA a evaluar, en rojo el comportamiento de la línea WT, en azul y verde el comportamiento de las líneas candidatas (izquierda), Curva que amplifica las diferencias de pérdida de fluorescencia con respecto a la temperatura durante el análisis de desnaturalización del fragmento amplificado para cada una de las líneas evaluadas (derecha), se utilizaron los oligonucleótidos 4E Exón 1 Fw y RPA4E.

Se puede ver la amplificación positiva de unas 1000 pb en siete plantas candidatas a ser mutantes de alelo sintético, no así en plantas WT y *eIF4E\_KO* utilizadas como controles, esto quiere decir que la amplificación guiada por el oligonucleótido específico es exclusiva para el alelo sintético.

Con el fin de reconfirmar la identidad mutante de la línea candidata para el alelo sintético, se utilizó la técnica de análisis de alta resolución de fusión (HRM). Esta técnica basada en PCR consiste en la medición de la temperatura en la que hay una pérdida de fluorescencia por desnaturalización de la doble cadena de DNA, a la cual está asociado el fluoróforo, esta será diferencial en caso de cambios en la secuencia del amplicón. Se utilizó un par de oligonucleótidos que flanquean el primer exón del gen *eIF4E*, donde se ubican cuatro de las modificaciones puntuales que fueron introducidas en el alelo sintético. En el ensayo se incluyeron muestras de DNA correspondientes a la línea WT y dos líneas candidatas a evaluar, para realizar la amplificación del exon y posteriormente el análisis de desnaturalización. Como se puede apreciar en las curvas de alta resolución (derecha), las curvas de muestras WT (rojo) son diferentes a las de las líneas de alelo sintético (azul y verde), lo cual indica que en el exón uno hay diferencias de secuencia que provocan estos cambios en la pérdida de la fluorescencia durante la separación de la doble hebra a medida que aumenta la temperatura. Las muestras WT tuvieron un 99% de identidad al clúster WT y las muestras candidatas se agruparon a un clúster diferente al WT con una identidad de entre 93 y 99%, esto nos permitió reconfirmar la identidad mutante de la línea *eIF4E\_R*. Se continuó el desarrollo de las plántulas confirmadas para la obtención de semillas.

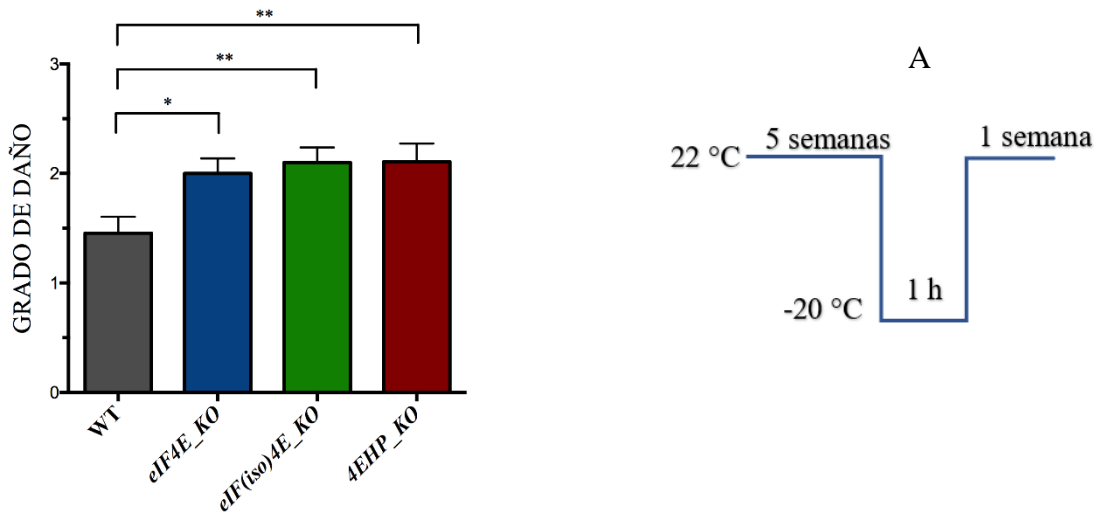
## **12.2 ANALISIS FENOTIPICO DE MUTANTES DE DIFERENTES ISOFORMAS DE eIF4E EN SU RESPUESTA AL ESTRÉS POR CONGELAMIENTO**

### **TOLERANCIA BASAL AL CONGELAMIENTO**

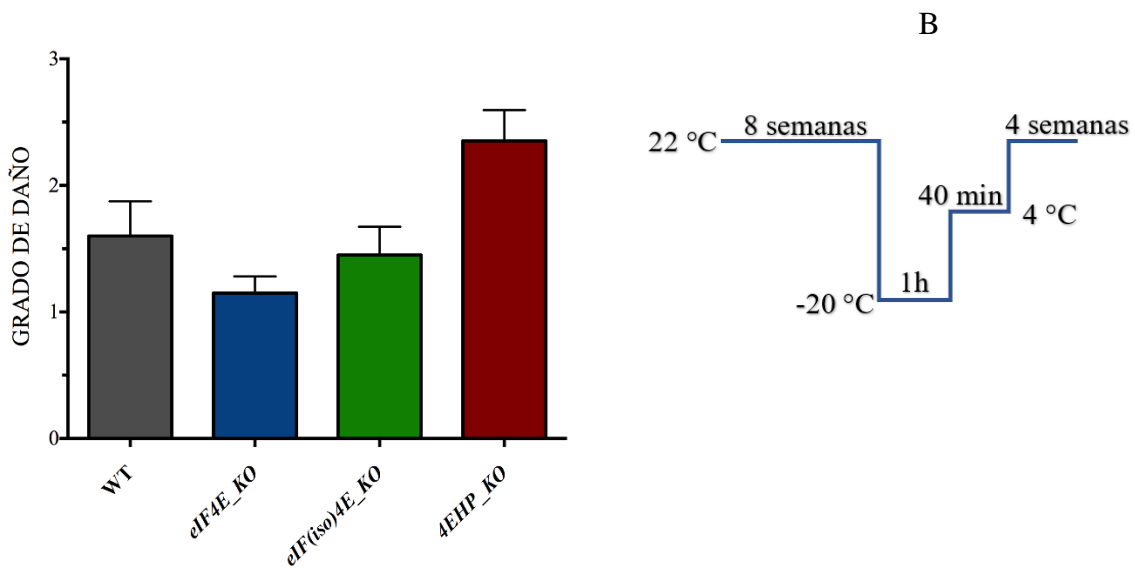
Para estos ensayos se utilizaron plantas crecidas en fotoperíodo corto, de dos etapas diferentes de desarrollo: 5 semanas y 8 semanas post-siembra. En la Figura 19 se muestra el promedio de grado de daño (según las escalas presentadas en métodos) de un total de

50 plantas de cinco semanas de cada línea mutante, divididas en 5 ensayos de 10 plantas cada uno (A), y 20 plantas de 8 semanas divididas en dos ensayos diferentes (B):

### Tolerancia Basal al Congelamiento



### Tolerancia Basal al Congelamiento



**Figura 19. Tolerancia basal al Congelamiento.** A) Se presenta el promedio de grado de daño a la semana de recuperación del reto congelante en plantas de 5 semanas acorde al esquema señalado a la derecha. Resultados de 5 ensayos independientes. B) Se presenta el promedio de grado de daño a las cuatro semanas de recuperación del reto congelante en plantas de 8 semanas acorde al esquema señalado a la derecha. Resultados de dos ensayos independientes. Para ambos gráficos se muestra el error estándar de la media. Se realizó un análisis de ANOVA (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ .

En este experimento se puede apreciar que las líneas mutantes para las isoformas de cinco semanas de edad se ven en general más afectadas en su capacidad de responder al estrés por congelamiento, siendo las líneas *eIF(iso)4E\_KO* y *4EHP\_KO* quienes presentan un daño mayor en comparación con WT, esto quiere decir que la falta de estas isoformas

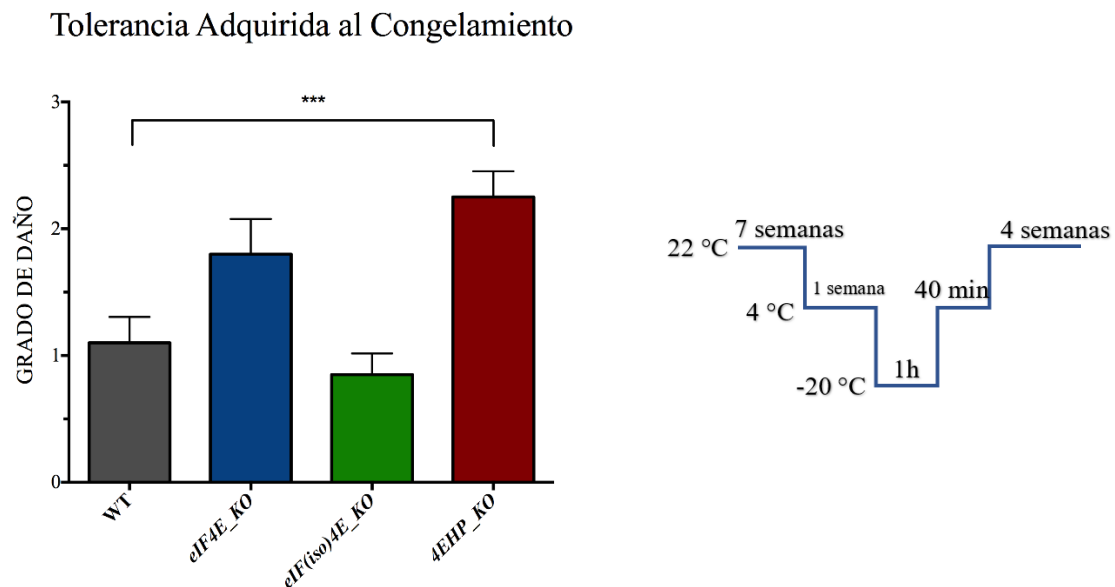


tanto las canónicas (eIF4E, eIF(iso)4E), como la isoforma no canónica 4EHP tienen un papel importante en la respuesta de tolerancia cuando no hay un proceso de aclimatación y es la primera exposición de las plantas al estrés.

Los resultados de este tratamiento comparado con el de plantas de 8 semanas muestran dos fenómenos importantes: primero, que la respuesta de plantas no aclimatadas al estrés por congelamiento difiere en algunas líneas según factores como la edad de las plantas y el tiempo de recuperación post-estrés al que se evalúa el daño. En plantas más grandes, a pesar de que no hay una significancia estadística se ve que la línea *4EHP\_KO* tiende a tener un mayor grado de daño con respecto a la WT lo que coincide con lo encontrado en plantas de cinco semanas. Por otro lado, a esta edad las mutantes de las isoformas canónicas parecen haber disminuido el nivel de grado de daño con respecto a WT, sin embargo, no se encontró significancia estadística en este comportamiento.

### TOLERANCIA ADQUIRIDA AL CONGELAMIENTO

Este ensayo se realizó solamente para plantas de 8 semanas de edad, donde en la última semana las plantas aclimatadas se crecieron a 4°C. Se registró el fenotipo de un total de 20 plantas por línea, divididas en dos ensayos y se calculó el promedio de daño, el cual se muestra en la Figura 20.



**Figura 20. Tolerancia Adquirida al Congelamiento.** Se representa el promedio de grado de daño a las cuatro semanas de recuperación del reto congelante en plantas aclimatadas de las líneas mutantes. Resultados de dos ensayos independientes, se muestra el error estándar de la media. Se realizó un análisis de ANOVA (\*\*\*)= $p < 0.001$ .

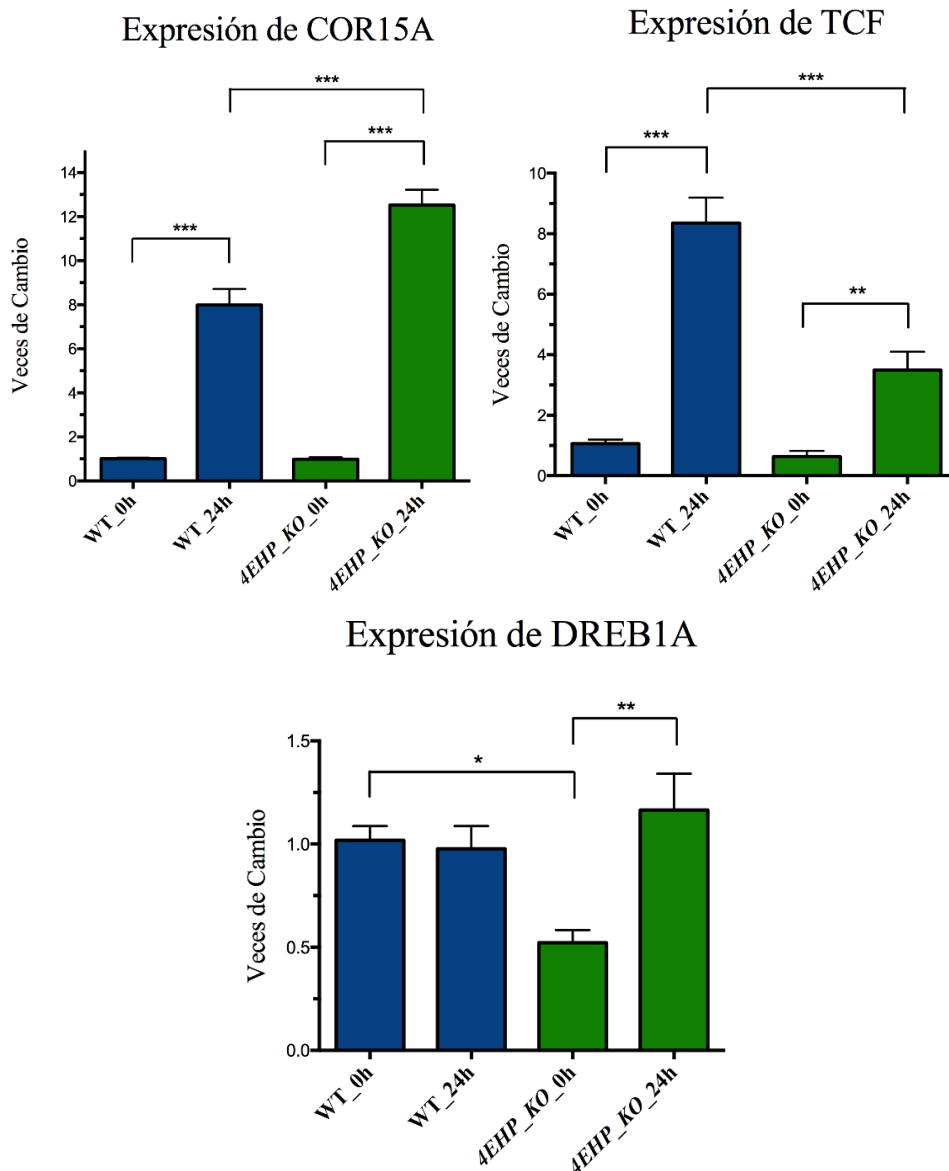
Es muy interesante ver que en las plantas que son aclimatadas, la línea *4EHP\_KO* de nuevo tiene una susceptibilidad significativa con respecto a WT, lo que nos indica que la falta de esta isoforma está afectando el proceso de aclimatación de la planta que le

permitiría contender al posterior estrés congelante. Por su parte, la línea *eIF4E\_KO* también tiende a ser más susceptible al reto congelante después de la aclimatación, mientras la susceptibilidad de *eIF(iso)4E\_KO* es similar e incluso levemente menor a WT, sin embargo, este comportamiento de las isoformas canónicas en comparación con WT no fue estadísticamente contundente.

### 12.3 ANÁLISIS MOLECULAR DE LA RESPUESTA A FRÍO EN AUSENCIA DE 4EHP

#### EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE TOLERANCIA A BAJAS TEMPERATURAS

Dados los resultados de susceptibilidad de la línea *4EHP\_KO* obtenidos en los experimentos de fenotipo, se decidió ahondar en la respuesta molecular de esta línea mediante la evaluación de los niveles de expresión de tres genes marcadores de tolerancia a congelamiento (Figura 21).



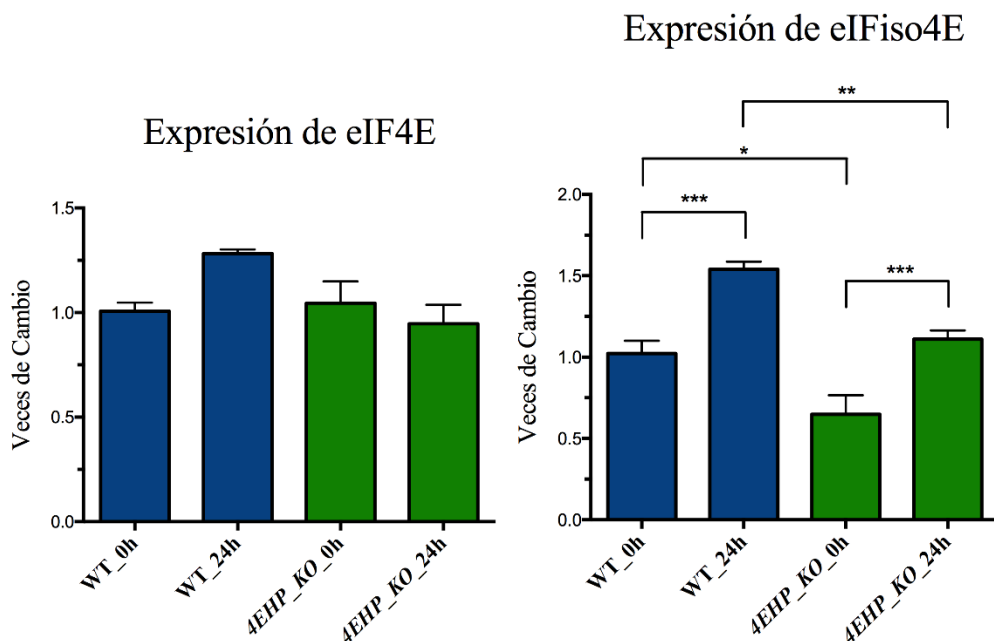
**Figura 21. Niveles de expresión relativa de los genes *COR15A*, *TCF1* y *DREB1A* en respuesta a frío para WT y *4EHP\_KO*.** Se realizó la extracción de RNA a partir de hojas de plantas de cinco semanas sometidas por 24 horas a 4°C y se evaluaron los niveles de transcritos mediante qPCR. Como transcrito normalizador se utilizó actina, la expresión relativa se refiere a plantas WT no sometidas a 4°C. Los datos corresponden a tres replicas biológicas con tres replicas técnicas cada una, se presenta el error estándar de la media. Se realizó un análisis de ANOVA (\*) =p < 0.05, (\*\*) =p < 0.01, (\*\*\*) =p < 0.001.

*COR15A* es un gen regulado por frío que le confiere tolerancia a la planta a bajas temperaturas, actuando sobre la estabilidad de la membrana del cloroplasto cuando hay deshidratación por congelamiento (Steponkus *et al.*, 1998). Por su parte *TCF1* codifica para una proteína nuclear remodeladora de la cromatina, importante en la tolerancia al frío pues habilita la expresión del gen *BCB* (*BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN*) que se encarga de regular la síntesis de lignina en respuesta a este estrés (Ji *et al.*, 2015). *DREB1A* (Dehydration-Responsive Element/C-repeat-binding) es un factor de transcripción que induce la transcripción de genes asociados a la respuesta de tolerancia a estrés por bajas temperaturas, entre otros (Maruyana *et al.*, 2004).

En este experimento se puede ver que el proceso de aclimatación está induciendo la transcripción de estos marcadores, pero hay algunas alteraciones en la respuesta transcripcional de la mutante de *4EHP* con respecto a WT. Mientras que *COR15A* está acumulado a niveles similares a las 0 horas de tratamiento en las dos líneas y su inducción por la exposición a 4 °C se ve más favorecida en *4EHP\_KO* que en WT. *TCF* presenta menor cantidad de transcrito en *4EHP\_KO* no aclimatada en comparación con WT y la inducción a las 24 horas de exposición a 4°C es significativamente menor en la línea mutante que en WT. Por último, los niveles de acumulación de *DREB1A* son menores en la línea mutante a las 0 horas, pero se observa inducción a 24 horas de exposición a 4°C, mientras que no se aprecia inducción al mismo tiempo en WT. Esto implica que los niveles de transcrito fueron similares entre WT y *4EHP\_KO* a las 24 horas de tratamiento.

#### **EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS CANONICAS *eIF4E* y *eIF(iso)4E* EN LA MUTANTE *4EHP\_KO***

Se evaluó el comportamiento transcripcional de las isoformas canónicas *eIF4E* y *eIF(iso)4E* en la línea mutante de *4EHP* y en WT en plantas aclimatadas y no aclimatadas.



**Figura 22. Niveles de expresión relativa de los genes *eIF4E* y *eIF(iso)4E* en plántulas WT y en la mutante *4EHP\_KO*.** Se realizó la extracción de RNA a partir de hojas de plantas de cinco semanas sometidas por 24 h a 4°C y se evaluaron los niveles de transcritos mediante qPCR. Como transcrito normalizador se utilizó Actina, la expresión relativa se refiere a plantas WT no sometidas a 4°C. Los datos corresponden a tres replicas biológicas con tres replicas técnicas cada una, se presenta el error estándar de la media. Se realizó un análisis de ANOVA (\*) =  $p < 0.05$ , (\*\*) =  $p < 0.01$ , (\*\*\*) =  $p < 0.001$ .

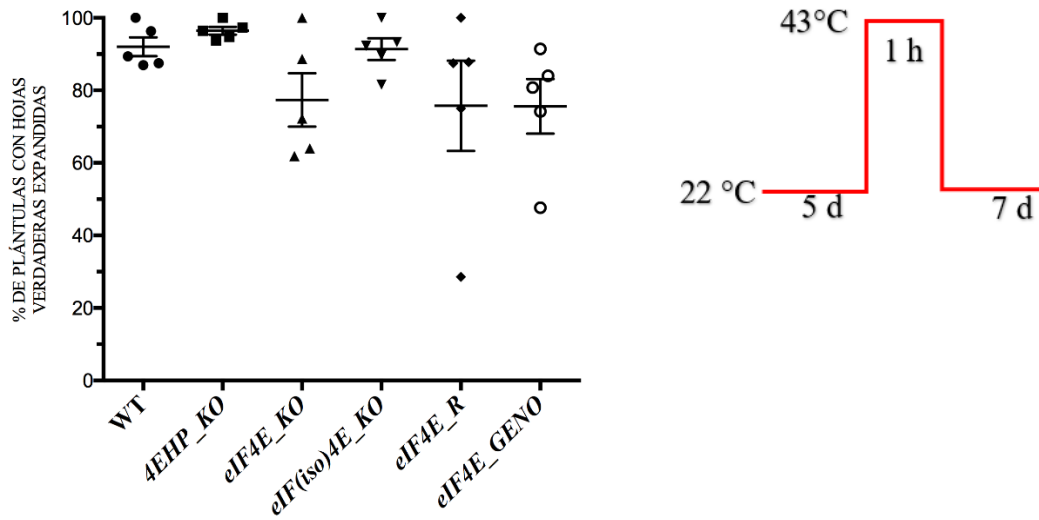
Se puede apreciar que el transcrito *eIF4E* no se ve significativamente inducido durante la exposición al frío en WT ni en la línea *4EHP\_KO*. Por otro lado, la inducción de *eIF(iso)4E* presenta un leve incremento de 1.6 veces en las dos líneas analizadas. Sin embargo, en la línea mutante este transcrito está menos acumulado desde las 0 horas de tratamiento y a las 24 horas también alcanza un nivel de acumulación menor que en WT.

## 12.4 ANÁLISIS DE TERMOTOLERANCIA EN LÍNEAS MUTANTES PARA DIFERENTES ISOFORMAS DE eIF4E.

### TOLERANCIA BASAL AL CALOR

Con el fin de evaluar la respuesta fenotípica de las líneas mutantes al calor sin aclimatación previa, se sembraron entre 30 a 60 semillas de cada línea (WT, *4EHP\_KO*, *eIF4E\_KO*, *eIF(iso)4E\_KO*, *eIF4E\_R* y *eIF4E\_GENO*) en una misma caja Petri dividida espacialmente en 6 áreas iguales. En total, se analizaron un promedio de 200 a 215 plántulas de cada línea mutante, divididas en cinco ensayos. Las cajas Petri se sometieron al protocolo de estrés por calor que se ilustra, y los resultados de porcentaje de plántulas con hojas verdaderas expandidas se muestran en la Figura 23.

## Tolerancia Basal al Calor



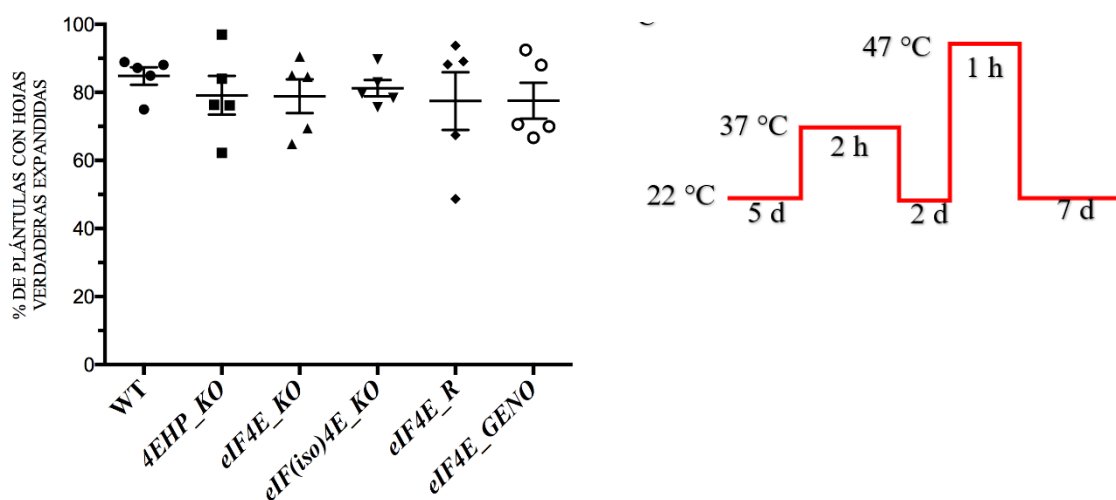
**Figura 23. Tolerancia Basal al Calor.** La tolerancia basal se evaluó a 43°C. Se representa el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas expandidas después de ser sometidas a el estrés por calor sin aclimatación previa, el registro del fenotipo se realizó a los siete días de recuperación, se muestra el error estándar de la media de 5 ensayos independientes. El análisis estadístico ANOVA no arrojó diferencias significativas entre las líneas mutantes y WT.

En este experimento podemos apreciar que las líneas mutantes tienen una respuesta de tolerancia mucho más variable entre replicas comparado con la WT, a excepción de *4EHP\_KO*. Esto indica que la falta de una isoforma, o el reemplazo de esta en el caso de la línea con el alelo sintético o complementada con el gen silvestre no está influyendo de manera significativa en la capacidad de soportar el choque térmico. Sin embargo, es de notarse la alta variabilidad de respuesta fenotípica entre ensayos, excepto la línea mutante de *4EHP* que presentó un fenotipo de sobrevivencia consistentemente elevado, mayor incluso que WT. Aunque no significativo estadísticamente esto sugiere que la ausencia de la isoforma no canónica, contrario a lo visto para la respuesta a temperaturas congelantes, aparentemente mejora la respuesta al choque térmico cuando no hay un proceso de aclimatación previo.

## TOLERANCIA ADQUIRIDA AL CALOR

Un promedio de 200 a 215 plántulas de cada línea mutante, divididas en cinco ensayos, fueron sometidas al protocolo de estrés y los resultados de porcentaje de plántulas con hojas verdaderas expandidas se muestran en la Figura 24.

## Tolerancia Adquirida al Calor

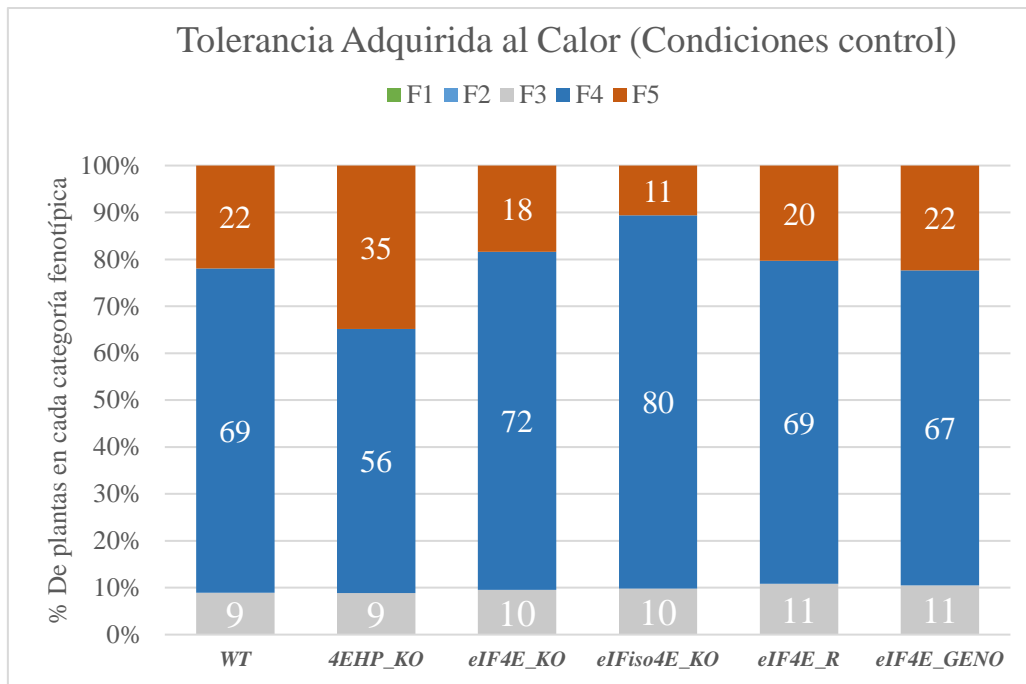


**Figura 24. Tolerancia Adquirida al Calor.** La tolerancia adquirida se evaluó a 47 °C. Se representa el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas expandidas que fueron sometidas a un proceso de aclimatación, el fenotipo se registró a los siete días de recuperación, se muestra el error estándar de la media de 5 ensayos independientes. El análisis estadístico ANOVA no arrojó diferencias significativas entre las líneas mutantes y WT.

Similar a lo observado para la tolerancia basal al calor, las líneas mutantes también mostraron una respuesta fenotípica variable entre replicas al choque térmico cuando son sometidas a un proceso previo de aclimatación. Para el caso de *eIF(iso)4E\_KO* esta variabilidad se redujo, pero en general no se puede apreciar una clara respuesta diferencial entre las líneas. Para profundizar en este comportamiento fenotípico, se realizó otro protocolo para tolerancia adquirida que ayudó a descifrar mejor el efecto de la ausencia de alguna de las isoformas de eIF4E en respuesta a calor, los resultados se muestran a continuación.

### TERMOTOLERANCIA ADQUIRIDA AL CALOR (protocolo 2)

Para evaluar si las mutantes presentaban alguna diferencia en crecimiento en las condiciones utilizadas para las respuestas al tratamiento de estrés, se crecieron un promedio de 130 a 160 plántulas por línea divididas en 7 ensayos independientes. Se registró el fenotipo a los 14 días de crecidas sin tratamiento y se clasificaron las plántulas según el criterio presentado en métodos (Figura 14). El porcentaje de plántulas con hojas verdes expandidas perteneciente a cada categoría fenotípica se muestra en la Figura 25.

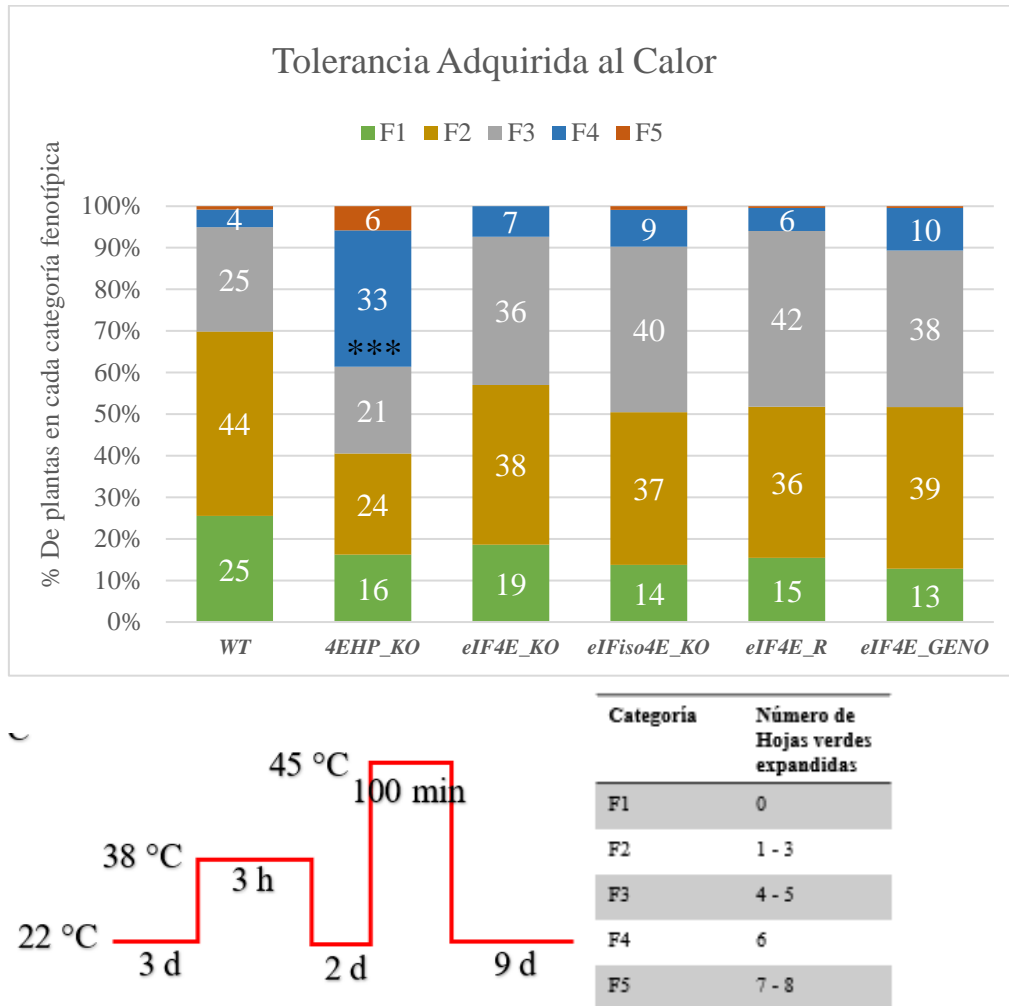


**Figura 25. Crecimiento control de plantas para el protocolo 2 de tolerancia adquirida al calor.** Se muestra el porcentaje de plántulas de cada una de las líneas mutantes de las isoformas ubicadas en cada categoría fenotípica a 14 días de crecidas en condiciones control de 22°C. Resultados de 7 ensayos independientes.

Se observó que la mayoría de las plántulas de las líneas evaluadas poseen 6 hojas verdes expandidas a los 14 días de crecidas, entre un 60 a 80%, pero existe cierta variación fenotípica propia de cada línea, en la que un porcentaje de plántulas está ligeramente adelantada (7 u 8 hojas), correspondiente a un 23% en promedio para todas las líneas. Se apreciaron dos tendencias: la línea mutante nula del factor 4EHP parece tener más plantas en dicha categoría fenotípica F5 (35%), lo que nos habla de una “aceleración” en el estado de desarrollo a esta edad, y segundo, la línea mutante nula para eIF(iso)4E posee un porcentaje menor de plántulas en esta categoría (11%). En general, se observa un pequeño porcentaje en todas las líneas que presenta un retraso en el desarrollo (4 a 5 hojas, Fenotipo 3), cerca del 10% del total. Así pues, se puede decir que bajo condiciones control cerca de un 90% de las plántulas de todas las líneas debe presentar seis o más hojas verdes

expandidas, información que va a ser primordial para el análisis y comparación de las poblaciones en estas categorías fenotípicas luego de los tratamientos de calor.

Se realizó el protocolo de estrés por calor propuesto por Fernández Bautista, 2018. Se evaluó un promedio de 230 a 260 plántulas de cada una de las líneas divididas en 12 ensayos diferentes. Las respuestas fenotípicas basadas en la tabla de clasificación propuesta se muestran en la Figura 26.



**Figura 26. Tolerancia Adquirida al Calor (protocolo 2).** Tratamiento de estrés. Se muestra el porcentaje de plántulas de cada una de las líneas mutantes de las isoformas ubicadas en cada categoría fenotípica después del tratamiento. Resultados de 12 ensayos independientes, se presenta el error estándar de la media. Se realizó un análisis de ANOVA (\*\*\*)= $p < 0.001$ .

Todas las líneas evaluadas llevaron a cabo un proceso de aclimatación exitoso en el que su exposición a temperaturas altas, pero no letales, les permitió sobrevivir (con diferente eficacia) a un choque térmico de 45°C por cien minutos. Plantas que no fueron sometidas a un régimen de aclimatación previo a la exposición al choque térmico, mostraron 100% de letalidad, mientras que la aclimatación a 38°C no afectó de manera significativa el crecimiento previamente registrado (Anexo 5).



Se puede ver que las plántulas con termotolerancia adquirida, presentaron un cambio en la distribución de poblaciones fenotípicas en comparación con las condiciones control. Surgieron dos nuevas categorías fenotípicas que denotan susceptibilidad, las plántulas completamente afectadas con 0 hojas verdes expandidas (F1) y las plántulas con 1 a 3 hojas verdes expandidas (F2).

En general, todas las líneas evaluadas presentaron un porcentaje de plántulas en F1 que fue en promedio del 17%. De manera interesante, la WT parece tener un porcentaje en esta categoría ligeramente mayor (25%). El porcentaje de plántulas en F2 fue igualmente superior para WT (44%), confirmando que parece tener una mayor susceptibilidad al tratamiento de estrés. Por otro lado, la línea mutante 4EHP mostró solamente 24% de plántulas en F2, es decir de manera interesante tiende a ser más resistente que el resto de las líneas (36-39%). En cuanto al fenotipo F3, su porcentaje incrementó respecto al crecimiento en condiciones control, pasando de un 10% a un 35-40% en la mayoría de las líneas, excepto para las tendencias descritas: WT tuvo un 25%, y 4EHP\_KO un 21%.

Los fenotipos F4 y F5 son indicativos de resistencia, ya que en condiciones control estas dos categorías representaron el 90% de las plántulas. En este caso fue muy llamativo observar que 4EHP\_KO mantuvo un 39% de plántulas en estos dos fenotipos, mientras que para las demás líneas el porcentaje fue de 4-10%. Esto confirma que la ausencia de 4EHP confiere mayor tolerancia a las condiciones de estrés por calor.

## 13. DISCUSIÓN

En este trabajo se exploró la respuesta de líneas mutantes nulas de miembros de la familia de factores de inicio de la traducción eIF4E, importantes en diferentes procesos de la regulación de la expresión génica de *Arabidopsis thaliana*, a estrés por temperaturas extremas, con el objetivo de aportar evidencia experimental que permita dilucidar el rol de estas proteínas bajo condiciones adversas.

### 13.1 LAS PROTEINAS DE LA FAMILIA eIF4E, PARTICULARMENTE LA ISOFORMA DE CLASE II 4EHP SON IMPORTANTES PARA LA RESPUESTA A BAJAS TEMPERATURAS EN *Arabidopsis thaliana*.

El análisis de exposición a estrés congelante sin previa aclimatación demostró que la ausencia de cualquiera de las isoformas canónicas de la familia eIF4E, en particular de la isoforma no canónica 4EHP, disminuye la capacidad de las plantas de responder al estrés, ya que los niveles de grado de daño de las mutantes de cinco semanas fueron significativamente mayores a la línea WT. Para empezar a entender estas respuestas de susceptibilidad debemos analizar los fenotipos observados bajo los diferentes tratamientos de estrés por congelamiento y proponer roles para las isoformas. A continuación, se analizará el comportamiento de las mutantes de las isoformas canónicas y, posteriormente, la respuesta de *4EHP\_KO*.

Estudios previos han reportado un cierto grado de redundancia y compensación en la función de las isoformas canónicas (Duprat *et al.*, 2002), así como una selectividad por poblaciones de RNAs mensajeros específicos (Martínez *et al.*, 2012) y un papel primordial en el proceso de la infección viral (Bastet *et al.*, 2018). En este trabajo, se encontró que la susceptibilidad basal a estrés por congelamiento de *eIF(iso)4E\_KO* es solo ligeramente mayor que la de *eIF4E\_KO* en plantas de 5 semanas de edad, lo que apoya en cierto grado la hipótesis de redundancia en su función para las plantas no aclimatadas. Sin embargo, este comportamiento se torna diferente bajo dos condiciones: la edad de la planta y cuando son sometidas a una aclimatación previa. En plantas de 7 semanas sometidas a un proceso de aclimatación se observó una tendencia de mayor susceptibilidad de la mutante *eIF4E\_KO* respecto a *eIF(iso)4E\_KO* y WT. Asimismo, para plantas de esta edad no se observaron diferencias significativas en la tolerancia basal a estrés congelante en *eIF4E\_KO* y *eIF(iso)4E\_KO* comparadas con la WT, sugiriendo que el rol de estas isoformas en la respuesta al estrés depende del estado de desarrollo de la planta. Esto concuerda con datos de la expresión diferencial de eIF4E y eIF(iso)4E durante el desarrollo y en diferentes tejidos (Rodríguez *et al.*, 1998; Bush *et al.*, 2009).

En *Arabidopsis thaliana* está reportado que con el crecimiento y a medida que se transita a floración, la expresión relativa de las dos isoformas canónicas cambia gradualmente hasta su senescencia (Anexo 6; *Arabidopsis* eFP browser). Esto implica, que para plantas más jóvenes las isoformas canónicas, particularmente eIF(iso)4E, tendrían un papel más relevante en la traducción activa asociada al crecimiento vegetativo, por lo que la ausencia

de alguna de ellas podría afectar la regulación de la expresión de genes en respuesta al estrés. De hecho, en plantas de cinco semanas los niveles de las isoformas canónicas son elevados en todas las hojas (Bush *et al.*, 2009). Mientras que en plantas de ocho semanas los niveles de estas decaen y solamente se detectan en las hojas jóvenes, siendo más abundante eIF4E para las etapas de floración. En este sentido, los cambios fenotípicos dados por la ausencia de eIF4E y eIF(iso)4E en plantas adultas fueron no significativos, probablemente debido a la variación en la edad de sus hojas y los diferentes niveles de expresión del par de genes en cada una de ellas. Por esta razón, a futuro se propone aumentar las réplicas del experimento de congelamiento con plantas de ocho semanas y restringir el análisis de respuesta a las hojas más jóvenes para tener un panorama más claro del fenotipo de las mutantes de las isoformas canónicas. También sería recomendable implementar un tratamiento de aclimatación y posterior evaluación del fenotipo de susceptibilidad en las plantas de cinco semanas de edad o incluso más jóvenes, para complementar los datos presentados. Pero ¿Cuál podría ser el mecanismo en el que están actuando los factores canónicos de la familia eIF4E en condiciones congelantes?

En plantas, se ha reportado que existe una disminución transitoria en la tasa global de traducción en respuesta a bajas temperaturas (4°C) provocada por una reacción a nivel de reguladores traduccionales como la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , la reducción de la actividad cinasa de Target of Rapamycin (TOR) y de la fosforilación de su blanco, la cinasa de la proteína ribosomal S6 (AtS6K1) (Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, estos efectos son transitorios recuperándose los niveles de AtS6K1 fosforilada e inhibiéndose la fosforilación de eIF2 $\alpha$  después de la exposición por 24 horas a 4°C, lo que nos habla de una respuesta traduccional finamente regulada a nivel temporal. Además, se sabe que en *Arabidopsis* se mantiene la traducción activa de proteínas necesarias para lidiar con un estímulo adverso, por ejemplo, en condiciones de estrés por calor, algunos transcritos particulares se han encontrado reclutados a polisomas e incluso se han visto regulados al alza a nivel transcripcional (Lukoszek *et al.*, 2016).

En este sentido, un reciente estudio transcriptómico en *Arabidopsis thaliana* encontró que en plantas de siete días de crecimiento y tras un proceso de exposición a 4°C por 24 horas, se estimuló la expresión de genes asociados a biogénesis de ribosomas, a procesamiento de rRNA y a inicio de la traducción, incluidos *eIF4E* y *eIF(iso)4E* entre otros, lo que indica que bajo estas condiciones la síntesis de proteínas e incluso de RNA pertenecientes a la maquinaria de traducción se incrementa, probablemente para lidiar con la afectación de la actividad de las enzimas dado el estrés (Xi *et al.*, 2020). En concordancia con esta evidencia, en este trabajo encontramos la inducción de la expresión de *eIF(iso)4E* en plantas de 5 semanas expuestas por 24 horas a 4°C, así como la inducción de eIF4E y eIF(iso)4E en plantas de ocho semanas expuestas por 1 semana a 4°C reportada por Salazar, 2017. Estos datos sitúan a la maquinaria traduccional como un mecanismo adaptativo que permite ajustar la síntesis de proteínas acorde a las condiciones ambientales, en contextos de traducción reprimida o activada, y resaltan la participación de los factores de inicio canónicos que además pueden promover especificidad por mRNAs particulares, mediante la formación de complejos regulatorios en asociación con

las proteínas de anclaje eIF4G o eIFiso4G e inducir así la traducción selectiva de RNAs mensajeros (Browning, 2015).

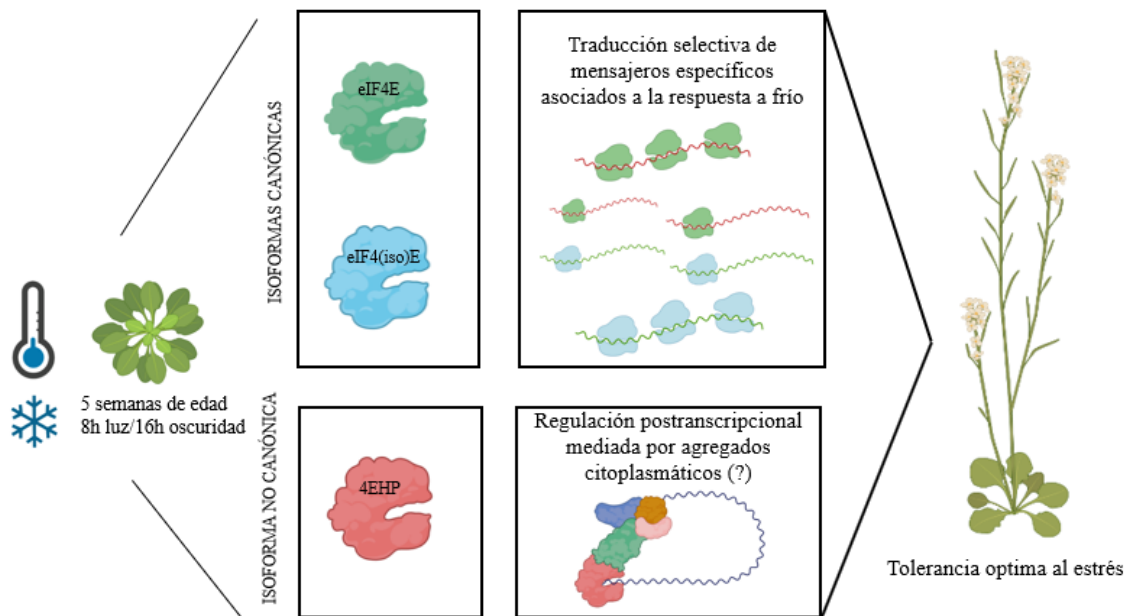
En el laboratorio se ha reportado que eIF4E favorece el reclutamiento de mRNAs correspondientes a genes que actúan en el mantenimiento del equilibrio osmótico y estabilización de membranas, como factores transcripcionales de la familia DREB o MYB, mientras que eIF(iso)4E favorece, por ejemplo, la traducción de mRNA codificante de proteínas relacionadas con la síntesis de la pared celular (Martinez-Silva *et al.*, 2012). La presencia de eIF(iso)4E en angiospermas probablemente permite regular de manera más fina la traducción de transcritos específicos en respuesta a estrés, como lo hace en las transiciones a la etapa reproductiva o disponibilidad de nutrientes en raíz (Martínez-Silva *et al.*, 2012). Por consiguiente, la falta de alguna de las isoformas canónicas eIF4E o eIF(iso)4E podría alterar el equilibrio en la traducción de mRNAs necesarios para contender con los cambios de temperatura súbitos y afectar la respuesta de tolerancia, tanto a niveles basales como en los procesos de aclimatación (Figura 27).

Con este amplio panorama, una estrategia para determinar el complejo papel de las isoformas canónicas podría llevarse a cabo mediante un acercamiento global a nivel de traducción como RiboSeq, así como transcriptómico para la mutante de eIF4E lo que permitiría contrastar con la información que se tiene de *eIF(iso)4E\_KO* y aportar información sobre cómo están participando exactamente en la reacción ante el reto congelante cada una de ellas.

En animales, es común la presencia de más de una isoforma de eIF4E. Por ejemplo, se sabe que en células humanas el factor canónico eIF4E se encuentra reprimido en respuesta a hipoxia y se fomenta la formación de complejos traduccionales con otras isoformas de la familia (Ho *et al.*, 2016). En *Caenorhabditis elegans*, múltiples isoformas de eIF4E participan en diferentes etapas de desarrollo, tipos celulares y respuesta a estrés (Rhoads *et al.*, 2006). Particularmente, para las isoformas de clase II se ha propuesto su participación en regulación negativa o positiva, compitiendo con las isoformas canónicas por el 5'Cap de mRNAs específicos mediante la formación de complejos ribonucleoproteicos (Huggins & Keiper, 2020). En este trabajo, se analizó por primera vez la función de una isoforma no canónica de clase II de plantas, 4EHP, en respuestas a temperaturas extremas, permitiendo ampliar el conocimiento sobre la regulación mediada por miembros de la familia 4E.

En los ensayos de tolerancia basal para plantas de cinco y de ocho semanas, así como en el ensayo de tolerancia adquirida por aclimatación, *4EHP\_KO* tuvo los niveles más altos de daño de las líneas mutantes evaluadas. Si bien la expresión de este gen es mayor en flores y raíz, se presenta de manera ubicua (Hidalgo, 2007), y los niveles del transcrito aumentan progresivamente en hojas a medida que llegan a la madurez (Anexo 7; Arabidopsis eFP browser). Esto concuerda con la observación de que la falta de la isoforma afecta la respuesta de tolerancia incluso en plantas de mayor edad; pero ¿cuál es la posible acción regulatoria de 4EHP en frío que determina su relevancia a nivel molecular en el estrés por congelamiento?

Varios de los genes inducidos a baja temperaturas también se ven activados en otros tipos de estrés como salinidad y deshidratación. Esto se debe a que los estímulos tienen efectos en común, como son la restricción del agua disponible debido al congelamiento, y acumulación de ROS (Ouellet y Charron 2001). Entre los genes activados por bajas temperaturas se encuentran las bien conocidas HSPs, en especial chaperonas de la familia HSP70, las cuales se han visto incrementadas en trigo, arroz y maíz bajo estrés por frío (Vitamvas *et al.*, 2012. Cui *et al.*, 2005, Kollipara *et al.*, 2002). Precisamente, algunos de los complejos citoplasmáticos cuya formación se promueve por estas chaperonas involucran a la maquinaria de traducción, como es el caso de los gránulos de estrés en respuesta a choque congelante inducido en levaduras y mamíferos (Hofmann, 2012). De hecho, resultados previos del laboratorio han sugerido que 4EHP podría estar formando parte de este tipo de regulación. Utilizando transformación transitoria de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* con 4EHP-GFP se encontró que la proteína forma agregados citoplasmáticos, cuya localización se modifica en respuesta a hipoxia y calor. También se encontró co-localización con la proteína DCP1, característica de cuerpos de procesamiento (PBs), los cuales están asociados a la represión traduccional y degradación de RNAs mensajeros (León, 2018). Se sabe que en los PBs se almacenan mRNAs que no se están traduciendo hasta que las condiciones sean favorables, así como mRNAs silenciados por miRNAs y degradados (Thomas *et al.*, 2011). Por lo que una posibilidad es que su ausencia afecte de alguna manera el reclutamiento de mRNAs a este tipo de agregados en respuesta a frío (Figura 27). Pero ¿Qué tipo de regulación puede estar sucediendo en este tipo de asociaciones que dependa de la presencia de 4EHP?



**Figura 27. Isoformas de la familia eIF4E en respuesta a estrés por bajas temperaturas.** Se ilustra el principal rol que se propone para tres isoformas de la familia eIF4E de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a estrés por temperaturas bajas en plantas de

cinco semanas de edad. Para eIF4E y eIF(iso)4E se ha demostrado su rol en la traducción selectiva de algunos mRNAs asociados a estrés (Martínez-Silva *et al.*, 2012 y datos no publicados) La hipótesis propuesta para la isoforma 4EHP requiere de más evidencia experimental.

En células animales se ha encontrado que el homólogo de 4EHP participa en la maquinaria de silenciamiento mediada por miRNAs y se recluta con componentes del complejo RISC, actuando sobre el bloqueo de la traducción de mensajeros blanco (Chen & Gao, 2017). También en un modelo animal, se ha propuesto que 4EHP interactúa con la proteína 4E-T (transportadora de eIF4E) formando un complejo de mRNA circularizado inhibitorio que bloquea el inicio de la traducción. A través de esta unión con la proteína 4E-T se incrementa la afinidad de 4EHP por el 5'cap superando la afinidad que tiene la isoforma canónica eIF4E (Chapat *et al.*, 2017). Además, la fosforilación de la proteína 4E-T a su vez está involucrada en la regulación de la formación de PBs en respuesta a estrés (Cargnello *et al.*, 2012). Aunque en *Arabidopsis thaliana* no se han encontrado ortólogos de 4E-T, es posible que en plantas 4EHP pueda interactuar con otras proteínas y participe en la regulación de mRNAs específicos para llevarlos a agregados como PBs durante la respuesta a estrés, de ahí que su ausencia desregule esta respuesta y promueva su susceptibilidad al frío. Es más, acá se abre otro interrogante en este campo de estudio: ¿cuál es el papel de la regulación mediada por agregados citoplasmáticos dependientes de miRNAs en respuesta a estrés?, y específicamente, ¿en estas rutas hay una participación diferencial de alguna isoforma de 4E?, campo que eventualmente sería interesante ahondar.

Otra evidencia del papel regulatorio postranscripcional de 4EHP surge del hallazgo reciente en células animales que un factor de clase II es parte esencial de la maquinaria de control de calidad de la traducción (Hickey *et al.*, 2020). En este estudio los autores demostraron que 4EHP interactúa con la proteína GIGYF2 (Grb10-interacting GYF protein 2) para inhibir el inicio de la traducción de polipéptidos defectuosos (provenientes de mRNAs dañados o problemáticos), previniendo de esta manera su acumulación y potencial toxicidad. En *Arabidopsis thaliana* existen proteínas con dominio GYF de unión a eIF4E, por ejemplo la proteína EXA1 (Essential for poteXvirus Accumulation 1), la cual además es esencial en el proceso de infección por virus del mosaico (Hashimoto *et al.*, 2016). Esto apoya su participación en la regulación de la traducción, sugiriendo que un mecanismo de control de calidad mediado por esta vía pueda estar sucediendo de manera similar en plantas y, por consiguiente, la ausencia de 4EHP impida se lleve a cabo este proceso importante en la solución de problemas dados por proteínas defectuosas que estén siendo inducidas bajo condiciones estresantes.

Para confirmar hipótesis como las anteriores, primero hay que investigar la localización celular de 4EHP en respuesta a bajas temperaturas para dilucidar exactamente qué tipo de gránulos está formando y por qué no, contrastarlo con la localización de las isoformas canónicas para evaluar así, si este tipo de acción regulatoria postranscripcional es exclusiva de la 4EHP a bajas temperaturas.

Con el fin de explorar posibles cambios transcripcionales en la mutante de 4EHP a 4°C se evaluaron genes marcadores de tolerancia a frío previamente estudiados en el laboratorio (Salazar, 2017). Se encontró que los niveles basales de dos transcritos fuertemente inducidos por bajas temperaturas, *COR15A* y *TCF1*, son similares entre la línea *4EHP\_KO* y WT. A 24 horas de exposición a 4°C se observó la esperada inducción de ambos transcritos, tanto en WT como en *4EHP\_KO*, sin embargo, *COR15A* presentó mayores niveles de transcrito en la mutante que en WT, mientras que la inducción de *TCF1* fue menor en la mutante. ¿Cómo se interpreta este comportamiento transcripcional?

TCF1 es una importante proteína nuclear que participa en la regulación epigenética de un set de genes asociados a la aclimatación por frío. Durante la exposición a frío, TCF1 promueve la deposición de marca de activación H3K4me2 en el gen *BCB* (*BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN*) quien es el responsable de la acumulación de lignina y remodelación de la pared celular (Ji *et al.*, 2015). Este proceso es importante para regular la permeabilidad del agua y la rigidez de la pared celular (Whetten & Sederoff, 1995). Se ha planteado que la inducción de TCF1 en plantas Col-0 incrementa la rigidez de pared y reduce de la expansión celular, permitiendo detener el crecimiento de la planta durante la aclimatación, es decir que probablemente está regulando procesos de plasticidad de desarrollo y no aquellos directamente asociados con la tolerancia a frío (Ji *et al.*, 2015). Con esto en mente es curioso que la mutante de 4EHP presente menores niveles de inducción de *TCF1*, pues esto nos dice que al menos mediante esta ruta, *4EHP\_KO* pudiera presentar mayor elasticidad de pared y así mejorada capacidad de contender con la deshidratación causada por el frío, como fue reportado para la mutante *tcf1*. Sin embargo, al mismo tiempo se presentaron mayores niveles de *COR15A*, codificante de una proteína de cloroplasto asociada a la estabilización de los lípidos de membrana interna para evitar la formación de lesiones inducidas por el congelamiento y afectación de la osmolaridad celular (Steponkus *et al.*, 1998). Los niveles de *TCF1* y *COR15A* que actúan en vías independientes para la respuesta a frío, no coinciden en explicar el fenotipo de mayor susceptibilidad al reto de congelamiento de la mutante *4EHP\_KO*. Por esto, se propone la realización de ensayos de fuga de solutos para evaluar la integridad membranal y determinar si las rutas encargadas de la regulación de membrana y pared celular son las que se ven afectadas en la mutante y están causando la susceptibilidad.

El análisis de transcrito correspondiente al factor de transcripción DREB1A quien controla la activación de genes inducidos por estrés asociados a la tolerancia de deshidratación (Maruyana *et al.*, 2004) mostró niveles significativamente incrementados en la mutante *4EHP\_KO* a las 24 horas de exposición a 4°C, aunque presentó menores niveles que WT previo al tratamiento. Se ha reportado que la inducción de este factor por frío ocurre entre las 2 a 5 horas de exposición, después de lo cual hay un decremento progresivo del transcrito (Liu Q, 1998; Miura *et al.*, 2007). Kidokoro *et al.* (2020) reportaron, en un estudio de la regulación epigenética de este *loci*, un pico de inducción a las 6 horas seguido de un decremento progresivo hasta verse muy poco acumulado a las 24 horas. Este comportamiento también es soportado por datos transcriptómicos globales en eFP browser, donde se puede apreciar que el pico de inducción se registra entre las 3 a 6 horas y para las 24 horas los niveles de acumulación ya han alcanzado los presentes

en la planta sin tratamiento. Previos estudios en el laboratorio realizados por Salazar en el 2017 y Aquino en el 2018, encontraron que este gen tampoco se ve inducido significativamente en plantas WT a nivel de transcrito o reclutamiento en polisomas a la semana de aclimatación a 4 °C. Tomando en cuenta todo lo anterior, llama la atención el incremento observado de DREB1A en las plantas *4EHP\_KO* a las 24 horas de exposición a frío. ¿Es esto debido a los niveles basales menores en la mutante o a otras señales de regulación? Por ejemplo, es posible que en esta mutante la cinética de acumulación de transcritos de respuesta a frío se encuentra alterada por un defecto en la distribución de mRNAs en agregados citoplasmáticos y estabilidad. Para estudiar esto será necesario seguir a tiempos más cortos la dinámica de cambios transcripcionales en los cuales es donde parece que sucede la regulación de la expresión de este gen y, sobre todo, extender el análisis a un mayor grupo de mRNAs marcadores de la respuesta a estrés utilizando análisis globales de transcriptoma.

Por último, se encontró que el transcrito de la isoforma canónica *eIF(iso)4E* en *4EHP\_KO* posee una dinámica de inducción por 24 horas a 4°C similar a la línea WT, con la salvedad de que los niveles de acumulación y basales del transcrito en la mutante tienden a ser menores, mientras que el transcrito *eIF4E* no presentó cambios en este tiempo. Estos resultados coinciden con información obtenida previamente en el laboratorio para WT en la que se ve un aumento de la proteína eIF4E a las 12h, pero una disminución a las 24h, y por su parte un aumento de la proteína eIF(iso)4E a las 24 horas (Trabajo post-doctoral, Hernández, 2013). Esta información nos habla de la regulación fina a nivel temporal que puede estar ocurriendo en las dos isoformas en respuesta a frío, sin embargo no se puede descartar que la afectación de los niveles de *eIF(iso)4E* en la línea *4EHP\_KO* modifiquen su rol en la selectividad de mensajeros en respuesta al estrés tal como se ha planteado en esta discusión, causando con ello su susceptibilidad.

### **13.2 LA AUSENCIA DE ALGUNA DE LAS ISOFORMAS eIF4E O LAS MUTACIONES INTRODUCIDAS EN EL ALELO SINTETICO RESISTENTE A POTYVIRUS NO AFECTAN NEGATIVAMENTE LA TOLERANCIA A ESTRÉS POR CALOR**

Estudios sobre la regulación post-transcripcional en respuesta a estrés por elevadas temperaturas han sugerido que existe una movilización selectiva de mRNAs hacia el inicio de la traducción, concomitante con una reducción en los niveles globales de esta (Yángüez et al., 2013). Sin embargo, no se ha explorado el rol de los factores eIF4E en este tipo de respuesta. Para evaluar la termotolerancia en las mutantes de diferentes isoformas de eIF4E se implementaron varios protocolos de estrés por calor buscando discernir un fenotipo comparable en la respuesta de susceptibilidad de las líneas mutantes (incluida la mutante de alelo sintético eIF4E\_R y su respectivo control, la mutante complementada eIF4E\_GENO).

La temperatura en la que se encontró un comportamiento ideal para su comparación en la tolerancia basal fue 43°C, pues en ensayos con temperaturas menores se vio una alta tolerancia de todas las líneas presentando porcentajes de hojas verdaderas expandidas muy similar, cercanas al 100%. Contrario a esto, utilizar temperaturas mayores a 43°C



resultó en demasiada afectación, llegando a tener un porcentaje de susceptibilidad del 100% en WT. En cuanto a la tolerancia adquirida en donde existe un proceso de aclimatación a 37°C, 47°C fue la temperatura adecuada para el choque térmico debido a que temperaturas por debajo resultaron en plantas con una tolerancia absoluta y, por otro lado, temperaturas mayores dañaron por completo las plántulas aclimatadas. La temperatura de choque térmico evidentemente fue mucho mayor para este protocolo, debido a que el proceso de aclimatación otorga a la planta la capacidad de soportar mayores temperaturas de estrés posteriormente (Anexos 3 y 4).

La información obtenida con este primer acercamiento permitió apreciar dos sucesos que llaman la atención: el primero, una respuesta de tolerancia bastante variable entre los diferentes ensayos para las líneas mutantes evaluadas y el segundo, una aparente respuesta de mayor termotolerancia basal en la línea *4EHP\_KO*, la cual resultaba opuesta al fenotipo observado en estrés por congelamiento. Para explorar de manera más detallada lo anterior se decidió ensayar el protocolo propuesto por Fernández-Bautista y colaboradores en el 2018, donde se modificaron varios parámetros como el fotoperiodo, la orientación de crecimiento, la combinación de nivel y duración de las temperaturas de aclimatación y reto, así como el tiempo de recuperación. Este protocolo coincide además con el reporte del mismo grupo sobre cambios traduccionales en respuesta a estrés por altas temperaturas durante la aclimatación (Yangüez *et al.*, 2013).

En ausencia de estrés alguno, el desarrollo de las plántulas, representado como la cantidad de hojas verdes expandidas a los 14 días, fue similar para todas las líneas y WT (alrededor del 70% de plántulas con 6 hojas), excepto por la línea *4EHP\_KO* que presentó un crecimiento ligeramente acelerado (35% de plántulas con 7-8 hojas). Esta observación coincide con evidencia obtenida anteriormente en el laboratorio que reporta para esta línea mutante mayor número de hojas de roseta comparada con WT a los 32 días de crecida en maceta (León, 2016). Por otro lado, se observó un ligero retraso en el desarrollo para la línea *eIF(iso)4E\_KO* bajo las condiciones de crecimiento y tiempo evaluadas, fenómeno que no se había reportado anteriormente en el laboratorio, y que complementa la caracterización morfológica de la línea mutante a estadios tempranos del desarrollo. Las plántulas sometidas sólo a la aclimatación a 37°C no mostraron modificaciones en las tasas de crecimiento respecto a las condiciones control, mientras plántulas sometidas directamente al choque térmico de 47°C presentaron letalidad absoluta (Anexo 5).

Este último protocolo demostró que no existe una afectación clara a nivel fenotípico de las plántulas de líneas mutantes de las isoformas canónicas eIF4E y eIF(iso)4E bajo condiciones de altas temperaturas, pero sí permitió apreciar más claramente lo que sucede con la línea *4EHP\_KO* que de manera inesperada parece soportar mejor el daño causado por el calor, ya que mantiene un significativo porcentaje de plántulas en un estado fenotípico de “resistencia” (ver Figura 26, F4 y F5). Hay que recordar que los antecedentes sitúan a ortólogos de 4EHP en animales como una proteína que participa en el reclutamiento de mRNAs a PBs en estrés por arsénico y calor, y a gránulos de estrés bajo choque térmico (Frydryskova *et al.*, 2016). Asimismo, en el laboratorio se había observado que la distribución de 4EHP de *Arabidopsis* en protoplastos también depende

del tipo de estrés. En hipoxia y estrés por calor se vio co-localizada con DCP1 en PBs, mientras que en choque térmico co-localiza con HSP17 en HSGs (León, 2018). Aunque esto sugiere que la falta de la isoforma podría afectar la formación de gránulos citoplasmáticos regulatorios y por lo tanto la respuesta al estrés, en el caso de estrés por calor se observa una mejora en la termotolerancia. Con esta evidencia surge la pregunta, ¿cómo es posible que la ausencia de 4EHP afecte a las plantas en su respuesta a bajas temperaturas, pero por el contrario pareciera que las favorece cuando el estímulo es de calor?

Una de las principales y más estudiadas respuestas de las plantas al estrés por altas temperaturas es la inducción de HSPs que se activan cuando se detecta la presencia de proteínas mal plegadas o desnaturalizadas por el calor (revisado por Lamers *et al.*, 2020). Esta respuesta es vital en el proceso de aclimatación y por esta razón no es difícil pensar que la mutante de 4EHP tenga en principio una mejor tolerancia dada por la presencia de altos niveles de proteínas HSPs, y que esté, en cierta manera, predispuesta o preparada para lidiar de forma más efectiva con el estrés, o bien, que presente una inducción potenciada de este tipo de proteínas durante la aclimatación provocando un efecto protector mayor, para corroborar esta información habría que evaluar la expresión HSPs clave, objetivo que lamentablemente no alcanzó a ser cubierto en esta tesis, pero que se convierte en una perspectiva a explorar.

Pero no solo la respuesta de chaperonas es importante, bajo alta temperatura la composición de la pared celular es primordial y esta se ve afectada a varios niveles, por ejemplo, el funcionamiento de enzimas remodeladoras, el metabolismo del azúcar, y por lo tanto, la composición de polímeros como celulosa, hemicelulosa o pectina se ven modificados (revisado por Le Gall 2015). Entre las características biofísicas de la pared, una de las más importantes es la flexibilidad, pues se sabe que una pared flexible ayuda a mantener las funciones celulares en respuesta al calor, este es el caso de proteínas como las expansinas por ejemplo, cuya expresión se incrementa en respuesta a choque térmico de 40°C en el pasto *Agrostiis* (Xu & Huang, 2008). De hecho, la expresión de expansinas de *Poa pratensis* en tabaco mejora su tolerancia a calor (Xu *et al.*, 2014). Podríamos pensar entonces que la mutante de 4EHP presenta una inducción de genes que promuevan modificaciones de la pared celular, y específicamente, que propicien flexibilidad de esta, directamente como los ejemplos recién mencionados o indirectamente como de hecho sucede en respuesta a frío con la baja expresión del gen *TCF1* antes discutido. Sería recomendable entonces evaluar la expresión de este tipo de genes asociados a resistencia a altas temperaturas en la mutante *4EHP\_KO* con respecto a WT.

Como se esperaba la línea de alelo sintético no se vio afectada en su desarrollo bajo el protocolo de aclimatación a estrés por calor, de hecho, su comportamiento fue similar a la línea mutante de *eIF(iso)4E*, y la línea *eIF4E\_GENO*. Esto nos indica que las modificaciones puntuales en los seis aminoácidos no están afectando la respuesta a alta temperatura al menos en nuestras condiciones. Recordemos que como primer argumento para garantizar su rol normal en la célula este alelo está construido basado en la variabilidad natural de cultivares de chícharo, sumado a esto, las modificaciones no

corresponden a residuos importantes para el reclutamiento a agregados citoplasmáticos, como algunos encontrados en homólogos de modelos animales (Ferrero *et al.*, 2012), ni a otros residuos vitales para la interacción con eIF4G, como lo reporta Miras *et al* en el 2017 para eIF4E del melón, por lo que en principio no existe una evidencia clara que podría dar luz sobre alguna interacción faltante en la proteína mutante.

Sin embargo, recientemente se han realizado adelantos importantes en el entendimiento de eIF4E y sus proteínas interactoras en *Arabidopsis thaliana* (Patrick *et al.*, 2018; Toribio *et al.*, 2019), por lo que hacen falta estudios estructurales para demostrar que la modificación de los aminoácidos no afecta la función del alelo sintético de eIF4E en otro tipo de interacciones. Además, será necesario ampliar el rango de condiciones de estrés abióticos para evaluar su respuesta. No obstante, nuestros resultados resultan prometedores por el momento teniendo en cuenta las proyecciones biotecnológicas para las que fue propuesto este alelo (Bastet *et al.*, 2018).

## 14. CONCLUSIONES.

- La ausencia de las isoformas canónicas eIF4E y eIF(iso)4E y especialmente de la isoforma 4EHP, provoca una susceptibilidad en las plantas a comparación con las plantas WT cuando son expuestas por primera vez al reto congelante (no aclimatadas), respuesta que es dependiente del estadio de desarrollo de la planta.
- En plantas aclimatadas, la ausencia de 4EHP provoca una mayor susceptibilidad al reto congelante con respecto a WT, lo que sugiere que puede tener deficiencias en el proceso de aclimatación a 4°C.
- La inducción de expresión de los genes marcadores de respuesta a frío, *COR15A* y *TCF1*, así como de las isoformas canónicas (*eIF4E* y *eIF(iso)4E*) se mantiene en la línea *4EHP\_KO* aunque sus niveles de acumulación son menores con respecto a la línea WT, por lo que no se puede descartar que estas alteraciones influyan en la susceptibilidad a estrés congelante observada para la mutante.
- Utilizando diferentes protocolos para evaluar termotolerancia basal y adquirida, se determinó que la ausencia de alguna de las isoformas canónicas, eIF4E o eIF(iso)4E, no afecta de manera significativa la respuesta de la planta al estrés por calor.
- La línea mutante carente de la isoforma 4EHP tiende a soportar de manera más eficiente el estrés por calor en comparación a la WT cuando es sometida, o no, a un proceso de aclimatación previo.
- Las mutaciones puntuales introducidas en el alelo sintético de la línea *eIF4E\_R* no afectan su respuesta a estrés por calor bajo las condiciones evaluadas.

## 15. PERSPECTIVAS.

- Aumentar el número de ensayos de estrés por frío en plantas de ocho semanas de edad de las líneas mutantes, con el fin complementar los resultados presentados en este trabajo.
- Realizar un acercamiento a nivel global de traducción como RiboSeq y transcriptómico de la línea mutante de eIF4E, para ahondar en el papel diferencial de las dos isoformas canónicas ante el estrés por frío.
- Explorar la localización de las isoformas canónicas de eIF4E y 4EHP mediante experimentos de inmunolocalización y el uso de marcadores de agregados citoplasmáticos en respuesta a bajas temperaturas, para evaluar si existe una respuesta diferencial.
- Evaluar el estado transcripcional de *DREB1A* a tiempos menores de 24 horas en la línea *4EHP\_KO*, con el fin de confirmar si está afectada esta importante ruta de respuesta a estrés por bajas temperaturas.
- Explorar el estado transcripcional de genes clave en la respuesta a estrés por calor en la línea *4EHP\_KO* para evaluar si existe una alteración, dada la ausencia de la isoforma, que de pistas sobre el comportamiento fenotípico de esta mutante en esta condición.

## 16. BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis, J., Raff, M., & Roberts, K. (2008). *Molecular cell biology*. New York: Garland Science.
- Aquino, M. (2018). Análisis de la regulación traduccional en la expresión de genes en respuesta a estrés por frío en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arabidopsis eFP Browser by Winter et al., (2007) . PLoS One, 2(8), e718. Original eFP Browser by B. Vinegar, drawn by J. Alls and N. Provart.
- Baltes, N.J. y Voytas, D.F. (2015). Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends Biotechnol.* 33, 120–131.
- Barlow, K. M., Christy, B. P., O’Leary, G. J., Riffkin, P. A., & Nuttall, J. G. (2015). Simulating the impact of extreme heat and frost events on wheat crop production: A review. *Field Crops Research*, 171, 109–119.
- Bastet, A., Lederer, B., Giovinazzo, N., Arnoux, X., German-Retana, S., Reinbold, C., ... Gallois, J. L. (2018). Trans-species synthetic gene design allows resistance pyramiding and broad-spectrum engineering of virus resistance in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 16(9), 1569–1581
- Bastet, A., Robaglia, C., & Gallois, J. L. (2017). eIF4E Resistance: Natural Variation Should Guide Gene Editing. *Trends in Plant Science*, 22(5), 411–419.
- Browning, K. S., & Bailey-Serres, J. (2015). Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. *The Arabidopsis Book*, 13, e0176.
- Bush, M. S., Hutchins, A. P., Jones, A. M., Naldrett, M. J., Jarmolowski, A., Lloyd, C. W., & Doonan, J. H. (2009). Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 59(3), 400-412.
- Callot, C., & Gallois, J. L. (2014). Pyramiding resistances based on translation initiation factors in Arabidopsis is impaired by male gametophyte lethality. *Plant Signaling and Behavior*, 9, 2–5.
- Cargnello, M., Tcherkezian, J., Dorn, J. F., Huttlin, E. L., Maddox, P. S., Gygi, S. P., & Roux, P. P. (2012). Phosphorylation of the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Transporter (4E-T) by c-Jun N-Terminal Kinase Promotes Stress-Dependent P-Body Assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 32(22), 4572–4584.
- Chapat, C., Jafarnejad, S. M., Matta-Camacho, E., Hesketh, G. G., Gelbart, I. A., Attig, J., ... & Sonenberg, N. (2017). Cap-binding protein 4EHP effects translation silencing by microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(21), 5425-5430.

- Chen, S., & Gao, G. (2017). MicroRNAs recruit eIF4E2 to repress translation of target mRNAs. *Protein & cell*, 8(10), 750-761.
- Cho, P. F., Poulin, F., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Chicoine, J. D., Lasko, P., & Sonenberg, N. (2005). A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, 121(3), 411-423.
- Contreras-Paredes, C. A., Silva-Rosales, L., Daròs, J. A., Alejandri-Ramírez, N. D., & Dinkova, T. D. (2013). The absence of eukaryotic initiation factor eIF(iso)4E affects the systemic spread of a Tobacco etch virus isolate in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(4), 461-470.
- Cramer, G. R., Urano K., Delrot S., Pezzoti M. and Shinozaki K. (2011). Effects of abiotic stress a plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11, 163
- Cui, S., Huang, F., Wang, J., Ma, X., Cheng, Y., & Liu, J. (2005). A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 5(12), 3162-3172.
- Dever, T. E. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, 108(4), 545-556.
- Dinkova, T. D., Martinez-Castilla, L., & Cruz-Espíndola, M. A. (2016). The diversification of eIF4E family members in plants and their role in the plant-virus interaction. En: *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation* (pp. 187-205). Springer, Cham.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S., & Robaglia, C. (2002). The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant Journal*, 32(6), 927-934.
- Fernández-Bautista, N., Fernández-Calvino, L., Muñoz, A., Toribio, R., Mock, H. P., & Castellano, M. M. (2018). HOP family plays a major role in long-term acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment*, 41(8), 1852-1869.
- Ferrero P., Layana C., Paulucci E., Gutiérrez P., Hernández G. and Rivera-Pomar R. (2012). Cap binding-independent recruitment of eIF4E to cytoplasmatic foci. *Molecular Cell Research*.1823, 1217-1224.
- Frydryskova, K., Masek, T., Borcin, K., Mrvova, S., Venturi, V., & Pospisek, M. (2016). Distinct recruitment of human eIF4E isoforms to processing bodies and stress granules. *BMC molecular biology*, 17(1), 21.
- Gallie DR. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes and Development*, 5, 2108-2116
- Gao, Z., Johansen, E. Eyers, S. Thomas, C. Ellis, T. Maule, A. (2004). The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *The plant Journal*, 40,376-85

- Hannah, M. A., Heyer, A. G., & Hinch, D. K. (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 1(2), e26.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam Md, M., Roychowdhury Fujita, M., (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Science*, 14, 9643–9684
- Hashimoto, M., Neriya, Y., Keima, T., Iwabuchi, N., Koinuma, H., Hagiwara-Komoda, Y., ... & Namba, S. (2016). EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to plantago asiatica mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 88(1), 120-131.
- Hickey, K. L., Dickson, K., Cogan, J. Z., Replogle, J. M., Schoof, M., D’Orazio, K. N., ... & Kostova, K. K. (2020). GIGYF2 and 4ebp inhibit translation initiation of defective messenger RNAs to assist Ribosome-Associated quality control. *Molecular cell*, 79(6), 950-962.
- Hidalgo, A. (2007). Obtención y caracterización de mutantes homocigotas de un miembro de la familia de eIF4E: nCBP (novel Cap-Binding protein) en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM
- Ho, J. D., Wang, M., Audas, T. E., Kwon, D., Carlsson, S. K., Timpano, S., ... & Chen, S. (2016). Systemic reprogramming of translation efficiencies on oxygen stimulus. *Cell Reports*, 14(6), 1293-1300.
- Hofmann, S., Cherkasova, V., Bankhead, P., Bukau, B., & Stoecklin, G. 2012. Translation suppression promotes stress granule formation and cell survival in response to cold shock. *Molecular Biology of the Cell*, 23(19), 3786–3800
- Huggins, H. P., & Keiper, B. D. (2020). Regulation of Germ Cell mRNPs by eIF4E: 4EIP Complexes: Multiple Mechanisms, One Goal. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 562.
- IPCC. (2013). Summary for policymakers. In: climate change (2013): the physical science basis. In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (Eds.), Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment
- Ji, H., Wang, Y., Cloix, C., Li, K., Jenkins, G. I., Wang, S., ... & Li, X. (2015). The Arabidopsis RCC1 family protein TCF1 regulates freezing tolerance and cold acclimation through modulating lignin biosynthesis. *PLoS genetics*, 11(9).
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L., & Jagus, R. (2005). *Phylogenetic analysis of eIF4E-family members*. *BMC Evolutionary Biology*, 20, 1–20.
- Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E. A., & Bailey-Serres, J. (2004). Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 38(5), 823–839.



- Keima, T., Hagiwara-Komoda, Y., Hashimoto, M., Neriya, Y., Koinuma, H., Iwabuchi, N., ... Namba, S. (2017). Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant virus encoding triple-gene-block proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 7, 1–13.
- Kidokoro, S., Kim, J. S., Ishikawa, T., Suzuki, T., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2020). DREB1A/CBF3 is repressed by transgene-induced DNA methylation in the *Arabidopsis ice1-1* mutant. *The Plant Cell*, 32(4), 1035-1048.
- Kollipara, K. P., Saab, I. N., Wych, R. D., Lauer, M. J., & Singletary, G. W. (2002). Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation tolerance. *Plant Physiology*, 129(3), 974-992
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Doring, P., Vierling, E., Scharf K.D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants, *Curr. Opin. Plant Biology*. 10, 310–316
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *ELife*, 4, 1–13.
- Lamers, J., Van Der Meer, T., & Testerink, C. (2020). How plants sense and respond to stressful environments. *Plant Physiology*, 182(4), 1624-1635.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4(1), 112-166.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., & Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection. *Current Biology*, 12(12), 1046-1051.
- León, A. (2016). Caracterización molecular y fenotípica de plantas de *Arabidopsis thaliana*, mutantes de la proteína nCBP, en condiciones de estrés. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
- León, A. (2018). Análisis de la expresión y localización de la proteína nCBP en respuesta a estrés. Tesis de Maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low temperature responsive gene expression respectively, in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 10, 1391–1406.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lukoszek, R., Feist, P., & Ignatova, Z. (2016). Insights into the adaptive response of *Arabidopsis thaliana* to prolonged thermal stress by ribosomal profiling and RNA-Seq. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1-13.

- Martin, G. B., Bogdanove, A. J., & Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 23-61.
- Martínez-Silva, A. V., Aguirre-Martínez, C., Flores-Tinoco, C. E., Alejandri-Ramírez, N. D., & Dinkova, T. D. (2012). Translation initiation factor ateiF(iso)4E is involved in selective mRNA translation in arabidopsis thaliana seedlings. *PLoS ONE*, 7(2).
- Martinez Silva, V., & Dinkova, T. (2010). *Mecanismos de regulación traduccional mediados por el factor de inicio 4e: las dos caras de la moneda*. 29(3), 208708.
- Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*, 38(6), 982-993.
- Matsuo, H., Li, H., McGuire, A. M., Fletcher, C. M., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Wagner, G. (1997). Structure of translation factor eIF4E bound to m<sup>7</sup> GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nature structural biology*, 4(9), 717-724.
- Merchante, C., Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2017). Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *Plant Journal*, 90(4), 628–653.
- Miras, M., Truniger, V., Silva, C., Verdaguer, N., Aranda, M. A., & Querol-Audí, J. 2017. Structure of eIF4E in Complex with an eIF4G Peptide Supports a Universal Bipartite Binding Mode for Protein Translation. *Plant Physiology*, 174(3), 1476–1491.
- Miura, K., Jin, J. B., Lee, J., Yoo, C. Y., Stirm, V., Miura, T., ... & Hasegawa, P. M. (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(4), 1403-1414.
- Mizoi, J., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819,86-96
- Monzingo, A. F., Dhaliwal, S., Dutt-Chaudhuri, A., Lyon, A., Sadow, J. H., Hoffman, D. W., ... & Browning, K. S. (2007). The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond. *Plant physiology*, 143(4), 1504-1518.
- O’Leary S., Petrov A., and Puglisi J. (2012). Dynamic recognition of the mRNA Cap by *Saccharomyces cerevisiae* eIF4E. *Cell Press Structure*, 21, 2197-2207
- Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. *Trends in Plant Science*, 22(1), 53–65.
- Ouellet, F., & Charron, J. B. (2013). Cold acclimation and freezing tolerance in plants. *eLS*.
- Patrick, R. M., & Browning, K. S. (2012). The eIF4F and eIFiso4F Complexes of Plants:

- An Evolutionary Perspective. *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 1–12.
- Patrick, R. M., Mayberry, L. K., Choy, G., Woodard, L. E., Liu, J. S., White, A., ... & Browning, K. S. (2014). Two *Arabidopsis* loci encode novel eukaryotic initiation factor 4E isoforms that are functionally distinct from the conserved plant eukaryotic initiation factor 4E. *Plant Physiology*, 164(4), 1820-1830.
- Patrick, R. M., Lee, J. C., Teetsel, J. R., Yang, S. H., Choy, G. S., & Browning, K. S. (2018). Discovery and characterization of conserved binding of eIF4E 1 (CBE1), a eukaryotic translation initiation factor 4E-binding plant protein. *Journal of Biological Chemistry*, 293(44), 17240-17247.
- Rao, K., Raghavendra, A., & Reddy, K. (2006). Physiology and molecular biology of stress tolerance. Springer: Dordrecht, Netherlands. 1-5.
- Rhoads, R. E., Dinkova, T. D., & Korneeva, N. L. (2006). Mechanism and regulation of translation in *C. elegans*. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]*.
- Robaglia, C., & Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 11(1), 40–45.
- Rodriguez, C. M., Freire M. A, Camilleri, C, Robaglia C. (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant Journal*, 13,465-473.
- Rosinski, J.A., Atchley, W.R. (1998). Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin, *Journal of Molecular Evolution*, 46, 74–83.
- Ruffel,S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., & Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal*, 32(6), 1067–1075.
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A., & Caranta, C. (2006). Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF (iso) 4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. *Journal of General Virology*, 87(7), 2089-2098.
- Ruud, K. A., Kuhlow, C., Goss, D. J., & Browning, K. S. (1998). Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10325-10330.
- Salazar-Diaz, K. (2017). Papel de los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E durante el estrés por congelamiento en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Salomé, P. A. (2017). Some Like It HOT: Protein Translation and Heat Stress in Plants.

- The Plant Cell*, 29(9), 2075–2075.
- Sangwan, V., Orvar, B.L., Beyerly, J., Hirt, H., & Dhindsa, R.S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant Journal*, 31, 629–638
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M., & Uyeda, I. (2005). Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Letters*, 579(5), 1167–1171.
- 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 Academic of Science. (USA)*, 95(24), 14570–14575.
- Stevanović, M., Popp, A., Lotze-Campen, H., Dietrich, J. P., Müller, C., Borsch, M., ... Weindl, I. (2016). The impact of high-end climate change on agricultural welfare. *Science Advances*, 2(8), e1501452.
- Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C repeat/ DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit, *Proceedings of the National Academic of Science.. (USA)*, 94, 1035–1040
- Strudwick, S., & Borden, K. L. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation*, 70(1), 10–22.
- Sunkar, R. (2010). Plant stress tolerance. *Methods in Molecular Biology*, 639, 401.
- Suzuki, N. & Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, 126, 45–51
- Swindell, W. R., Huebner, M., & Weber, A. P. (2007). Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 8(1), 125.
- Thalhammer, A., & Hinch, D. K. (2013). The Function and Evolution of Closely Related COR/LEA (Cold-Regulated/Late Embryogenesis Abundant) Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Microbe Adaptations to Cold in a Changing World*, Springer, 89–105.
- Thomas M., Loschi M., Desbast M. & Boccacio G. (2011). RNA granules: The good, the bad and the ugly. *Cellular Signaling*, 23, 324–334
- Thomashow M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiology*, 50, 571–599

- Toribio, R., Muñoz, A., Castro-Sanz, A. B., Merchante, C., & Castellano, M. M. (2019). A novel eIF4E-interacting protein that forms non-canonical translation initiation complexes. *Nature plants*, 5(12), 1283-1296.
- United Nations (2017). World Population Prospects: The 2017 Revision. United Nations Population Division, New York.
- Villa, N., & Fraser, C. S. (2014). Mechanism of Translation in Eukaryotes. *Translation and Its Regulation in Cancer Biology and Medicine*, 7–37.
- Vítámvás, P., Prášil, I. T., Kosova, K., Planchon, S., & Renaut, J. (2012). Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *Proteomics*, 12(1), 68-85.
- Wang, A. & Krishnaswamy, S. (2012). Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Molecular Plant Pathology*, 13,795–803.
- Wang, A. (2015). Dissecting the Molecular Network of Virus-Plant Interactions: The Complex Roles of Host Factors. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 45–66.
- Wang, L., Li, H., Zhao, C., Li, S., Kong, L., Wu, W., ... & Zhang, H. (2017). The inhibition of protein translation mediated by AtGCN1 is essential for cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 40(1), 56-68
- Waters, E. R., Lee, G. J., & Vierling, E. (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47(3), 325-338
- Weber, C., Nover, L., & Fauth, M. (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *The Plant Journal*, 56(4), 517-530.
- Whetten, R., & Sederoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 1001.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G., & Laliberté, J. F. (1997). Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*, 234(1), 84-92.
- Xi, Y., Park, S. R., Kim, D. H., Kim, E. D., & Sung, S. (2020). Transcriptome and epigenome analyses of vernalization in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 103(4), 1490-1502.
- Xiong, L., Shumaker, S. y Zhu, J. (2002). Cell signaling during cold, and salt stress. *Plant Cell*, 14,165-83
- Xu, C., & Huang, B. (2008). Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4183-4194.

- Xu, Q., Xu, X., Shi, Y., Xu, J., & Huang, B. (2014). Transgenic tobacco plants overexpressing a grass PpEXP1 gene exhibit enhanced tolerance to heat stress. *PLoS One*, 9(7), e100792.
- Yadav, S. K. (2009). Cold stress tolerance mechanisms in plants. *Sustainable Agriculture*, 2, 605–620.
- Yangüez, E., Castro-Sanz, A.B., Fernández-Bautista, N., Oliveros, J.C., Castellano, M.M. (2013) Analysis of genome-wide changes in the translome of Arabidopsis seedlings subjected to heat stress. *PLoS One* 8(8), e71425.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324.

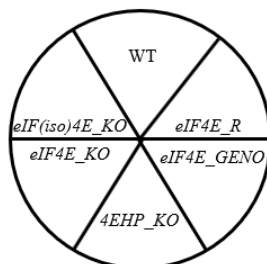
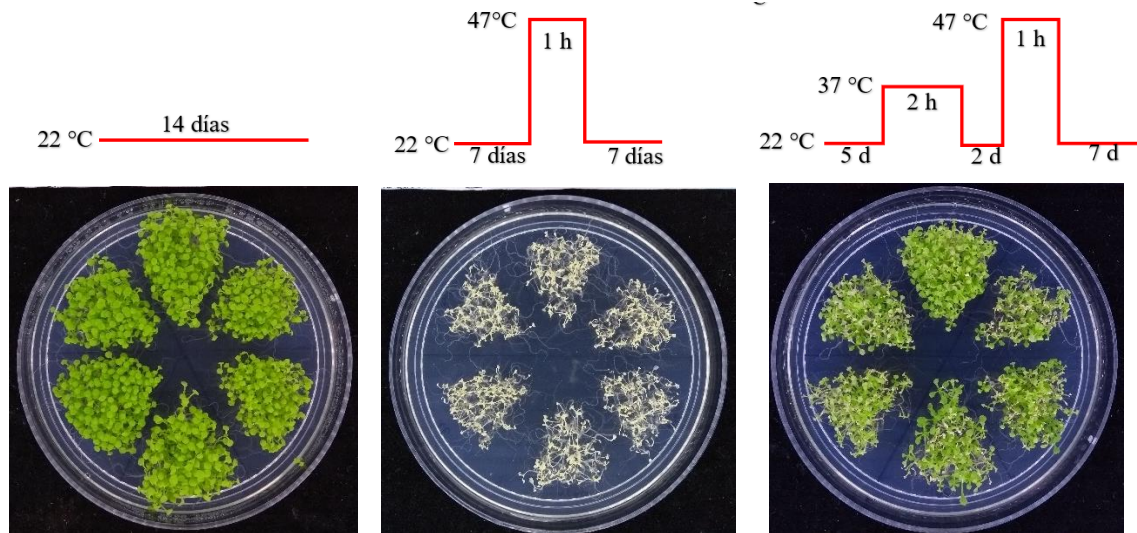
**17. ANEXOS**  
**FENOTIPO DE LAS PLANTAS SEGÚN LA EDAD**



**Anexo 1. Fenotipo de las plantas de *A.thaliana* a cinco y a ocho semanas de crecidas.** A la izquierda se observa como luce una planta de cinco semanas de edad y a la derecha de ocho semanas de edad.

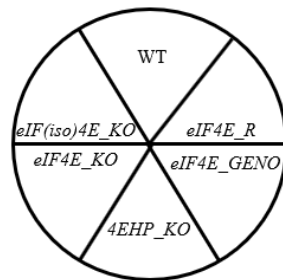
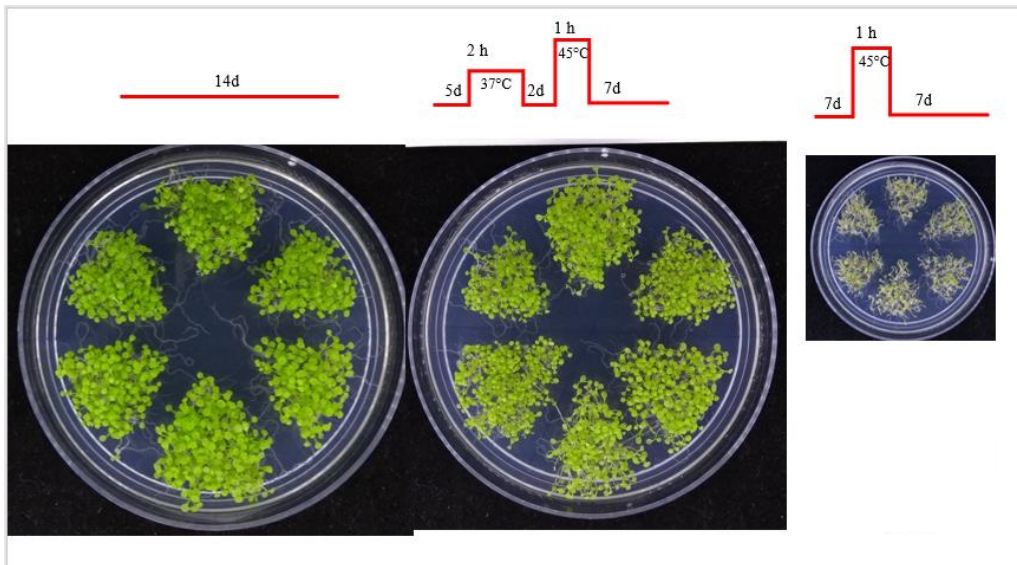
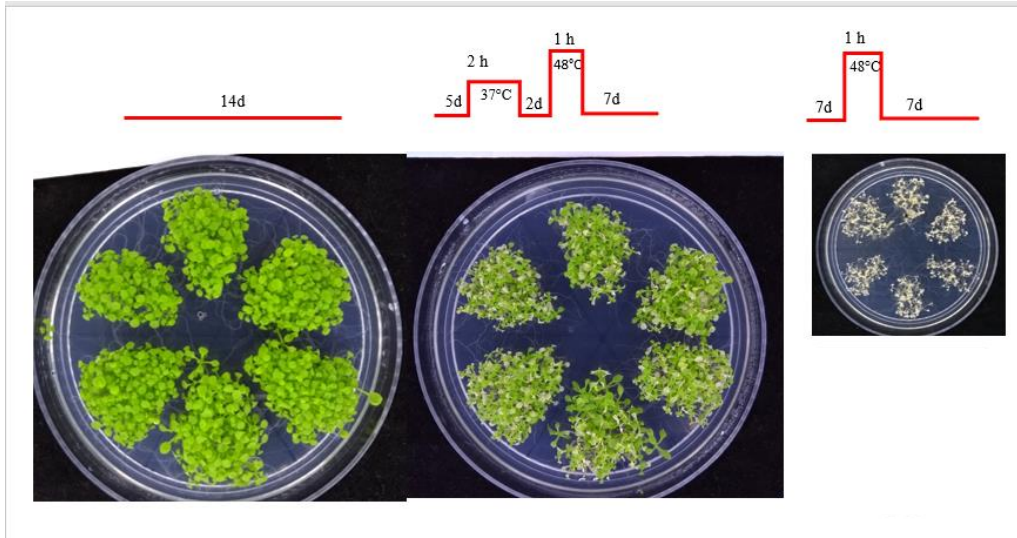
**ENSAYOS EXPLORATORIOS PARA EL PROTOCOLO 1 DE TOLERANCIA ADQUIRIDA AL CALOR**

Para cada ensayo de termotolerancia adquirida, las semillas de las diferentes líneas analizadas se sembraron en la misma caja, bajo el esquema señalado en las figuras. Se sembró un control de crecimiento que no fue sometido a retos de temperatura y un control da plántulas no aclimatadas, directamente sometidas al reto de elevada temperatura. A continuación, se muestran los fenotipos observados en diferentes pruebas:



**Anexo 2. Termotolerancia adquirida a 47°C.** Aspecto de las plántulas después de siete días de recuperación. Fenotipos de plántulas sometidas al protocolo de tolerancia adquirida al calor utilizando incubación previa a 37°C como aclimatación (derecha). Se compara con plántulas no sometidas a estrés (izquierda) y plántulas directamente sometidas al reto (centro).

A continuación se muestra los fenotipos presentados para dos temperaturas de HS abajo y arriba de la óptima:



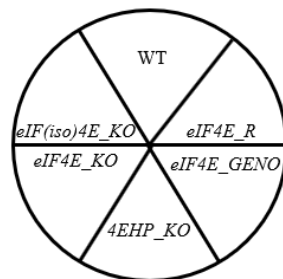
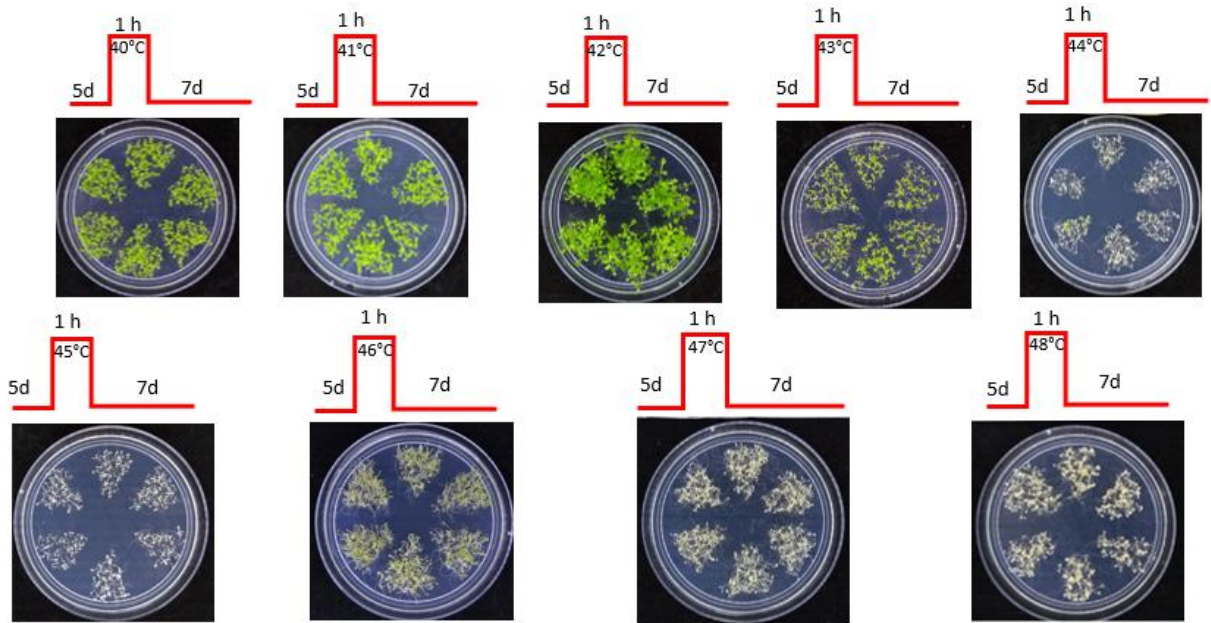


**Anexo 3. Termotolerancia adquirida a 45°C y 48°C.** Fenotipos de plántulas sometidas al protocolo de tolerancia adquirida al calor utilizando incubación previa a 37°C como aclimatación (centro). Se compara con plántulas no sometidas a estrés (izquierda) y plántulas directamente sometidas al reto (derecha).

El uso de una temperatura mayor a 47°C presentó una tendencia a ser demasiado alto para poder observar un grado de supervivencia de las plántulas, además de una muy baja reproducibilidad, y con temperaturas menores a 47°C la capacidad de tolerancia era perfecta, por lo que fueron descartadas para buscar una respuesta diferencial

**ENSAYOS EXPLORATORIOS PARA EL PROTOCOLO DE TERMOTOLERANCIA BASAL**

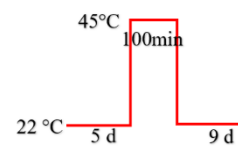
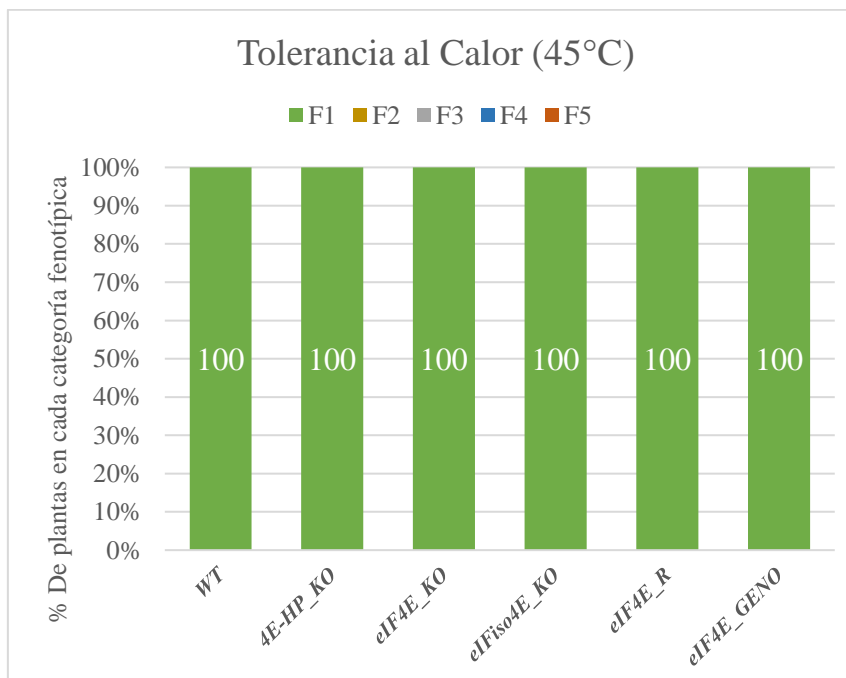
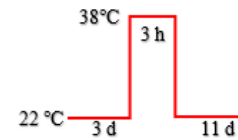
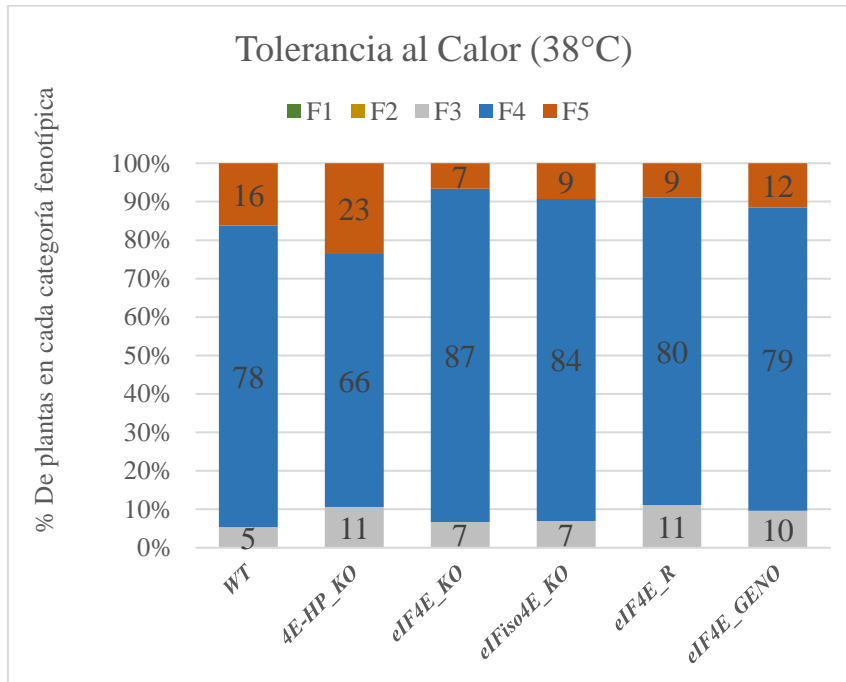
El fenotipo después de siete días de recuperación de plantas estresadas a los cinco días de crecimiento a diferentes temperaturas de HS se muestra a continuación:



**Anexo 4. Fenotipo de plantas sometidas a diferentes temperaturas de estrés por calor.** Se muestra como lucen las plántulas de las diferentes líneas evaluadas a nueve temperaturas de 40 a 48°C.

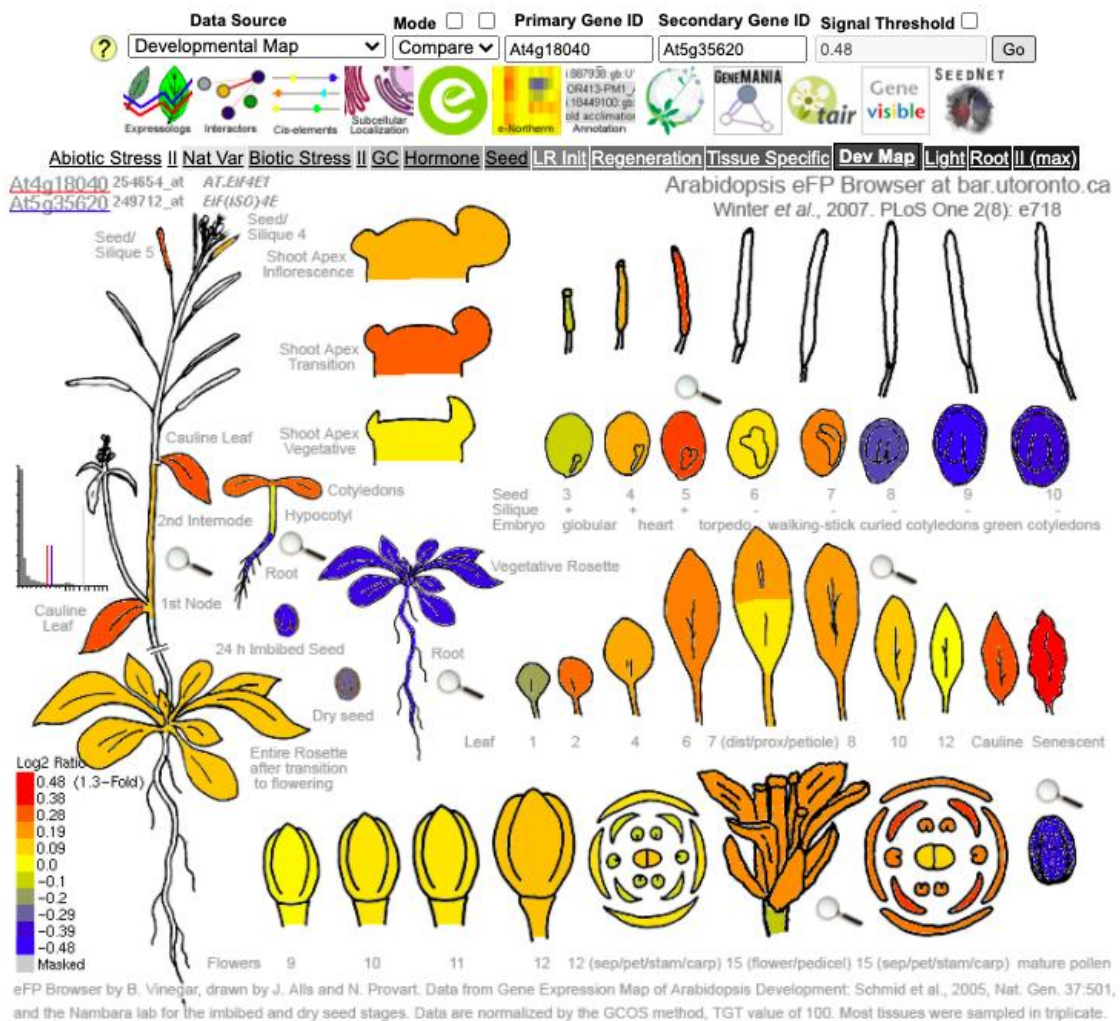
## TERMOTOLERANCIA AL CALOR, CONDICIONES CONTROL (protocolo 2)

Se realizaron dos protocolos de termotolerancia: sólo a la temperatura de aclimatación sin choque térmico, así como sólo choque térmico sin tratamiento de aclimatación, un promedio de 40 a 50 plántulas de cada línea mutante divididas en dos ensayos fueron sometidas al protocolo indicado en la figura, y los resultados de porcentaje de plántulas con hojas verdes expandidas se ilustra:

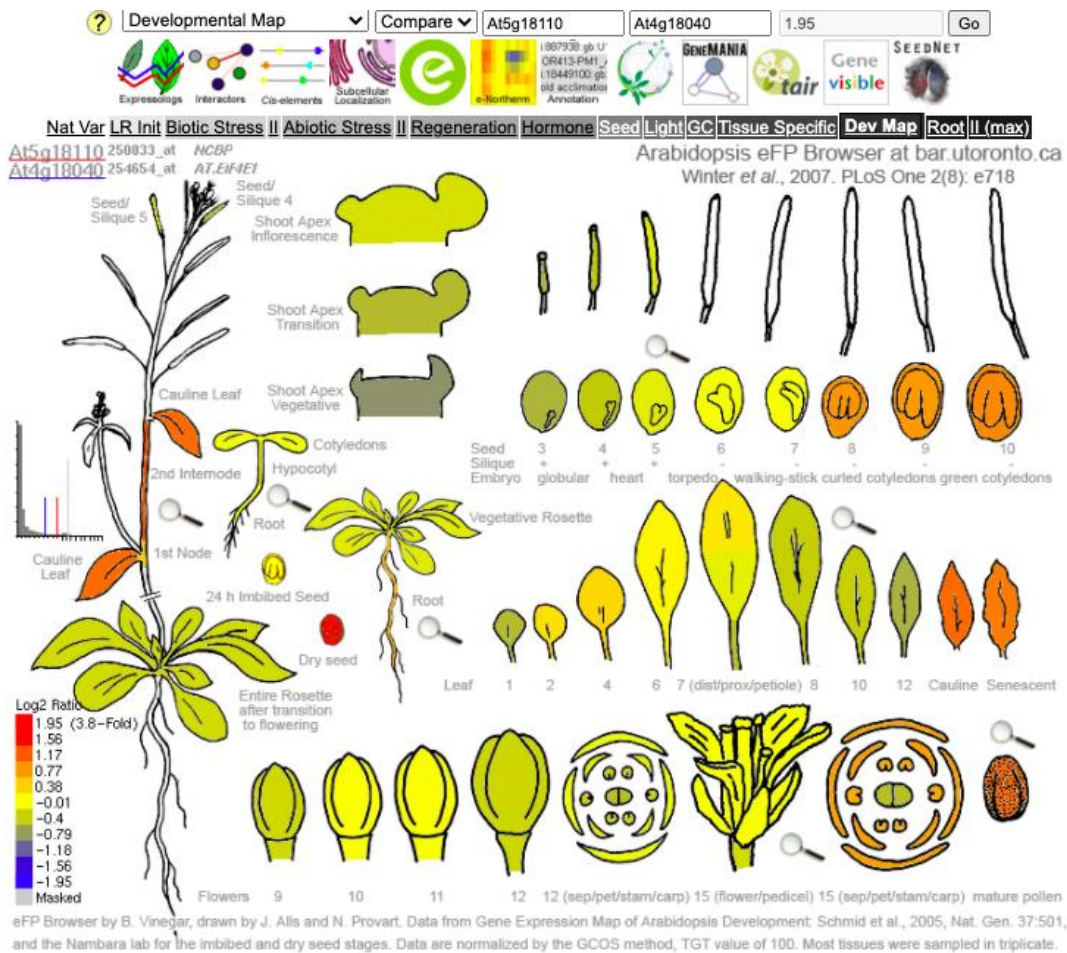


Categoría	Número de Hojas verdes expandidas
F1	0
F2	1 - 3
F3	4 - 5
F4	6
F5	7 - 8

**Anexo 5. Termotolerancia al Calor y condiciones control (protocolo2).** Se muestra el porcentaje de plántulas de cada una de las líneas mutantes de las isoformas ubicadas en cada categoría fenotípica después del tratamiento: A) Plántulas de 14 días expuestas a aclimatación al calor en el día 3. B) Plántulas de 14 días expuestas al choque térmico al día 5 de crecidas.



**Anexo 6. Expresión relativa de *eIF4E* y *eIF(iso)4E* a lo largo del desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (eFP Browser).** Se muestran los niveles de transcrito relativos en log base 2 de *eIF4E* (At4g18040)/*eIF(iso)4E* (At5g35620) acorde a datos de expresión globales en diferentes etapas de desarrollo y tejidos de la planta. El color rojo indica predominancia de *eIF4E*, mientras que el color azul, predominancia de *eIF(iso)4E*.



**Anexo 7. Expresión relativa de *4EHP* y *eIF4E* a lo largo del desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (eFP Browser).** Se muestran los niveles de transcrito relativos en log base 2 de *4EHP* (At5g18110)/*eIF4E* (At4g18040) acorde a datos de expresión globales en diferentes etapas de desarrollo y tejidos de la planta. El color rojo indica predominancia de *4EHP*, que es evidente en hojas senescentes y caulinares, polen maduro y semilla seca.