



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CONTRIBUCIÓN DE ESFINGOLÍPIDOS Y DE MPKs A LA EXPRESIÓN DE  
FENOTIPOS RESISTENTES A ALTAS TEMPERATURAS A TRAVÉS DE UN  
PROCESO DE ACLIMATACIÓN EN ARABIDOPSIS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**DAVID FERNANDO BARRERA GÓMEZ**



**CIUDAD DE MÉXICO A 1 DE DICIEMBRE DE 2023**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor:** Marina Gavilanes Ruíz

**VOCAL:**                   **Profesor:** Sobeida Sánchez Nieto

**SECRETARIO:**         **Profesor:** Tzvetanka Dimitrova Dinkova

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor:** Manuel Gutiérrez Aguilar

**2° SUPLENTE:**         **Profesor:** César Luis Cuevas Velázquez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio 101, Conjunto E, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM

**ASESOR DEL TEMA:**



---

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

**SUPERVISOR TÉCNICO:**



---

M. EN C. ILIAN GIORDANO PONCE PINEDA

**SUSTENTANTE:**



---

David Fernando Barrera Gómez

## **RECONOCIMIENTOS**

Al Subprograma 127, Formación Básica en Investigación, de la Facultad de Química, UNAM, por el financiamiento a David Fernando Barrera Gómez, en el periodo septiembre de 2022 a agosto 2023.

A la DGAPA (UNAM), por el financiamiento al proyecto PAPIIT IN222621, dentro del cual esta Tesis de Licenciatura fue desarrollada.

A la Facultad de Química, UNAM, por su financiamiento al proyecto PAIP 5000 9115, dentro del cual esta tesis de licenciatura fue desarrollada.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Laura Carmona Salazar, por su asesoría en el trabajo de laboratorio y en el tratamiento estadístico.

Al Med. Cir. Rodolfo Paredes, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su trabajo en la microscopía electrónica de transmisión.

Al Dr. Diego González Halphen, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su colaboración en los estudios de ultraestructura celular.

Al Dr. Edgar B. Cahoon, de la Universidad de Nebraska-Lincoln y al Dr. Arturo Guevara García del Instituto de Biotecnología, UNAM, por facilitar las líneas de *Arabidopsis thaliana* modificadas genéticamente usadas en este proyecto.

Al jurado asignado, por la revisión y correcciones realizadas a este trabajo.

## **SITIO EN DONDE SE REALIZÓ EL TEMA**

Laboratorio 101, Conjunto E, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

# ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	6
1. RESUMEN	8
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
2.2 Estreses bióticos y abióticos que afectan a las plantas	10
2.3. Las altas temperaturas y sus efectos en las plantas	13
2.3.1. Mecanismos de respuestas a altas temperaturas, tolerancia y resistencia en las plantas.	16
2.3.2. Termomorfogénesis.	18
2.3.3. Aclimatación al estrés por altas temperaturas	19
2.3.4. Proteínas de choque de calor.	19
2.4. Sistema de transducción de señales al estrés	20
2.5. MAP cinasas	22
2.5.1. Función de las MAP cinasas, MPK3 y MPK6 en la respuesta a las altas temperaturas	25
2.6. Esfingolípidos	26
2.6.1 Funciones de los esfingolípidos	28
2.6.2. Función de los esfingolípidos en la respuesta a las altas temperaturas	30
3. ANTECEDENTES	31
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	32
5.1. Objetivo General	32
5.2. Objetivos Específicos	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1. Reactivos	33
6.2. Diseño experimental	33
6.3. Material biológico	33
6.4. Preparación del medio de cultivo	35
6.5. Desinfección de semillas	36
6.6. Siembra en cajas Petri	36
6.7. Tratamientos térmicos	37
6.8. Determinación de los fenotipos	38

<b>6.8.1. Medición de la longitud de la raíz primaria</b>	<b>39</b>
<b>6.8.2. Determinación del número de raíces laterales</b>	<b>39</b>
<b>6.8.3. Determinación de la cantidad de pelos radiculares</b>	<b>39</b>
<b>6.8.4. Estimación del color de las hojas</b>	<b>40</b>
<b>6.10. Análisis Estadístico</b>	<b>41</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>74</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>75</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO I. Composición del medio utilizado en el crecimiento en cajas de Petri</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO II. Pruebas para determinar condiciones que aseguren un crecimiento homogéneo de las plántulas</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO III. Registro fotográfico de las plántulas bajo el microscopio estereoscópico en caja vertical</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO IV. Soluciones y reactivos utilizados</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO V. Ensayos de extracción de RNA y qPCR</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>9</b>
<b>Fig. 2.</b> Ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> en diferentes regiones geográficas	<b>10</b>
<b>Fig. 3.</b> Mecanismos de respuesta de las plantas a estreses bióticos y abióticos	<b>12</b>
<b>Fig. 4.</b> Aumento de la temperatura desde 1800 a la fecha	<b>13</b>
<b>Fig. 5.</b> Algunos de los efectos provocados por el estrés por calor en las plantas	<b>14</b>
<b>Fig. 6.</b> Reprogramación metabólica en cloroplastos bajo estrés por calor	<b>17</b>
<b>Fig. 7.</b> Procesos de respuesta generados por estreses bióticos y abióticos que conducen a la resistencia y tolerancia al estrés y en los que participan las HSPs	<b>21</b>
<b>Fig. 8.</b> Estructura de los esfingolípidos y bases de cadena larga (BCL) que se encuentran en las plantas y de su efecto en la propiedad de fluidez membranal	<b>26</b>
<b>Fig. 9.</b> Vía biosintética de esfingolípidos vegetales	<b>27</b>
<b>Fig. 10.</b> Posibles papeles de los esfingolípidos, la MPK3, la MPK6 y la función de proteínas de choque de calor (HSP) en la vía de señalización en respuesta al estrés por alta temperatura.	<b>32</b>
<b>Fig. 11.</b> Estrategia experimental propuesta	<b>34</b>
<b>Fig. 12.</b> Representación de la siembra para el crecimiento en vertical y la germinación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>36</b>
<b>Fig. 13.</b> Procedimiento seguido para llevar a cabo los tratamientos control y de altas temperaturas en plántulas descritos en este trabajo.	<b>38</b>
<b>Fig. 14.</b> Características fenotípicas en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de líneas mutantes y de la silvestre	<b>38</b>
<b>Fig. 15.</b> Esquema de un ejemplo de una réplica biológica y acomodo de las semillas en las cajas Petri	<b>40</b>
<b>Fig. 16.</b> Características de las plantas de los genotipos <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i> en cuanto al gen que no se expresa, la enzima que es codificada y la reacción que cataliza comparado con wt.	<b>43</b>
<b>Fig. 17.</b> Efectos de altas temperaturas en los fenotipos de las plántulas wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i>	<b>44</b>
<b>Fig. 18.</b> Efecto de altas temperaturas en la longitud de la raíz primaria de plántulas de los wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i>	<b>45</b>
<b>Fig. 19.</b> Detalle de los cambios en los fenotipos de plántulas sometidas a la temperatura del reto (45 °C)	<b>46</b>
<b>Fig. 20.</b> Efectos de altas temperaturas en los fenotipos de plántulas wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i> en las raíces laterales	<b>47</b>
<b>Fig. 21.</b> Efecto de las altas temperaturas en el número de raíces laterales de plántulas de los genotipos wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i>	<b>48</b>
<b>Fig. 22.</b> Efecto de las altas temperaturas en el número de raíces laterales a diferentes tiempos postratamiento de plántulas wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i>	<b>49</b>
<b>Fig. 23.</b> Efecto de las altas temperaturas en la abundancia de pelos radiculares a diferentes tiempos postratamiento de plántulas wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i>	<b>50</b>
<b>Fig. 24.</b> Efecto de las altas temperaturas en las características de la roseta a diferentes tiempos postratamiento de plántulas wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i>	<b>52</b>
<b>Fig. 25.</b> Detalle de los cambios en la roseta de plántulas wt sometidas al reto (45 °C)	<b>53</b>

<b>Fig. 26.</b> Efecto de las altas temperaturas en el color de las hojas estimado tres días posteriores a los tratamientos de plántulas wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i> crecidas en posición vertical	<b>54</b>
<b>Fig. 27.</b> Efecto de las altas temperaturas en el color de las hojas estimado siete días posteriores a los tratamientos de plántulas wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i> crecidas en posición vertical por registro fotográfico en estereoscopio	<b>55</b>
<b>Fig. 28.</b> Efecto de las altas temperaturas en la evolución del color de las hojas a diferentes tiempos postratamiento de plántulas wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i> crecidas verticalmente	<b>57</b>
<b>Fig. 29.</b> Efecto de las altas temperaturas en la evolución del color de las hojas y en el número de hojas emergentes a diferentes tiempos postratamiento de plántulas wt, <i>sbh1-1</i> , <i>sld1 sld2</i> , <i>mpk3</i> y <i>mpk6</i> crecidas verticalmente	<b>58</b>
<b>Fig. 30.</b> Efecto de la temperatura de 22 °C (control) en la ultraestructura celular de cortes transversales de hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i> del genotipo wt	<b>60</b>
<b>Fig. 31.</b> Efecto de la temperatura de 37 °C (aclimatación) en la ultraestructura celular de cortes transversales de hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i> del genotipo wt	<b>61</b>
<b>Fig. 32.</b> Efecto de la temperatura de 45 °C (reto) en la ultraestructura celular de cortes transversales de hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i> del genotipo wt	<b>62</b>
<b>Fig. 33.</b> Efecto de la temperatura de 37 °C y 45 °C (aclimatación y reto) en la ultraestructura celular de cortes transversales de hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i> del genotipo wt	<b>63</b>
<b>Fig. 34.</b> Crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> del genotipo silvestre, wt, de una semana de edad crecidas con fotoperiodo largo a 22 °C	<b>81</b>
<b>Fig. 35.</b> Confirmación de la carencia de efecto de la posición de las plántulas en su crecimiento en la caja de Petri	<b>81</b>
<b>Fig. 36.</b> Experimento 1. Fenotipos de plántulas expuestas a calor moderado (aclimatación) y calor extremo (reto) crecidas verticalmente	<b>82</b>
<b>Fig. 37.</b> Seguimiento en el cambio de fenotipo hasta 7 días después de los tratamientos de calor	<b>83</b>
<b>Fig. 38.</b> Seguimiento en el cambio de fenotipo hasta 25 días después de los tratamientos de calor	<b>84</b>
<b>Fig. 39.</b> Experimento 1. Fenotipos de plántulas expuestas a calor moderado (aclimatación) y calor extremo (reto) crecidas horizontalmente	<b>85</b>
<b>Fig. 40.</b> Experimento 2. Seguimiento del fenotipo de plántula expuestas a calor moderado (aclimatación) y calor extremo (Reto) crecidas en caja horizontal	<b>86</b>
<b>Fig. 41.</b> Experimento 2. Fenotipos de plántulas expuestas a calor moderado (aclimatación) y calor extremo (reto) crecidas horizontalmente	<b>87</b>
<b>Fig. 42.</b> Seguimiento en el cambio de fenotipo de la mutante que sobre expresa la MPK6 después de los tratamientos de calor	<b>88</b>
<b>Fig. 43.</b> Curva de disociación obtenida con los oligonucleótidos diseñados para el gen HSFA2	<b>95</b>
<b>Fig. 44.</b> Ejemplo de una curva de calibración de un par de oligonucleótidos	<b>96</b>
<b>Fig. 45.</b> Geles de agarosa de los dos ensayos de optimización realizados para la técnica de extracción de RNA	<b>97</b>
<b>Fig. 46.</b> Integridad del RNA total usado para la síntesis de cDNA.	<b>100</b>
<b>Fig. 47.</b> Producto de PCR punto final evaluado en un gel de agarosa al 2 %	<b>103</b>
<b>Fig. 48.</b> Curvas de amplificación y de disociación del DNA durante los ciclos de calentamiento de los genes de referencia <i>tubulina</i> y <i>actina2</i>	<b>104</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Lista de genes de la cascada MAPK de Arabidopsis involucrados en la respuesta al estrés abiótico determinada por análisis funcional con referencias	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Características genóticas y fenotípicas de las líneas mutantes que se utilizaron	<b>35</b>
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio Gamborg's	<b>35</b>
<b>Tabla 4.</b> Volumen de medio Gamborg's por caja Petri	<b>35</b>
<b>Tabla 5.</b> Composición del medio Gamborg's	<b>80</b>
<b>Tabla 6.</b> Condiciones para la síntesis de cDNA	<b>93</b>
<b>Tabla 7.</b> Criterios de diseño recomendados para oligonucleótidos de PCR en tiempo real	<b>94</b>
<b>Tabla 8.</b> Oligonucleótidos utilizados en la evaluación de los transcritos de HSP17.6, HSP70-4, HSP70-5, HSP101 y los genes de referencia	<b>94</b>
<b>Tabla 9.</b> Condiciones utilizadas para la qPCR	<b>95</b>
<b>Tabla 10.</b> Cuantificación de RNA del primer ensayo de optimización	<b>97</b>
<b>Tabla 11.</b> Cuantificación del RNA del segundo ensayo de optimización	<b>97</b>
<b>Tabla 12.</b> Rendimiento del RNA total aislado por cantidad de tejido en tres replicas biológicas, con los cuatro tratamientos térmicos el genotipo wt	<b>98</b>
<b>Tabla 13.</b> Rendimiento del RNA total aislado por cantidad de tejido en tres replicas biológicas, con los cuatro tratamientos térmicos el genotipo <i>sbh1-1</i>	<b>99</b>
<b>Tabla 14.</b> Rendimiento del RNA total aislado por cantidad de tejido en tres replicas biológicas, con los cuatro tratamientos térmicos el genotipo <i>mpk6</i>	<b>99</b>
<b>Tabla 15.</b> Pruebas de reconocimiento y curvas de calibración de los oligonucleótidos diseñados	<b>101</b>

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ABRE	Elemento sensible al ácido abscísico
APX2	Ascorbato peroxidasa 2
ATP	Adenosín trifosfato
BCL	Bases de cadena larga
BR	Brasinoesteroides
CAT	Catalasa
CBF	Factor de unión de repetición C
CDPK	Proteínas cinasas dependientes de calcio
CK	Citocinina
cDNA	DNA complementario
CMV	Virus del mosaico de pepino
Col	ecotipo Columbia
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPS	Desoxiribonucleótidos trifosfatos
DREB	Proteína de unión a elementos sensibles a deshidratación
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
ET	Etileno
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación S transferasa
HSE	Elementos de choque de calor
HSF	Factor de transcripción de choque térmico
HSFA2	Factor de transcripción de choque de calor A2
HSFA4A	Factor de transcripción de choque de calor A4A
HSP	Proteínas de choque de calor
HSP17.6	Proteína de choque de calor 17.6
HSP70	Proteínas de choque calor 70
HSP70-4	Proteínas de choque calor 70-4
HSP70-5	Proteínas de choque calor 70-5
HSP70-14	Proteínas de choque calor 70-14
HSP101	Proteínas de choque calor 101
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno

JA	Jasmonato
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MPK3	Proteína cinasa activada por mitógenos 3
MPK6	Proteína cinasa activada por mitógenos 6
MAPKK/MKK	Proteína cinasa cinasa activada por mitógenos
MAPKKK/ MEKK	Proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógenos
mRNA	RNA mensajero
MS	Espectrometría de masas
NB	Northern blot o réplica en Northern
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singulete
OH·	Radical hidroxilo
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Radical superóxido
ORTV	Virus de la colza oleaginosa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLD	Fosfolipasa D
POD	Peroxidasa
PSI	Fotosistema 1
PSII	Fotosistema 2
PVX	Virus X de la papa
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RLK	Cinasas similares a receptores
RLP	Proteínas similares a receptores
RNA	Ácido ribonucleico
SA	Ácido salicílico
<i>sbh1-1</i>	Hidroxilasa de base esfingoide 1
<i>sld1 sld2</i>	Desaturasa 1 y 2 de base de cadena larga de esfingolípidos 8
SOD	Superóxido dismutasa
TuMV	Virus de mosaico del nabo
WB	Western Blot o réplica en Western
wt	Wild type, silvestre

## 1. RESUMEN

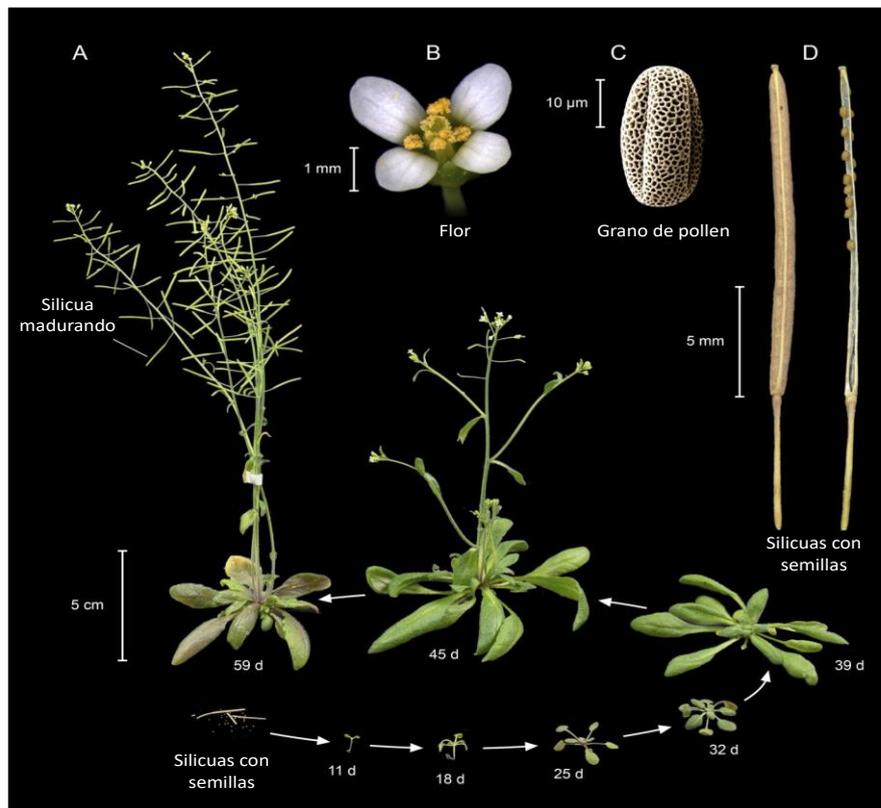
La creciente amenaza de los extremos climatológicos, incluidas las temperaturas muy altas, podría conducir a una pérdida catastrófica de la productividad de los cultivos y provocar una hambruna generalizada (Bitá et al. 2013). La producción agrícola futura y, por lo tanto, la seguridad alimentaria mundial, enfrentará desafíos adicionales derivados del crecimiento de la población humana (Bitá et al. 2013). Lo anterior implica que es necesario conocer los mecanismos naturales de tolerancia a las altas temperaturas para poder optimizarlos y aplicarlos de manera remedial.

El estrés por calor puede provocar cambios fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente el crecimiento y la productividad de las plantas. Un ejemplo es la síntesis de proteínas de choque de calor (HSPs) en el proceso de termotolerancia (Coronato et al. 1999). Inicialmente, las altas temperaturas generan respuestas en las plantas que producen transductores o segundos mensajeros, como cinasas activadas por mitógenos (MAPK) esfingolípidos, respectivamente (Pérez-Salamó et al. 2014). No se ha estudiado si la respuesta a alta temperatura genera algún esfingolípido señalizador relacionado con respuestas de termotolerancia (Niu y Xiang, 2018). El propósito de este trabajo, fue determinar los fenotipos de plántulas que expresaran resistencia a altas temperaturas, pero que específicamente carecieran o fueran deficientes en MPK3, MPK6 o esfingolípidos. Por ello, se usaron plántulas de 5 genotipos mutantes de la especie *Arabidopsis thaliana*: wt, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*, que se expusieron a calor moderado como aclimatación previa a un tratamiento de un calor más intenso. El diseño experimental utilizado permitió evidenciar los efectos producidos en las plántulas de los 5 genotipos estudiados por condiciones de aclimatación a altas temperaturas y de reto con temperaturas aún más altas. La aclimatación a 37 °C no resultó en características fenotípicas deletéreas que fueran visibles en ninguno de los genotipos, indicando una inesperada resistencia de *Arabidopsis* a esta alta temperatura. Pero el reto a 45 °C sí afectó severamente el crecimiento de la planta. La aclimatación previa al reto permitió que las plantas pudieran resistir mejor el reto. La notable sensibilidad de los cloroplastos de las plantas silvestres a las altas temperaturas indica que la exposición a altas temperaturas induce cambios fenotípicos a nivel de la ultraestructura celular, que no son aparentes macroscópicamente. En general, los resultados sugieren que los esfingolípidos trihidroxilados y saturados, así como MPK3 y MPK6, participan en la respuesta a las altas temperaturas, dependiendo del órgano de la planta y de la magnitud y duración de la exposición a la alta temperatura. Lo anterior abre la posibilidad de estudiar los mecanismos detrás de estos efectos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 *Arabidopsis thaliana*

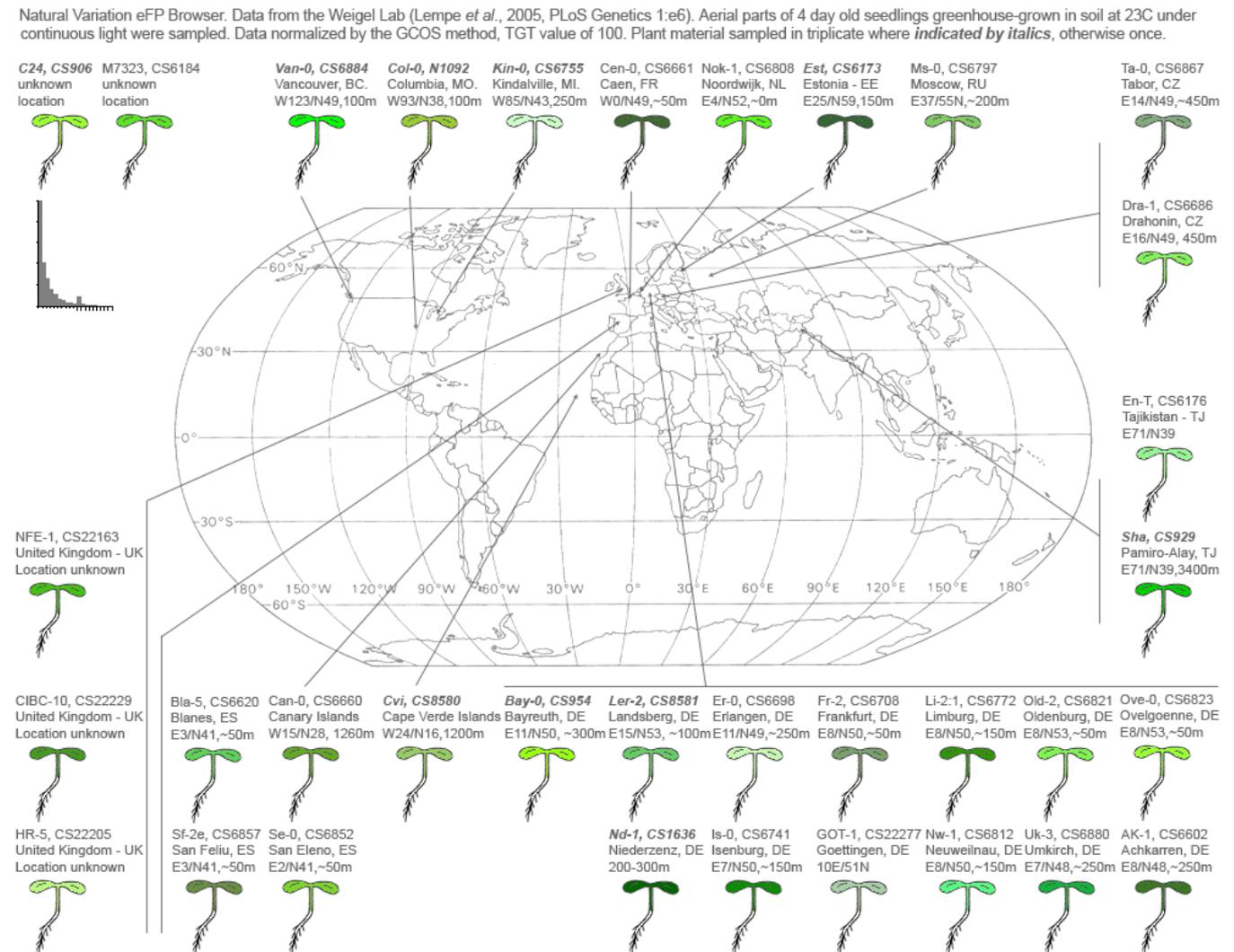
*Arabidopsis thaliana* es un valioso modelo para observar cambios en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Fig. 1). Es una planta pequeña con un tiempo de generación rápido (6 semanas) que crece bien en laboratorios, a temperatura ambiente y con luz de intensidad moderada. Se reproduce por autopolinización, aunque es posible la polinización cruzada. Produce aproximadamente de 10,000 a 30,000 semillas. Estas semillas se pueden cultivar bajo circunstancias ambientales controladas en placas de Petri estériles. Como resultado, mientras se mantienen constantes las condiciones de crecimiento, es posible exponer plántulas individuales a niveles variables de un parámetro ambiental particular (Ute, 2015).



**Fig. 1.** Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. (A) *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col) en diferentes etapas de su ciclo de vida, desde semilla (extremo inferior izquierdo), hasta plántula (11 días), su crecimiento vegetativo (39 días) y su crecimiento reproductivo (45 días). Fotografías de (B) una flor, (C) un grano de polen (micrografía electrónica de barrido) y (D) silicuas maduras (vainas de semillas; izquierda: cerrada; derecha: abierta con algunas semillas restantes sin romper). Tomado de Ute (2015).

*Arabidopsis thaliana* tiene una secuencia genómica de 115 409 949 pares de bases de DNA, con 25 498 genes distribuidos en cinco cromosomas. *A. thaliana* es miembro de la familia Brassicaceae, que contiene alrededor de 340 géneros y 3700 especies distribuidas en

diferentes regiones geográficas (Fig. 2). Asimismo, las plantas de *A. thaliana* son más pequeñas y sus semillas son de larga vida y altamente viables (Ute, 2015).



**Fig. 2.** Ecotipos de *Arabidopsis thaliana* en diferentes regiones geográficas. Tomada de Winter et al. (2007).

## 2.2 Estrés bióticos y abióticos que afectan a las plantas

Una planta requiere carbono, energía, luz, nutrientes minerales y agua para su crecimiento óptimo, cuando cualquiera de estos requisitos es limitado o excesivo, se produce un estrés. El estrés puede definirse como cualquier cambio en las condiciones ambientales que tenga efectos indeseables sobre el crecimiento y desarrollo normal de las plantas. Asimismo, el estrés se puede definir como una condición no ideal para la supervivencia (Baweja et al. 2020). Las plantas sufren diferentes factores estresantes durante su ciclo de vida, desde la germinación de la semilla hasta la formación de los frutos. Para entender el estrés vegetal, se puede categorizar como biótico o abiótico, según el factor que está causando el estrés

(Baweja et al. 2020). Estos estreses pueden afectar a la planta de manera más o menos severa dependiendo de su magnitud y duración.

Los estreses abióticos como la sequía, la salinidad, los productos químicos (metales pesados), la luz, las temperaturas altas y bajas, así como los bióticos como los ataques de patógenos, tienen efectos independientes o interconectados en las plantas, lo que resulta en la alteración de la homeostasis celular ante lo cual las plantas producen mecanismos de respuesta específicos (Fig. 3; Bitá et al. 2013).

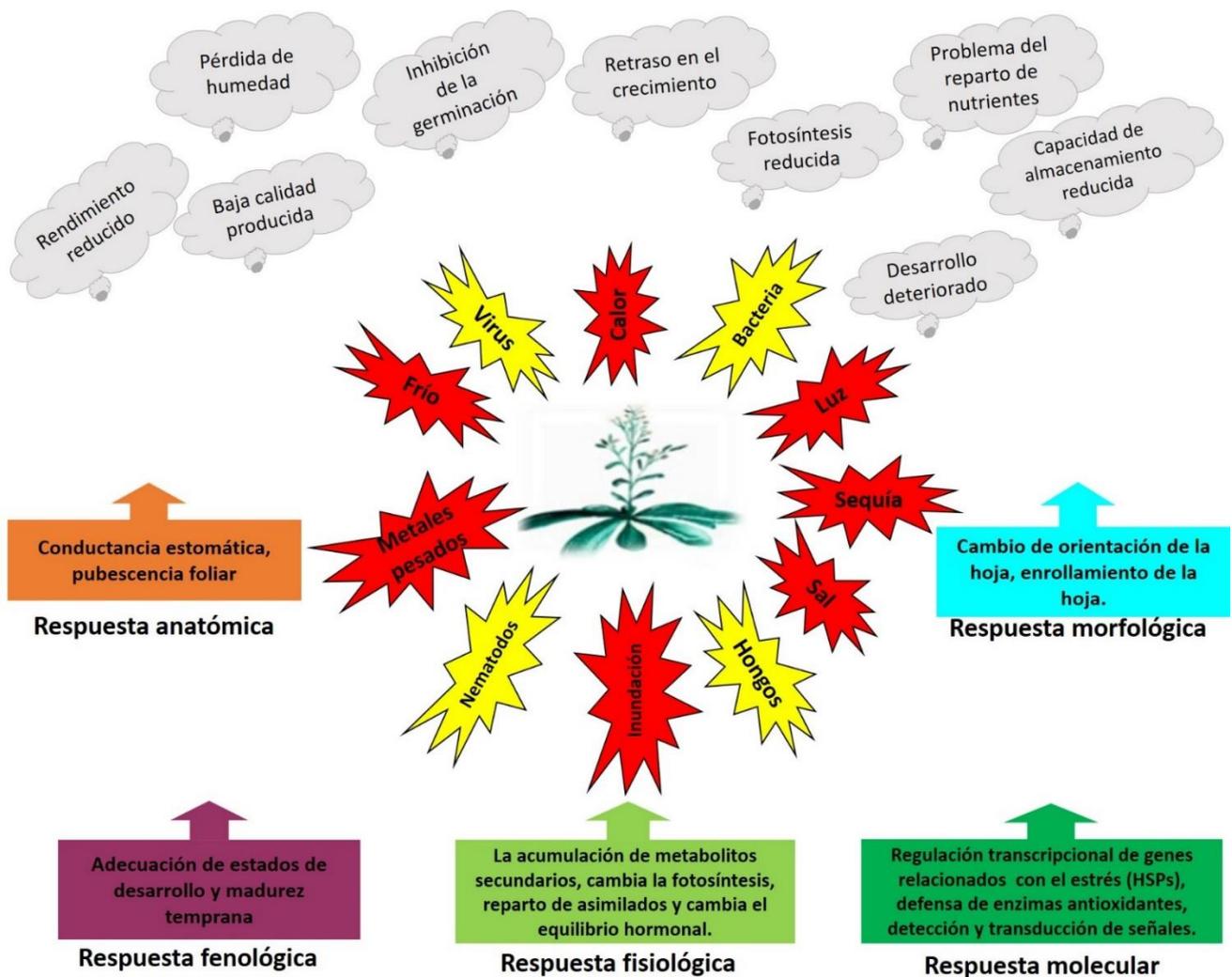
El estrés biótico es una condición adversa en la que la planta no puede mantener su crecimiento normal debido a la interacción con hongos, bacterias, virus, nematodos e insectos, entre otros. Estos microorganismos crecen principalmente sobre o dentro de los tejidos de las plantas y pueden causar clorosis, atrofia, pudrición o formación de lesiones locales (Swapnil et al. 2021). Las plantas enfrentan muchos estresores bióticos (patógenos y herbívoros), que afectan en mayor medida la productividad de los cultivos. Uno de los cambios cruciales es la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), una alta concentración de EROs conduce al estrés oxidativo y provoca la peroxidación de lípidos, daño de la clorofila, el desequilibrio redox y la degradación de ácidos nucleicos y proteínas (Saurav et al. 2021). Asimismo, el estrés biótico provoca una gran pérdida de rendimiento ya que virus, hongos y bacterias infectan las hojas, lo que resulta en una disminución del nivel de fotosíntesis. De esta manera, las pérdidas debidas a enfermedades de las plantas no solo reducen la productividad de los cultivos, sino que representan un riesgo para la seguridad alimentaria (Swapnil et al. 2021).

El estrés abiótico se define como el impacto negativo de los factores no vivos sobre los organismos vivos en un ambiente específico y estos son condiciones ambientales extremas (Ul Haq et al. 2019).

La temperatura es una variable ambiental crítica que influye en el crecimiento y la supervivencia de las plantas. La temperatura por encima de un umbral óptimo conduce a un estrés que interrumpe la homeostasis celular de la planta, lo que retrasa aún más el crecimiento, el desarrollo y el metabolismo de las plantas. Las bajas temperaturas afectan a las plantas causando tres tipos de daños: desecación, daño por frío y daño por congelación. La congelación en las plantas puede ser inducida, ya sea por la liberación en el agua del suelo o por la congelación del agua dentro de las células o a nivel intracelular. El frío (ausencia de calor) puede provocar cambios en la estructura y composición de la membrana, reducción del

flujo de protoplastos, aumento/disminución de la respiración, reducción de la fotosíntesis, producción de metabolitos anormales, reducción del crecimiento de las plantas, enrollamiento de las hojas, necrosis, muerte de los tallos y maduración anormal de los frutos (Baweja et al. 2020).

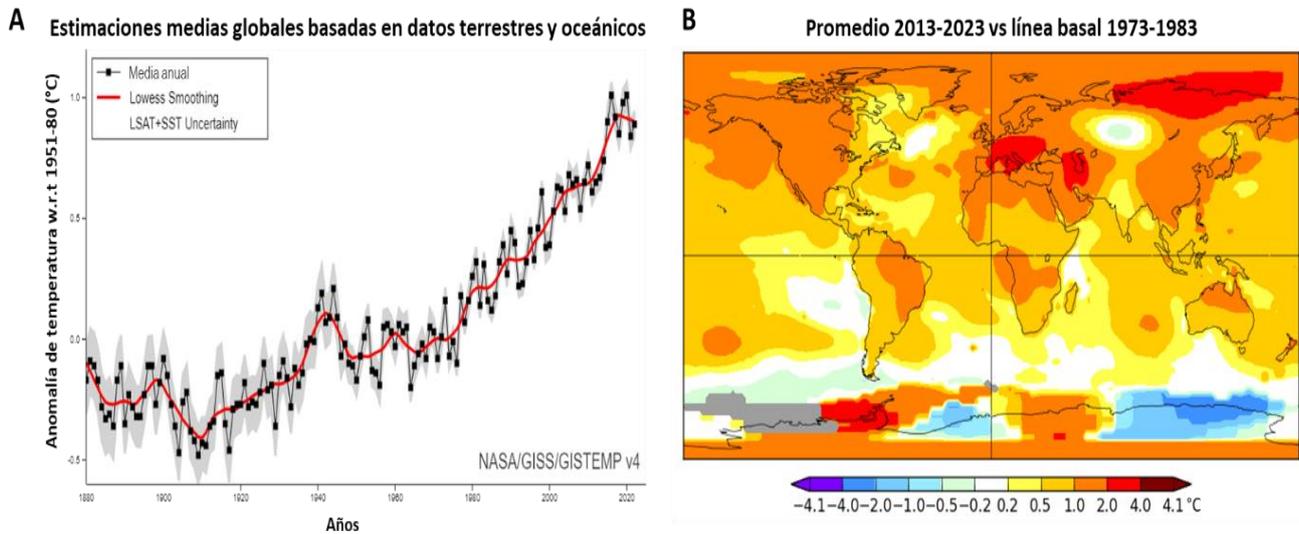
Por otro lado, las altas temperaturas o el estrés por calor dañan a las plantas provocando la reducción del crecimiento y desarrollo, quemaduras de hojas y frutos, costras solares, abrasiones, etc. A nivel celular y molecular, las altas temperaturas afectan la estabilidad de varias proteínas, lo que impide o altera muchas actividades enzimáticas que conducen a trastornos metabólicos, cambios en la estructura de la membrana y el citoesqueleto y alteración del nivel y tipo de RNA. Al mismo tiempo, hay acumulación de Proteínas de Choque de Calor (HSP), cada vez que la temperatura se eleva más allá de los límites del umbral (Baweja et al. 2020).



**Fig. 3.** Mecanismos de respuesta de las plantas a estreses bióticos y abióticos. Se presentan los diferentes factores bióticos y abióticos que pueden afectar a una planta y que producen alteraciones, algunas de las cuales son parte de respuestas de defensa. Tomado de Ul Haq et al. (2019).

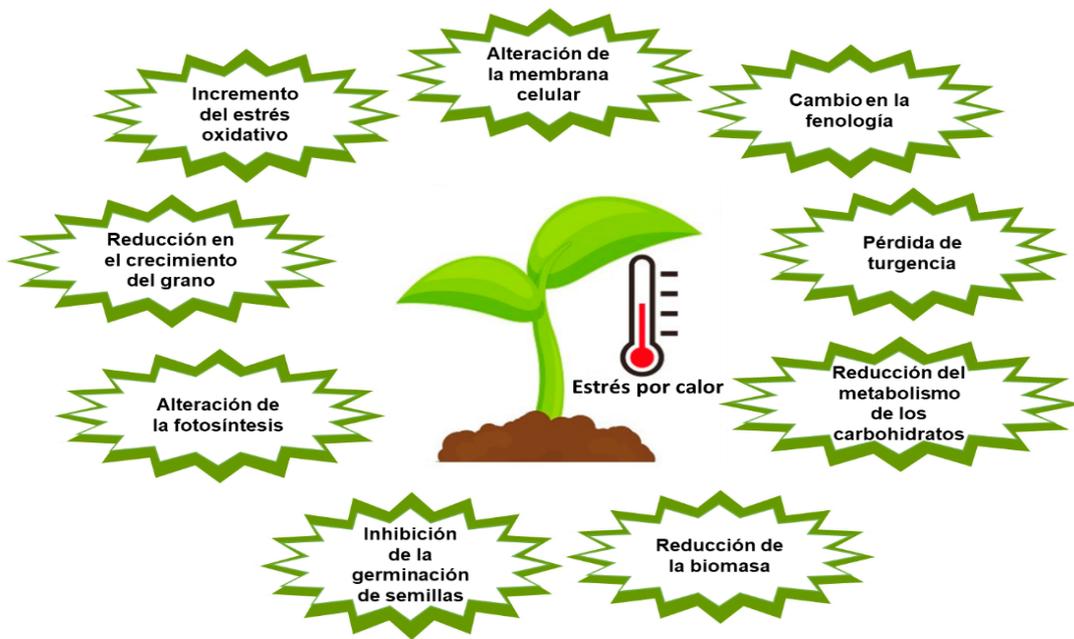
### 2.3. Las altas temperaturas y sus efectos en las plantas

Debido al cambio climático, el área de los desiertos está aumentando, mientras que las olas de calor y los incendios forestales se están generalizando. El calentamiento global y los periodos de temperaturas extremas (Fig. 4) podrían tener una influencia negativa considerable en la productividad de cultivos (Raza et al. 2022). Se prevé que la temperatura del aire mundial aumente 0.2 °C por década, lo que dará lugar a temperaturas entre 1.8 y 4.0 °C más altas que el nivel actual para 2100 (Hasanuzzaman et al. 2013).



**Fig. 4.** Aumento de la temperatura desde 1800 a la fecha. A. Cambio de la temperatura media anual global del aire en la superficie. Índice de temperatura tierra-océano, con período base 1951-1980. La línea negra continua es la media anual mundial y la línea roja continua es el mínimo uniforme de cinco años. El sombreado gris representa la incertidumbre anual total (LSAT y SST) con un intervalo de confianza del 95 %. B. Análisis de temperatura superficial, temperaturas promedio del aire en la superficie de 2013 a 2023 en comparación con el promedio de 1973 a 1983. Fuente: NASA (<https://data.giss.nasa.gov/gistemp/>, consultado el 17 de julio de 2023).

En particular, las plantas como organismos sésiles, no pueden trasladarse a ambientes más favorables y se ven afectadas cuando hay un estrés por calor. Algunos daños del estrés por calor (Fig. 5) incluyen la alteración de la membrana y la fotosíntesis, reducción del metabolismo de carbohidratos, del grano y la biomasa, entre otros. Además, quemaduras en hojas, ramas y tallos, senescencia y abscisión de hojas, inhibición del crecimiento de brotes y raíces. Al mismo tiempo, las altas temperaturas provocan la pérdida del contenido de agua de las células, por lo que se reduce su tamaño y, en última instancia, el crecimiento (Hasanuzzaman et al. 2013). Los cambios en el crecimiento de las plantas se ven reflejados en el enrollamiento de las hojas, así como en la reducción de la germinación de las semillas, la decoloración de los frutos y la viabilidad del polen (Paupière et al. 2014). A continuación, se detallan algunos daños por calor.



**Fig. 5.** Algunos de los efectos provocados por el estrés por calor en las plantas. Tomado de dos Santos et al. (2022).

La reproducción de las plantas es el proceso más sensible a la temperatura dentro de su ciclo de vida. Más precisamente, las altas temperaturas conducen a una disminución de la viabilidad del polen, lo que está directamente relacionado con una pérdida de producción de frutos. La disminución de la viabilidad del polen está asociada con cambios en el nivel y la composición de metabolitos que juegan un papel importante en el desarrollo del polen (Paupière et al. 2014). Durante la reproducción, un breve período de estrés por calor (una ola de calor) puede causar una disminución significativa de los botones florales y el aborto de las flores y como resultado no se producen frutos o semillas (Hasanuzzaman et al. 2013). Igualmente, las altas temperaturas alteran la permeabilidad de la membrana aumentando su fluidez. Esto conduce a un aumento de la pérdida de electrolitos, lo que es una indicación de la disminución de la estabilidad de la membrana celular (Paupière et al. 2014).

Las altas temperaturas pueden conducir a una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes. Esto disminuirá la capacidad de la planta para protegerse contra las especies reactivas de oxígeno y en consecuencia conduce a la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Paupière et al. 2014). Al igual que otros tipos de estrés abióticos, el estrés por calor podría desacoplar las enzimas y las rutas metabólicas que provocan la acumulación de EROs, más comúnmente el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) (Hasanuzzaman et al. 2013). El radical hidroxilo puede reaccionar potencialmente con todas las biomoléculas, como pigmentos, proteínas, lípidos, DNA, y casi con todos los constituyentes de las células. El oxígeno singulete puede

oxidar directamente proteínas, ácidos grasos poliinsaturados y DNA. En casos extremos, la acumulación de EROs en las células puede desencadenar la muerte celular programada (Hasanuzzaman et al. 2013).

Las hojas funcionan como un órgano altamente especializado que se encarga del proceso fotosintético en las plantas superiores. En el cloroplasto, el metabolismo del carbono del estroma y las reacciones fotoquímicas en las laminillas de los tilacoides se consideran los principales sitios de lesión por el estrés por calor. Además, la organización estructural de los tilacoides se ve alterada, hay una pérdida del apilamiento e hinchamiento de los grana bajo estrés por calor. El fotosistema II (PSII) es el objetivo más susceptible por altas temperaturas dentro de los complejos de proteínas membranales de los tilacoides del cloroplasto. Los daños severos al PSII afectan la transferencia de electrones en la cadena de transporte y la síntesis de ATP (Wang et al. 2018).

El ciclo de Calvin-Benson es responsable de la fijación de CO<sub>2</sub> en carbohidratos, así como la asimilación, el transporte y la utilización de fotoasimilados como productos orgánicos de la fotosíntesis. La interrupción del transporte de electrones y la inactivación de las enzimas que generan oxígeno del PSII inhiben drásticamente la tasa de regeneración de ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP). La inhibición inducida por el estrés por calor en la actividad de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) resulta principalmente de la inactivación de la rubisco activasa que es extremadamente sensible al estrés por calor (Wang et al. 2018). Los centros de reacción de PSI y PSII en los cloroplastos son los principales sitios de generación de EROs, aunque las EROs también se generan en otros orgánulos, como los peroxisomas y mitocondrias. Se ha sugerido que, debido al daño térmico de los fotosistemas por altas temperaturas, se produce una menor absorción de fotones (Hasanuzzaman et al. 2013). Además, la alteración de la actividad de fotosíntesis a altas temperaturas puede conducir a una disminución de la abundancia de azúcares (Paupière et al. 2014).

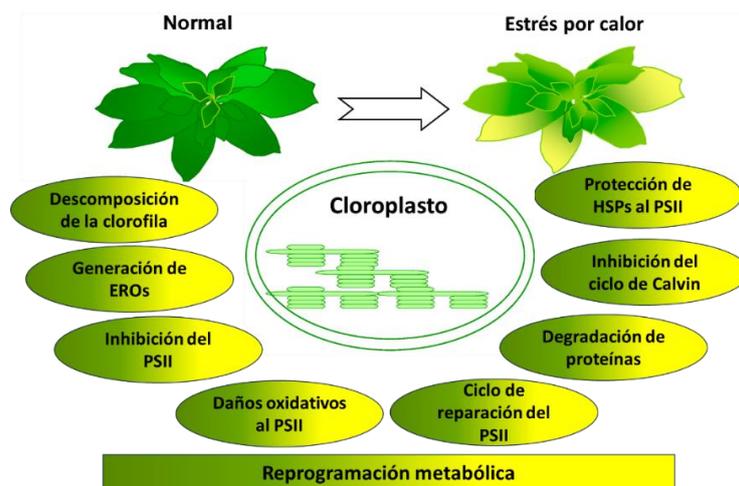
A nivel molecular, el estrés por calor provoca alteraciones en la expresión de genes implicados en la protección directa contra el estrés por calor. Estos incluyen genes responsables de la expresión de osmoprotectores, enzimas desintoxicantes, transportadores y proteínas reguladoras. El estrés por calor afecta diferencialmente la estabilidad de varias proteínas, membranas, tipos de RNA y estructuras del citoesqueleto y altera la eficiencia de las reacciones enzimáticas en la célula (Hasanuzzaman et al. 2013). Asimismo, el estrés oxidativo también conduce a las modificaciones de histonas que regulan la expresión génica (dos Santos et al. 2022).

### **2.3.1. Mecanismos de respuestas a altas temperaturas, tolerancia y resistencia en las plantas.**

La respuesta de las plantas a temperaturas elevadas es un proceso complejo que implica una serie de adaptaciones fisiológicas y morfológicas para sobrevivir y mantener su funcionamiento adecuado. Algunas de las respuestas implican el cambio de la orientación de la hoja, el aumento en la transpiración, el cierre estomático, el aumento en la producción de antioxidantes, cambios en la composición de lípidos de la membrana y los cambios en el metabolismo. Asimismo, las plantas tienen la capacidad de responder al estrés por calor induciendo o activando mecanismos de protección, para asegurar su supervivencia. Entre ellos, los mecanismos generales de tolerancia al estrés involucran la producción de proteínas de estrés, los osmoprotectores, los captadores de radicales libres, los transportadores de iones y los factores involucrados en las cascadas de señalización, así como elementos de control transcripcional; todos ellos son esenciales para contrarrestar los efectos del estrés (Bita et al. 2013).

Por ejemplo, la elevación de la temperatura estimula las vías biosintéticas de hormonas como auxinas, ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides (BR), citocinina (CK), jasmonato (JA) y etileno (ET), lo que resulta en su acumulación en las células vegetales como una manera de tolerar el estrés por calor (dos Santos et al. 2022). Las enzimas captadoras de EROs como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) desempeñan un papel en la desintoxicación del exceso de EROs producidos por las células en condiciones de estrés (dos Santos et al. 2022). Las plantas pueden producir diferentes osmolitos y antioxidantes, como la prolina y el ácido aminobutírico, para protegerse del estrés por calor. Los carotenoides, el glutatión y el ascorbato pueden actuar como eliminadores de especies reactivas de oxígeno para prevenir el estrés oxidativo (Paupière et al. 2014).

Las altas temperaturas pueden activar una red de transducción de señales específica que involucra flujos de calcio, calmodulina, proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPK), proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), fosfatasa y reguladores transcripcionales (dos Santos et al. 2022). Los genes que responden al estrés por calor están regulados por una serie de factores de transcripción, incluidos los factores de transcripción de estrés por calor (HSF), NAC, MYB, WRKY, RAV, bZIP, AP2/ERF y ZAT, que regulan la expresión de los genes que responden al estrés. La transcripción se activa uniendo los elementos cis (ARE, CORE, W-box, GCC box, as-1 like) en los promotores de dichos genes inducibles por estrés (dos Santos et al. 2022).



**Fig. 6.** Reprogramación metabólica en cloroplastos bajo estrés por calor. Tomado de Wang et al. 2018.

Asimismo, las plantas alteran su metabolismo de varias maneras en respuesta a un estrés por calor, particularmente mediante la producción de solutos que son capaces de organizar proteínas y estructuras celulares, mantener la turgencia celular mediante el ajuste osmótico y modificar el sistema antioxidante para restablecer el equilibrio redox celular y la homeostasis (Hasanuzzaman et al. 2013). En el cloroplasto se produce una reprogramación metabólica en respuesta al estrés por calor (Fig. 6), que incluye la descomposición de la clorofila, la generación de EROs, defensa antioxidante, recambio de proteínas y alteraciones metabólicas en la asimilación del carbono. Se requiere una reprogramación metabólica en los cloroplastos para la aclimatación adquirida al estrés por calor en las plantas (Wang et al. 2018).

Además, de los factores de transcripción, los RNA pequeños regulan los genes que responden al estrés por calor. Las plantas también responden haciendo algunas modificaciones postranscripcionales sofisticadas que les ayudan a hacer frente a los estreses. Algunas de estas son el splicing alternativo y la expresión de microRNA (miRNA). El splicing alternativo genera diferentes variantes de transcrito a partir de un solo gen, ayudando a las plantas a mitigar el estrés abiótico. El miRNA, se une al mRNA para reprimir su traducción o la escisión directa del mRNA (UI Haq et al. 2019).

Uno de los medios más conocidos para responder al daño potencial causado por las altas temperaturas es a través de la síntesis de proteínas de choque de calor (HSPs). La mayoría de los transcritos inducidos en respuesta a altas temperaturas codifican HSPs, estas proteínas están involucradas en la homeostasis de las proteínas para evitar el mal plegamiento de las proteínas, la agregación de proteínas o la degradación de proteínas. Están

estrechamente relacionados con la termotolerancia y juegan un papel crucial en la transducción de señales de estrés.

Tanto el frío como el calor pueden desencadenar respuestas celulares que afectan la progresión del ciclo celular. En respuesta al estrés térmico, se activan flujos de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cascadas de cinasas y la generación de ácido abscísico, lo que a su vez activa puntos de control del ciclo celular que retrasan la entrada en la mitosis. Bajo un estrés térmico ligero, las células en proliferación se detienen temporalmente en las fases G1/S o G2/M, dependiendo de la etapa en la que se aplicó el estrés. Esto se debe, en parte, a la reducción en la transcripción de genes relacionados con las ciclinas y la consecuente disminución de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK).

Por otro lado, las altas temperaturas pueden inducir una cascada de señalización que conduce a la muerte celular programada. En general, las plantas se adaptan a las temperaturas extremas regulando la expresión de diferentes componentes de la maquinaria del ciclo celular. Se ha observado que las plantas tienen una mayor cantidad de ciclinas en comparación con otros eucariotas, lo que sugiere que las ciclinas pueden desempeñar un papel importante en la respuesta al estrés térmico (Qi et al. 2020).

### **2.3.2. Termomorfogénesis.**

La termomorfogénesis es la capacidad de las plantas para ajustar su morfología y desarrollo en respuesta a estímulos ambientales, específicamente a temperaturas elevadas. Es una respuesta de aclimatación morfológica a la elevación de la temperatura por debajo de los niveles de estrés térmico dañino (Delker et al. 2022). Entre los efectos tempranos de la termomorfogénesis se encuentra la elongación del hipocótilo en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a altas temperaturas. Este alargamiento mueve los tejidos meristemáticos y fotosintéticamente activos lejos del suelo que absorbe calor y facilita la refrigeración al permitir un mejor acceso al aire en movimiento. Las hojas en roseta y los cotiledones también experimentan una marcada elongación del pecíolo cuando perciben altas temperaturas, lo que se conoce como crecimiento hiponástico. Se argumenta que esta elongación del pecíolo reduce el flujo de calor directo del sol y permite que una brisa refrescante alcance las hojas. En conjunto con la elongación del pecíolo, el crecimiento hiponástico resulta en una estructura de roseta abierta. Además, las plantas cultivadas a altas temperaturas desarrollan menos

estomas y hojas más pequeñas y delgadas, lo que también contribuye a la refrigeración al reducir el espesor de la capa límite, estimulando la disipación de calor por evaporación y convección (Quint et al. 2016). El calor puede inhibir el crecimiento de las plantas y, en ciertas condiciones, la termomorfogénesis es una respuesta adaptativa que les permite crecer y desarrollarse de manera más efectiva en temperaturas elevadas.

### **2.3.3. Aclimatación al estrés por altas temperaturas**

La tolerancia al calor se define como la capacidad de la planta para crecer y producir un rendimiento económico bajo altas temperaturas o también puede definirse como la capacidad de una célula u organismo para sobrevivir a un estrés por calor normalmente letal. Usualmente se divide en termotolerancia adquirida y termotolerancia basal. La termotolerancia basal se refiere a la capacidad de las plantas para sobrevivir a temperaturas por encima de la temperatura óptima de crecimiento sin necesidad de un proceso previo de adaptación. Es decir, es una capacidad inherente de la planta. Por otro lado, la termotolerancia adquirida se refiere a la capacidad de las plantas para adquirir tolerancia a temperaturas letales a través de un proceso previo de adaptación. Aunque tiene un porcentaje de supervivencia mayor que la termotolerancia basal, es un proceso más lento (Norris et al. 2000).

### **2.3.4. Proteínas de choque de calor.**

Las plantas, debido a su naturaleza sésil, han desarrollado diferentes estrategias que contribuyen a conferir tolerancia al estrés biótico o abiótico. El estrés por calor afecta principalmente la función de las proteínas por el mal plegamiento de sus cadenas peptídicas lineales que conducen a interacciones desfavorables y agregaciones de proteínas nacientes. En situaciones de estrés, no solo los polipéptidos nacientes se enfrentan a un plegamiento propenso a errores, sino que también una gran parte de las proteínas plegadas se desnaturaliza parcial o completamente y vuelve a entrar en la maquinaria de control de calidad de la proteína asistida por chaperonas moleculares (Reddy et al. 2016).

Algunos organismos han desarrollado biomoléculas llamadas chaperonas que permiten mantener la calidad de las proteínas en las células. Aumentar el nivel de chaperonas moleculares preexistentes y expresar chaperonas adicionales a través del mecanismo de señalización asegura este mecanismo de protección. Las proteínas de choque de calor (HSPs) de las plantas desempeñan un papel esencial, porque son una clase de chaperonas moleculares que aseguran la preservación de las funciones celulares en condiciones de

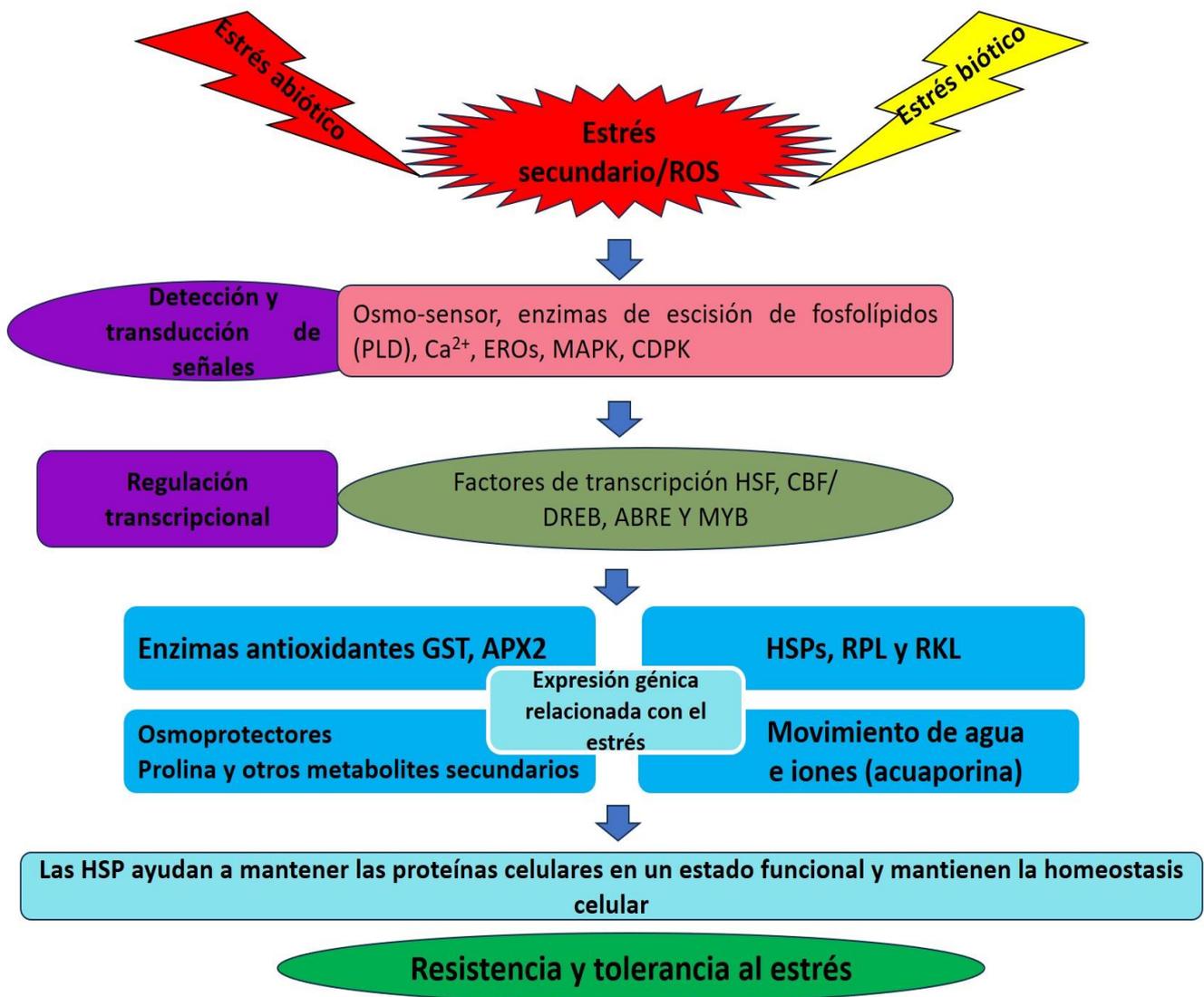
estrés. Existen muchas proteínas en una célula que no se plegarían correctamente sin la ayuda de chaperonas moleculares (Reddy et al. 2016).

Estas proteínas se encuentran en organismos procariotas y eucariotas, se descubrieron por primera vez en respuesta a un aumento de la temperatura, por esta razón se les asignó el término "proteínas de choque de calor", pero ahora se ha establecido que estas biomoléculas se producen en respuesta a diversos estreses bióticos y abióticos.

Las características de las HSP de las plantas son el dominio de unión nuclear-I, -II y un dominio medio que está precedido por una región N-terminal seguido por una extensión C-terminal. Su principal característica es que se sintetizan o activan muy rápidamente ante un aumento de temperatura. Algunas HSP responden a la duración y a la temperatura del estrés, otras HSP muestran una respuesta específica de tejido a situaciones de estrés. La acción de algunas HSP se desencadena en diferentes etapas de desarrollo y también los genes que codifican diferentes HSP se encuentran en diferentes compartimentos celulares (Ul-Haq et al. 2019).

#### **2.4. Sistema de transducción de señales al estrés**

Las formas de estrés biótico o abiótico generan insultos físicos o químicos que afectan a las plantas en diferente magnitud y en diferentes formas. Estos originan uno o varias señales o estímulos a los que responden las plantas con una transducción de la señal. La percepción de la señal, misma que se lleva a cabo por receptores, luego es convertida por elementos transductores entre los que están segundos mensajeros mismos que pueden ser lípidos, calcio, EROs y que son generados por enzimas específicas que o bien los producen o los movilizan. Entre los transductores también están muchos tipos de cinasas y fosfatasa que producen proteínas fosforiladas y con ello su activación o desactivación, respectivamente. Estos sistemas de transducción llevan a la activación de factores de transcripción que son proteínas que se van a unir a genes específicos para activar su lectura, de tal manera que los mRNA generados van a producir proteínas antioxidantes, HSPs, RKLs, osmoprotectores, prolina, metabolitos secundarios, etc (Fig. 7).



**Fig. 7.** Procesos de respuesta generados por estreses bióticos y abióticos que conducen a la resistencia y tolerancia al estrés y en los que participan las HSPs. ABRE (elemento sensible al ácido abscísico), APX2 (ascorbato peroxidasa 2), CBF (factor de unión de repetición C), CDPK (proteína cinasa dependiente de calcio), DREB (proteína de unión al elemento de respuesta a deshidratación), GST (glutación-s-transferasa), HSF (factor de choque de calor), HSP (proteína de choque de calor), MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno), MYB (mieloblastosis), PLD (fosfolipasa D), RLK (cinasas similares a receptores), RLP (proteínas similares a receptores), EROs (especies reactivas de oxígeno). Tomado y modificado de Ul-Haq et al. (2019).

Las respuestas que perciben las plantas están mediadas por moléculas tanto proteicas como no proteicas, lo que les otorga características selectivas como especificidad y tasa de formación. En particular, se destacan las MAPK, las bases de cadena larga, el ácido fosfatídico y las especies reactivas de oxígeno como mediadores que pueden responder al estrés biótico y abiótico. Estos pueden provenir de diferentes fuentes, ubicaciones celulares, momentos o magnitudes, lo que explica las diversas respuestas en las plantas (Saucedo et al. 2021).

## 2.5. MAP cinasas

En los eucariotas, la activación de las cascadas de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), participan en la transducción de distintos tipos de señales mediante la fosforilación de diversos sustratos como las enzimas, componentes estructurales, factores transcripcionales e incluso otras cinasas. Además, son un mecanismo general a través del cual los estímulos externos, incluidos los estreses bióticos y abióticos, se traducen en respuestas celulares (Zhenbin et al. 2015).

Las MAPK operan mediante módulos de señalización conformados por miembros de tres familias de proteínas diferentes, denominadas MAPK, MEK o MAPKK (MAP cinasa cinasa) y MEKK o MAPKKK (MAP cinasa cinasa cinasa), que se activan de manera secuencial por la fosforilación de residuos de aminoácidos localizados en el llamado dominio de activación. Las señales se transmiten principalmente por diferentes componentes celulares hasta llegar al núcleo, a través de una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones de diversas proteínas. La fosforilación de proteínas consiste en la adición de un grupo fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) desde el ATP a uno o varios residuos, comúnmente de serina, treonina o tirosina, de una proteína blanco (González et al. 2021).

La cascada de señalización inicia cuando las proteínas MEKK activadas fosforilan un par de residuos de serina (S) y treonina (T) en el dominio de activación con la secuencia canónica S/T-X3-5-S/T presente en las proteínas MEK. Posteriormente, estas MEK activan a las MAPK mediante la fosforilación de residuos de treonina (T) y tirosina (Y) en el dominio de activación canónico (T-X-Y). Una vez activadas, los sustratos de las MAPK incluyen proteínas citoplásmicas y proteínas transmembranales, pero también se pueden translocar al núcleo, para fosforilar factores de transcripción y/o otros componentes de la maquinaria transcripcional, para afectar la expresión de diferentes genes (González et al. 2021). Asimismo, las MAPK también pueden fosforilar a MEK, MEKK y otras cinasas de proteínas, creando un circuito de regulación que controla los incrementos o atenuaciones de la inducción de las mismas a las cascadas de MAPK (González et al. 2021). En general en las plantas, la cantidad de genes que codifican para los miembros de la familia MEK es mucho menor que la de los miembros que forman parte de las familias MAPK y MEKK, lo que implica promiscuidad y redundancia en la actividad de este tipo de enzimas (González et al. 2021).

Las vías de MAPK se estudian ampliamente y se caracterizan funcionalmente en *Arabidopsis thaliana*, una planta modelo bien establecida para estudios moleculares y genéticos. El

genoma de Arabidopsis codifica para 20 MAPK (MAP cinasas), 10 MAPKK (MAP cinasas cinasas) y 80 MAPKKK (MAP cinasas cinasas cinasas), la mayoría de los cuales aún no están funcionalmente caracterizadas (Kumar et al. 2020). La cascada MAPK de Arabidopsis está involucrada en la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico (Tabla 1). Sin embargo, las MAPK de Arabidopsis mejor caracterizadas son MPK3, MPK4 y MPK6. MPK3 y MPK6 están implicadas en el control de varias respuestas al estrés, en la regulación de algunos programas de desarrollo. Mientras que MPK4, es reconocida por participar en la respuesta a patógenos y en varios mecanismos de defensa (González et al. 2021).

**Tabla 1.** Lista de genes de la cascada MAPK de Arabidopsis involucrados en la respuesta al estrés abiótico determinada por análisis funcional con referencias

S. no	Cascada de genes MAPK	Respuesta al estrés abiótico	Referencias
<b>Genes MEKK</b>			
1	MEKK1	Sal	Teige et al. (2004)
		Frio	Zhao et al. (2017), Furuya et al.(2013)
		Cd	Suzuki et al. (2001)
2	MEKK18	Sequía	Li et al. (2017)
3	MEKK20	Sal	Kim et al. (2012)
4	Raf 43	Sal, sequía	Virk et al. (2015)
<b>Genes MKK</b>			
1	MKK1	Sal	Mizoguchi et al. (1998), Conroy et al. (2013)
		Sequia	Matsuoka et al. (2002)
		Estrés oxidativo	Xing et al. (2008)
2	MKK2	Sal	Teige et al. (2004)
		Frio	Zhao et al. (2017), Furuya et al. (2013), Teige et al. (2004)
3	MKK3	Sal	Verma et al. (2020)
		Oxidativo	Takahashi et al. (2011)
		Respuesta a la luz azul	Sethi et al. (2014)
4	MKK4	Sal, sequía	Kim et al. (2011)
5	MKK7	Sal	Shen et al. (2019)
6	MKK9	Sal	Shen et al. (2019), Xu et al. (2008), Liu et al. (2020)
<b>Genes MAPK</b>			
1	MPK1	Estrés oxidativo	Ortiz-Masia et al. (2007)
2	MPK2	Estrés oxidativo	Ortiz-Masia et al. (2007)

<b>3</b>	MPK3	Sal	Droillard et al. (2002), Xu et al. (2008), Zhou et al. (2017)
		Calor	Andra'si et al. (2019)
		Frio	Ding et al. (2019)
		Estrés oxidativo	Liu and He (2017)
		Cd	Liu et al. (2010)
<b>4</b>	MPK4	Sal	Droillard et al. (2002), Ichimura et al. (2000), Teige et al. (2004)
		Sequía	Matsuoka et al. (2002)
		Calor	Andra'si et al. (2019)
		Frio	Zhao et al. (2017)
		Estrés oxidativo	Nakagami et al. (2006)
<b>5</b>	MPK6	Sal	Droillard et al. (2002), Ichimura et al. (2000), Teige et al. (2004), Yu et al. (2010), Shen et al. (2014,2019), Zhou et al. (2017), Verma et al. (2020)
		Sequía	Xu and Chua (2012)
		Calor	Evrard et al. (2013), Li et al. (2012), Andra'si et al. (2019)
		Frio	Ding et al. (2019)
		Estrés oxidativo	Liu and He (2017), Xing et al. (2008)
		Cd	Ye et al. (2013), Jin et al. (2013)
		Respuesta a la luz azul	Sethi et al. (2014)
<b>6</b>	MPK7	Estrés oxidativo	Doczi et al. (2007)
<b>7</b>	MPK9	Sal	Nagy et al. (2015)
		Estrés oxidativo	Jammes et al. (2009)
<b>8</b>	MPK12	Estrés oxidativo	Jammes et al. (2009)

Asimismo, Alejandro Franco Mendieta en un Trabajo Monográfico de Actualización (Franco-Mendieta, 2018) encontró que las cascadas de MAP cinasas son cruciales para el crecimiento de las estructuras de una planta, así como para montar una defensa eficaz contra el estrés externo. Se ha descubierto que las MAP cinasas participan en la respuesta a cambios extremos de temperatura según la información actualmente disponible, lo que sugiere que desempeñan un papel en la ejecución de los ajustes necesarios para su adaptación a estas condiciones.

### 2.5.1. Función de las MAP cinasas, MPK3 y MPK6 en la respuesta a las altas temperaturas

Se anticipa que el cambio climático elevará las temperaturas promedio, esto tendrá implicaciones significativas en la necesidad del conocimiento sobre la percepción, procesamiento y respuesta de las plantas a las altas temperaturas (Sinha et al. 2011).

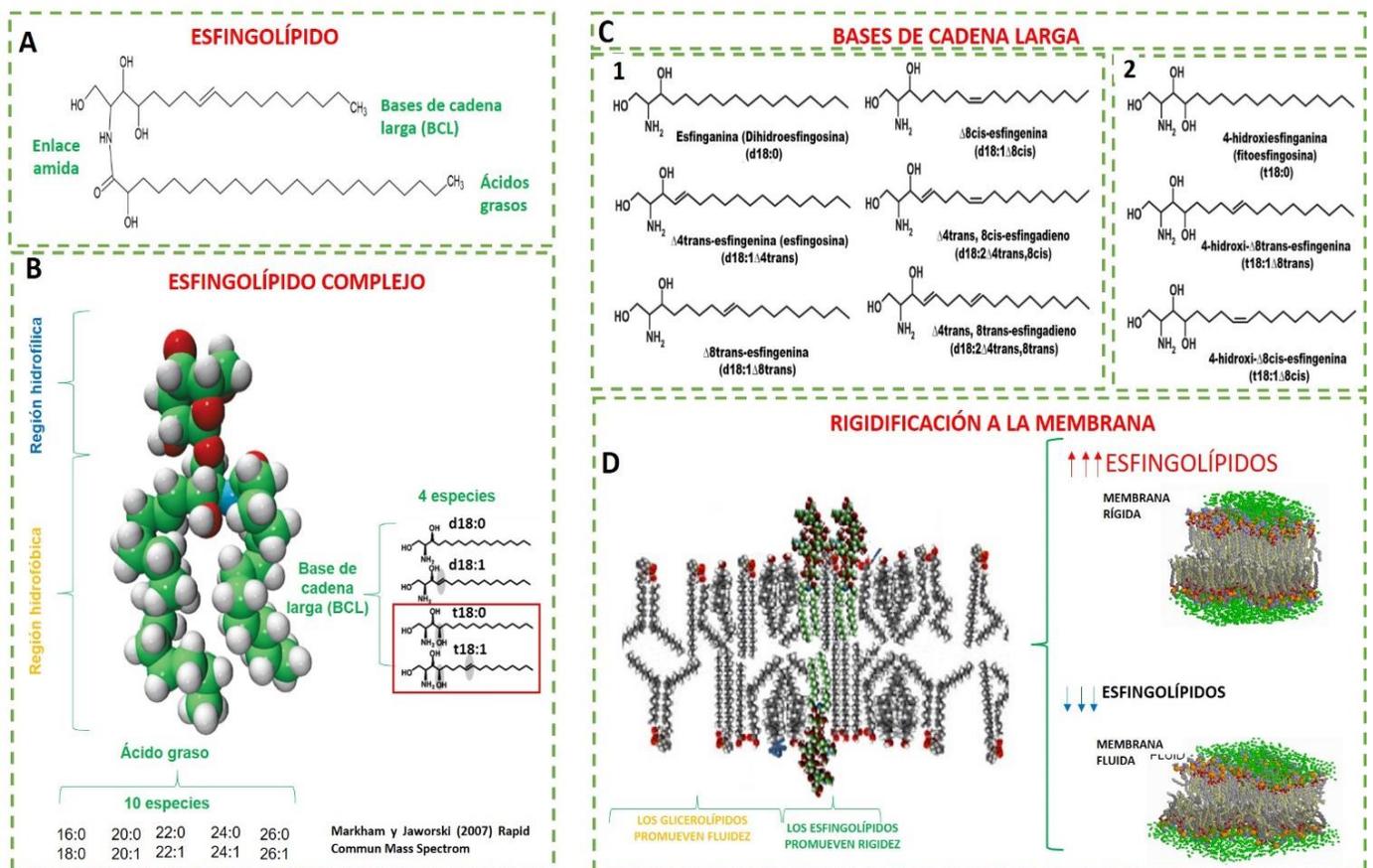
MPK3 (Proteína cinasa activada por mitógenos 3) es una proteína cinasa activada por mitógenos que se encuentra en las plantas, específicamente en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. MPK3 está involucrada en la transducción de señales durante el desarrollo de las plantas y se ha identificado como un regulador clave en la germinación, la configuración de la arquitectura de la raíz, la formación de estomas, la floración y la senescencia. Asimismo, MPK6 está involucrada en la transducción de señales durante el desarrollo de las plantas y se ha identificado como un regulador clave en la formación de semillas y en la configuración de la arquitectura de la raíz (López et al. 2014).

En *Arabidopsis*, el estrés por calor activa MPK6, que activa al factor de transcripción del estrés por calor HSF2. HSFA2 se fosforila en el residuo de aminoácido T249, que controla su acumulación nuclear bajo estrés por calor (Evrard et al. 2013). HSFA4A es otro HSF importante en *Arabidopsis* que reacciona a una variedad de estreses abióticos que causan el mal plegamiento de proteínas. Las proteínas MPK3, MPK4 y MPK6 de *Arabidopsis* pueden fosforilar HSFA4A en la Ser-309 ubicada entre dos dominios activadores, reportado como es el sitio preferencial para su fosforilación (Kumar et al. 2020). Se reportó que la fosforilación por MPK3/6 aumenta la actividad de HSFA4a. Además, se demostró que la fosforilación de HSFA2 por MPK6 es necesaria para su localización nuclear, pero el mecanismo molecular que determina la localización subcelular de HSFA2 no se ha descifrado por completo (Jacob et al. 2017).

MPK3 y MPK6 están involucrados en la inmunidad de las plantas y pueden ser activados por estímulos similares. Se sabe que existe una redundancia funcional entre MPK3 y MPK6 en *Arabidopsis*, lo que significa que pueden realizar funciones similares o superpuestas en ciertas vías de señalización. Sin embargo, todavía se están estudiando sus funciones específicas en ciertas respuestas, como al estrés por calor.

## 2.6. Esfingolípidos

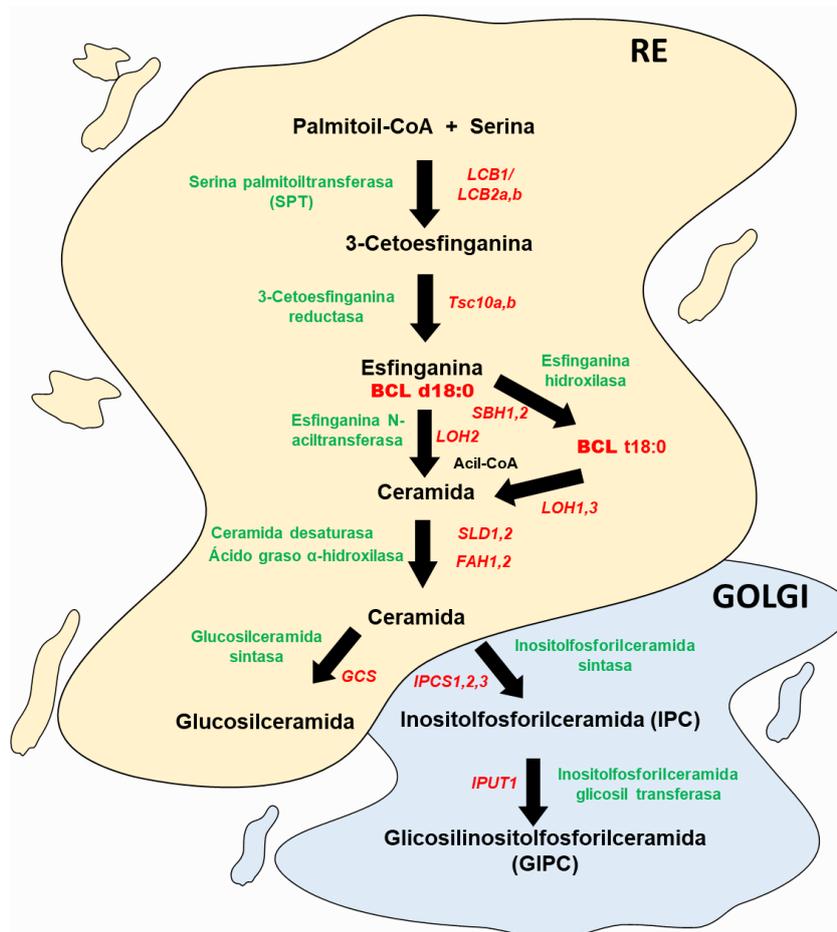
Los esfingolípidos son moléculas anfipáticas que contienen un grupo de cabeza polar y dos cadenas de acilo hidrofóbicas. La porción hidrófoba de los esfingolípidos está compuesta por un ácido graso unido mediante un enlace amida a una base de cadena larga (BCL) (Fig. 8A). En las plantas, las BCLs contienen 18 átomos de carbono y se caracterizan por la presencia de dos o tres grupos hidroxilo. Los dihidroxi LCB contienen grupos hidroxilo en las posiciones C-1 y C-3 (Fig. 8C1), mientras que los trihidroxi LCB contienen un grupo hidroxilo adicional en la posición C-4 (Fig. 8C2). Además, las BCLs se pueden modificar por dobles enlaces entre los átomos C-4 y C-5 y los átomos C-8 y C-9. El doble enlace  $\Delta 4$  ocurre exclusivamente en la configuración trans, mientras que el doble enlace  $\Delta 8$  puede ser cis o trans. Las membranas de las plantas contienen como lípidos muy abundantes a los esfingolípidos, que representan aproximadamente del 40-60% de las membranas plasmáticas (Markham et al. 2013). El ajuste de la composición membranal de los lípidos en general y de los esfingolípidos en particular, es esencial para regular la fluidez. Dadas las características tan ordenadas de su estructura, estos lípidos pueden rigidizar a la membrana (Fig. 8D), por lo que una disminución en esfingolípidos contribuye a fluidificar la membrana para protegerla del daño por congelación (Cano et al. 2021).



**Fig. 8.** Estructura de los esfingolípidos y bases de cadena larga (BCL) que se encuentran en las plantas y de su efecto en la propiedad de fluidez membranal.

Por otro lado, los ácidos grasos de los esfingolípidos vegetales varían típicamente en longitud de cadena de 16 a 26 átomos de carbono y están saturados o monoinsaturados con un doble enlace cis  $\omega$ 9. La cadena de ácido graso puede variar en longitud y grado de insaturación, lo que afecta las propiedades físicas y funcionales del esfingolípidio (Chen et al. 2009)

La porción hidrófila de los esfingolípidos consta de un grupo de cabeza polar que está unido al átomo C-1 del resto LCB de la ceramida. Estos incluyen residuos de carbohidratos como glucosa o galactosa que se encuentran en las glucosil- y galactosilceramidas o tan complicados como en los gangliósidos. Las dos clases principales de esfingolípidos complejos identificados en las plantas son las glucosilceramidas (Glc Cers) o glucocerebrósidos y las glicosilinositol fosfoceramidas (GIPC).



**Fig. 9.** Vía biosintética de esfingolípidos vegetales.

La síntesis de esfingolípidos en las plantas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (Fig. 9). El componente LCB de las ceramidas resulta de la condensación de serina y palmitoil-CoA para formar 3-cetoesfinganina, catalizada por la serina palmitoiltransferasa (SPT). SPT de

*Arabidopsis thaliana* consta de las subunidades LCB1 y LCB2. *Arabidopsis thaliana* LCB2 está codificado por dos genes denominados LCB2a y LCB2b que se expresan constitutivamente y codifican polipéptidos redundantes. Posteriormente, la enzima 3-cetoesfingianina reductasa reduce la 3-cetoesfingianina, el producto de SPT, para formar esfingianina (d18:0), la LCB más simple que se encuentra en las plantas. La 3-cetoesfingianina reductasa está codificada por dos genes en *Arabidopsis thaliana* (Chen et al. 2009)

El paso final en el ensamblaje de las ceramidas es la condensación de una BCL con un ácido graso-CoA, una reacción catalizada por la ceramida sintasa, a veces denominada esfingianina N-aciltransferasa. Se han identificado tres genes para ceramida sintasas dependientes de acil-CoA en *Arabidopsis thaliana*. Para la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga, el componente de ácido graso de las ceramidas vegetales consta de ácidos grasos C16 y ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) con longitudes de cadena de hasta 26 átomos de carbono. Los componentes VLCFA de las ceramidas surgen del alargamiento de la cadena de acilo en incrementos de dos carbonos que involucran cuatro reacciones (Chen et al. 2009).

### **2.6.1 Funciones de los esfingolípidos**

Los esfingolípidos son elementos cruciales del sistema de endomembranas en eucariotas como las plantas. Se ha estimado que los esfingolípidos constituyen alrededor del 40 % de los lípidos en las membranas plasmáticas y también se concentran en los tonoplastos. Principalmente, son elementos estructurales importantes de las endomembranas. GlcCer ha sido identificado como el componente lipídico principal en varias membranas celulares, como la membrana plasmática, el tonoplasto y el aparato de Golgi. Los cambios en el contenido y la composición de los esfingolípidos pueden afectar las propiedades físicas de la membrana plasmática y el tonoplasto, que son cruciales para la adaptación osmótica y los flujos de iones en las plantas. Por lo tanto, estas alteraciones pueden influir en la capacidad de las plantas para responder a situaciones de estrés ambiental, como sequía, congelación, salinidad y contaminación por metales pesados. Se ha observado que la disminución del contenido de GlcCer en la membrana plasmática durante la aclimatación al frío mejora la tolerancia a la congelación en varias especies de plantas (Chen et al. 2009).

Los esfingolípidos forman micelas en ambientes acuosos y pueden asociarse en estructuras autoorganizadas complejas, como liposomas y bicapas, que son modelos de membranas biológicas. Los esfingolípidos tienen una alta temperatura de fusión y una conformación relativamente rígida en la membrana debido a sus cadenas alifáticas y grupos polares.

Tienden a juntarse con esteroides en regiones de membrana altamente empaquetadas y ordenadas llamadas "balsas lipídicas" o microdominios. Se ha identificado un gran número de proteínas en los microdominios de membrana, la interacción de los esfingolípidos con las proteínas de membrana puede influir en la actividad de estas proteínas y contribuir a su función biológica. Los microdominios de membrana también pueden ser sitios importantes para la entrada de patógenos y para la transducción de señales en respuesta a estímulos externos. Se cree que estos microdominios permiten una respuesta rápida y eficiente a demandas metabólicas o situaciones de estrés. Los BCL, en forma libre o fosforilada, también pueden actuar como mediadores en las vías de transducción de señales y podrían desempeñar un papel importante en los microdominios como reservorios de señalización de esfingolípidos (Chen et al. 2009).

Los esfingolípidos en las plantas tienen un papel en la señalización celular y la respuesta a estrés ambiental, se ha demostrado que los LCB (componentes estructurales de los esfingolípidos) median el cierre estomático en las células de las plantas, lo que ayuda a reducir la pérdida de agua durante la transpiración. Las BCL tienen un papel importante en la señalización celular que regula el cierre estomático en las células vegetales. Los esfingolípidos, especialmente la esfingosina-1-fosfato (S1P), y la BCL cinasa juegan un papel crucial en la señalización mediada por ABA que regula el cierre estomático en las células vegetales. Estos hallazgos proporcionan información importante sobre cómo las plantas responden y se adaptan a cambios ambientales y químicos para mantener la homeostasis y la eficiencia en la fotosíntesis (Chen et al. 2009).

Además, se han documentado funciones bioactivas de los esfingolípidos en la respuesta al estrés por sequía, la muerte celular programada y la patogénesis. La muerte celular programada es un proceso esencial en el desarrollo y respuestas al estrés de las plantas, y comparte características similares con la apoptosis en células animales. Se ha demostrado que los lípidos de cadena larga, como las ceramidas, actúan como mediadores potenciales de la muerte celular programada en células vegetales. Además, las plantas reconocen moléculas derivadas de microbios llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de interacciones con genes de resistencia, lo que inicia una respuesta de defensa para detener la colonización de patógenos. Se ha implicado a los lípidos, como el ácido jasmónico y los esfingolípidos, como posibles mediadores en la señalización de defensa de las plantas. Toxinas producidas por hongos patógenos necrotróficos, como la fumonisina B1, provocan un aumento en los niveles de lípidos de cadena larga libres y la muerte celular en plantas (Chen et al. 2009).

### **2.6.2. Función de los esfingolípidos en la respuesta a las altas temperaturas**

Cuando las plantas se enfrentan a altas temperaturas, experimentan cambios fisiológicos y bioquímicos para adaptarse y sobrevivir. En este contexto, los esfingolípidos pueden desempeñar un papel importante en la respuesta al estrés térmico. Los esfingolípidos pueden actuar como señales de transducción en la cascada de respuestas al estrés por calor en las plantas. En condiciones de estrés por calor, se ha observado que los niveles de ciertos esfingolípidos específicos, como la ceramida y la esfingosina-1-fosfato, pueden aumentar en las membranas celulares de las plantas. Estos cambios en la composición lipídica pueden desencadenar respuestas adaptativas, como la regulación de la expresión de genes relacionados con la tolerancia al calor y la síntesis de proteínas de choque de calor (chaperonas) que ayudan a proteger a la planta contra el daño celular inducido por el estrés térmico. Además, los esfingolípidos también pueden influir en la permeabilidad de las membranas celulares, lo que puede afectar la capacidad de la planta para mantener la integridad de las estructuras celulares y evitar la pérdida de agua durante condiciones de estrés por calor.

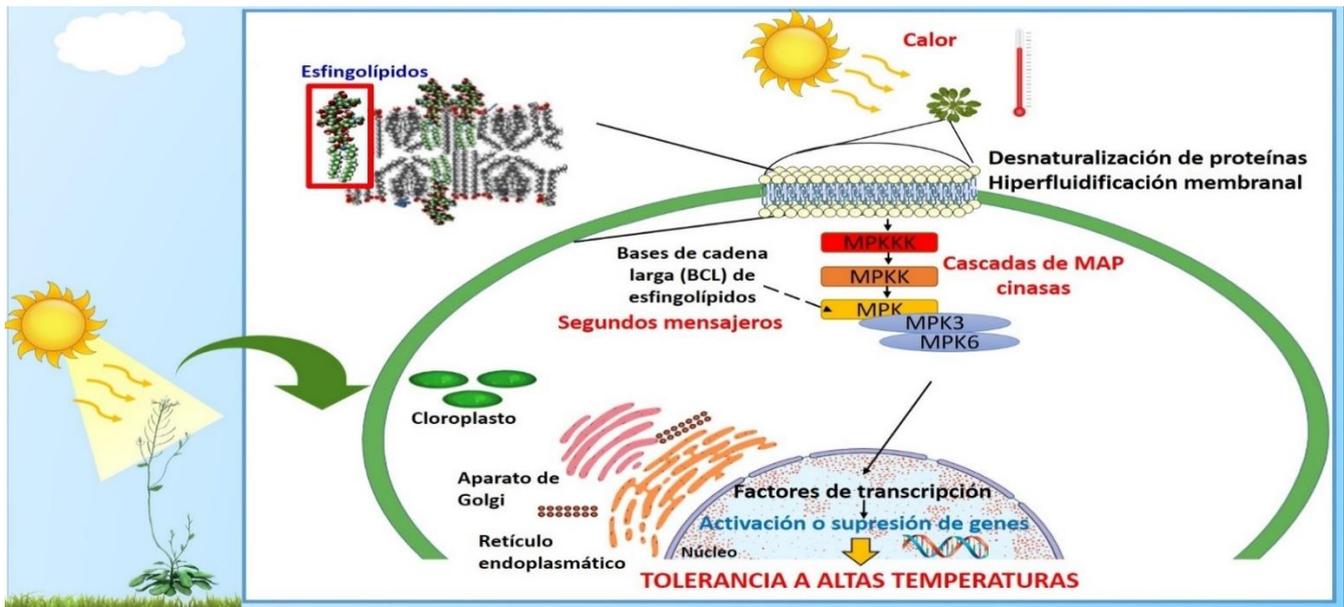
### 3. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de investigación se han estudiado líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que son mutantes en genes que codifican para enzimas de la vía de síntesis de esfingolípidos y en vías de señalización mediadas por MAP cinasas. Anteriormente, se ha trabajado con estas líneas en respuestas de aclimatación al frío (Zavafer et al. 2020) y en vías de respuesta a patógenos (Saucedo et al. 2021).

Trabajos pasados han demostrado que las MAP cinasas MPK3, MPK4 y MPK6 participan en la respuesta a frío. Se estableció que MPK6 es un regulador crítico en el proceso de aclimatación al frío que conduce a la tolerancia a la congelación. Asimismo, se encontró que MPK3 ejerce una regulación negativa de la actividad H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de plantas no aclimatadas al frío y la MPK6 en condiciones aclimatadas (Ponce et al. 2021). La línea mutante MPK6 sugirió que MPK6 puede estar involucrada en la regulación de la fluidez de la membrana plasmática. También Saucedo et al. 2021, resume el manejo de los esfingolípidos, su regulación y las conexiones con las vías de señalización moduladas por estas moléculas. Los esfingolípidos tienen funciones en la regulación de la sustitución celular, la diferenciación, la apoptosis y la señalización. Dos moléculas de señalización lipídica, el ácido fosfatídico (PA) y los esfingolípidos de cadena larga, desempeñan un papel relevante en esta respuesta. La generación de PA y LCB-P se activa por la acción de enzimas específicas, y se ha observado una retroalimentación positiva entre estas dos moléculas durante la señalización mediada por ABA. Además, las proteínas MAPK9 y MAPK12 han sido identificadas como importantes transductores de señal en el cierre de los estomas y se ha demostrado que están río abajo de la generación de EROs.

## 4. HIPÓTESIS

Los esfingolípidos, la MPK3 y MPK6 participan en la respuesta a las altas temperaturas (Fig. 10).



**Fig. 10.** Posibles papeles de los esfingolípidos, la MPK3, la MPK6 y la función de proteínas de choque de calor (HSP) en la vía de señalización en respuesta al estrés por alta temperatura. Se contempla la posibilidad de que estos componentes puedan afectar la función de factores de transcripción para la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta a calor. Lo anterior puede desembocar en la síntesis de biomoléculas protectoras y el aumento en la calidad de proteínas tanto existentes y recién sintetizadas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Determinar si el cambio en los niveles de esfingolípidos trihidroxilados, desaturados y la ausencia de MPK3 y MPK6 contribuye a las respuestas de *Arabidopsis thaliana* a altas temperaturas.

### 5.2. Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones para el crecimiento óptimo de las diferentes líneas mutantes (*sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*) de *Arabidopsis thaliana*.
- Afinar las condiciones de exposición de las plántulas en los tratamientos de aclimatación (37 °C), reto (45 °C), aclimatación más reto y el control (22 °C)
- Determinar los fenotipos de las plántulas producidos por los tratamientos térmicos.
  - A) Cuantificar las características fenotípicas de la plántula completa (longitud de la raíz primaria, raíces laterales, pelos radiculares, color de hojas y emergencia de nuevas hojas)
  - B) Describir los cambios en la ultraestructura de las células del mesófilo de las hojas

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Reactivos

Agar Bacto (Bacto™), Gamborg's B-5 Basal Medium with Minimal Organics (SIGMA®), hipoclorito de sodio (Cloralex®).

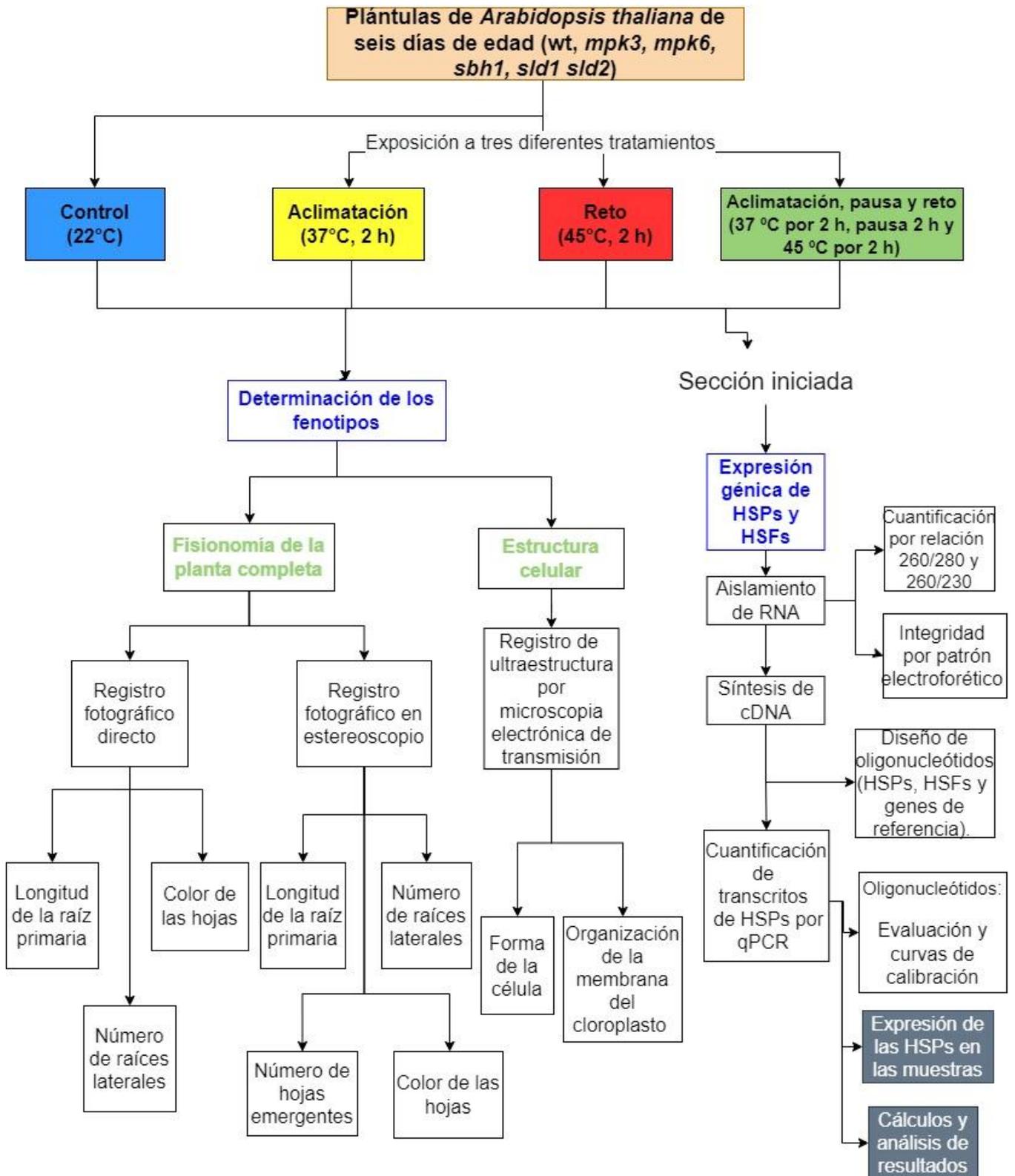
### 6.2. Diseño experimental

La estrategia experimental propuesta (Fig. 11) consistió en utilizar plántulas de *Arabidopsis thaliana* mutantes cuyas membranas plasmáticas tienen una composición alterada de esfingolípidos (líneas *sbh1-1* y *sld1 sld2*) y plántulas que carecen de las cinasas MPK3 y MPK6 (líneas *mpk3* y *mpk6*). Las plantas del genotipo silvestre, wt, ecotipo Col 0 fueron los controles. A las plántulas de *Arabidopsis* de los genotipos indicados se cultivaron durante seis días en cajas de Petri con medio sólido en condiciones de esterilidad y en ambiente controlado (22°C, 8 h de oscuridad y 16 h de luz). En seguida, las plántulas se expusieron a tres diferentes tratamientos: Aclimatación (37°C, 2 h), Reto (45°C, 2 h), Aclimatación más Reto que son las dos condiciones sucesivas. La condición control fue de 22°C. En los cuatro tratamientos se usó luz continua. Los pasos específicos de todo el procedimiento experimental se describen individualmente en la siguiente sección.

Los resultados y la información técnica relacionada con la expresión de proteínas de choque de calor se detallan en el Anexo V.

### 6.3. Material biológico

Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* del genotipo silvestre (wt), ecotipo Columbia (Col-0) como control. Asimismo, se usaron plántulas de líneas mutantes cuyas membranas plasmáticas tienen una composición alterada de esfingolípidos (líneas *sbh1-1* y *sld1 sld2*) y plantas mutantes que carecen de las cinasas MPK3 y MPK6 (líneas *mpk3* y *mpk6*) (Tabla 2).



**Fig. 11.** Estrategia experimental propuesta.

**Tabla 2.** Características genóticas y fenotípicas de las líneas mutantes que se utilizaron.

Genotipo	Características	Composición genética	Referencia
Wild type (wt)	Normal	Ninguna modificación	
<i>sbh1-1</i>	Menor cantidad de LCB trihidroxiladas y mayor cantidad de LCB dihidroxiladas	Inserción de T-DNA en el gen que codifica a la hidroxilasa 1 de bases de esfingolípidos (SBH1)	Chen et al. 2008
<i>sld1 sld2</i>	Menor cantidad de desaturasas de bases de cadena larga	Doble mutante que no expresa a las desaturasas 1 y 2 de bases de cadena larga	Chen et al. 2012
<i>mpk3</i>	Ausencia de la MPK3	Silenciamiento del gen que codifica para la MAP cinasa 3 mediante RNAi	Saucedo-García et al. 2011
<i>mpk6</i>	Ausencia de la MPK6	Silenciamiento para el gen que codifica la MAP cinasa 6 mediante la inserción de T-DNA	Saucedo-García et al. 2011

#### 6.4. Preparación del medio de cultivo

Para preparar el medio de medio sólido de Gamborg's se realizó el cálculo para la cantidad de cajas Petri que se requerían y se pesaron los componentes que se encuentran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Composición del medio Gamborg's

Composición	Concentración
Medio de Gamborg SIGMA (G5893)	3.2 g/L
Bactoagar Difco	1.0 %
Sacarosa	0.5 %
MES	0.05 %

Una vez pesados los componentes se colocaron en un frasco y se añadió agua destilada, se ajustó el pH a 5.6 con KOH. El medio de cultivo se esterilizó a 121 °C a una presión de 1.1 kg/cm<sup>2</sup> durante 20 min. Se utilizaron cajas Petri circulares y cuadradas, la Tabla 4 indica el volumen que se utilizó para cada una.

**Tabla 4.** Volumen de medio Gamborg's por caja Petri

Caja Petri	Volumen de medio (mL)
Cajas redondas, 8 cm de diámetro	20
Cajas cuadradas 9 cm de lado	40

## 6.5. Desinfección de semillas

El procedimiento de lavado se realizó en la campana de flujo laminar y se colocaron semillas en un microtubo de 1.5 mL (aproximadamente se colocó una cantidad de semilla equivalentes a 0.1 mL), se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio al 20% (v/v) estéril elaborado a partir de cloro comercial (Cloralex®), además se añadió 1 µL de Tween 20 estéril a una concentración de 0.1 % (v/v). Con un agitador eléctrico se agitó 20 min y se centrifugó por 3 s en una minicentrífuga para decantar el sobrenadante. Finalmente, se hicieron 5 lavados con agua destilada (estéril), con periodos de agitación de 1 min seguidos de un periodo de centrifugación de 2 s para cada lavado. Finalmente, se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril.

## 6.6. Siembra en cajas Petri

En la campana de flujo laminar se sembraron las semillas (ya desinfectadas), se colocaron una por una con ayuda de una micropipeta en una caja Petri con medio Gamborg. Las cajas se sellaron con 3M micropore™ y se colocaron en gradillas para el crecimiento vertical u horizontal con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 22 °C por 6 días como se ilustra en la Fig.12A. Después de dos días de la siembra, se descartaron las semillas que no germinaron Fig. 12B, con el propósito de no considerar estas semillas en los ensayos de determinación de los fenotipos. Mientras que la Fig. 12C muestra la germinación de las semillas dos días después de la siembra. Posteriormente, cada caja se sometió a 1 tratamiento térmico diferente.

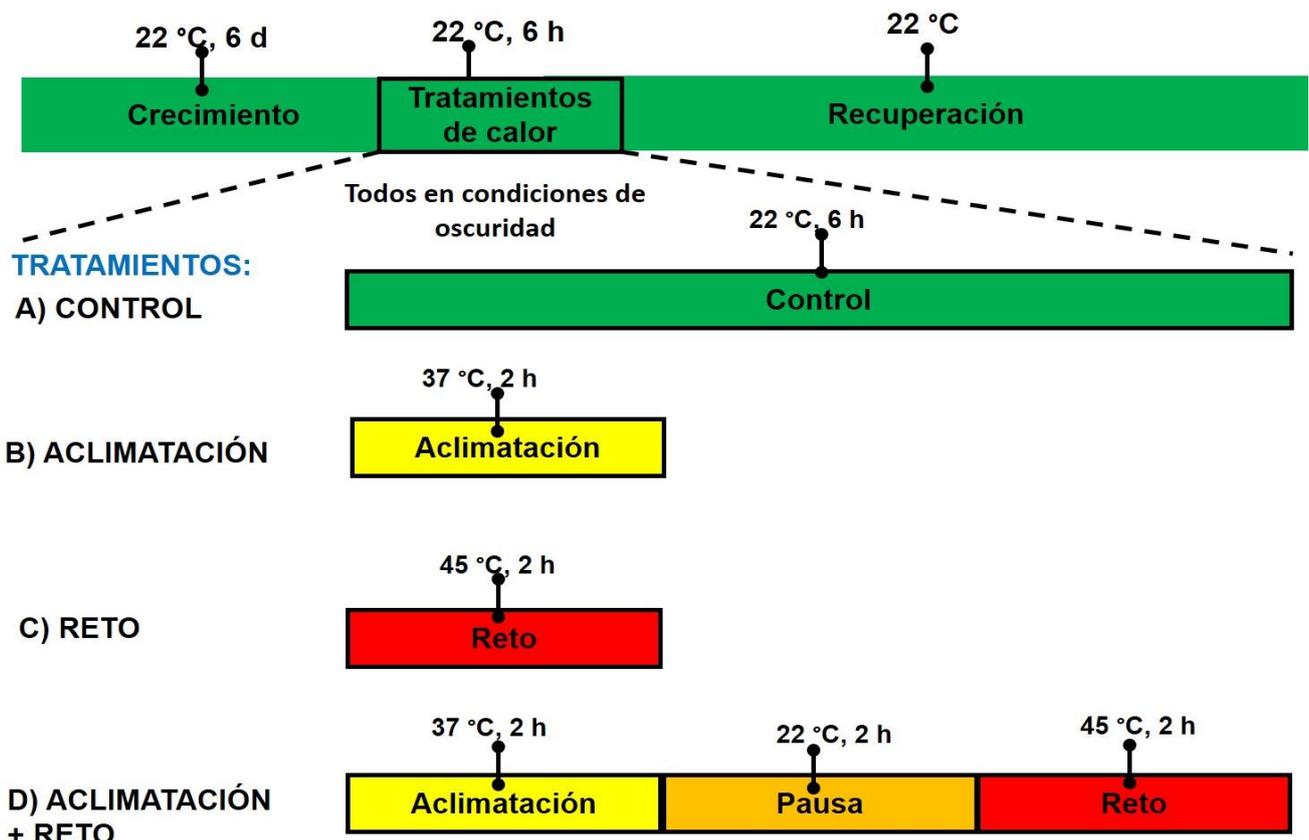


**Fig. 12.** Representación de la siembra para el crecimiento en vertical y la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*. **A** representación del crecimiento vertical en caja Petri, **B** semilla de *Arabidopsis* que no germinó. **C** semillas de *Arabidopsis* que si germinaron después de dos días de que se sembraron.

## 6.7. Tratamientos térmicos

Plántulas de *Arabidopsis* de los genotipos indicados se cultivaron durante seis días en cajas de Petri con medio sólido en condiciones de esterilidad y en ambiente controlado (22°C, 8 h de oscuridad y 16 h de luz). En seguida, las plantas se expusieron a tres diferentes tratamientos: Aclimatación (37°C, 2 h), Reto (45°C, 2 h) y Aclimatación más Reto, que son las dos condiciones sucesivas, en este último tratamiento se realizó una pausa de dos horas entre la aclimatación y el reto. La condición control fue 22°C. Los cuatro tratamientos se realizaron en oscuridad (Fig. 13).

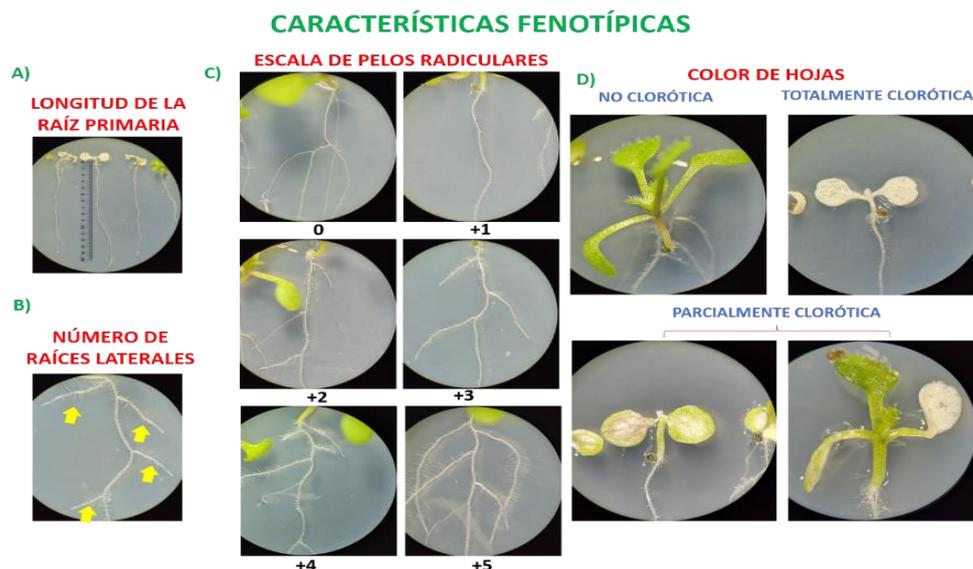
Los experimentos se llevaron a cabo en entornos controlados en términos de intensidad luz y duración de las condiciones de fotoperiodo. Los tratamientos de temperatura se llevaron a cabo siempre en el día 6 de la edad de las plántulas, realizándose durante las horas del día comenzando siempre entre las 8-10 h de la mañana. Para la exposición a cada temperatura se usaron cámaras independientes, en oscuridad y cada una con una temperatura fija de 22 °C, 37 °C y 45 °C. La duración total del experimento fue de 6 h en el día 6 de desarrollo de las plántulas. Para ilustrar la secuencia de acciones en cada tratamiento, se puede usar como ejemplo el de Aclimatación más Reto: El experimento comenzó transfiriendo las plántulas crecidas a 22 °C bajo un fotoperiodo natural, a una incubadora a 37 °C, en donde las plántulas se mantuvieron por 2 h (período de aclimatación). Luego, las plántulas se trasladaron a estantes del invernadero bajo oscuridad a 22 °C (periodo de pausa). Dos horas después, las plántulas se trasladaron a una cámara con una temperatura de 45 °C bajo oscuridad por 2 h (período de reto). Al terminar este tiempo, las plántulas pudieron tener dos destinos: en el caso del muestreo para determinar transcritos u otros parámetros bioquímicos, las plántulas se congelaron inmediatamente a -70 °C. En el caso de los registros de fenotipos, las plántulas se transfirieron a la cámara del invernadero a 22 °C con fotoperiodo de 8 h de oscuridad y 16 h de luz para que las plantas continuaran su desarrollo bajo condiciones normales (periodo de recuperación) y hacer el seguimiento de sus cambios fenotípicos a partir de los 2 d hasta los 7 d, en general. La anterior descripción se aplica a los otros tratamientos de acuerdo a su naturaleza según lo descrito en el párrafo anterior y la Fig. 13.



**Fig. 13.** Procedimiento seguido para llevar a cabo los tratamientos control y de altas temperaturas en plántulas descritos en este trabajo.

### 6.8. Determinación de los fenotipos

Se hizo la determinación del fenotipo de las plántulas al cabo de los tratamientos a través de registros fotográficos y observaciones en el microscopio estereoscópico, se determinaron las características de raíz y hoja (Fig. 14).



**Fig. 14.** Características fenotípicas en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de líneas mutantes y de la silvestre. **A.** Longitud de la raíz primaria. **B.** Número de raíces laterales. **C** Escala de abundancia de pelos radiculares donde se estableció una escala. Donde +5 es la mayor escala asignada por una gran cantidad de pelos radiculares y 0 es una nula cantidad de pelos radiculares. **D.** Color de hojas, donde se hizo una clasificación entre hojas verdes, parcialmente cloróticas y totalmente cloróticas.

### **6.8.1. Medición de la longitud de la raíz primaria**

Para determinación de la longitud primaria de los genotipos *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas verticalmente, en cada caja de Petri se colocaron 2 semillas de la silvestre como control interno y 8 de cada mutante. Al día seis se hizo el experimento de calor y tres días después del tratamiento se hizo un registro fotográfico con una cámara Nikon modelo L120, con una intensidad de luz: -0.7, con un tamaño de imagen máximo (-7) y un contraste de double plant y utilizando una fuente de luz externa. Con el registro fotográfico de las plántulas de diferentes líneas mutantes y partiendo de una escala de 13 mm (esta longitud la marca la caja Petri) se midió la longitud de la raíz primaria utilizando el programa de procesamiento de imagen digital Image J. Se realizaron tres replicas biológicas con una réplica técnica. El número total de individuos por experimento fue de 15-40 provenientes de las tres replicas biológicas. Posteriormente se calculó el promedio  $\pm$  ESD y se determinó con el programa MetaboAnalyst versión 5.0 la significancia estadística por la prueba ANOVA con post-hoc de Turkey ( $\alpha < 0.05$ ).

### **6.8.2. Determinación del número de raíces laterales**

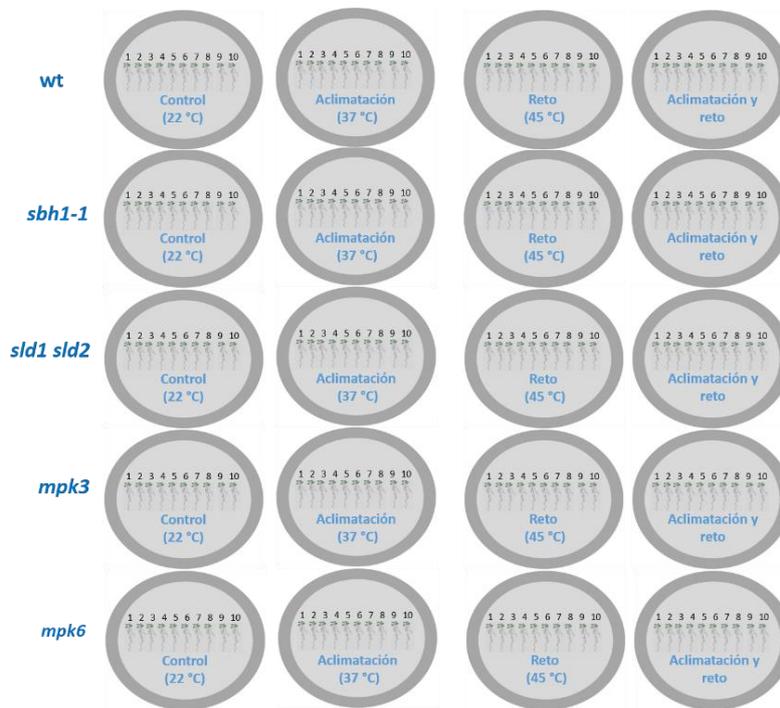
Se realizaron dos experimentos:

En el primer experimento se contó el número de raíces laterales a partir de un registro fotográfico tres días después de los tratamientos de calor. Se realizaron tres réplicas biológicas cada una con una réplica técnica, en cada condición cada caja tenía entre 8 y 10 plántulas. El número total de individuos por experimento fue de 15-40 provenientes de tres réplicas biológicas.

El segundo experimento, se contó el número de raíces laterales a los 2, 3, 4 y 7 días después de los tratamientos de calor, en un microscopio estereoscópico (Motic Images Plus 3.0 ML). Se realizaron dos réplicas biológicas con dos réplicas técnicas, en cada condición cada caja tenía entre 8 y 10 plántulas. La Fig. 15 muestra un ejemplo de una réplica técnica.

### **6.8.3. Determinación de la cantidad de pelos radiculares**

Se contó el número de raíces laterales, a los 2, 3, 4 y 7 días después de los tratamientos de calor, en un microscopio estereoscópico (Motic Images Plus 3.0 ML). Se realizaron dos replicas biológicas con dos réplicas técnicas, en cada condición cada caja tenía entre 8 y 10 plántulas. Se estableció una escala que se muestra en la Fig. 14C, donde +5 es la mayor escala asignada por una gran cantidad de pelos radiculares y 0 es una nula cantidad de pelos radiculares. Este valor le fue asignado a cada plántula de cada genotipo y se hizo un promedio para tener datos cuantitativos y poder hacer una comparación.



**Fig. 15.** Esquema de un ejemplo de una réplica biológica y acomodo de las semillas en las cajas Petri

#### 6.8.4. Estimación del color de las hojas

Se realizaron tres experimentos:

El primer experimento para determinar el cambio del color de las hojas consistió en crecer a plántulas de los genotipos *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* verticalmente. Al día seis de crecimiento se hizo el experimento de calor y tres días después del tratamiento se hizo un registro fotográfico y se clasificó a las plántulas como verdes o cloróticas (blancas). Se realizaron tres replicas biológicas con una réplica técnica, en cada condición cada caja tenía entre 8 y 10 plántulas.

El segundo experimento consistió en crecer a plántulas de los 5 genotipos (*wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*) verticalmente. Al día seis se hizo el experimento de calor y a los 2, 3, 4 y 7 días después de los tratamientos se clasificaron las plántulas como verdes, parcialmente cloróticas y totalmente cloróticas (Fig. 14D). Esto se realizó en un microscopio estereoscópico (Motic Images Plus 3.0 ML). Se realizaron dos réplicas biológicas con dos réplicas técnicas, en cada condición cada caja tenía entre 8 y 10 plántulas.

El tercer experimento consistió en crecer a plántulas de los 5 genotipos (*wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*) horizontalmente. Al día seis se hizo el experimento de calor y se realizó un seguimiento fotográfico hasta los 7 días después de los tratamientos de calor y se clasificaron las plántulas como verdes, parcialmente cloróticas y totalmente clorótica. Los registros fotográficos se realizaron con la cámara de un celular motorola edge 30, 50MP (OIS) + 50MP (ancho y macro) + 2MP (profundidad). Se tomaron fotografías de diferentes partes de la

plántula con ayuda del microscopio estereoscópico (Motic Images Plus 3.0 ML) y se tomaron fotografías de la caja completa en una campana de flujo laminar. Se realizaron dos replicas biológicas con dos réplicas técnicas, en cada condición cada caja tenía 10 plántulas de cada genotipo.

### **6.9. Ultraestructura celular**

Después de los tratamientos térmicos las hojas de las plántulas del genotipo wt se fijaron en un amortiguador de fosfato 100 mM (pH 7.2) y glutaraldehído al 3 % (v:v) a 4 °C, se deshidrataron y se incluyeron en epóxido de polipropileno durante 4 días. Se contrastaron secciones ultrafinas (espesor de 80 nm) con una solución de acetato de uranilo al 5 % y citrato de plomo. Las secciones se visualizaron con un microscopio electrónico Jeol 1200 EXII (Jeol Ltd., <http://www.jeol.com/>) operado a 40 kV.

### **6.10. Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron con ayuda de Metaboanalyst. Con base a los resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se hizo una prueba poshoc de Turkey.

## 7. RESULTADOS

### **Características de las líneas mutantes.**

En este trabajo se utilizaron plantas de varios genotipos de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col 0, como se indicó en la Tabla 2 de Materiales y Métodos. En la Fig. 16 se presentan con detalle las enzimas y reacciones que no se expresan en los fondos genéticos de las plantas *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* en comparación con el genotipo wt.

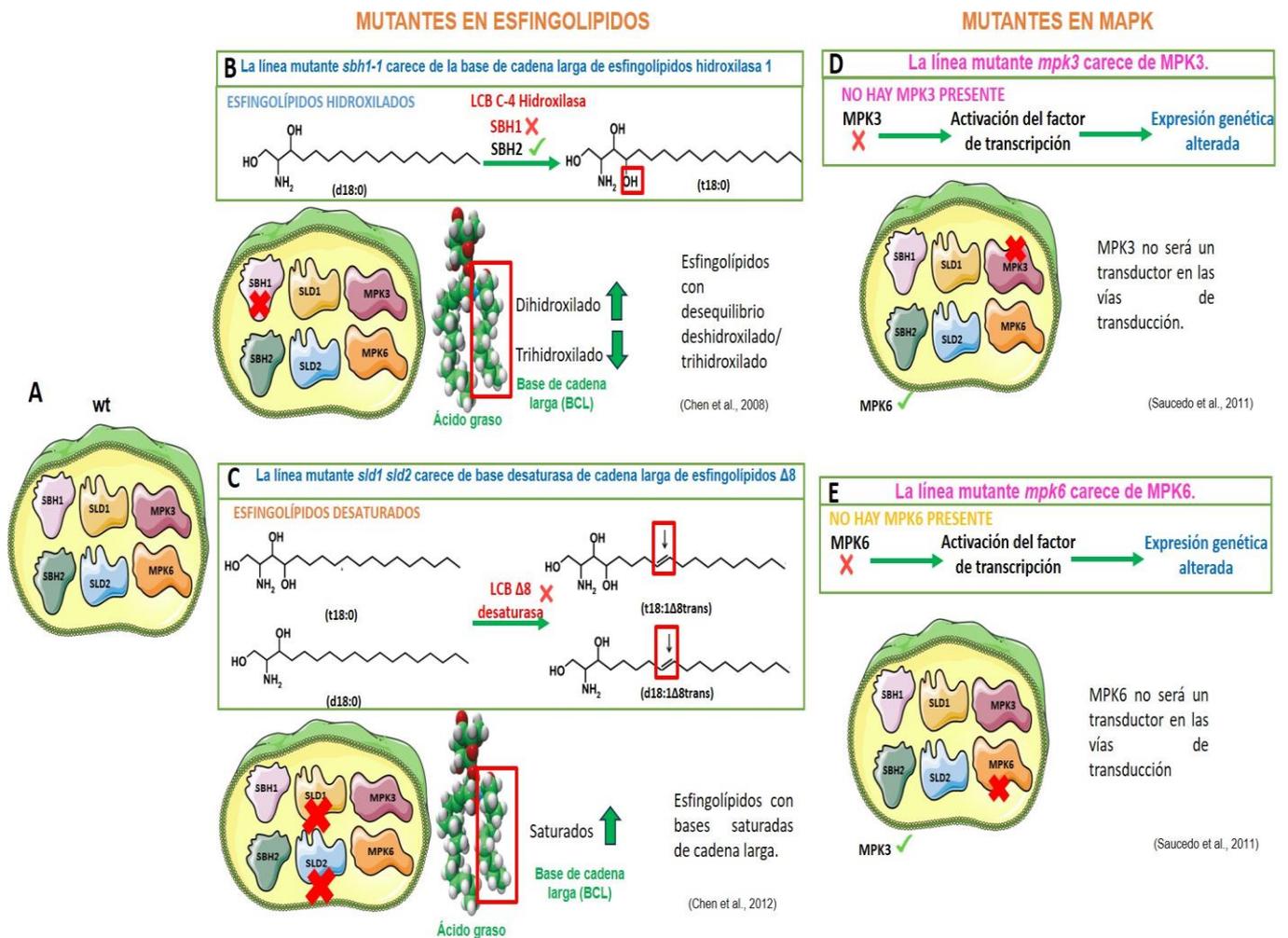
**Línea *sbh1-1*.** La mutante *sbh1-1* carente de la Hidroxilasa 1 de Bases de Cadena Larga (SBH1) presenta una disminución del 50 % de BCL trihidroxiladas en los esfingolípidos totales de hojas de plantas de 8 semanas de edad (Chen et al. 2008). Los autores reportaron que esta mutación genera un fenotipo en que hay un efecto compensatorio por el que se aumentan los niveles de BCL dihidroxiladas.

**Línea *sld1 sld2*.** Esta es una doble mutante que no expresa a las dos desaturasas de BCL, SLD1 y SLD2, por lo cual los esfingolípidos de la planta sólo tienen bases de cadena larga saturadas (Chen et al. 2012).

**Línea *mpk3*.** Esta mutante no expresa a la cinasa MPK3 (pero sí expresa a la cinasa MPK6) (Saucedo-García et al. 2011).

**Línea *mpk6*.** Esta mutante no expresa a la cinasa MPK6 (pero sí expresa a la cinasa MPK3) (Saucedo-García et al. 2011).

Por lo tanto, la estrategia de este trabajo fue analizar los parámetros fenotípicos tanto a nivel macroscópico como a nivel celular en estas plántulas que carecían de las enzimas correspondientes. Los resultados entonces se pueden interpretar en términos de la contribución de cada enzima a las respuestas al estrés térmico en las plántulas silvestres, según el efecto encontrado. La aclimatación se instrumentó por la exposición de las plantas a un calor moderado (37 °C) y su efecto se valoró por una subsecuente exposición a un calor extremo o reto (45 °C). Estos efectos se evaluaron en la fisonomía de las plántulas, específicamente en características de las hojas y las raíces (Fig. 17). Se puede observar en términos muy generales, que las plántulas de todos los genotipos tuvieron un crecimiento similar a los 22 °C, si bien las plántulas *mpk6* presentaron siempre un desarrollo ligeramente mayor. La exposición a 37 °C por 2 h no modificó el crecimiento en ninguno de los genotipos. Sin embargo, cuando las plántulas fueron retadas directamente (exposición a 45 °C por 2 h), se apreció que las plántulas de todos los genotipos presentaron clorosis en las hojas y una disminución de la longitud de la raíz principal. En contraste, las plántulas que fueron retadas (45 °C), pero previamente expuestas a la aclimatación (37 °C), no perdieron la coloración verde y el detrimento en la longitud de la raíz primaria fue menor. Estos fenotipos de examinarán en detalle más adelante.

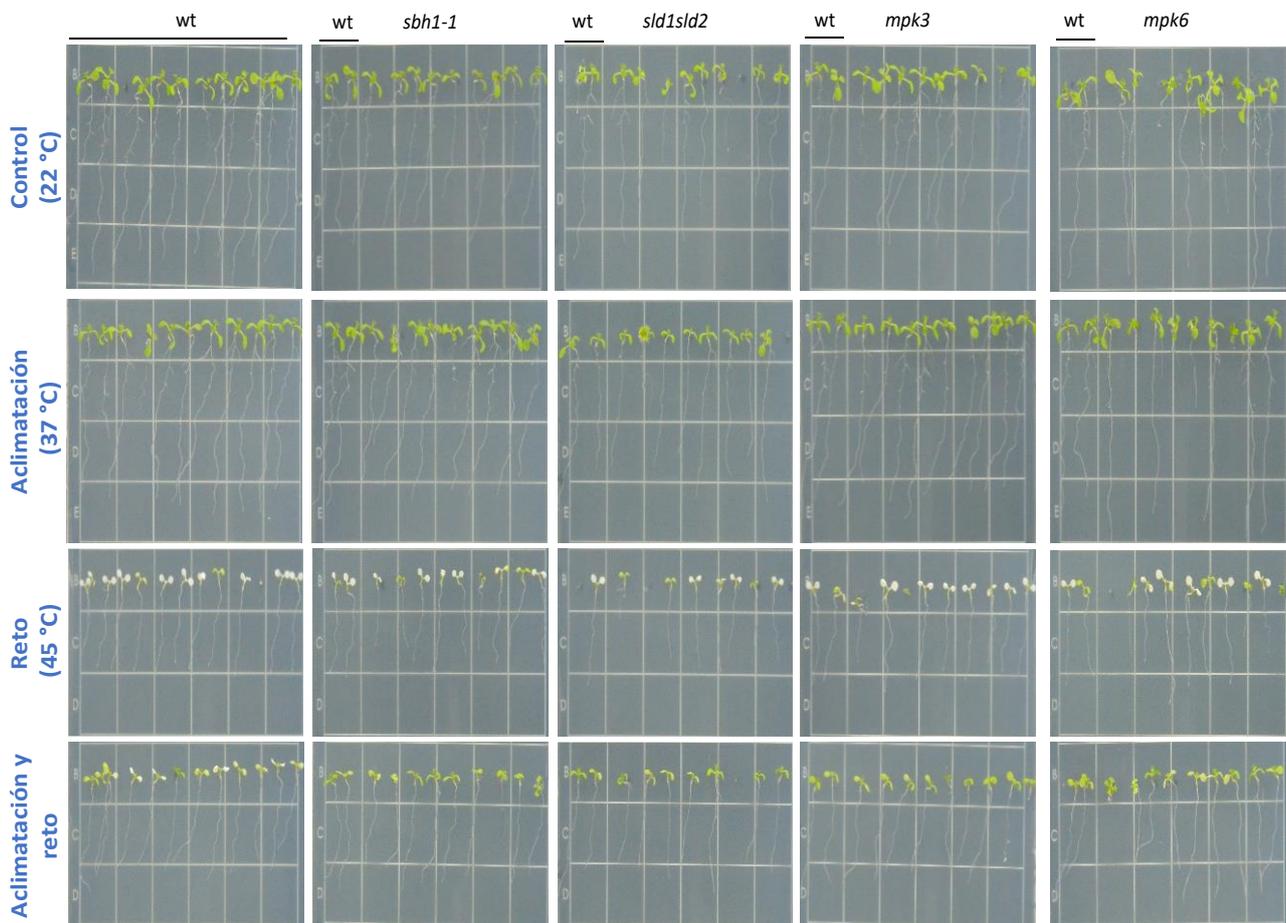


**Fig. 16.** Características de las plantas de los genotipos *sbh1-1*, *sid1 sid2*, *mpk3* y *mpk6* en cuanto al gen que no se expresa, la enzima que es codificada y la reacción que cataliza comparado con wt. Se indican en particular, las enzimas del resto de los genotipos.

## Cambios en la raíz de las plántulas expuestas a tratamientos térmicos (crecimiento vertical)

### Efectos en la raíz primaria registrados por fotografía directa

Los cambios fenotípicos descritos fueron analizados en términos cuantitativos. El efecto de altas temperaturas en la longitud de la raíz primaria de las plántulas de los 5 genotipos se determinó en las condiciones de aclimatación (37 °C), reto (45 °C) y en la de la combinación de ambos tratamientos (Fig. 18). Para ello se usó una herramienta del programa Image J procesando las imágenes de la Fig. 17. Se midió la raíz desde su inicio debajo del hipocótilo hasta la punta (Fig. 18 A). Se observó en la Fig. 18 B que las raíces de las plántulas de todos los genotipos tuvieron un crecimiento similar a los 22 °C y 37 °C, mientras que la longitud disminuyó cerca de 5 veces en todos los genotipos expuestos a 45 °C. Sin embargo, en la combinación de la aclimatación más reto, el crecimiento de la raíz primaria no se vio tan fuertemente afectado, siendo la longitud de la raíz aproximadamente el doble en los genotipos wt y *mpk6* con respecto al tratamiento de reto, mientras que en los genotipos *sbh1-1*, *sid1 sid2* y *mpk3* el crecimiento alcanzó tres veces más que las plántulas expuestas a 45 °C.

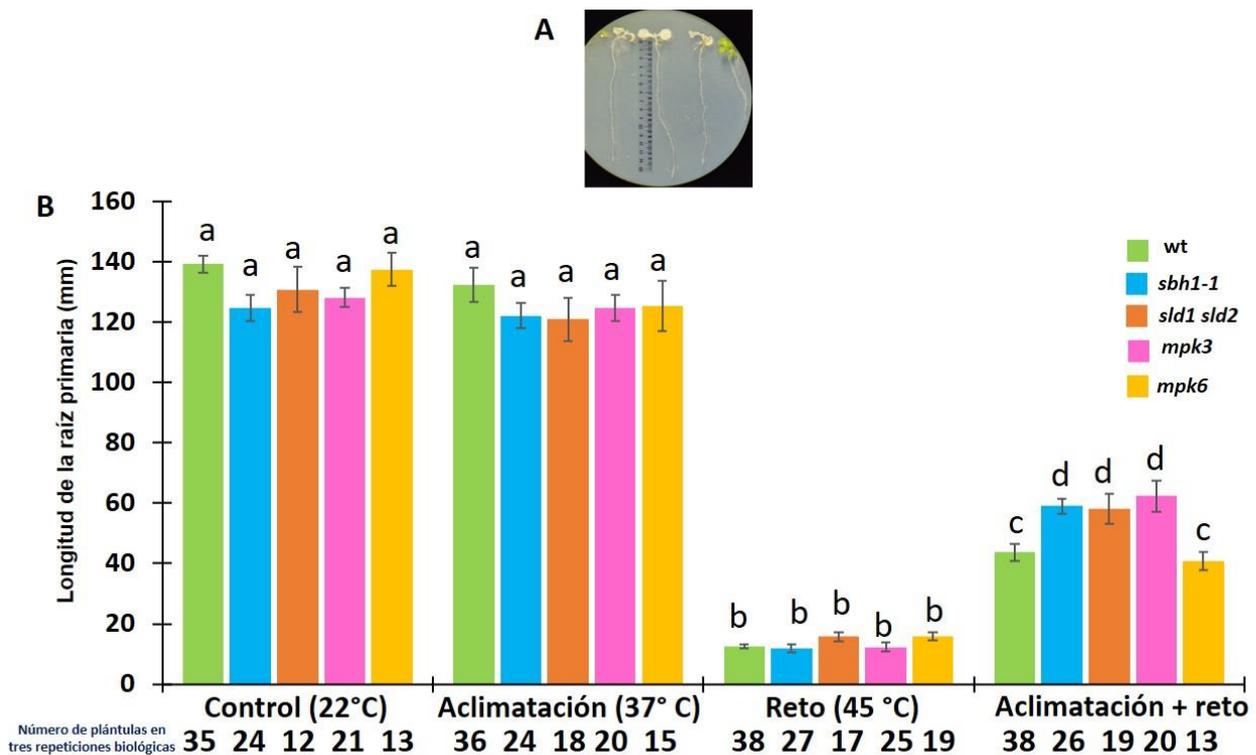


**Fig. 17.** Efectos de altas temperaturas en los fenotipos de las plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*. Plántulas de seis días de edad fueron expuestas a las temperaturas indicadas. Las fotos mostradas fueron tomadas 3 días después de la exposición a los tratamientos. Durante todo el tiempo las cajas se mantuvieron en posición vertical. Se presenta un experimento representativo de tres réplicas independientes y en las cuales cada tratamiento/genotipo fue hecho por duplicado. Lo anterior implica que el número de plántulas de cada genotipo expuestas al tratamiento indicado fue de 10 por cada réplica independiente y una *n* total de 30 individuos por condición/genotipo. Ver detalles en Materiales y Métodos.

### Efectos en la raíz primaria registrados por fotografía en microscopio

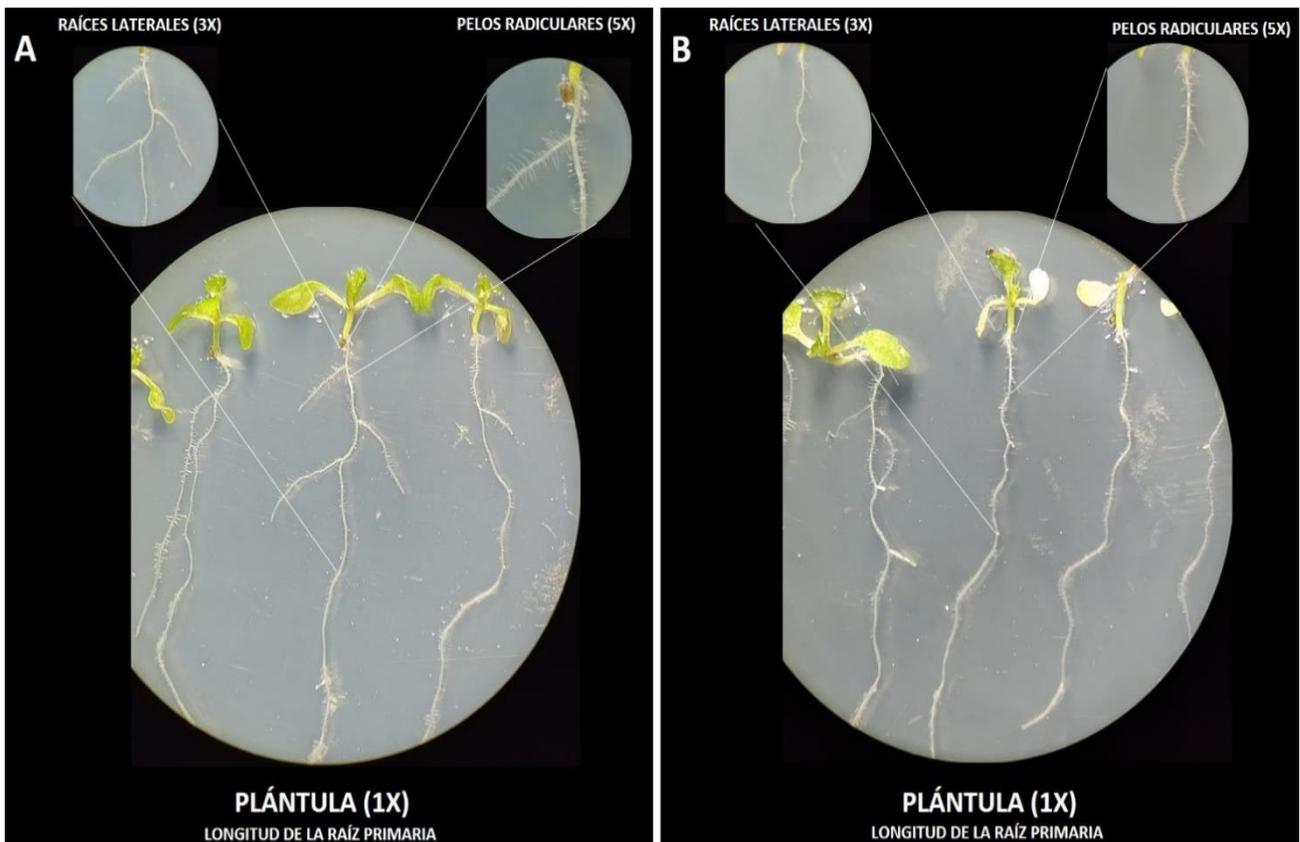
Para detectar los cambios en el número de raíces laterales y la cantidad de pelos radiculares se hicieron observaciones bajo un microscopio de disección. La Fig. 19 muestra un ejemplo de los principales cambios en la raíz de una plántula *wt* a 22 °C (Fig. 27 A) y a 45 °C (Fig. 27 B).

Las raíces laterales de una plántula son aquellas raíces que se desarrollan a lo largo del cuerpo principal de la raíz, conocida como raíz primaria o raíz principal. Estas raíces laterales



**Fig. 18.** Efecto de *altas temperaturas* en la longitud de la raíz primaria de plántulas de los *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*. Las imágenes de las plántulas de la Fig. 17 (tomadas tres días posteriores a los tratamientos térmicos) se procesaron para hacer las mediciones de la raíz primaria con el programa Image J. A. Se muestra un ejemplo de imagen procesada para la determinación de la longitud de la raíz. B. Longitud de la raíz principal tras la exposición al tratamiento indicado. Se muestran los resultados de las determinaciones de las tres réplicas independientes. Debajo de cada barra se muestra el número total de plántulas analizadas en las tres réplicas. Se determinó la longitud de la raíz primaria y de las réplicas independientes se calculó el promedio  $\pm$  ESD y se determinó la significancia estadística por la prueba ANOVA con post-hoc de Turkey ( $\alpha < 0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas.

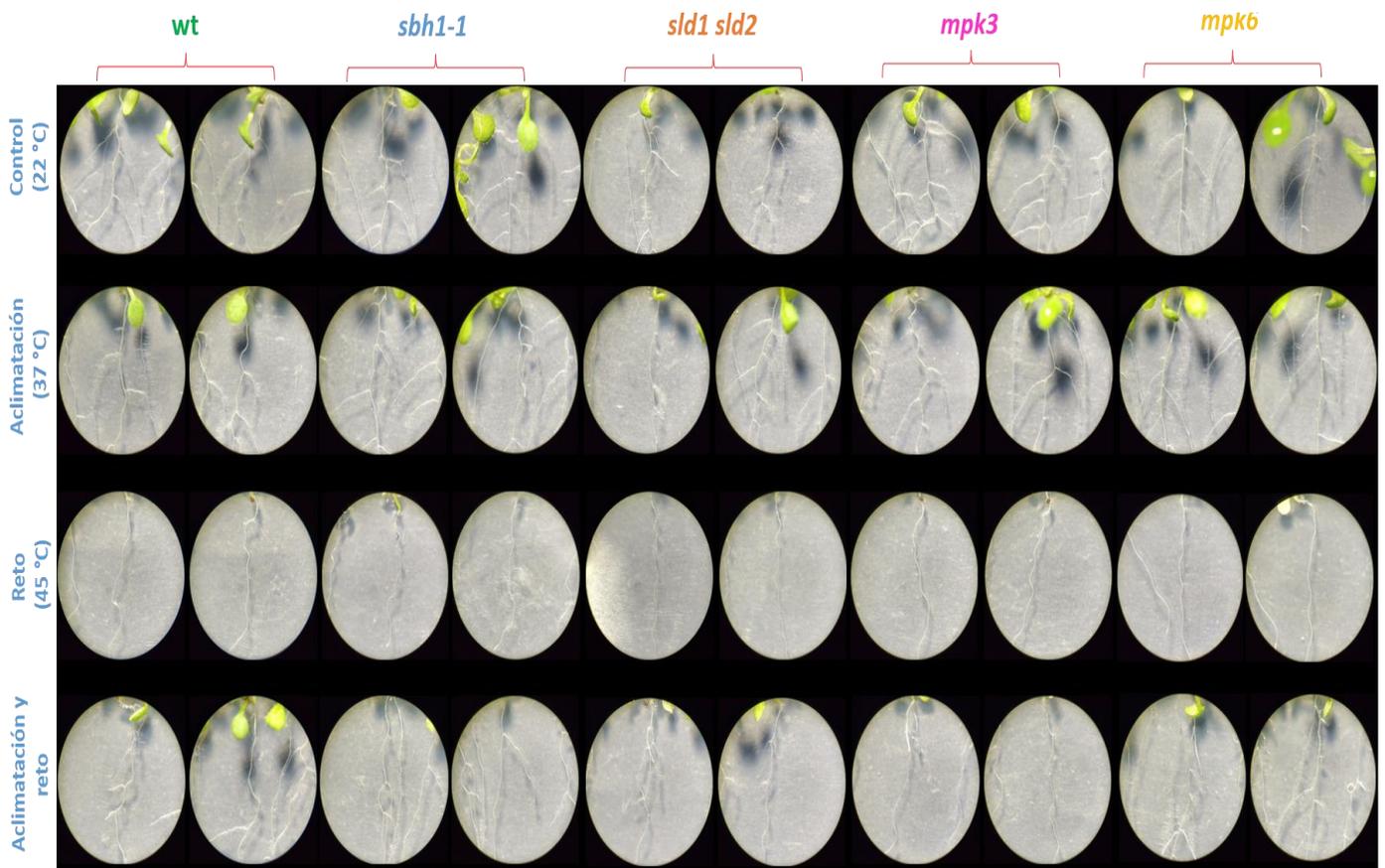
se ramifican desde la raíz primaria y crecen en diversas direcciones. Se determinó el número de raíces laterales de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* en los diferentes tratamientos térmicos (Fig. 20). Se observó que las plántulas de todos los genotipos tienen un crecimiento heterogéneo a los 22 °C y 37 °C, mientras que la exposición a 45 °C por 2 h disminuyó el número de raíces laterales en todos los genotipos. Sin embargo, cuando las plántulas fueron retadas por exposición a 45 °C, pero tuvieron una aclimatación previa, las plántulas presentaron una recuperación reflejada en un aumento del número las raíces laterales en todos los genotipos. Cuantitativamente esto se presenta en la Fig. 21.



**Fig. 19.** Detalle de los cambios en los fenotipos de plántulas sometidas a la temperatura del reto (45 °C). A. Plántulas de 6 días de edad se expusieron a las condiciones de control (a 22 °C). B. Plántulas de 6 días de edad se expusieron a las condiciones de reto (45 °C) como en la Figura 17. Las imágenes fueron obtenidas bajo un microscopio de disección.

### Efectos en las raíces laterales registrados por fotografía directa

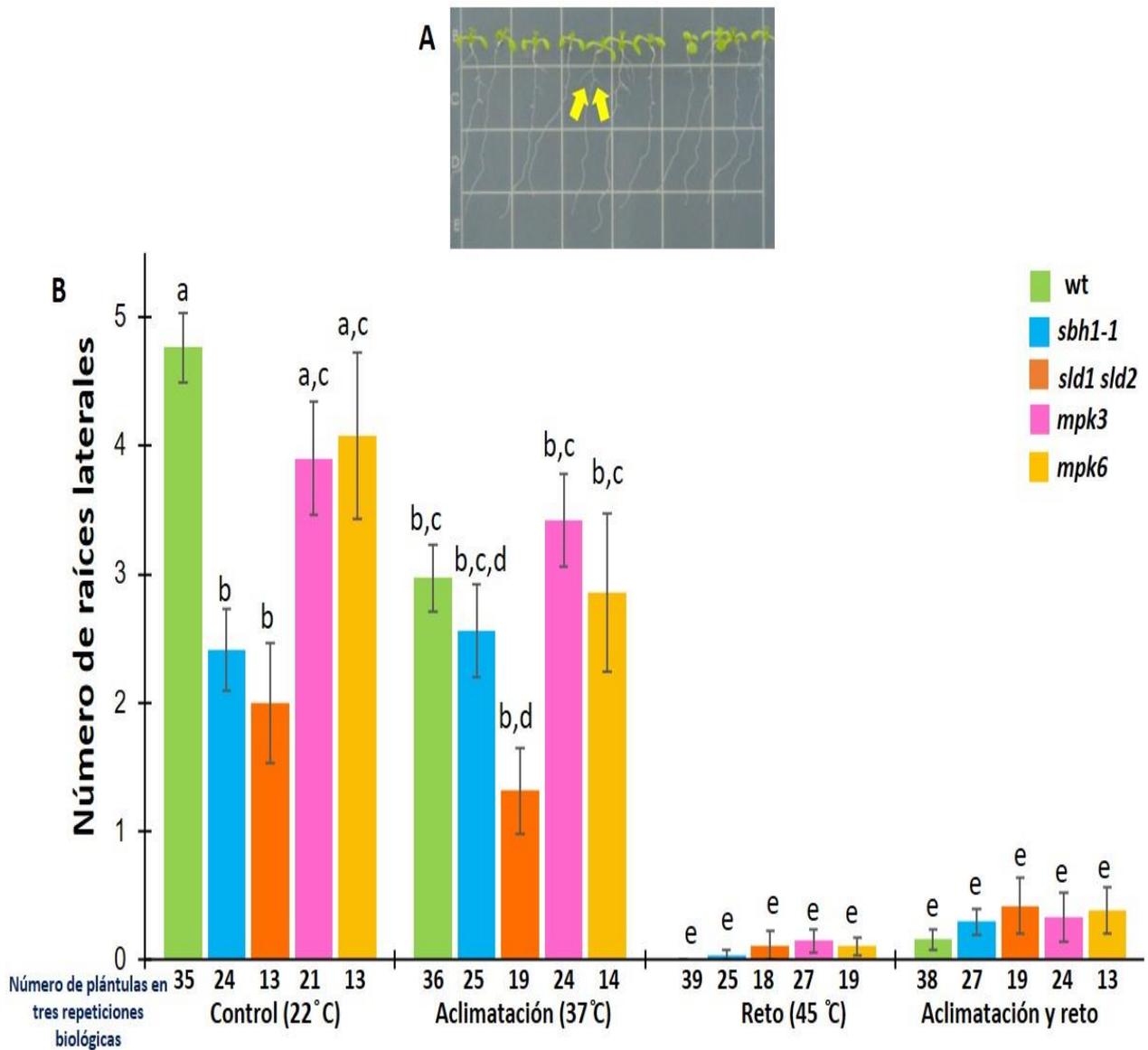
Para determinar cómo cambiaba el número de raíces laterales en las plántulas de los 5 genotipos en los diferentes tratamientos térmicos, se procesaron las imágenes de la Fig. 17, tomadas tres días postratamiento. La Fig. 21 A muestra un ejemplo de cómo se vieron las raíces laterales tomadas directamente por una cámara fotográfica. Se puede observar en la Fig. 21B que a 22 °C las plántulas de los genotipos *wt*, *mpk3* y *mpk6* presentaron un número similar de raíces laterales, mientras que las de los genotipos *sbh1-1* y *sld1 sld2* presentaron 50 % menos raíces laterales con respecto a la *wt* a los 22 °C. En la aclimatación, el número de raíces laterales del genotipo *wt* disminuyó aproximadamente un 40 % con respecto a la *wt* del control, pero las mutantes *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* permanecieron con un número similar de raíces laterales que en el control. Por otro lado, el tratamiento de reto (45 °C) y la combinación de reto y aclimatación (37 °C y 45 °C) disminuyó prácticamente el 100 % el número de raíces laterales en todos los genotipos a los tres días postratamiento.



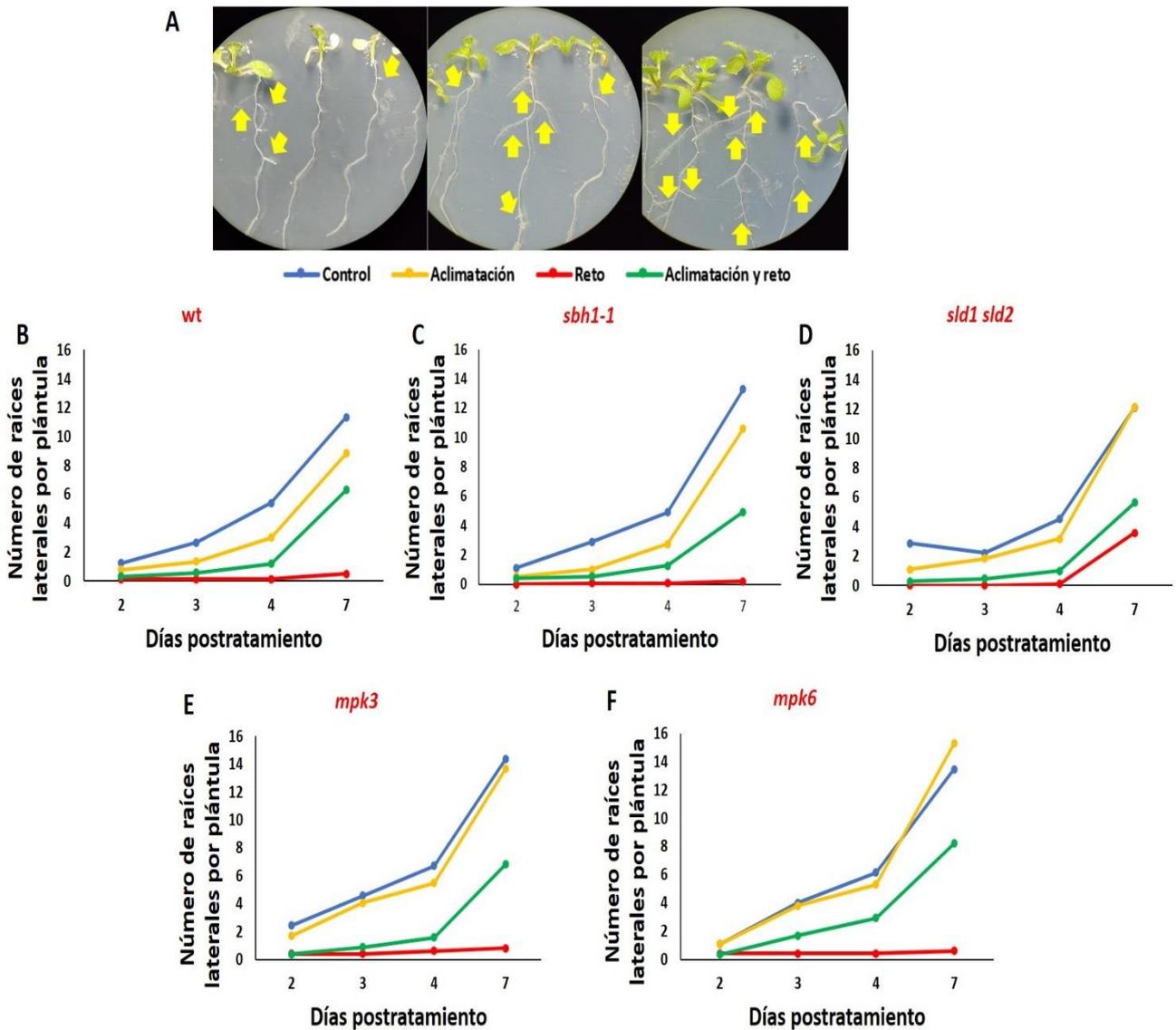
**Fig. 20.** Efectos de altas temperaturas en los fenotipos de plántulas wt, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* en las raíces laterales. Plántulas de seis días de edad fueron sembradas en cajas Petri y al día 6 fueron expuestas a las temperaturas indicadas. Se hicieron observaciones en la raíz de las plántulas en un microscopio estereoscópico y se tomaron fotografías a 1x. Se presentan las fotografías del día 7 postratamiento. Se muestra el segundo de dos experimentos similares correspondientes a dos réplicas independientes, cada una con dos réplicas técnicas. La n fue de 30 plántulas analizadas en total para cada tratamiento/genotipo. Ver detalles en Materiales y Métodos.

### Efectos en las raíces laterales registrados por fotografía en microscopio

Para determinar si la magnitud del efecto de los tratamientos térmicos se modificaba una vez que el tratamiento terminaba, se hizo un seguimiento del número de las raíces laterales de las plántulas de los 5 genotipos a los 2, 3, 4 y 7 días postratamiento (Fig. 22). La condición control mostró, en todos los genotipos, un mayor número de raíces laterales a lo largo del tiempo estudiado. A 37 °C, los genotipos *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*, alcanzaron un número de raíces laterales semejantes a los niveles observados a 22 °C, revelando que en estas mutantes esta temperatura no es nociva para el desarrollo de raíces laterales como sí lo es para los genotipos wt y *sbh1-1*. De manera dramática, el reto abolió la presencia de raíces laterales en todos los genotipos a lo largo de los 7 días de observación, pero el genotipo *sld1 sld2* presentó una recuperación a partir del día 4 postratamiento. Sin embargo, la aclimatación permitió remontar el efecto del reto en todos los genotipos, ya que el número de raíces secundarias aumentó comparado con lo observado en el reto a los mismos tiempos, si bien este efecto se comenzó a ver a partir de los 4 días y fue muy claro a los 7 días postratamiento en todos los genotipos.



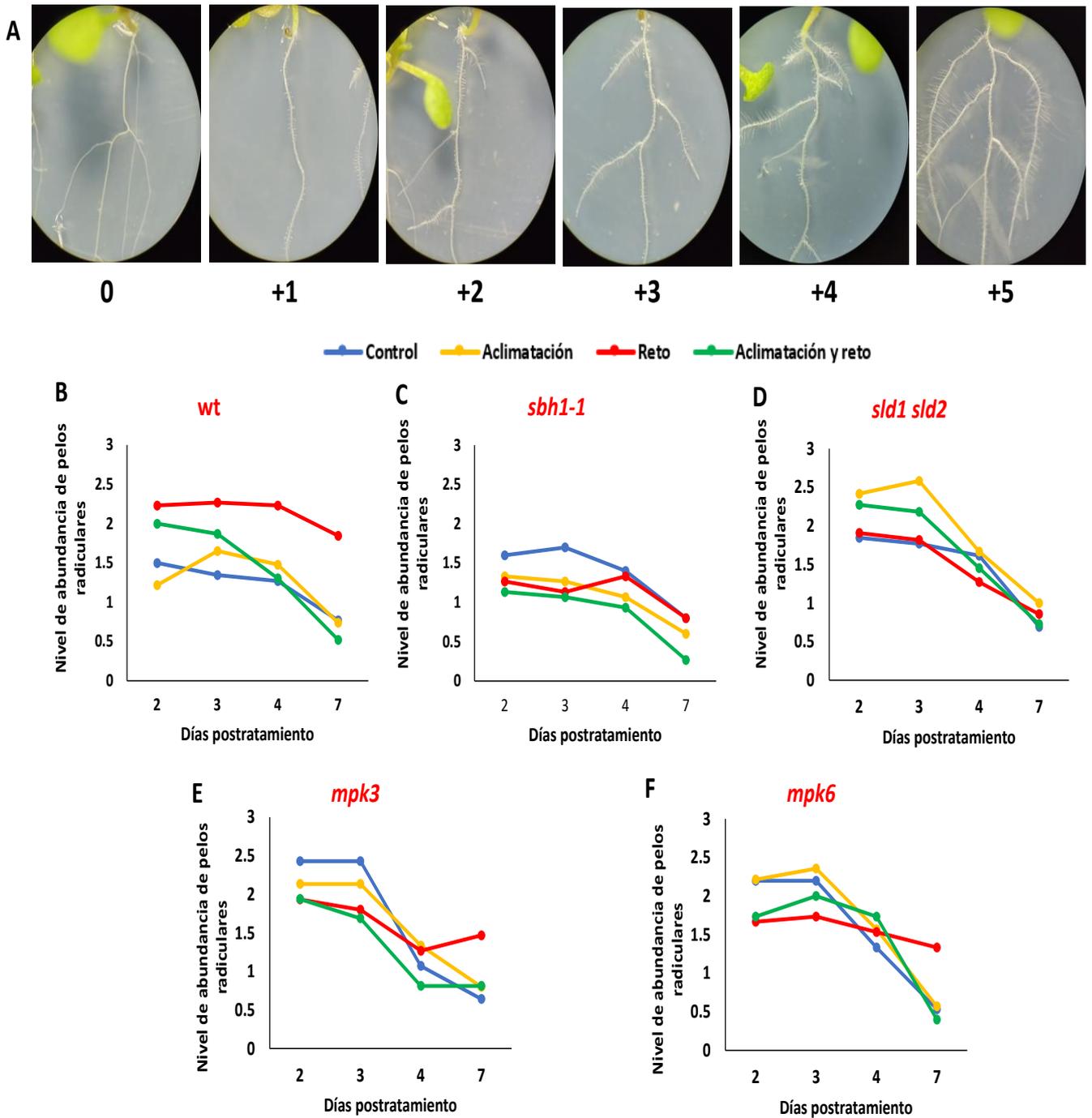
**Fig. 21.** Efecto de las altas temperaturas en el número de raíces laterales de plántulas de los genotipos *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*. Se expusieron las plántulas de 6 días de edad a los tratamientos térmicos indicados. Al cabo de tres días de exposición, se contaron las raíces laterales a través del análisis de las imágenes de registros fotográficos directos (se usaron las imágenes de la Fig. 17). A. Se señalan con flechas el tipo de raíces cuantificadas. B. Se muestran los resultados de las determinaciones de raíces laterales de tres réplicas independientes. Debajo de cada barra se muestra el número total de plántulas analizadas en las tres réplicas. Se determinó el número de raíces laterales y de las réplicas independientes se calculó el promedio  $\pm$  ESD y se determinó la significancia estadística por la prueba ANOVA con post-hoc de Turkey ( $\alpha < 0.05$ ).



**Fig. 22.** Efecto de las altas temperaturas en el número de raíces laterales a diferentes tiempos postratamiento de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sls1 sls2*, *mpk3* y *mpk6*. A. Se señalan con flechas el tipo de raíces cuantificadas. B. Se muestran los resultados de las determinaciones de raíces laterales de dos réplicas independientes. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Una vez terminados los tratamientos, se observaron las plántulas crecidas verticalmente bajo un microscopio estereoscópico, contándose el número de raíces laterales a los 2, 3, 4 y 7 días. Las imágenes de las plántulas de la Fig. 20 (tomadas a los 2,4,6 y 7 días posteriores a los tratamientos térmicos) se procesaron para hacer las mediciones del número de raíces laterales. Se muestran los resultados de dos réplicas independientes de las que el número total de plántulas analizadas fue de 10 a 25. Se presenta el promedio de raíces laterales por plántula.

### Efectos en los pelos radiculares registrados por fotografía en microscopio

En un experimento análogo, se evaluó el número de pelos radiculares de las plántulas de los 5 genotipos *wt*, *sbh1-1*, *sls1 sls2*, *mpk3* y *mpk6*, después de 2, 3, 4 y 7 días de terminados los tratamientos térmicos. Dependiendo de la abundancia de pelos radiculares se asignó un número (Fig. 23 A). Todos los genotipos presentaron un cambio heterogéneo en la cantidad pelos y fueron disminuyendo conforme pasaba el tiempo y no por el tratamiento.



**Fig. 23.** Efecto de las altas temperaturas en la abundancia de pelos radiculares a diferentes tiempos postratamiento de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Una vez terminados los tratamientos, se observaron las plántulas crecidas verticalmente bajo un microscopio estereoscópico, asignándose un número a la abundancia de pelos radiculares a lo largo de 7 días postratamiento. A, escala de asignación de abundancia de pelos radiculares. El número cero corresponde a la ausencia de pelos y el 5 al número máximo de pelos, los valores intermedios corresponden a abundancias intermedias como se aprecia en la foto. B. Las gráficas se construyeron usando los valores de la escala. Las imágenes de las plántulas de la Fig. 20 (tomadas a los 2,4,6 y 7 días posteriores a los tratamientos térmicos) se procesaron para determinar la cantidad de pelos radiculares. Se muestran los resultados de dos réplicas independientes de las que el número total de plántulas analizadas fue de 10 a 25 por tratamiento por genotipo. Se presenta el promedio de raíces laterales por plántula.

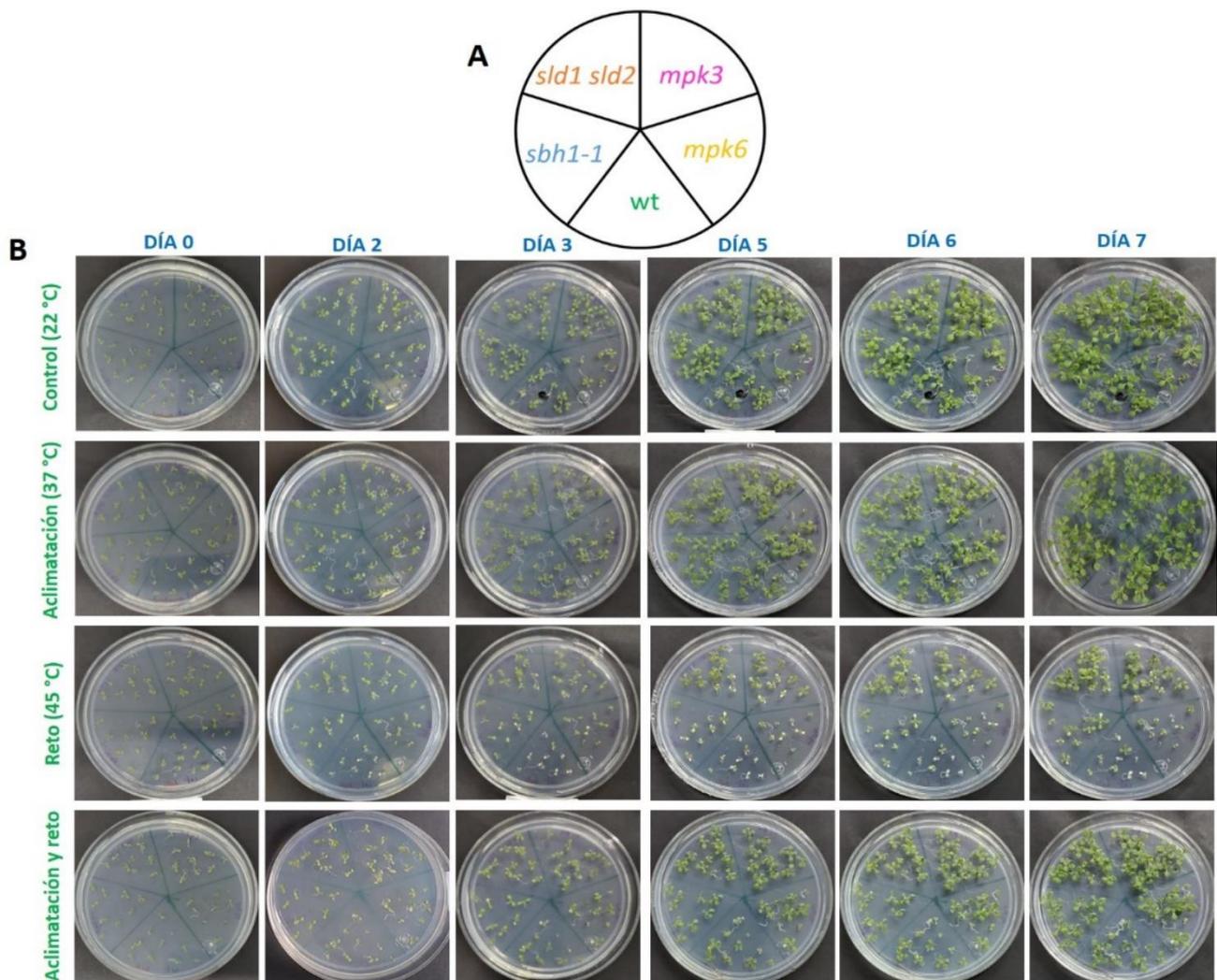
## **Cambios en la parte aérea de las plántulas expuestas a tratamiento térmicos (crecimiento horizontal)**

### **Efectos en la parte aérea registrados por fotografía directa**

La roseta de las plántulas fue claramente afectada por los tratamientos térmicos. Para evaluar los cambios en los 5 genotipos se hizo un seguimiento fotográfico a lo largo de 7 días postratamiento de las plántulas crecidas en cajas Petri puestas horizontalmente. La Fig. 24A muestra la distribución de las plántulas por genotipo en este trabajo. De manera muy general se observa que a lo largo de los 7 días postratamiento, todas las plántulas de todos los genotipos permanecieron verdes solo aumentó su crecimiento a los 22 °C y a los 37 °C. Sin embargo, cuando las plántulas fueron retadas (45 °C por 2 h), las hojas presentaron un color amarillento o blanco en lugar del verde (clorosis) y hubo una disminución del crecimiento de la parte aérea en todos los genotipos. A partir del día 2 postratamiento inicio la clorosis en las hojas de las plántulas *wt*, *sbh1-1* y *mpk6*. Sin embargo, al día 3 postratamiento todos los genotipos presentaron clorosis en sus hojas. En los genotipos *wt*, *sbh1-1* y *mpk6* se intensificó este cambio en la clorosis y la disminución del crecimiento mientras que en los genotipos *sld1 sld2* y *mpk3* presentaron una mayor resistencia a la clorosis y un mayor crecimiento respecto a las plántulas *wt*. En contraste, las plántulas que fueron retadas (45 °C) pero previamente expuestas a la aclimatación (37 °C), mostraron muy poca clorosis y su desarrollo no se vio reducido en todos los genotipos durante los 7 días postratamiento, sin embargo, las plántulas de los genotipos *sld1sld2* y *mpk3* presentaron una mejor recuperación.

### **Efectos en la parte aérea de la plántula registrados por fotografía en microscopio**

Para observar a detalle los cambios en la roseta de los genotipos *de las plántulas wt, sbh1-1, sld1 sld2, mpk3 y mpk6* generados por los diferentes tratamientos térmicos se hicieron observaciones y registros fotográficos en un microscopio de disección. La Fig. 25 muestra los principales cambios en la roseta de plántulas expuestas a 22 °C (Fig. 25 A) y 45 °C (Fig. 25 B). Los principales cambios fueron el color y tamaño de las hojas primordiales, la presencia de hojas emergentes.

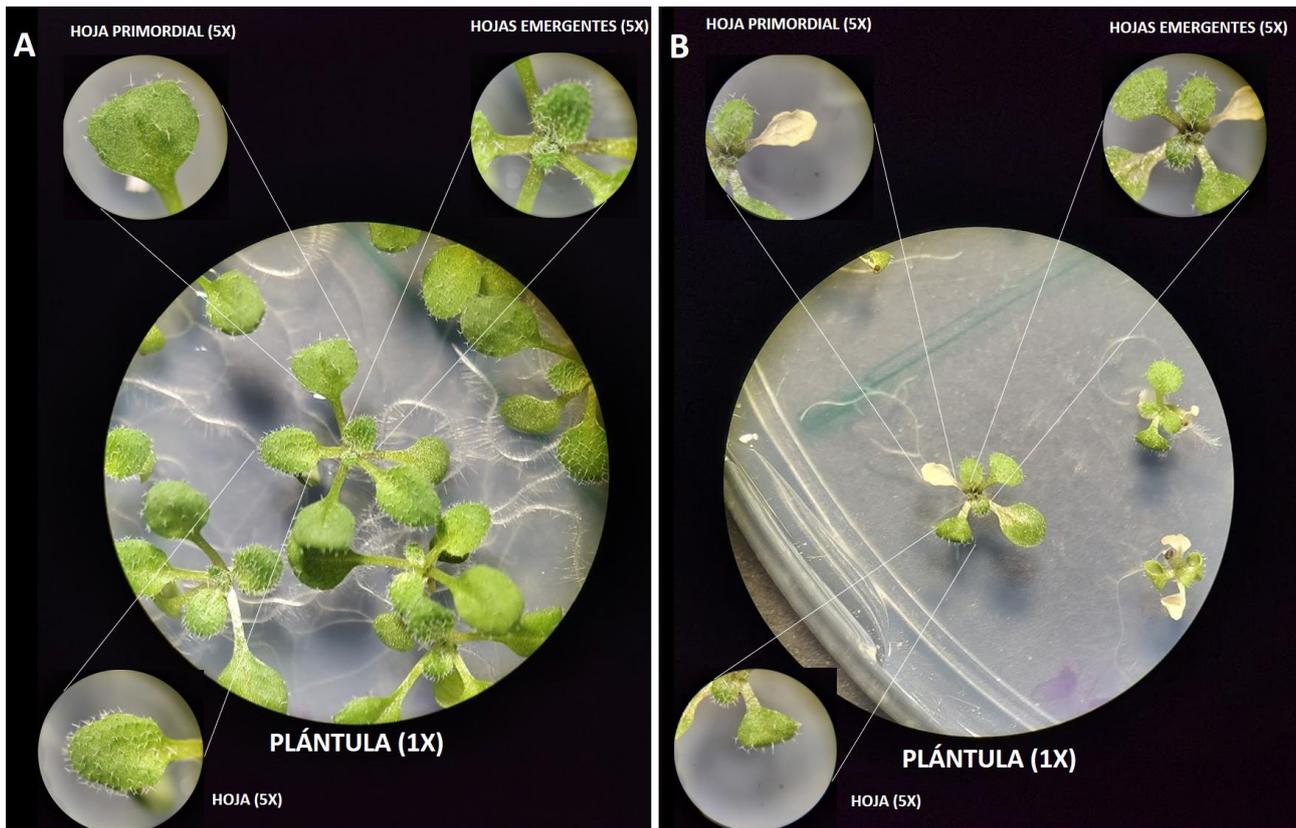


**Fig.24.** Efecto de las altas temperaturas en las características de la roseta a diferentes tiempos posttratamiento de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Una vez terminados los tratamientos se hicieron los registros fotográficos a los 2, 3, 5, 6 y 7 días. Las plántulas fueron crecidas en cajas de Petri dispuestas horizontalmente. Se muestra el primero de dos experimentos similares correspondientes a dos réplicas independientes.

## Cambios en la parte aérea de las plántulas expuestas a tratamiento térmicos (crecimiento vertical)

### Efecto en el color de las hojas registrados por fotografía directa

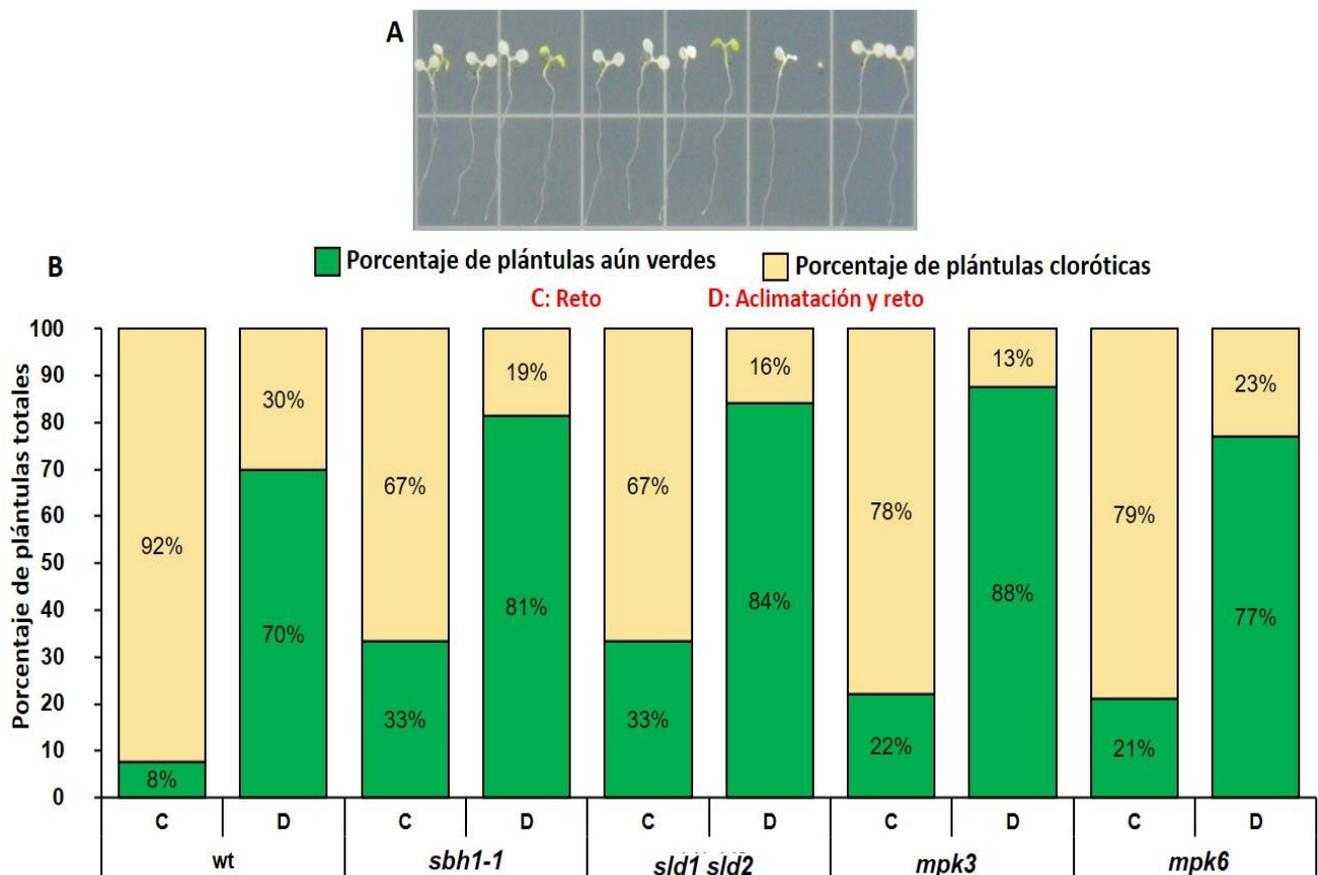
El efecto de las altas temperaturas en el color de las hojas de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* se determinó en las condiciones controles (22 °C), de aclimatación (37 °C), reto (45 °C), y la combinación de ambos tratamientos. Esta determinación se hizo en plántulas crecidas en caja de Petri horizontal y también en vertical.



**Fig. 25.** Detalle de los cambios en la roseta de plántulas wt sometidas al reto (45 °C). A. Plántulas de 6 días de edad se expusieron a las condiciones de control (a 22 °C). B. Plántulas de 6 días de edad se expusieron a las condiciones de reto (45 °C) como en la Figura 17. Las imágenes fueron obtenidas bajo un microscopio de disección.

Para el análisis del color de hojas en las plántulas en crecimiento de caja vertical, se procesaron las imágenes de la Fig. 17, mismas que fueron tomadas tres días postratamiento. Se clasificó la apariencia de las hojas sólo en los extremos: como cloróticas (blancas) o verdes (Fig. 26 A). Los tratamientos de 22 °C y 37 °C produjeron plántulas con hojas verdes todo el tiempo, por lo que en la Fig. 26 B no se muestran esos resultados.

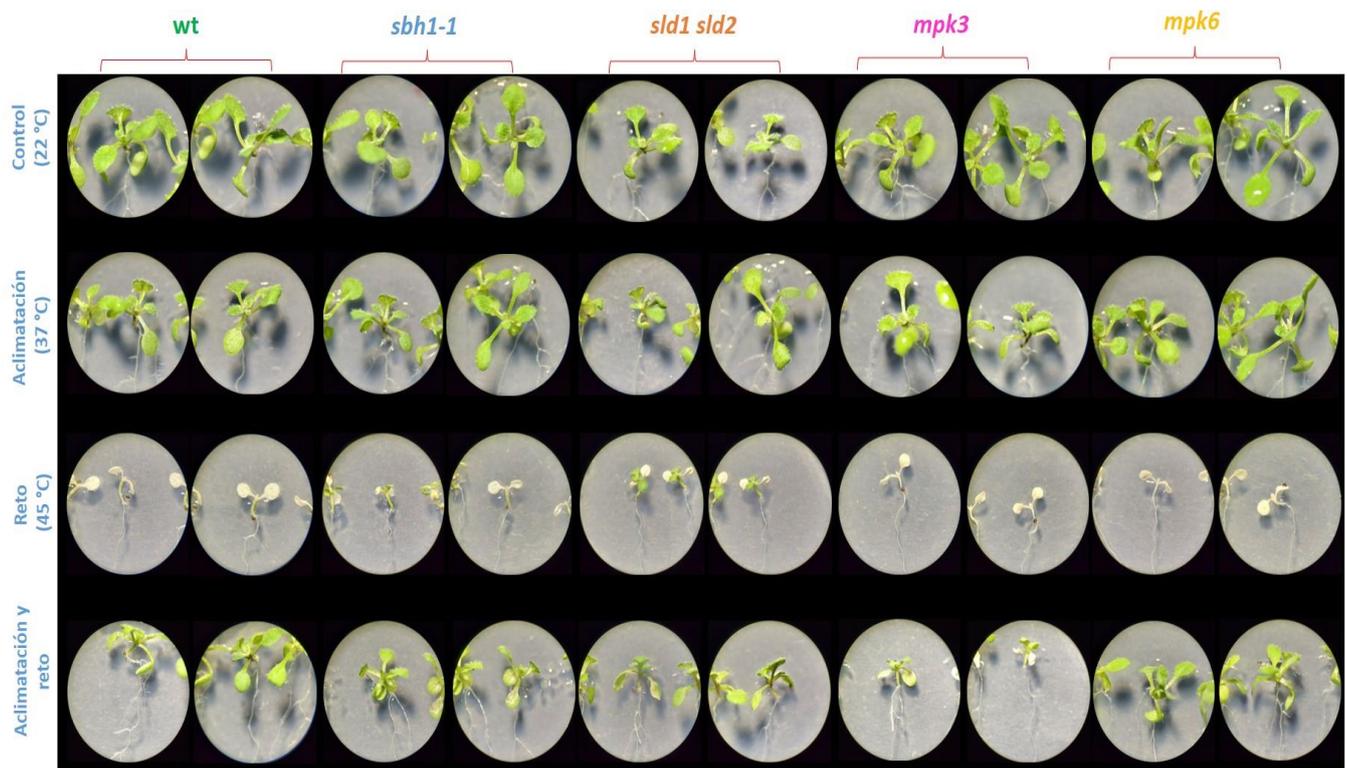
Cuando las plántulas de los 5 genotipos se expusieron a 45 °C, se presentaron cambios en el color de las hojas (Fig. 26 B). Sólo el 8 % de las plántulas del genotipo wt se mantuvo verde, mientras que en los genotipos *sbh1-1* y *sld1 sld2* sólo el 33 % de las plántulas permaneció verde, y en las plántulas que carecen de las MAP cinasas 3 y 6, aproximadamente, sólo el 20 % de plántulas totales se mantuvo verde. Sin embargo, en la combinación de la aclimatación más reto, el color de las hojas se recuperó aproximadamente 7 veces en el genotipo wt, mientras que en los genotipos *sbh1-1* y *sld1 sld2* las plántulas se recuperaron aproximadamente 1.5 veces y en las plántulas de los genotipos *mpk3* y *mpk6*, la recuperación fue cerca de 4 veces.



**Fig. 26.** Efecto de las altas temperaturas en el color de las hojas estimado tres días posteriores a los tratamientos de plántulas wt, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas en posición vertical. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Se procesaron las imágenes de la Fig. 17, haciéndose las observaciones sobre el color de las hojas. A. Se muestra un ejemplo de imagen procesada para la determinación del color de las hojas, considerando el color total de la plántula. B. Longitud de la raíz principal tras la exposición al tratamiento indicado. Se calculó el porcentaje de plántulas verdes con respecto al número total de plántulas expuestas a los tratamientos térmicos, mientras que el porcentaje de plántulas cloróticas se calculó con base en el número de plántulas blancas respecto al número total de plántulas expuestas a los tratamientos térmicos. El número total de individuos por experimento fue de 30-40 (100 %) provenientes de tres replicas biológicas.

### Efecto en el color de las hojas registrados por fotografía en microscopio

Para ver a detalle el cambio de color en las hojas de las plántulas wt, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas verticalmente en los diferentes tratamientos de calor se hizo un registro fotográfico en el estereoscopio (Fig. 27). Se puede observar que las plántulas de todos los genotipos a los 22 °C y 37 °C tienen una morfología similar en la parte aérea, mientras que la exposición a 45 °C por 2 h modificó el tamaño y el color de las plántulas en todos los genotipos, adquirieron un color blanco (clorosis). Sin embargo, cuando las plántulas fueron retadas a una exposición a 45 °C y tuvieron una aclimatación previa, se apreció que las plántulas presentaron una recuperación, viéndose reflejada en la permanencia del color verde de las hojas.



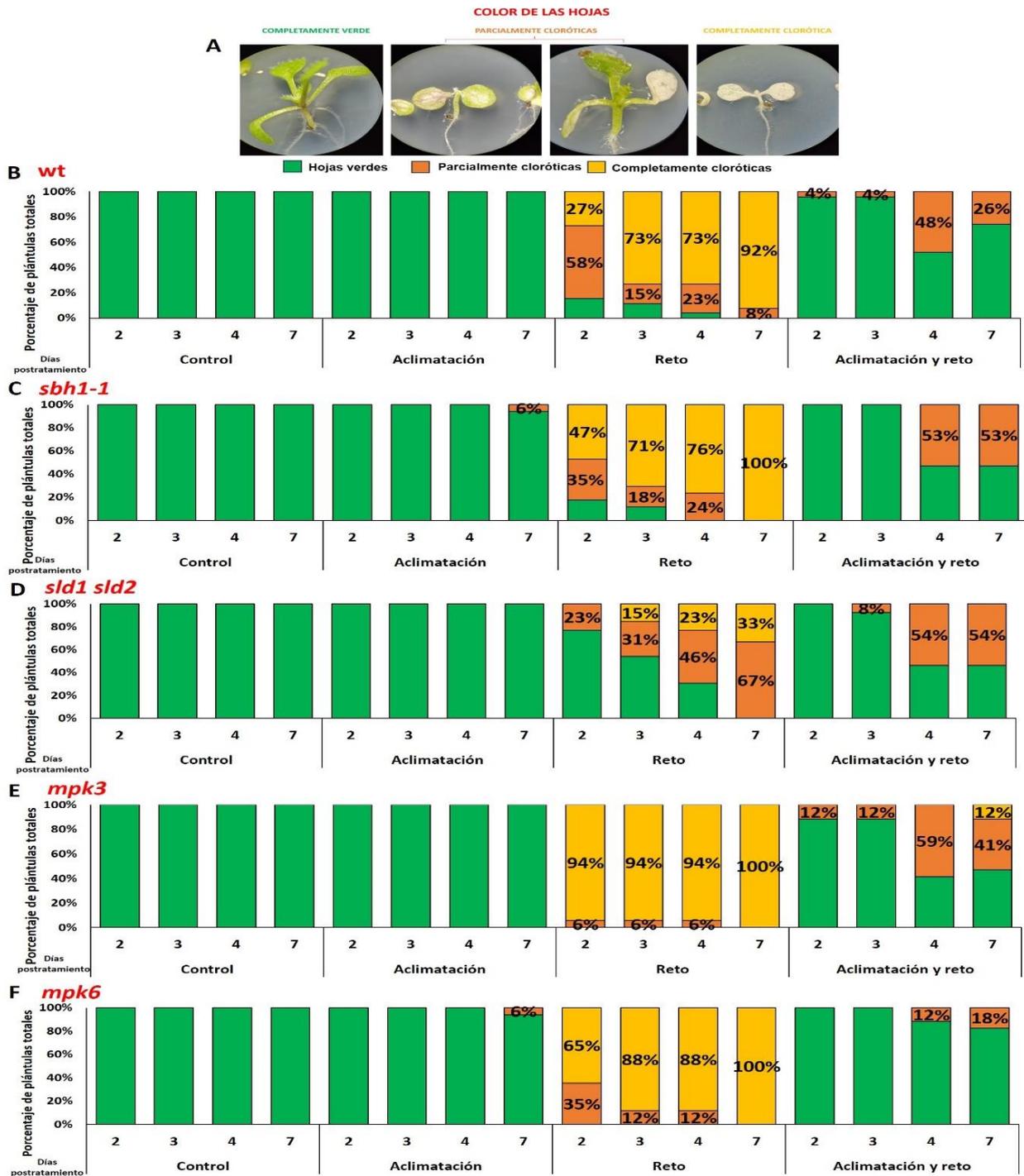
**Fig. 27.** Efecto de las altas temperaturas en el color de las hojas estimado siete días posteriores a los tratamientos de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas en posición vertical por registro fotográfico en estereoscopio. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Se hicieron observaciones de la parte aérea de las plántulas en un microscopio estereoscópico y se tomaron fotografías a una magnificación de 1x, se presentan las fotografías del día 7 postratamiento. Se presentan imágenes representativas de las plántulas de una caja de Petri correspondiente a la segunda réplica biológica. El número total de individuos por experimento fue de 20 provenientes de dos replicas independientes.

Para evaluar la evolución del color de las hojas de los 5 genotipos después de los tratamientos de calor se hizo un seguimiento a los 2, 3, 4 y 7 días postratamiento de las plántulas crecidas verticalmente. Se procesaron las imágenes de la Fig. 27, haciéndose las observaciones sobre el color de las hojas. Se contó y clasificó el número de plántulas cloróticas, parcialmente cloróticas y verdes en el microscopio de disección (Fig. 28 A). A los 22 °C y 37 °C todas las plántulas de los 5 genotipos permanecieron verdes. Sin embargo, la condición de reto (45 °C) cambió el color de las hojas desde el día 2 postratamiento en todos los genotipos; las plántulas *wt* (Fig. 28 B) y *sbh1-1* (Fig. 28 C) presentaron un cambio en el color de las hojas similar a través de los 7 días, pero las plántulas *sld1 sld2* (Fig. 28 D) fueron más resistentes a la temperatura de 45 °C, al día 2 el 77% de plántulas tenían el color verde, al día 3 el 54% de plántulas permanecieron verdes, el día 4 el 31% de plántulas permanecieron verdes y al día 7 el 67 % de plántulas permanecieron parcialmente cloróticas y el 33 % de plántulas totalmente cloróticas. Sin embargo, la mayoría de plántulas *mpk3* (Fig. 28 E) y *mpk6* (Fig. 28 F) se pusieron totalmente cloróticas desde el día 2 postratamiento y no presentaron recuperación en el color.

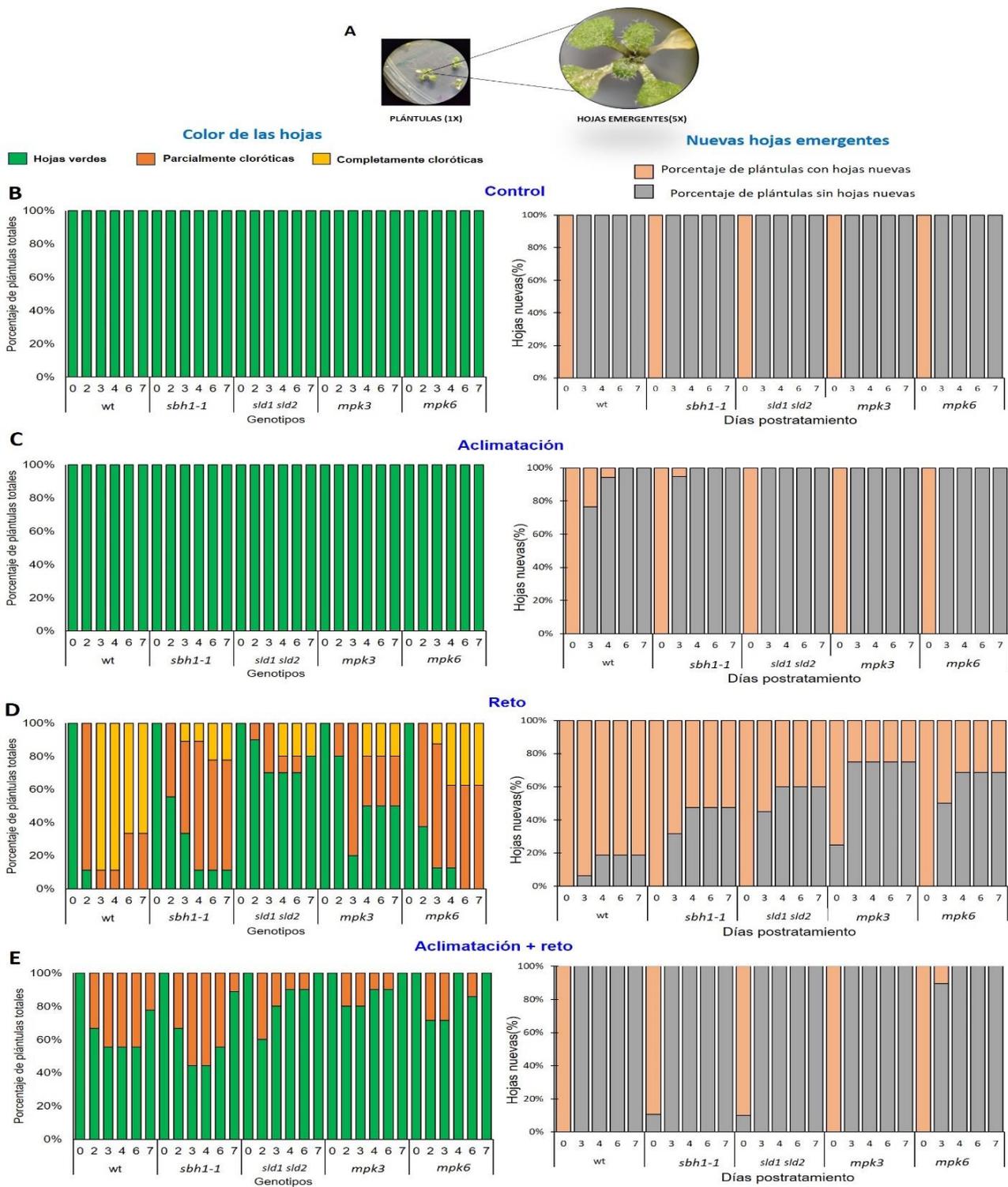
En la condición de aclimatación y reto, el genotipo wt a los días 2 y 3 presentó el 4 % de plántulas cloróticas y fue aumentando la clorosis al 48 % y 26 % a los 4 y 7 días respectivamente. El genotipo *sbh1-1* mantuvo el fenotipo verde hasta el día 3, pero después de este día, aproximadamente el 50 % de plántulas se pusieron parcialmente cloróticas. Las plántulas del genotipo *sld1 sld2* empezaron a cambiar de color desde el día 3 con 8 % de plántulas parcialmente cloróticas y aproximadamente el 50 % de plántulas se pusieron parcialmente cloróticas los días 4 y 7. Las plántulas del genotipo *mpk3* presentaron un 12 % de plántulas parcialmente cloróticas al día 2 y 3, este porcentaje aumentó 5 veces el día 4 postratamiento, pero el día 7 disminuyó la cantidad de plántulas parcialmente cloróticas al 41 %, si bien se observó que el 12 % de plántulas adquirieron una clorosis total. Finalmente, las plántulas sin la enzima MPK6 permanecieron verdes hasta el día 3 pero solo el 12 % cambiaron a plántulas cloróticas los días 4 y 7 postratamiento.

### **Cambios en la parte aérea y crecimiento de hojas emergentes de las plántulas expuestas a tratamiento térmicos (crecimiento horizontal)**

Para entender si las altas temperaturas afectaban el crecimiento de nuevas hojas (emergentes) se hizo un seguimiento en los 5 genotipos a los 1, 3, 4, 5, 6, 7 días postratamiento en plántulas crecidas horizontalmente. Las Figs. 29 B y 29 C muestran el color de las hojas y el número de plántulas con nuevas hojas (emergentes) en los 5 genotipos tanto para 22 °C (control) y 37 °C (aclimatación) respectivamente. La condición de 45 °C (reto) (Fig. 29 D) cambió el color de las plántulas desde el día 3 postratamiento y en los genotipos wt y *sbh1-1* no se observó el surgimiento de nuevas hojas durante 7 días postratamiento, solo una plántula del genotipo *sld1 sld2* generó hojas nuevas, mientras que 4 plántulas del genotipo *mpk3* y 3 plántulas del genotipo *mpk6* produjeron hojas nuevas. En la condición de aclimatación y reto (37 °C y 45 °C), todas las plántulas del genotipo wt y *sbh1-1* presentaron hojas emergentes a partir del día 3 postratamiento (Fig. 29 E). La mitad de las plántulas del genotipo *sld1 sld2* y *mpk6* presentaron hojas nuevas desde el día 1 postratamiento, pero al día 3 todas las plántulas tenían hojas nuevas. Mientras que en las plántulas del genotipo *mpk3*, el 40 % de las plántulas presentaron hojas nuevas el día 1 y el día 3 todas las plántulas presentaron hojas nuevas.



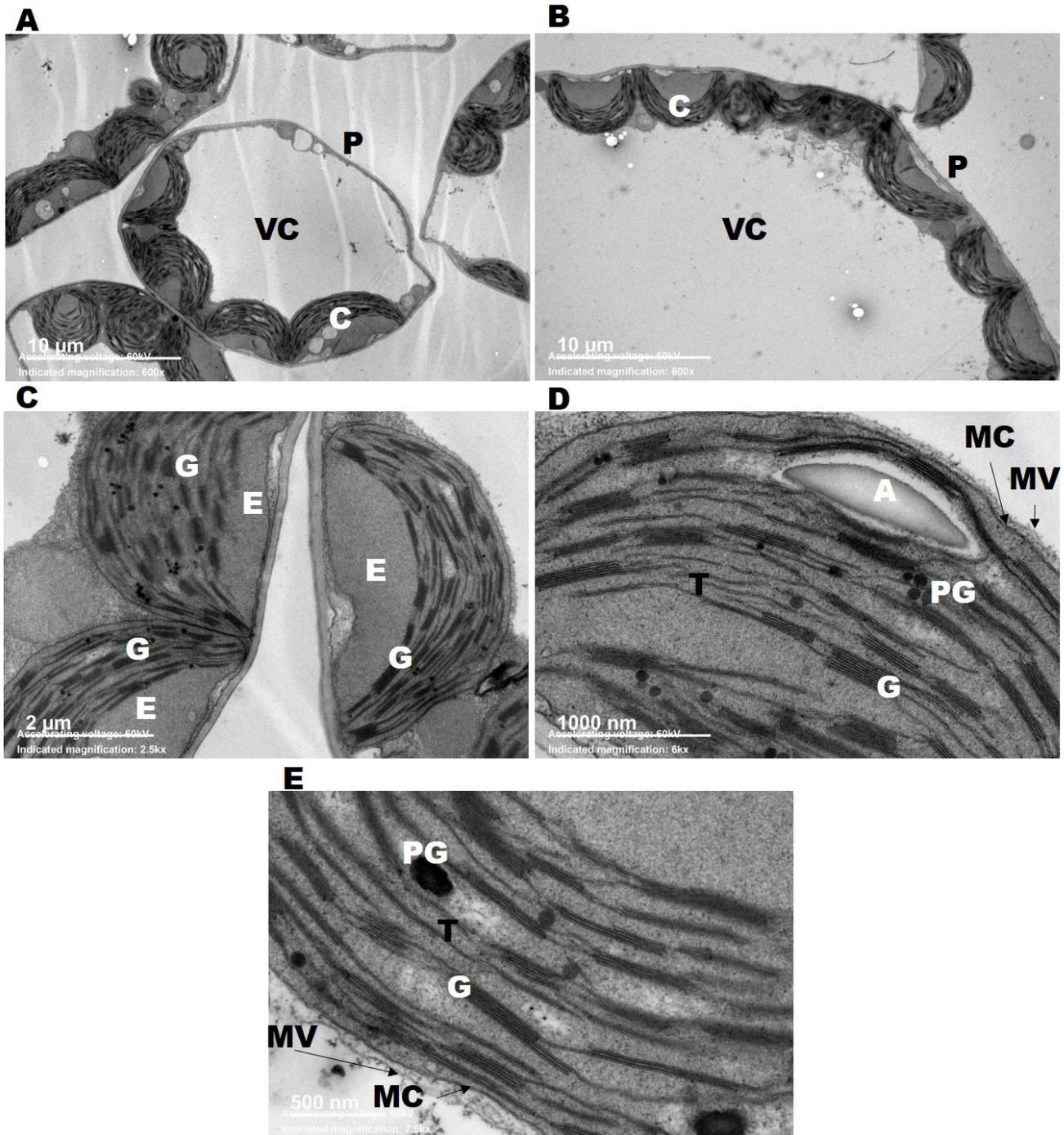
**Fig. 28.** Efecto de las altas temperaturas en la evolución del color de las hojas a diferentes tiempos postratamiento de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas verticalmente. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Se hicieron observaciones de la parte aérea en un microscopio estereoscópico y se registró el cambio en el color de las hojas a lo largo de 7 días postratamiento. Las réplicas independientes fueron dos. A. Representa la estimación del color de las plántulas: si las hojas no tenían un cambio en el color y permanecía verdes se consideraba verde la plántula; si presentaban algunas manchas blancas, o una de las hojas estaba verde y la otra clorótica se consideró la plántula como parcialmente clorótica y si la plántula estaba totalmente blanca se consideró como una plántula clorótica. B. Representa el cambio del color de plántulas *wt* a lo largo de 7 días postratamiento. C. Representa el cambio del color de plántulas *sbh1-1* a lo largo de 7 días postratamiento. D. Representa el cambio del color de plántulas *sld1 sld2* a lo largo de 7 días postratamiento. E. Representa el cambio del color de plántulas *mpk3* a lo largo de 7 días postratamiento. F. Representa el cambio del color de plántulas *mpk6* a lo largo de 7 días postratamiento. El número total de individuos por experimento fue de 15-25 (100 %) provenientes de dos réplicas independientes.



**Fig. 29.** Efecto de las altas temperaturas en la evolución del color de las hojas y en el número de hojas emergentes a diferentes tiempos postratamiento de plántulas wt, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas verticalmente. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos) A. Aparición de las hojas emergentes en la condición de 22 °C (control) en los genotipos wt, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* a lo largo de 7 días postratamiento. B. Aparición de las hojas emergentes en la condición de 37 °C (aclimatación) en los 5 genotipos a lo largo de 7 días postratamiento. C. Aparición de las hojas emergentes en la condición de 45 °C (reto) en los 5 genotipos a lo largo de 7 días postratamiento. D. Aparición de las hojas emergentes en la condición de 37 °C y 45 °C (aclimatación y reto) en los 5 genotipos a lo largo de 7 días postratamiento. El número total de individuos por experimento fue de 15-25 (100 %) provenientes de dos réplicas independientes.

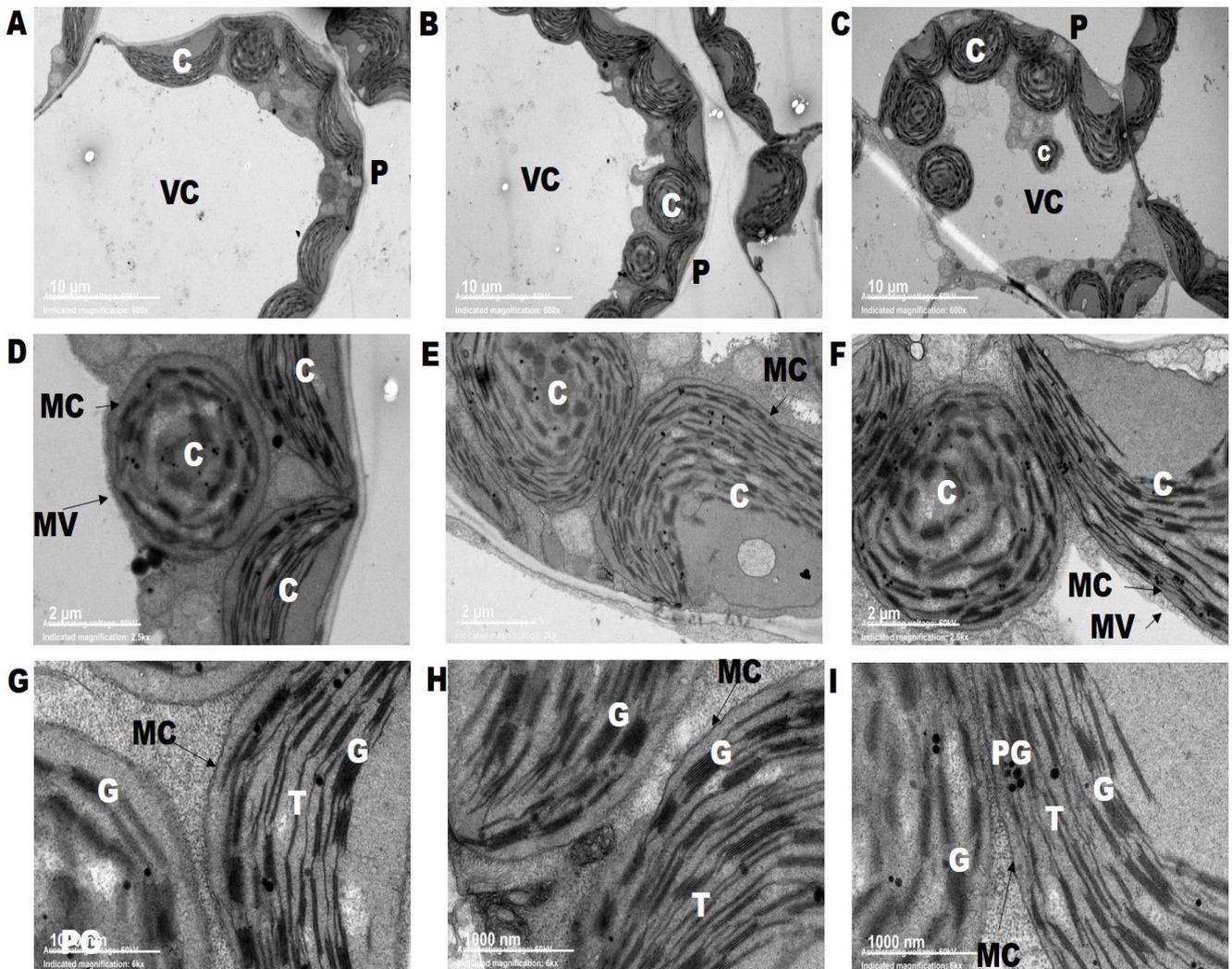
## **Efecto de los tratamientos térmicos en los fenotipos a nivel celular**

Para determinar los efectos de las altas temperaturas a nivel celular en las hojas de *Arabidopsis thaliana*, se utilizó microscopía electrónica de transmisión en un estudio que incluyó solo a las plántulas de *Arabidopsis thaliana* wt expuestas a los cuatro tratamientos térmicos usados en esta tesis. Se usaron microcortes de las hojas para examinar la ultraestructura de las células del mesófilo de las hojas (Fig. 30). En las hojas control o sea tratadas a 22 °C, se observaron células con la morfología típica: células de forma más bien poliédrica rodeadas de una franja que corresponde a la pared celular y una membrana plasmática bordeando el perímetro vecino a la pared celular. Al interior, se observó un gran espacio correspondiente a la vacuola central rodeada por una fina capa de citoplasma conteniendo estructuras identificadas como retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias. En el citoplasma sobresalen por su tamaño los cloroplastos con una forma alargada y una organización membranal muy bien definida en la que los tilacoides están distribuidos en grana unidos por membranas intertilacoidales. El gran tamaño, el número abundante y la estructura típica membranal de los cloroplastos hace que sean las organelas en las que se pueden visualizar mejor los cambios producidos por los insultos ambientales, en nuestro caso, por las altas temperaturas (Figs. 30 A y 30 B).



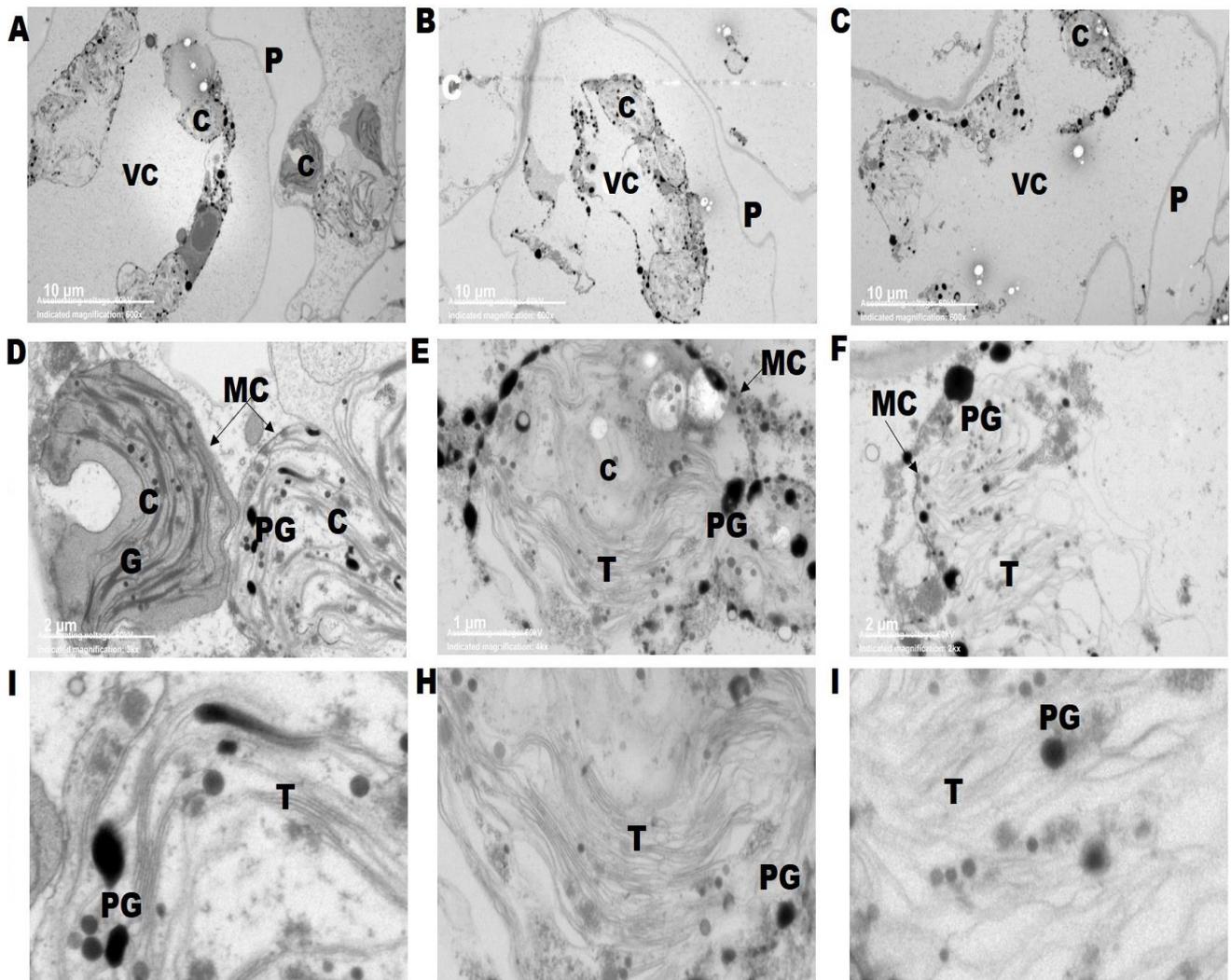
**Fig. 30.** Efecto de la temperatura de 22 °C (control) en la ultraestructura celular de cortes transversales de hoja de *Arabidopsis thaliana* del genotipo wt. Plántulas de seis días se expusieron a 22 °C durante 6 h en oscuridad (como control de las condiciones en las que se exponen a altas temperaturas en oscuridad). Tras esta exposición, hojas de tres diferentes plántulas se fijaron en glutaraldehído al 3 % (v:v) y se procesaron según se describe en Materiales y Métodos. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Jeol 1200 EXII. A, gránulos de almidón; C, cloroplasto; E, estroma; G, grana; MC, membrana del cloroplasto; MV, membrana de la vacuola central externa; P, pared celular; PG, plastoglóbulos; T, membrana tilacoidal intergrana; VC, vacuola central. Las imágenes mostradas son representativas de cortes de dos hojas de plántulas (2 réplicas técnicas independientes) de una réplica biológica.

La aclimatación al calor provocó cambios dramáticos en la estructura del cloroplasto en las plántulas (Fig. 31). Las alteraciones mostradas por las plantas silvestres aclimatadas consistieron en cloroplastos ahora con forma redondeada y con el sistema de membranas tilacoidales ahora organizado en una disposición más bien concéntrica dentro del cloroplasto, observándose una pérdida de parte de los tilacoides (Fig. 31 D). Además, se observó que las células de tipo silvestre interiorizaron algunos de los cloroplastos en la vacuola central (Fig. 31 C).



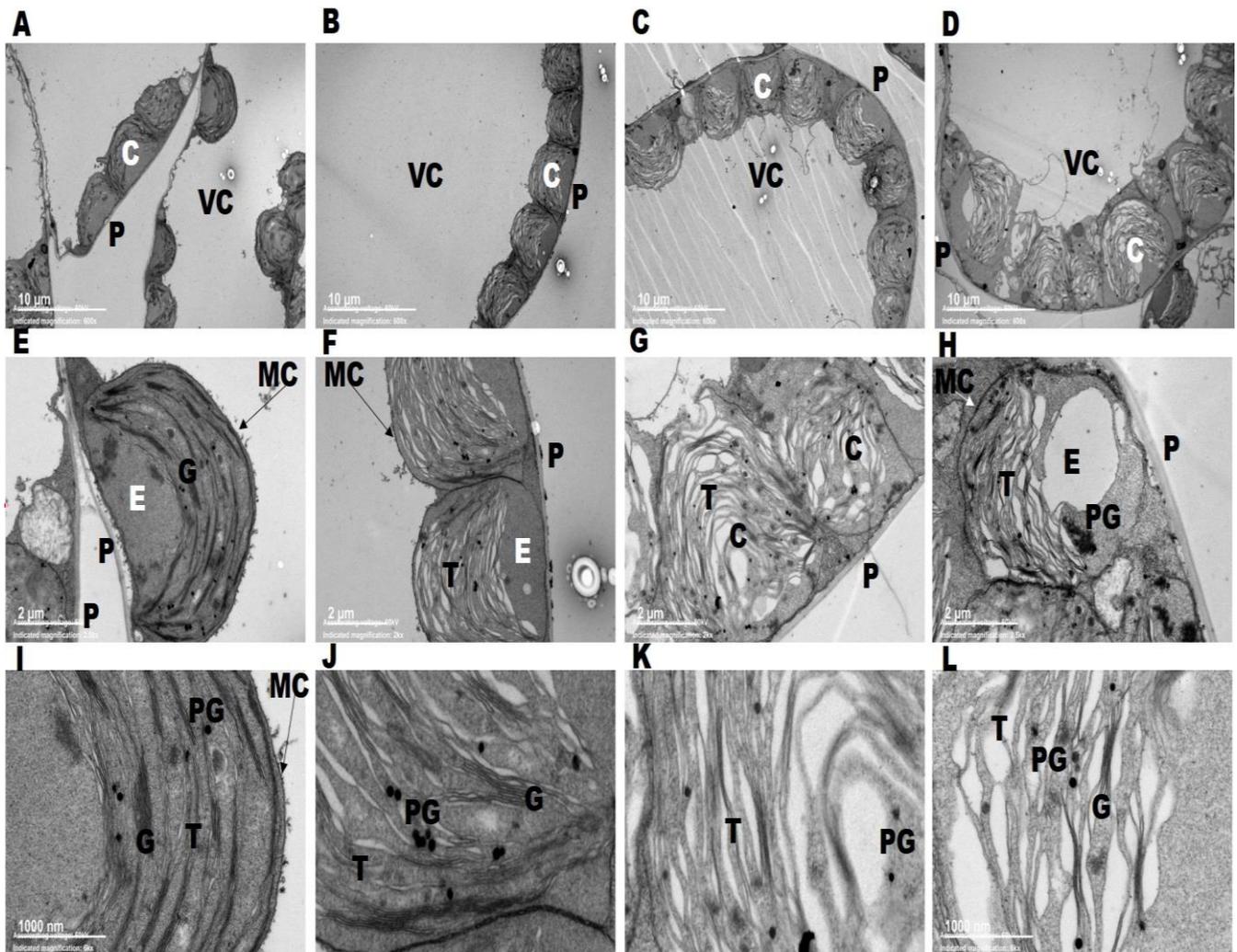
**Fig. 31.** Efecto de la temperatura de 37 °C (aclimatación) en la ultraestructura celular de cortes transversales de hoja de *Arabidopsis thaliana* del genotipo wt. Plántulas de seis días se expusieron a 37 °C durante 2 h y a 22 °C durante 2 h, todo el tiempo en oscuridad. En seguida, hojas de tres diferentes plántulas se fijaron en glutaraldehído al 3 % (v:v) y se procesaron según se describen en Materiales y Métodos. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Jeol 1200 EXII. A, gránulos de almidón; C, cloroplasto; E, estroma; G, grana; MC, membrana del cloroplasto; MV, membrana de la vacuola central externa; P, pared celular; PG, plastoglóbulos; T, membrana tilacoidal intergrana; VC, vacuola central. Las imágenes mostradas son representativas de cortes de dos hojas de plántulas (2 réplicas técnicas independientes) de una réplica biológica.

La Fig. 32 muestra los cambios en la ultraestructura celular en la condición de reto (45 °C) en donde se observan campos con células con grandes espacios vacíos y con estructuras internas agregadas en un interior colapsado y contornos muy irregulares (Figs. 32 A, B). En varias células se aprecian los cloroplastos dentro de la vacuola central (Figs. 32 B, C). La estructura de los cloroplastos se vio enormemente perturbada con la exposición a 45 °C, afectándose profundamente la estructura de los grana, perdiéndose el apilamiento y con los tilacoides formando estructuras como de madejas y sin ningún patrón de organización (Figs, 32 G-I). También en el interior se observó un gran aumento de plastoglóbulos (Figs. 32 A-I).



**Fig. 32.** Efecto de la temperatura de 45 °C (reto) en la ultraestructura celular de cortes transversales de hoja de *Arabidopsis thaliana* del genotipo wt. Plántulas de seis días se expusieron a 45 °C durante 2 h en oscuridad. En seguida, hojas de tres diferentes plántulas se fijaron en glutaraldehído al 3% (v:v) y se procesaron según se describen en Materiales y Métodos. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Jeol 1200 EXII. A, gránulos de almidón; C, cloroplasto; E, estroma; G, grana; MC, membrana del cloroplasto; MV, membrana de la vacuola central externa; P, pared celular; PG, plastoglóbulos; T, membrana tilacoidal intergrana; VC, vacuola central. Las imágenes mostradas son representativas de cortes de dos hojas de plántulas (2 réplicas técnicas independientes) de una réplica biológica.

En contraste, las plántulas que fueron retadas (45 °C), pero que previamente fueron expuestas a la aclimatación (37 °C), presentaron una morfología celular más cercana a la normal, en la que los cloroplastos estaban más cerca de la membrana celular y en la zona del citosol y ninguno interiorizado a la vacuola (Figs. 33 A-C). Sin embargo, los cloroplastos presentaron una forma semicircular, aún no alargada pero ya no esférica y con membranas tilacoidales aún desorganizadas y con una pequeña cantidad de plastoglóbulos (Fig. 33 D-J). Algunos cloroplastos ya presentan granas con cierta estructuración típica.



**Fig. 33.** Efecto de la temperatura de 37 ° C y 45 ° C (aclimatación y reto) en la ultraestructura celular de cortes transversales de hoja de *Arabidopsis thaliana* del genotipo wt. Plántulas de seis días se expusieron consecutivamente a 37 °C durante 2 h, a 22 °C durante 2 h y a 45 °C durante 2 h, en todo el tratamiento estuvieron en oscuridad. En seguida, hojas de tres diferentes plántulas se fijaron en glutaraldehído al 3% (v:v) y se procesaron según se describen en Materiales y Métodos. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Jeol 1200 EXII. A, gránulos de almidón; C, cloroplasto; E, estroma; G, grana; MC, membrana del cloroplasto; MV, membrana de la vacuola central externa; P, pared celular; PG, plastoglóbulos; T, membrana tilacoidal intergrana; VC, vacuola central. Las imágenes mostradas son representativas de cortes de dos hojas de plántulas (2 réplicas técnicas independientes) de una réplica biológica.

## Otros resultados

Inicialmente, el objetivo principal de este trabajo de tesis era el determinar la expresión de genes de proteínas de choque de calor en los cinco genotipos que hemos usado bajo la influencia de los tratamientos térmicos ya presentados. Esta parte fue desarrollada desde el principio del trabajo y paralelamente se fue describiendo también la parte fenotípica (Fig. 11)

Se avanzó de manera efectiva en la parte de la determinación de transcritos, ya que se tuvo un aprendizaje sólido en el aislamiento de RNA, síntesis de cDNA, PCR en tiempo real, diseño y calibración de oligonucleótidos, manejo y establecimiento de las condiciones para amplificación de genes por qPCR (ver tanto Anexos de Materiales y Métodos como de Resultados). Por lo anterior y por el tiempo y esfuerzos invertidos que han redundado en la formación del ejecutor de esta tesis, se consideró la inclusión de los resultados de esta parte como Anexos al final de la tesis.

## 8. DISCUSIÓN

Los aumentos globales recientes de temperatura, mismos que amenazan la productividad alimentaria de la población del planeta, afectan negativamente el crecimiento, productividad y rendimiento de los cultivos (Bita et al. 2013). Lo anterior hace que sea muy relevante el conocimiento sobre los mecanismos de sensibilidad y tolerancia de las plantas a las altas temperaturas. El presente trabajo de tesis se enmarca en este contexto.

Tras la activación de la respuesta al choque de calor, que se manifiesta ante el incremento notable de temperatura, se produce una activación de diversas moléculas señalizadoras como algunos esfingolípidos, los cuales también podrían contribuir a remodelar la membrana plasmática para disminuir su fluidez. Dentro de los esfingolípidos señalizadores en otros tipos de estrés se han reportado a las bases de cadena larga di y trihidroxiladas y las ceramidas (Huby et al. 2020). También se ha descrito que la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) MPK3 y MPK6 participan en la señalización como parte de la respuesta a las altas temperaturas (Evrard et al. 2013). No obstante, no se han establecido los eventos en los que participan los esfingolípidos y las MPK3 y MPK6 en mecanismos de tolerancia a altas temperaturas ya que los procesos de aclimatación a altas temperaturas no han sido profusamente abordados en la literatura.

### **Efectos de los tratamientos térmicos en los diferentes genotipos a nivel de plántula completa**

#### **Efectos de la aclimatación (37 °C) a altas temperaturas**

Si bien *Arabidopsis thaliana* es una herbácea de clima templado y se desarrolla a 22 °C, fue sorprendente, que por lo menos en las condiciones de laboratorio, si bien son óptimas para el crecimiento de esta especie, un aumento de 15 °C en la temperatura no tuvo ningún efecto visible en el crecimiento de la roseta, el color de las hojas, el número de hojas emergentes, la longitud de la raíz primaria y el número de pelos radiculares, comportamiento observado tanto en las plántulas silvestres como en las mutantes. Este resultado se apreció desde el primer día postratamiento hasta aproximadamente el día 20 postratamiento. Lo anterior implica que la falta de la hidroxilasa SBH1, las desaturasas SLD1 y SLD2 y las MAP cinasas MPK3 y MPK6, no alteró la tolerancia de las plántulas a 37 °C. Esta tolerancia por tanto se expresó de forma espontánea tras el tratamiento a 37 °C por 2 h, lo que significa que es una tolerancia basal (Norris et al. 2000).

Atendiendo al parámetro del número de raíces laterales, este se vio disminuido en las plántulas silvestres, pero no en las mutantes a los tres días postratamiento según el análisis de imágenes directas, sugiriendo que tanto los esfingolípidos trihidroxilados, los esfingolípidos

insaturados y las MPK3 y MPK6, contribuyen a la manifestación del número normal de raíces laterales. Sin embargo, bajo el microscopio estereoscópico, un seguimiento a los 2, 4, 6 y 7 días permitió visualizar que los genotipos *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* alcanzaron un número de raíces laterales similar a los observados a 22°C. Por tanto, la aclimatación (37 °C) no fue perjudicial para el desarrollo de raíces laterales en estas mutantes, sólo en las plántulas wt y *sbh1-1*.

Comparando estos efectos de la temperatura de 30 °C, con los obtenidos en otras especies, se encuentra una gran diversidad. Se ha reportado que 30 °C afectan de manera diferente la formación de raíces en dos especies de altramuces. Las raíces iniciales se caracterizaron por una mala orientación espacial y un crecimiento reducido de la raíz a 30 °C en comparación con su crecimiento normal a 25 °C. Asimismo, la longitud de las raíces primarias de los altramuces y el número de raíces laterales disminuyó (Gaveliené et al. 2022). Mientras que, en las plantas adultas de maíz, el aumento de la temperatura ralentizó el crecimiento de las raíces laterales para promover el desarrollo de raíces axilares largas y así alcanzar el agua de las capas más profundas del suelo. En papa, el aumento de temperatura provocó la inhibición de la iniciación y elongación de las raíces adventicias y laterales (Calleja-Cabrera et al. 2020).

### **Efectos del reto (45 °C)**

En cuanto a los fenotipos de la raíz, se encontró un 80 % de inhibición de crecimiento de la raíz primaria en todos los genotipos estudiados, lo que estableció claramente que la raíz fue intolerante a 45 ° C, verificado hasta los 7 días de seguimiento postratamiento. La única excepción fue la mutante *sld1 sld2*, la cual a los 4 días postratamiento presentó primordios de raíces laterales que fueron claramente visibles a los 7 días. Este resultado indica que la falta de esfingolípidos con bases de cadena larga desaturadas o el exceso de bases de cadena larga saturadas propicia la formación de raíces laterales, lo cual implica que estos compuestos no permiten el desarrollo de estas raíces en las plántulas silvestres. Lo anterior permite sugerir que, siendo los esfingolípidos muy abundantes en las membranas plasmáticas, y que, siendo las especies desaturadas aquellas que conceden fluidez a las membranas (Cano et al. 2021), quizás la raíz requiera de membranas más rígidas a altas temperaturas. Sin embargo, tampoco se puede descartar un papel señalizador de las bases de cadena larga desaturadas, ya que se ha reportado a la fitoesfingosina-P, una base de cadena larga desaturada como un segundo mensajero en la respuesta a estrés por frío en células en suspensión de *Arabidopsis* (Dutilleul et al. 2012).

Cuando las plántulas crecidas en posición vertical fueron sometidas a una temperatura de 45 ° C durante 2 h (reto), todas, silvestres y mutantes mostraron señales de estrés,

especialmente la silvestre, pues a los 2 o 3 días postratamiento, la roseta ya no se desarrolló, las hojas permanecieron pequeñas y se volvieron cloróticas, además de mostrar una disminución en la longitud de la raíz principal. Sin embargo, en crecimiento horizontal, las plántulas *sld1 sld2* y *mpk3* manifestaron una resistencia a la clorosis. Lo anterior indica que la clorosis de las hojas puede estar influenciada o bien por el espacio en el que se desarrolla la raíz y/o por la exposición de la roseta a la luz, ya que ambos factores son diferentes en las cajas en posición vertical y horizontal. De cualquier manera, lo más importante es que estas condiciones permiten evidenciar la tolerancia a 45 ° C de las plántulas que carecen de las desaturadas de la base de cadena larga de los esfingolípidos y de la MPK3. Esto implica que la presencia de estas enzimas en las plantas silvestres puede contribuir a la susceptibilidad a esta temperatura extrema como parte de los mecanismos de tolerancia basal. Es importante notar que este es el primer indicio de que dos de los genes que estudiamos están involucrados en este proceso. En cuanto al número de hojas emergentes, los genotipos interesantes fueron *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*, por su efecto tolerante a 45 ° C, en el cual se observó en la emergencia de hojas. Nuevamente, bases de cadena larga desaturadas y MPK3 y MPK6 pueden ser mediadores de respuesta en el desarrollo de hojas a altas temperaturas, si bien, no hay reportes al respecto.

Hay un número limitado de estudios que indican que el metabolismo de los esfingolípidos está involucrado en el estrés por calor, reportándose que las BCL fosforiladas contribuyen a la tolerancia al estrés por calor en un cultivo de células de Arabidopsis. Asimismo, la expresión de AtSLD1 disminuyó significativamente en respuesta a una combinación de una ola de calor y sequía, imitando los cambios globales en el clima (Huby et al. 2019). Fabri et al. (2020) mencionan que el estrés por calor en hongos induce la biosíntesis de esfingolípidos. Como resultado, los niveles de la mayoría de las especies de esfingolípidos aumentan, los intermediarios de la vía de biosíntesis realizan varias funciones de señalización que impactan en diferentes procesos, como la interrupción del ciclo celular, la proteólisis y la regulación de la traducción.

En Arabidopsis y soya, la falta de pelos radiculares produce una reducción en la capacidad de adaptación al calor, lo que sugiere un papel clave de los pelos radiculares en la adaptación a corto plazo a las altas temperaturas (Calleja-Cabrera et al. 2020). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron alguna diferencia que pudiera deberse a las altas temperaturas.

### **Efectos de la aclimatación ante el reto (37 y 45 °C, respectivamente)**

La termotolerancia adquirida se refiere a la capacidad de las plantas para adquirir tolerancia a temperaturas letales a través de un proceso previo de adaptación (Norris et al. 2000). El tratamiento de aclimatación fue exitoso para todos los genotipos en cuanto al crecimiento de

la roseta y el color verde de las hojas, ya que cuando fueron retadas: a) mostraron hojas emergentes verdes y sanas, b) tuvieron una ligera disminución en el tamaño de la roseta comparado con el de sus controles a 22 °C, c) el color verde de las hojas cotiledóneas se recuperó (aunque en diferente magnitud, a los 4 y a los 7 días). Confirmándose con estos resultados que la aclimatación eliminó los efectos negativos del reto. Sin embargo, la aclimatación más exitosa en cuanto a las rosetas y el color se observó en el genotipo carente de MPK6. Esto sugiere que la MPK6 en las plantas silvestres es un regulador negativo en el proceso de recuperación tras la aclimatación.

Se sabe que el papel de MAP cinasas es participar en la respuesta a múltiples estreses. Evrard et al. (2013) demuestra que la MPK6 en *Arabidopsis* se activa por el estrés por calor y se dirige al factor de transcripción HsfA2, lo que resulta en la formación de complejos y la posterior regulación de la respuesta al estrés por calor. Estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la respuesta al estrés térmico en las plantas y pueden tener implicaciones para el desarrollo de estrategias para mejorar la termotolerancia de las plantas. Asimismo, MPK6 ha estado implicada en otras formas de muerte celular programada como es el caso de la respuesta de defensa frente a patógenos, que, entre otros procesos, compromete la estructura del cloroplasto (Saucedo et al. 2011). Por otra parte, MPK3 y MPK6 son necesarios para regular cambios morfológicos por un estrés por frío (Saucedo et al. 2021). Lo anterior indica que así en el estrés por baja temperatura como por alta, las cascadas de MAPKs involucran a la MPK3 y la MPK6. Será muy interesante analizar qué otros procesos celulares relacionados con MPKs están afectados por las altas temperaturas.

En contraste con el efecto a 37 ° C, los 45 ° C del reto inhibieron el alargamiento de la raíz primaria. Sin embargo, este efecto fue parcialmente mitigado por la aclimatación, siendo particularmente notorio en las plántulas de las líneas *sld1 sld2*, *sbh1-1* y *mpk3*. Nuestros resultados que sugieren que las respectivas enzimas pueden ser reguladores negativos del crecimiento de la raíz primaria durante el proceso de aclimatación más reto a los tres días postratamiento.

En el número de raíces laterales expuestas al proceso de aclimatación más reto, se observó en todos los genotipos que la condición de reto fue tan agresiva (inhibición de la formación del número de raíces laterales), que la aclimatación no tuvo un efecto positivo observable sino hasta los 4 y 7 días postratamiento. Lo anterior sugiere que el proceso de formación de raíces laterales es particularmente sensible a las altas temperaturas. Esto es muy interesante ya que revela que los procesos de absorción de nutrientes por raíces laterales son severamente afectados por las altas temperaturas, lo cual puede afectar el desarrollo total de la planta.

Se sabe que la respuesta de los cloroplastos a las elevaciones de temperatura implica cambios en su estructura y composición, lo que puede afectar su función en la fotosíntesis. Paul et al. (2020) mencionan que un solo evento de estrés por calor puede resultar en una reducción del rendimiento fotosintético y del contenido de clorofila en plantas de tipo silvestre, pero tratamientos repetitivos de estrés por calor pueden conducir a la aclimatación y a un mayor grado de no-estrés.

### **Efectos de los tratamientos térmicos en las plántulas wt a nivel celular**

Las condiciones térmicas extremas pueden influir en la ultraestructura celular y, en particular, en la morfología y función de los cloroplastos, que desempeñan un papel fundamental en la fotosíntesis y, por lo tanto, en la capacidad de la planta para sobrevivir y crecer. Las observaciones de las hojas control tratadas a 22°C proporcionaron una referencia valiosa para las condiciones normales de crecimiento de las plántulas. Se identificaron células con una morfología típica, incluyendo la presencia de una vacuola central, los cloroplastos sobresalieron por su tamaño, número y organización membranal definida, lo que los convierte en marcadores notables de los cambios causados por las altas temperaturas.

### **Efectos de la aclimatación (37 °C)**

En las plántulas aclimatadas (37 °C), se observaron cloroplastos con una forma redondeada y una organización tilacoidal concéntrica, además de una internalización de algunos cloroplastos en la vacuola central y alteraciones en la organización de los tilacoides. Estos cambios indican una respuesta al estrés térmico, que no pueden considerarse como respuesta de estrés o de adaptación al estrés.

Saucedo et al. (2021) demostraron que la aclimatación al frío conduce a alteraciones en la ultraestructura de los cloroplastos y los sistemas de tilacoides en las plantas, y que las MPK3 y MPK6 desempeñan un papel crucial en la regulación de estos cambios morfológicos. Además, se sugiere que MPK6 está involucrada en la vacuolización de los cloroplastos dañados durante la aclimatación al frío y en el mantenimiento de la arquitectura de la membrana tilacoidal. Estos resultados revelan que la función, la arquitectura y el recambio de los cloroplastos, así como la plasticidad de la membrana tilacoide, son determinantes en la tolerancia a la congelación de *Arabidopsis*, en la que están implicados MPK3 y MPK6. Por lo que es importante determinar si también lo es en los procesos de aclimatación al calor.

### **Efectos del reto (45 °C)**

En contraste, las plantas expuestas directamente a 45°C sin aclimatación previa mostraron cambios drásticos en la morfología celular. Las células se colapsaron y mostraron contornos irregulares, los cloroplastos se vieron gravemente afectados, perdiendo la organización de

sus granas y adoptando una estructura caótica. Además, se notó un aumento significativo en la cantidad de plastoglóbulos en el citoplasma.

Se han estudiado los cambios ultraestructurales en las hojas de trigo después de la exposición a tratamientos de sequía y altas temperaturas, tanto individualmente como en combinación, en dos variedades de trigo: una tolerante a la sequía (Katya) y una susceptible a la sequía (Sadovo). Se observó que los cloroplastos y las mitocondrias se vieron afectados. Se observó un aumento significativo en el tamaño y el número de plastoglóbulos. Esto podría relacionarse con el papel protector de los plastoglóbulos en condiciones de estrés, ya que ayudan a prevenir daños oxidativos en el aparato fotosintético celular (Grigороva et al. 2012). Asimismo, Espinoza et al. (2021) mostraron cambios específicos en la composición de proteínas y prenilípidos de los plastoglóbulos bajo estrés de luz. Una estrategia fue la de promover la formación de plastoglóbulos que parecen facilitar la adaptación al estrés dentro de los cloroplastos.

### **Efectos de aclimatación y reto (37 y 45 °C)**

No se observó la internalización de los cloroplastos en la vacuola, lo que contrastó con la respuesta observada en las plántulas no aclimatadas. Sin embargo, es importante destacar que, a pesar de esta adaptación parcial al estrés térmico, los cloroplastos en las plántulas aclimatadas aún mostraban cambios significativos en comparación con las condiciones normales de crecimiento. Los cloroplastos ahora presentaban una forma esférica en lugar de semicircular, lo que indica una cierta adaptación a las condiciones de calor, pero aún no una recuperación completa de la morfología normal. Además, las membranas tilacoidales seguían estando desorganizadas, y se observó la presencia de una pequeña cantidad de plastoglóbulos, lo que sugiere que el estrés térmico persistente aún afecta la estructura y función de estos orgánulos. Sin embargo, integralmente, los cloroplastos de las plántulas aclimatadas y retadas estaban más cerca del fenotipo de los controles que del de las retadas. Estos hallazgos respaldan la idea de que la aclimatación previa al calor puede mejorar la resistencia de las plantas al estrés térmico, permitiendo una morfología celular más típica en comparación con las plantas no aclimatadas. Sin embargo, también revelan que la adaptación a temperaturas extremadamente altas sigue siendo un desafío y que los cloroplastos, a pesar de su capacidad de respuesta, aún experimentan cambios en su ultraestructura bajo estrés térmico.

Estos resultados indican que las altas temperaturas tienen un impacto considerable en la ultraestructura celular de *Arabidopsis thaliana*, con un efecto especialmente pronunciado en los cloroplastos. Lo anterior tiene implicaciones importantes para la adaptación de las plantas al cambio climático y la búsqueda de estrategias para mejorar su resistencia a las condiciones ambientales extremas. La observación de cambios en los cloroplastos destaca su papel

crucial en la respuesta de la planta al estrés térmico y sugiere que la aclimatación previa puede ser una estrategia efectiva para mitigar algunos de estos efectos adversos.

Las temperaturas de 22°C, 37°C y 45°C se utilizaron para explicar la termotolerancia en las plantas porque representan distintos grados de estrés térmico que las plantas pueden encontrar durante el transcurso de un día típico y demostrar cómo las plantas afrontan y se adaptan a los cambios de temperatura. Las temperaturas en el rango de 22°C, normalmente, se alcanzan inmediatamente después del amanecer, y cerca del atardecer. La radiación solar es menos intensa durante estas horas, lo que resulta en condiciones más frías. Asimismo, las nubes pueden bloquear la radiación solar, lo que evita que la temperatura aumente tanto como lo haría en un día despejado. Además, en la noche, las nubes pueden actuar como una manta, atrapando el calor y evitando que la temperatura descienda demasiado y el viento puede influir en la temperatura al dispersar el aire caliente y llevar aire más fresco.

Mientras que, durante el medio día, las temperaturas de 37°C pueden ser comunes en los meses de verano, cuando la radiación solar está en su apogeo y el calor se acumula en la superficie terrestre. Sin embargo, las temperaturas extremadamente altas de 45°C generalmente se observan en áreas con climas extremadamente cálidos, como en el norte de México, o durante olas de calor extremas. Estas temperaturas severas generalmente ocurren cuando la intensidad del calor alcanza su punto máximo poco antes de que se ponga el sol. La capacidad de las plantas para tolerar y adaptarse a altas temperaturas, como 37°C y 45°C, se denomina termotolerancia. Para hacer frente al estrés por calor, las plantas termotolerantes han desarrollado mecanismos de adaptación que permiten a los organismos soportar altas temperaturas y, en ciertos casos, prosperar en ellas.

Además, Sedaghatmehr et al. (2016) demostraron que el genotipo silvestre de *A. thaliana* adquiría termotolerancia cuando la temperatura aumentaba gradualmente, es decir, primero se exponían a 37°C durante 90 min, luego se recuperaban a 22°C durante 90 min, y luego a temperaturas más altas, temperaturas de 44°C durante 45 min. En comparación con las plantas que no fueron sometidas a un aumento progresivo de temperatura, la expresión de HSP21 en las plantas fue mayor al final de este procedimiento, permitiendo la recuperación y mayor tolerancia a la nueva exposición a 44 °C durante 90 min. Estos hallazgos demuestran claramente el papel de las HSP en el desarrollo de la tolerancia al calor en *A. thaliana*.

Nosotros propusimos este modelo para saber cómo responden las plantas a distintos grados de temperatura, desde condiciones ideales hasta estrés por calor agudo y un estrés extremo, lo cual es fundamental en un entorno de cambio climático cuando se esperan eventos climáticos extremos.

## 9. CONCLUSIONES

### Conclusión general

Los esfingolípidos trihidroxilados y saturados, así como MPK3 y MPK6, participan en la respuesta a las altas temperaturas dependiendo del órgano de la planta y de la intensidad de la temperatura.

### Conclusiones particulares

- El diseño experimental utilizado permitió evidenciar los efectos producidos en las plántulas de los 5 genotipos estudiados por condiciones de aclimatación a altas temperaturas y de reto con temperaturas aún más altas.
- La aclimatación a 37 °C no resultó en características fenotípicas deletéreas que fueran visibles en ninguno de los genotipos, indicando una inesperada resistencia de *Arabidopsis* a esta alta temperatura.
- De acuerdo con los resultados con la línea *sld1 sld2* expuesta a 45 °C, en la que se presentó un mayor número de raíces laterales, hojas emergentes y resistencia a la clorosis, en una planta silvestre, las bases de cadena larga desaturadas son un factor negativo para el desarrollo de estas tres características fenotípicas. Esto sugiere que los esfingolípidos saturados participan en una termotolerancia basal a altas temperaturas (45 °C).  
Cuando este genotipo se expuso a la aclimatación a 37 °C más el reto a 45 °C, la recuperación en el crecimiento de la raíz primaria reveló que los esfingolípidos saturados son importantes para este efecto, el cual no se presentaría en las plantas silvestres, en donde los esfingolípidos desaturados actuarían de manera negativa en el desarrollo de la raíz. Esto sucedería en condiciones de una preexposición a una alta temperatura, sugiriendo que esto es parte de la expresión de una termotolerancia adquirida.
- En cuanto con los resultados con la línea *sbh1-1* a 37 °C, en la que se presentó una disminución en las raíces laterales, probablemente debido a un aumento en bases de cadena larga dihidroxiladas o la disminución en trihidroxiladas, la sugerencia es que los esfingolípidos trihidroxilados, que son mayoritarios en la silvestre, participan en el desarrollo del número de raíces laterales (37 °C).  
Cuando este genotipo se expuso a la aclimatación a 37 °C más el reto a 45 °C, la recuperación en el crecimiento de la raíz primaria reveló que los esfingolípidos trihidroxilados son importantes para este efecto, el cual no se presentaría en las plantas silvestres, en

donde los esfingolípidos trihidroxilados actuarían de manera negativa en el desarrollo de la raíz. Esto sucedería en condiciones de una preexposición a una alta temperatura, sugiriendo que esto es parte de la expresión de una termotolerancia adquirida.

- En la línea *mpk3* expuesta a 45 °C, la ausencia de MPK3 permitió observar la recuperación del color de las hojas y el número de hojas emergentes. Esto implica que la MPK3 es un factor negativo en la expresión de estas dos características en las plantas silvestres, como parte de los eventos de termotolerancia basal.

Cuando este genotipo se expuso a la aclimatación a 37 °C más el reto a 45 °C, la recuperación en el crecimiento de la raíz primaria reveló que la MPK3 es importante para este efecto, el cual no se presentaría en las plantas silvestres, en donde la MPK3 actuaría de manera negativa en el desarrollo de la raíz. Esto sucedería en condiciones de una preexposición a una alta temperatura, sugiriendo que esto es parte de la expresión de una termotolerancia adquirida.

- En la línea *mpk6* expuesta a 45 °C, la ausencia de MPK6 permitió observar la recuperación del número de hojas emergentes. Esto implica que la MPK6 es un factor negativo en la expresión de esta característica en las plantas silvestres, obstaculizando mecanismos que contribuyan a la expresión a una termotolerancia basal.
- La ultraestructura celular destacó la alta sensibilidad de los cloroplastos de las plantas silvestres a las altas temperaturas tanto a 37 °C y 45 °C. Revelando que puede haber diferencias a nivel fenotípico celular que no se manifiestan de manera visible.
- El tratamiento de aclimatación utilizado, reveló que este proceso opera también a nivel de la estructura del cloroplasto, haciéndolo partícipe del mecanismo de protección frente al estrés térmico

## 10. PERSPECTIVAS

- Observación de la ultraestructura celular de plántulas de los genotipos *sbh1-1*, *sld1*, *sld2*, *mpk3* y *mpk6* expuestos a condiciones de aclimatación, reto y de aclimatación más reto.
- Determinación de la expresión recíproca de MPK3 y MPK6 en términos de proteína y de fosforilación.
- Determinación de especies reactivas de oxígeno.
- Obtener fracciones de RNA total con mayor pureza.
- Encontrar otro gen de referencia para la técnica de PCR cuantitativa, que se pueda usar en los tratamientos de alta temperatura.
- Determinar los niveles de transcritos de los genes de las proteínas HSP70-4, HSP70-5, HSP101 y HSFA2 empleando PCR cuantitativa en tiempo real y de genes que participan en la vía de síntesis de los esfingolípidos.

## 11.REFERENCIAS

1. Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P. (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth Res.* 98, 541–550
2. Barnabás B, Jäger K, Fehér A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* 31, 11–38.
3. Bitá CE, Gerats T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front Plant Sci.* 4, 273.
4. Calleja J, Boter M, Oñate L, Pernas M. (2020). Root growth adaptation to climate change in crops. *Front Plant Sci.* 11, 544.
5. Cano DL, Carmona L, Morales F, Ramírez J, Cahoon E, Gavilanes M. (2021). Plasma membrane fluidity: an environment thermal detector in plants. *Cells* 10. 2778.
6. Carmona L, Cahoon RE, Gasca J, González A, Vera R, Treviño V, Cahoon EB, Gavilanes M. (2021). Plasma and vacuolar membrane sphingolipidomes: composition and insights on the role of main molecular species. *Plant Physiol.* 186, 624–639.
7. Chatterjee B, Puri S, Sharma A, Pastor A, Chaudhuri T. (2018). Molecular Chaperones: structure-function relationship and their role in protein folding. In: Asea A, Kaur P. (eds) *Regulation of Heat Shock Protein Responses. Heat Shock Proteins.* Springer Cham. 13
8. Chen M, Cahoon EB, Saucedo M, Plasencia J, Gavilanes M. (2009). Plant Sphingolipids: Structure, Synthesis and Function. In: Wada, H., Murata, N. (eds) *Lipids in Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Springer Dordrecht. 30
9. Coronato S, Girolamo WD, Salas MS, Spinelli OM, Laguens G. (1999). *Biología de las Proteínas del Shock De calor.* Medicina-Buenos Aires. 59, 477-486.
10. Delker C, Quint M, Wigge PA. (2022). Recent advances in understanding thermomorphogenesis signaling. *Curr Opin.* 68, 102231.
11. dos Santos T, Ribas A, de Souza S, Budzinski I, Domingues D. (2022). Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: A Review. *Stresses.* 2, 113–135.
12. Dutilleul C, Benhassaine G, Demandre C, Rézé N, Launay A, Pelletier S, Renou JP, Zachowski A, Baudouin E, Guillas I. (2012). Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and Arabidopsis response to chilling. *New Phytol.* 194, 181–191.

13. Espinoza R, Schwenkert S, Lundquist PK. (2021). Molecular changes of *Arabidopsis thaliana* plastoglobules facilitate thylakoid membrane remodeling under high light stress. *Plant J.* 106, 1571-1587.
14. Fabri J, De Sá N, Malavazi I, Del Poeta M. (2020). The dynamics and role of sphingolipids in eukaryotic organisms upon thermal adaptation. *Prog Lipid Res.* 80, 101063.
15. Franco-Mendieta A. (2018). Las cascadas de MAP cinasas en la respuesta de las plantas a altas y bajas temperaturas. Trabajo Monográfico de Actualización, Facultad de Química, UNAM.
16. Grigorova B, Vassileva V, Klimchuk D, Vaseva I, Demirevska K, Feller U. (2012). Drought, high temperature, and their combination affect ultrastructure of chloroplasts and mitochondria in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *J Plant Interac.* 7, 204-213.
17. Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam M, Roychowdhury R, Fujita M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci.* 14, 9643–9684.
18. Huby E, Napier JA, Baillieul F, Michaelson LV, Dhondt S. (2020). Sphingolipids: towards an integrated view of metabolism during the plant stress response. *New Phytol.* 225, 659–670.
19. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.
20. Kaya H, Shibahara K, Taoka K, Iwabuchi M, Stillman B, Araki T. (2001). FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell.* 104, 131–142.
21. Kim J, Lim J, Lee C. (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol Adv.* 31, 1358–1373
22. Koetsier G, Cantor E. (2019). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers; New England BioLabs.
23. Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E, Scharf KD. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 10, 310–316.
24. Kumar K, Raina S, Sultan S. (2020). *Arabidopsis* MAPK signaling pathways and their cross talks in abiotic stress response. *J. Plant Biochem Biotechnol.* 29, 700–714

25. Larkindale J, Huang B. (2004). Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *J Plant Physiol.* 161, 405–413.
26. López J, Dubrovsky J, Raya J, Ugartechea Y, López J, de Luna L, Ramos M, León P, Guevara A. (2014). *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot.* 65, 169–183.
27. Luttgeharm KD, Kimberlin AN, Cahoon EB. (2016). Plant Sphingolipid Metabolism and Function. *Subcell biochem.* 86, 249–286.
28. Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, et al. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300–309.
29. Norris C, Hightower L. (2000). The heat shock response of tropical and desert fish (genus *Poeciliopsis*). *Elsevier Sci.* 1, 231-243.
30. Paul P, Mesihovic A, Chaturvedi P, Ghatak A, Weckwerth W, Böhmer M, Schleiff E. (2020). Structural and functional heat stress responses of chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Genes.* 11, 650.
31. Paupière M, van Heusden A, Bovy A. (2014). The metabolic basis of pollen thermotolerance: perspectives for breeding. *Metabolites.* 4, 889–920.
32. Pfaffl M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
33. Ponce I, Carmona L, Saucedo M, Cano D, Morales F, Peña A, Guevara Á, Sánchez S, Gavilanes M. (2021). MPK6 Kinase Regulates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in cold acclimation. *Int J Mol Sci.* 22. 6338.
34. Qi F, Zhang F. (2020). Cell Cycle Regulation in the Plant Response to Stress. *Front Plant Sci.* 10, 1765.
35. Queitsch C, Hong S, Vierling E, Lindquist S. (2000). Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant cell.* 12, 479–492.
36. Quint M, Delker C, Franklin KA, Wigge PA, Halliday KJ, van Zanten M. (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature plants,* 2, 15190.
37. Raza A, Charagh S, García P, Atikur M, Ogwugwa V, Saeed F Jin W. (2022) Melatonin-mediated temperature stress tolerance in plants. *GM Crops Food.* 13,196-217.
38. Sairam R, Tyagi A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr Sci.* 86, 407–421.

39. Sakata T, Higashitani A. (2008). Male sterility accompanied with abnormal anther development in plants—genes and environmental stresses with special reference to high temperature injury. *Plant Dev Biol.* 2, 42–51.
40. Saucedo M, González CD, Ponce IG, Cano DL, Romero FM, Arroyo EE, King B, Zavafer A, Gavilanes M. (2021). Effects of MPK3 and MPK6 kinases on the chloroplast architecture and function induced by cold acclimation in *Arabidopsis*. *Photosynth Res.* 149, 201-212.
41. Savchenko G, Klyuchareva E, Abramchik L, Serdyuchenko E. (2002). Effect of periodic heat shock on the inner membrane system of etioplasts. *Plant Physiol.* 49, 349–359.
42. Sedaghatmehr M, Mueller B, Balazadeh S. (2016). The plastid metalloprotease FtsH6 and small heat shock protein HSP21 jointly regulate thermomemory in *Arabidopsis*. *Nat Commun.* 7.12439.
43. Sinha K, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav.* 6. 196–203.
44. Swapnil S, Iti G, Vishwa V, Sumana S, Sharad T. (2021). Molecular techniques used in plant disease diagnosis. *Food Security and Plant Disease Management.* 405-421
45. Škiljaica A, Jagić M, Vuk T, Leljak D, Bauer N, Markulin L. (2022). Evaluation of reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated temperatures. *Plant Biol.* 24, 367–379.
46. Ul Haq S, Khan A, Ali M, Khattak AM, Gai WX, Zhang HX, Wei AM, Gong ZH. (2019). Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *Int J Mol Sci.* 20. 5321.
47. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen J. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35(Web Server issue), W71–W74.
48. Ute K. (2015). The natural history of model organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife.* 4.
49. Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR. (2007). Heat tolerance in Plants: An Overview. *Environ Exp Bot.* 61, 199-223.
50. Wang Q, Chen J, He N, Guo F. (2018). Metabolic reprogramming in chloroplasts under heat stress in plants. *Int J Mol Sci.* 19, 849.
51. Westerheide SD, Morimoto RI. (2005). Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem.* 280, 33097–33100.

52. Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson G, Provart N. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2. 718
53. Wise R, Olson A, Schrader S, Sharkey T. (2004). Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown pima cotton plants at high temperature. *Plant Cell Environ.* 27, 717–724.
54. Xu S, Li J, Zhang X, Wei H, Cui L. (2006). Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environ Exp Bot.* 56, 274–285.
55. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13:134.
56. Zavafer A, González A, Palacios S, Saucedo M, Tapia C, Vázquez S, King B, Gavilanes M. (2020). Organized Disassembly of photosynthesis during programmed cell death mediated by long chain bases. *Sci Rep.* 10, 10360.
57. Zhenbin L, Yuan L, Hanwei C, Dongtao R. (2015). Comparative phospho-proteomics analysis of salt-responsive phosphoproteins regulated by the MKK9-MPK6 cascade in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* 241,138-150.

## 12.ANEXOS

### ANEXO I. Composición del medio utilizado en el crecimiento en cajas de Petri

**Tabla 5.** Composición del medio Gamborg's, B-5 Basal Medium with Minimal Organics

Tomado de: Gamborg et al. 1968

Referencia: G5893 Marca: Sigma

Componentes (mg/L)	Peso (mg)
Inorgánicos	
Sulfato de amonio	134.0
Ácido bórico	3.0
Cloruro de calcio anhidro	113.24
Cloruro de cobalto • 6 H <sub>2</sub> O	0.025
Sulfato cúprico • 5 H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> - EDTA	37.25
Sulfato ferroso • 7H <sub>2</sub> O	27.85
Sulfato de magnesio	122.09
Sulfato de manganeso • H <sub>2</sub> O	10.0
Ácido molíbdico (sal de sodio) • 2 H <sub>2</sub> O	0.25
Yoduro de potasio	0.75
Nitrato de potasio	2500.0
Fosfato de sodio monobásico	130.5
Sulfato de zinc • 7 H <sub>2</sub> O	2.0
Orgánicos (mg/L)	
Mioinositol	100.0
Ácido nicotínico (ácido libre)	1.0
Piridoxina • HCl	1.0
Tiamina • HCl	10.0

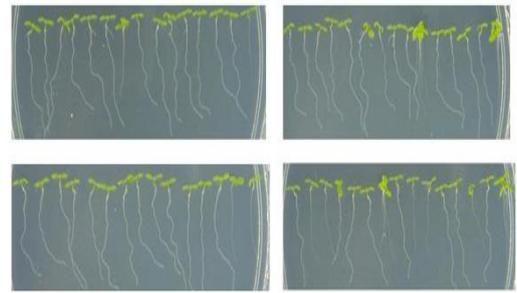
pH ± 0.5 a temperatura ambiente: 4

Gramos de polvo para preparar 1 L: 3.2 g

## ANEXO II. Pruebas para determinar condiciones que aseguren un crecimiento homogéneo de las plántulas

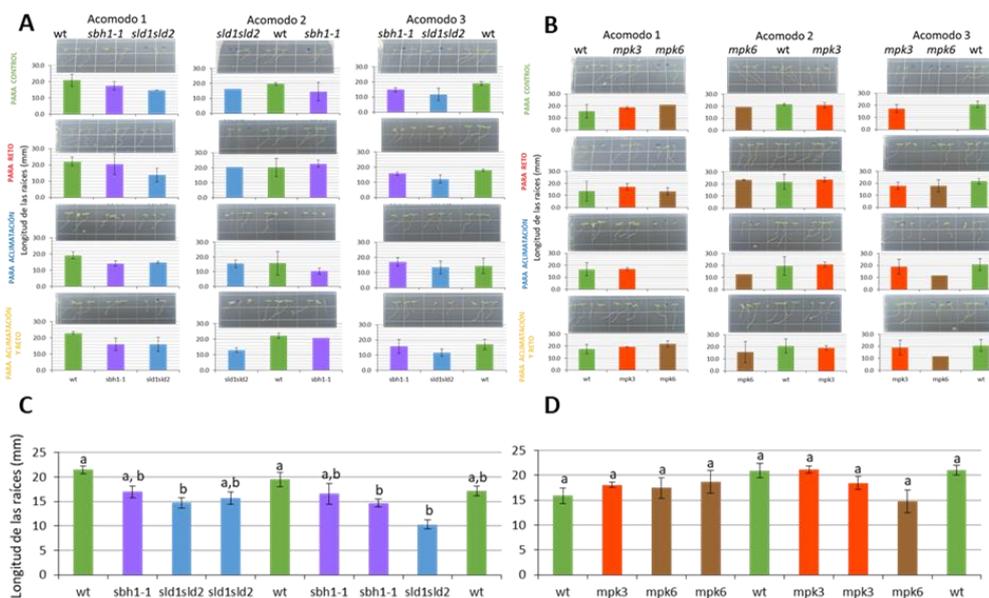
### Crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* en condiciones control.

Para determinar el crecimiento tanto de la parte aérea como el de la raíz y los fenotipos después de los diferentes tratamientos, primero se realizó una siembra de semillas del genotipo silvestre y se hizo el registro fotográfico de las plántulas de una semana de edad, que es el tiempo en el que se llevaron a cabo los tratamientos. La Figura 34 indica que las condiciones de crecimiento de las plántulas wt fueron adecuadas para luego probarlas en las líneas mutantes y así poder identificar aquellos genes que son relevantes para el proceso de aclimatación a altas temperaturas.



**Fig. 34.** Crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* del genotipo silvestre, wt, de una semana de edad crecidas con fotoperiodo largo a 22 °C. La figura muestra cuatro réplicas en cajas de Petri

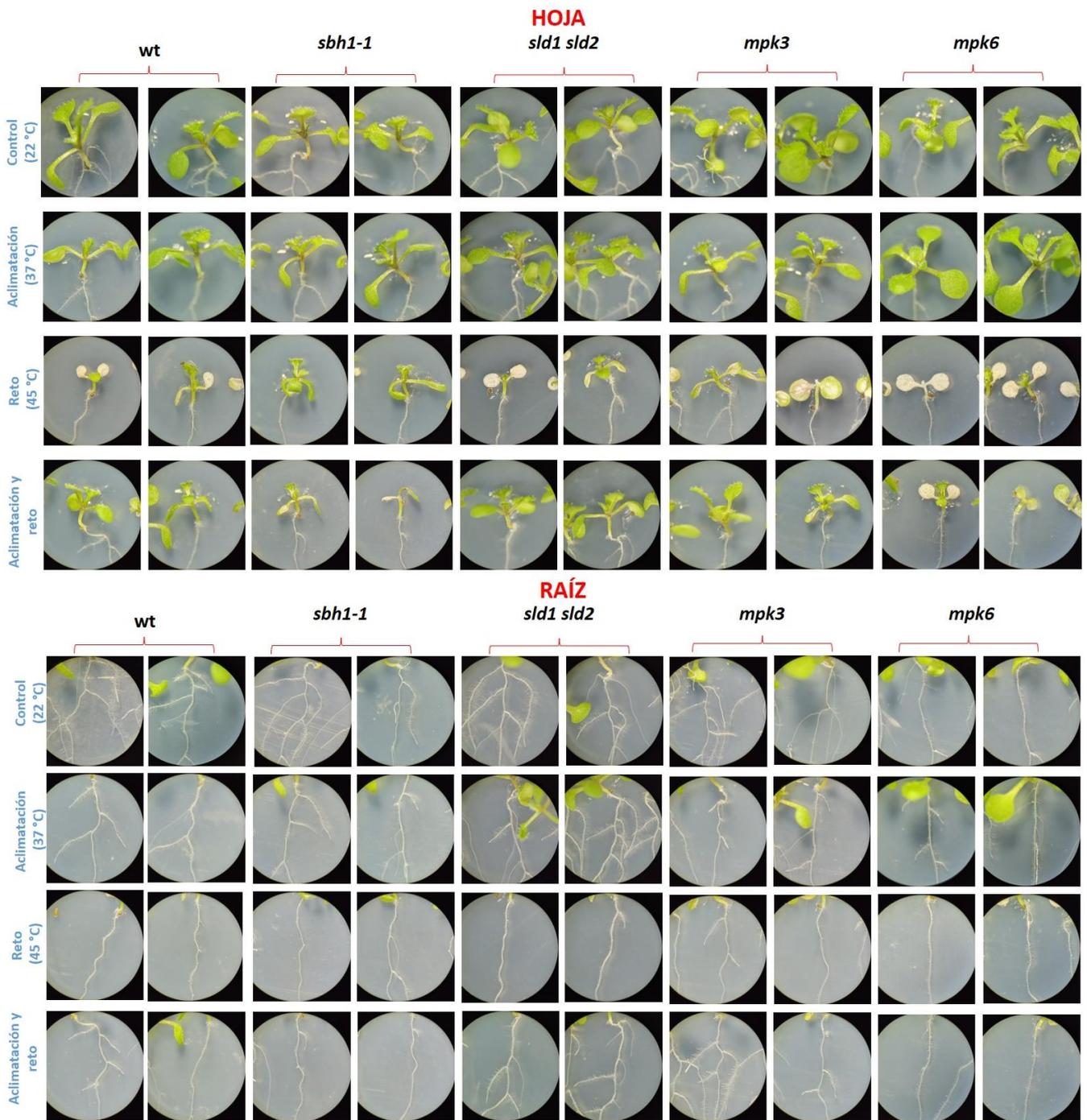
### Condiciones de crecimiento. Efecto de la posición de las semillas/plántulas en la caja vertical



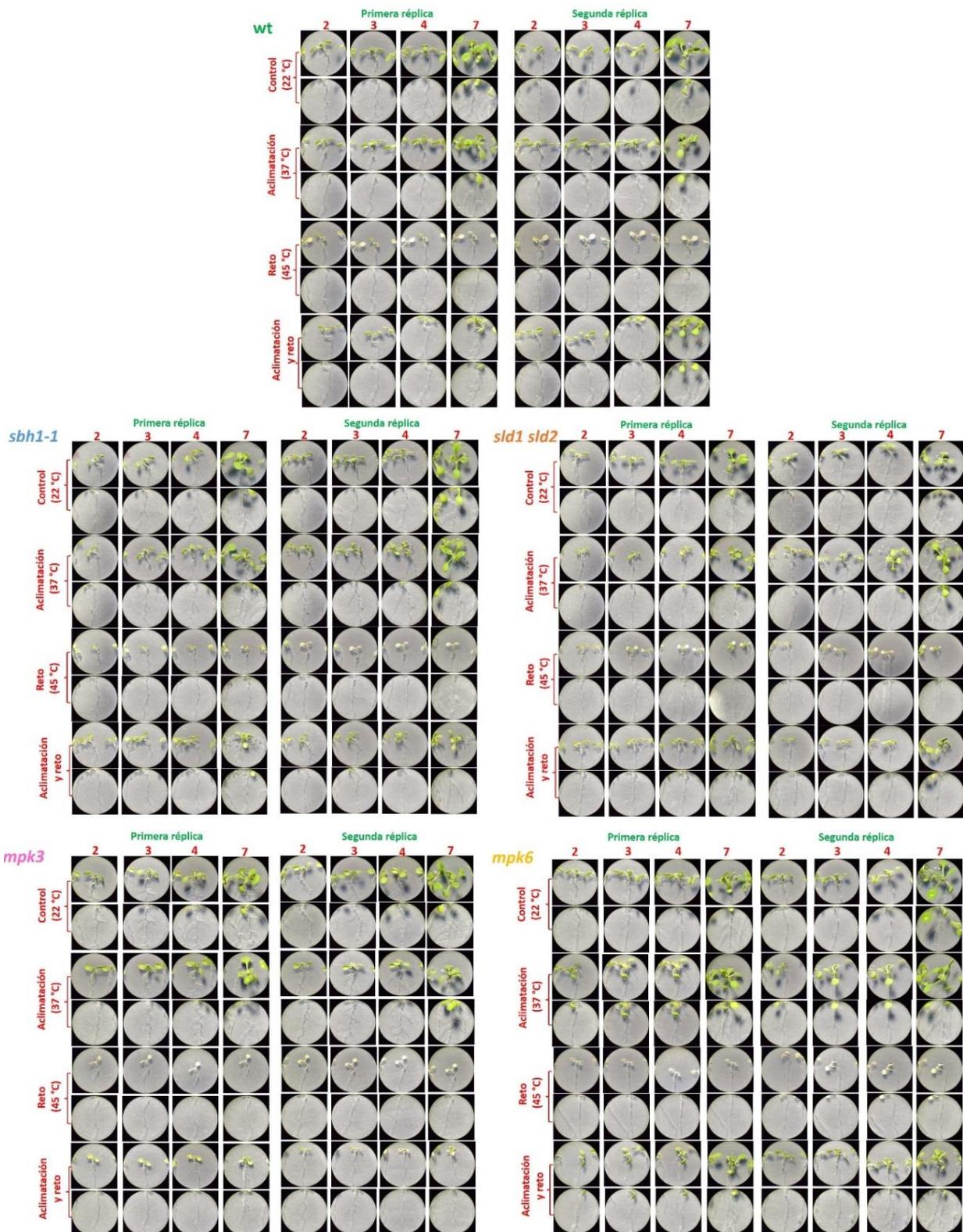
**Fig. 35.** Confirmación de la carencia de efecto de la posición de las plántulas en su crecimiento en la caja de Petri. Las plantas de los genotipos wt, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* fueron sembradas en tres diferentes posiciones dentro de cada caja. Después de una semana de crecimiento, se determinó la longitud de las raíces y de las réplicas independientes se calculó el promedio  $\pm$  ESD y se determinó la significancia estadística por la prueba ANOVA con post-hoc de Turkey ( $\alpha < 0.05$ ). (A) Longitud de la raíz de las líneas mutantes de esfingolípidos *sbh1-1*, *sld1 sld2* antes de los tratamientos. (B) Longitud de la raíz de las líneas mutantes de MAP cinasas *mpk3* y *mpk6* antes de los tratamientos. (C) Procesamiento estadístico de los datos en (A). (D) Procesamiento estadístico de los datos en (B). La longitud de las raíces se determinó con el programa ImageJ.

Las plántulas de los genotipos wt, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* de una semana de edad crecidas con fotoperiodo largo a 22 °C fueron sembradas en tres diferentes posiciones dentro de cada caja. Los resultados indican que el crecimiento de los genotipos no es afectado por las condiciones determinadas por la posición en la caja de Petri.

### ANEXO III. Registro fotográfico de las plántulas bajo el microscopio estereoscópico en caja vertical

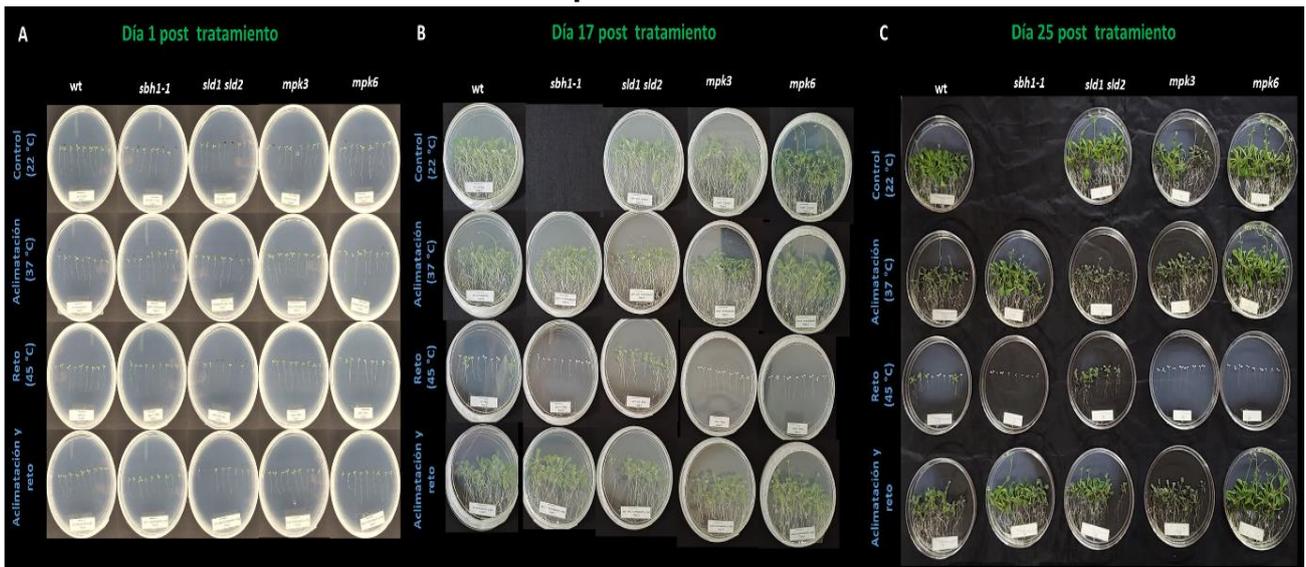


**Fig. 36.** Experimento 1. Fenotipos de plántulas expuestas a calor moderado (aclimatación) y calor extremo (reto) crecidas verticalmente. Efecto de las altas temperaturas en el color de las hojas estimado siete días posteriores a los tratamientos de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas en posición vertical por registro fotográfico en estereoscopio. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, refo y aclimatación más refo durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Se hicieron observaciones de la parte aérea y la raíz de las plántulas en un microscopio estereoscópico y se tomaron fotografías a 1x, se presentan las fotografías del día 7 postratamiento.



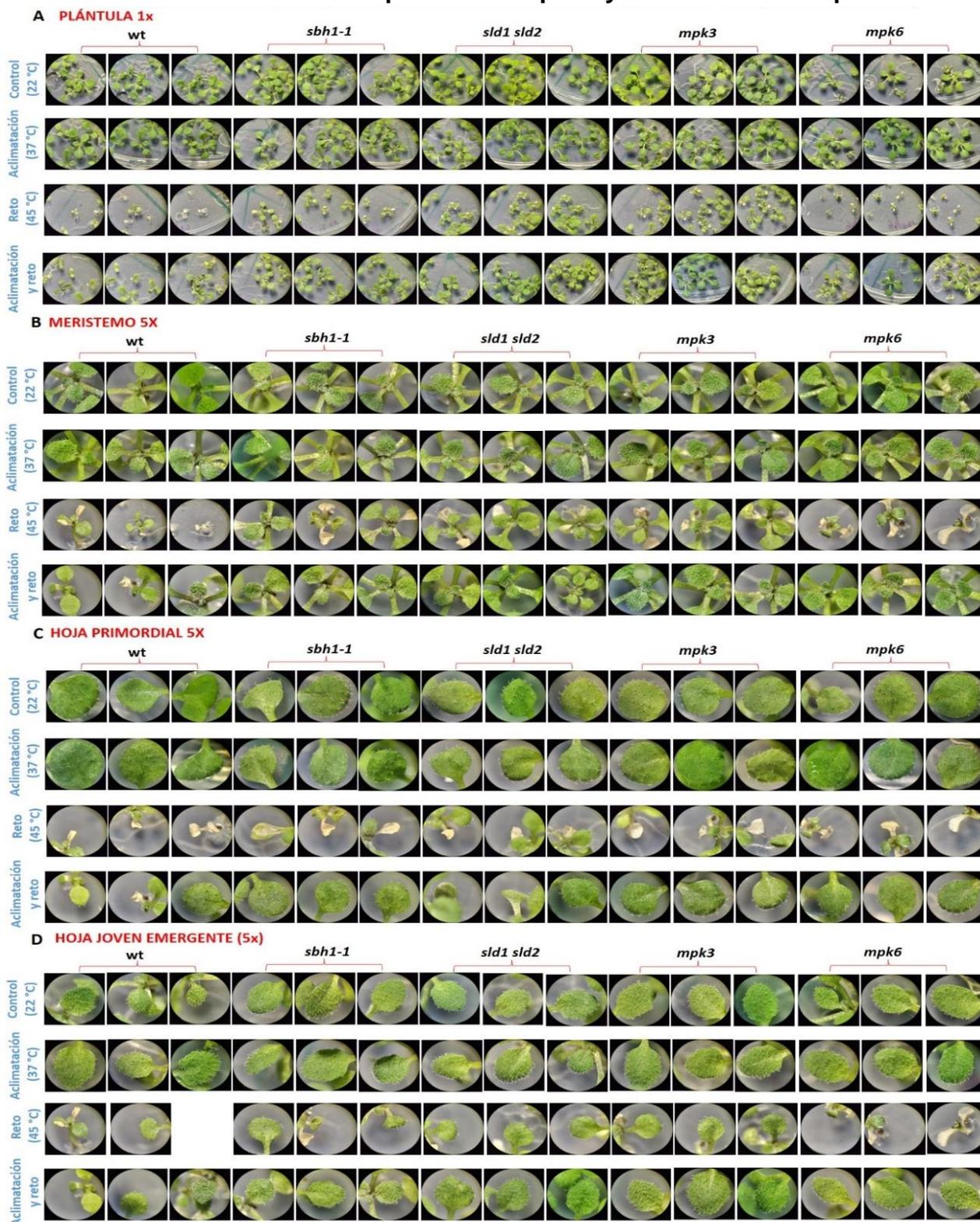
**Fig. 37.** Seguimiento en el cambio de fenotipo hasta 7 días después de los tratamientos de calor. Imágenes tomadas del experimento 2 de la Fig. 37. Efecto de las altas temperaturas en el color de las hojas estimado siete días posteriores a los tratamientos de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas en posición vertical por registro fotográfico en estereoscopio. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Se hicieron observaciones de la parte aérea y la raíz de las plántulas en un microscopio estereoscópico y se tomaron fotografías a 1x, se presentan las fotografías del día 2, 3, 4 y 7 posttratamiento.

## Fenotipos de plántulas expuestas a los tratamientos térmicos a tiempos 1, 17 y 25 días postratamiento

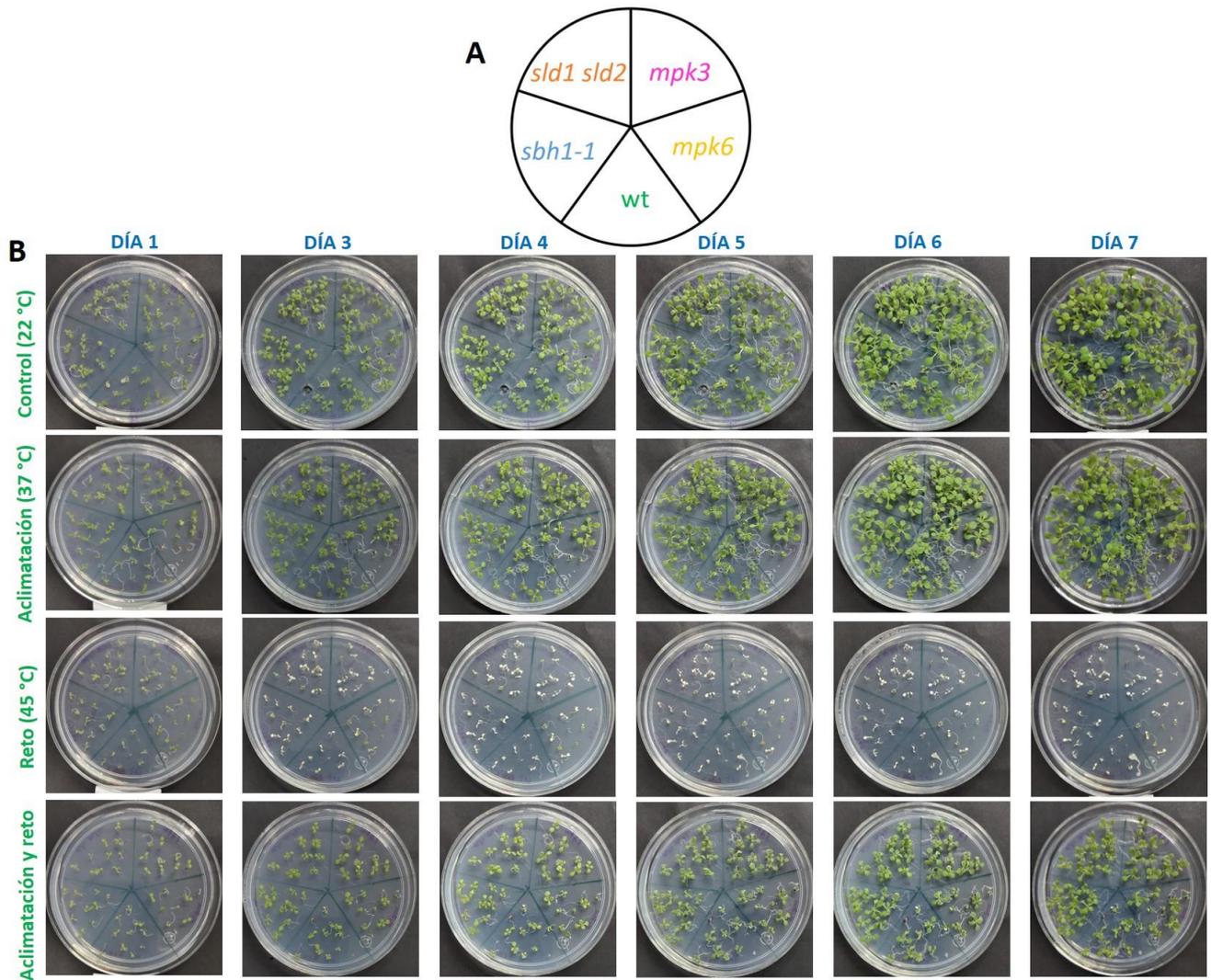


**Fig. 38.** Seguimiento en el cambio de fenotipo hasta 25 días después de los tratamientos de calor. Imágenes tomadas del experimento 2 de la Fig. 37. Se hizo un registro fotográfico de toda la caja de Petri para ver el efecto de las altas temperaturas en plántulas wt, *sbh1-1*, *slid1 slid2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas en posición vertical. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Se presentan las fotografías del día 1, 17, y 25 postratamiento.

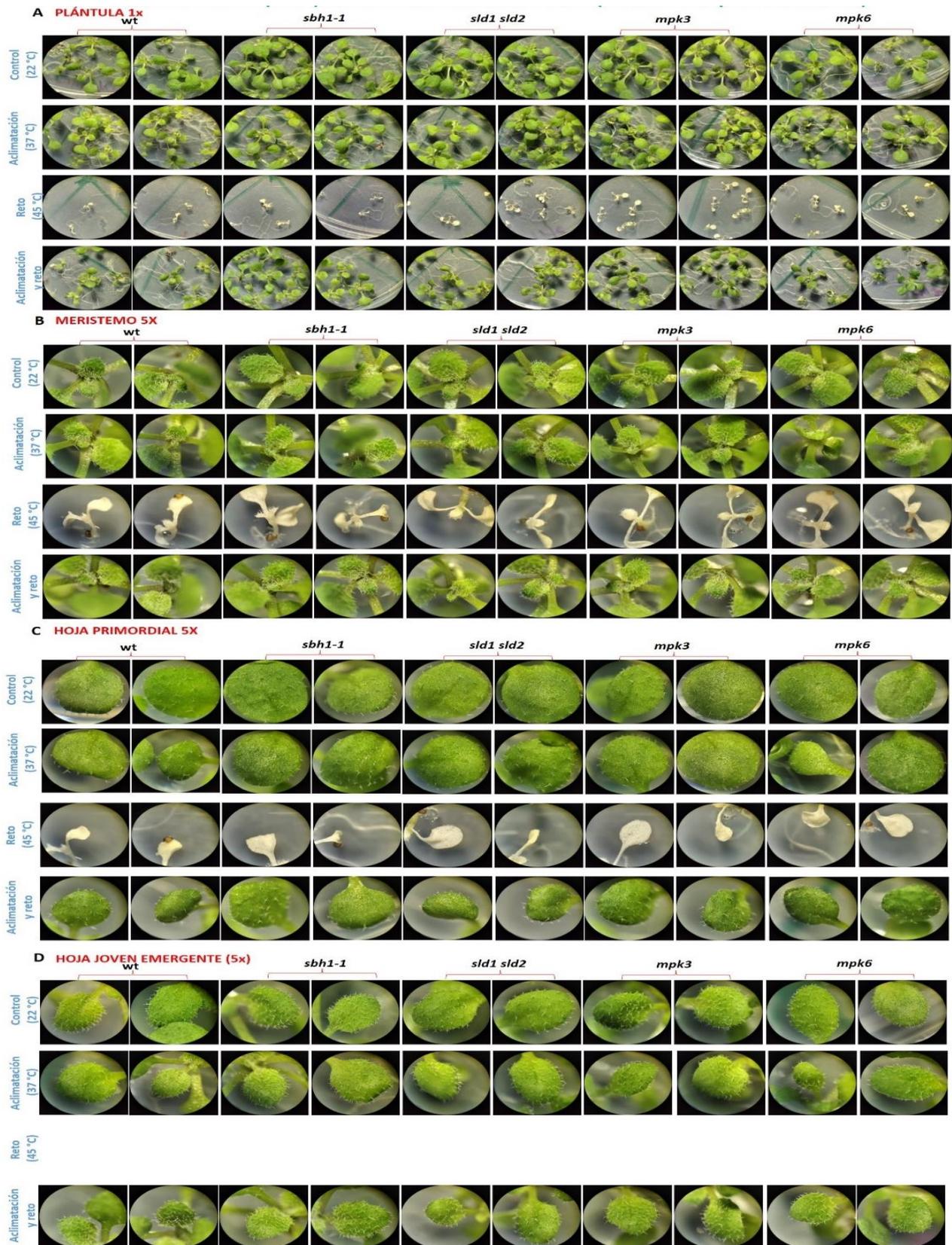
## Registro fotográfico de las plántulas bajo el microscopio estereoscópico en caja horizontal. Visualización de plántula completa y de estructuras específicas



**Fig. 39.** Experimento 1. Fenotipos de plántulas expuestas a calor moderado (aclimatación) y calor extremo (reto) crecidas horizontalmente. Efecto de las altas temperaturas en el color de las hojas estimado siete días posteriores a los tratamientos de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas en posición horizontal por registro fotográfico en estereoscopio. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Se hicieron observaciones de la parte aérea de las plántulas en un microscopio estereoscópico y se tomaron fotografías a 1x, se presentan las fotografías del día 7 postratamiento.

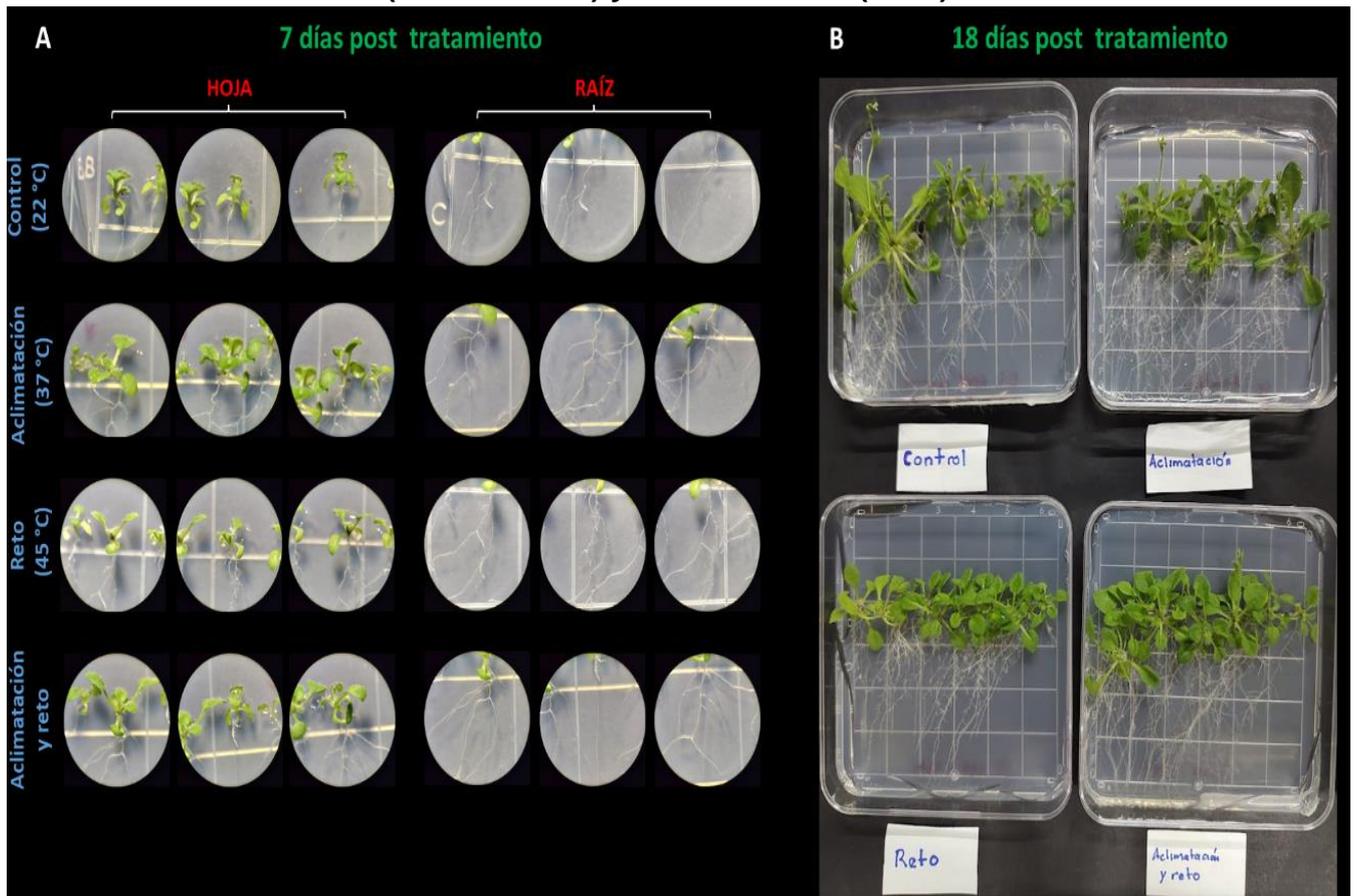


**Fig. 40.** Experimento 2. Seguimiento del fenotipo de plántula expuestas a calor moderado (aclimatación) y calor extremo (Reto) crecidas en caja horizontal. Efecto de las altas temperaturas en las características de la roseta a diferentes tiempos postratamiento de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6*. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Una vez terminados los tratamientos se hicieron los registros fotográficos a los 2, 3, 5, 6 y 7 días. Las plántulas fueron crecidas en plantas dispuestas horizontalmente.



**Fig. 41.** Experimento 2. Fenotipos de plántulas expuestas a calor moderado (aclimatación) y calor extremo (reto) crecidas horizontalmente. Efecto de las altas temperaturas en el color de las hojas estimado siete días posteriores a los tratamientos de plántulas *wt*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *mpk6* crecidas en posición horizontal por registro fotográfico en estereoscopio. Las plántulas de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). Se hicieron observaciones de la parte aérea de las plántulas en un microscopio estereoscópico y se tomaron fotografías a 1x, se presentan las fotografías del día 7 postratamiento.

## Fenotipo de la mutante que sobreexpresa la MPK6 expuesta a calor moderado (aclimatación) y calor extremo (Reto)



**Fig. 42.** Seguimiento en el cambio de fenotipo de la mutante que sobre expresa la MPK6 después de los tratamientos de calor. Las plántulas que sobre expresan la MPK6 crecidas en posición vertical de seis días se expusieron a los tratamientos de aclimatación, reto y aclimatación más reto durante los tiempos del protocolo de tratamientos (ver Materiales y Métodos). A. Observaciones de la parte aérea de las plántulas en un microscopio estereoscópico y se tomaron fotografías a 1x, se presentan las fotografías del día 7 postratamiento. B. Registro fotográfico de toda la caja de Petri 18 postratamiento.

## ANEXO IV. Soluciones y reactivos utilizados

### Amortiguadores y soluciones para los geles de agarosa

#### Agua libre de RNAasas

Dietilpirocarbonato	1 mL
Agua c.b.p	1 L

La solución se dejó en agitación durante toda la noche, al otro día se esterilizó durante 30 min en la autoclave.

#### Amortiguador TAE 50x

Tris	242.0 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA disódico	4.6525 g
Agua c.b.p	1 L

#### Amortiguador TAE 1X

TAE 50X	20 mL
Agua c.b.p	1 L

## ANEXO V. Ensayos de extracción de RNA y qPCR

### Objetivos Específicos

- Determinar los niveles de expresión de dos genes de proteínas de choque de calor y dos genes de referencia por la técnica de PCR cuantitativo.

### Reactivos

Agarosa (Labcitech easyrose<sup>®</sup>), buffer improm y transcriptasa reversa (Promega), oligo dT (20 mM), dNTP (10 mM), mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamilico 25:24:1, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) y TRIzol<sup>®</sup> Reagent (life technologies <sup>TM</sup>)

### Determinación de transcritos

Si bien, esta parte no se pudo concretar. Para el aislamiento de RNA total, se congelaron las plántulas en nitrógeno líquido y se utilizó Trizol. Se verificó la integridad y pureza del RNA por electroforesis en geles de agarosa. Para la síntesis de cDNA, se usó el sistema de la transcriptasa reversa y para analizar los niveles de transcrito de los genes de las proteínas HSP70 y HSFA2 se empleó PCR cuantitativa en tiempo real con el SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Se usaron como genes de referencia *OGIO*, *DWA*, *TUBULINA2*, *UBIQUITINA4* Y *ACTINA2*.

### Metodología

#### Aislamiento de RNA en hojas.

Terminados los tratamientos de aclimatación (37 °C), reto (45 °C), la combinación de ambos tratamientos y el control (22 °C), se separaron las hojas y se congelaron en nitrógeno líquido, se guardaron en microtubos de 1.5 mL o en papel aluminio y se almacenaron a -70°C hasta la posterior extracción de RNA con TRIzol, acorde a lo siguiente:

1. Se pesó el material biológico
2. El material biológico se transfirió a un mortero frío previamente esterilizado y se maceró en N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo muy fino y blanco, cuidando que el N<sub>2</sub> nunca se agotara.
3. Una vez obtenido el polvo, se le agregó un volumen 1:1 de TRIzol (Invitrogen) frío directamente en el mortero. Es decir, si el peso del tejido fue de 100 mg se agregaron 100

µL de TRIzol. Se continuó macerando hasta que el TRIzol se descongeló y se obtuvo una mezcla.

4. La mezcla se transfirió a un microtubo de 1.5 mL previamente congelado en N<sub>2</sub> y se centrifugó a 13 000 g durante 15 min, 4 °C.
5. Después, se transfirió el sobrenadante a otro microtubo y se le agregaron 200 µL de una mezcla fría de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, vol:vol:vol). El tubo se agitó manualmente unas 15 veces y se volvió a centrifugar a 13 000 g durante 10 min, 4 °C.
6. La fase acuosa (superior) se transfirió a otro microtubo y se le agregaron 400 µL de CHCl<sub>3</sub> frío, se agitó nuevamente unas 15 veces y se volvió a centrifugar a 13 000 g por 5 min, 4 °C.
7. Posteriormente, se transfirió nuevamente la fase acuosa (superior) a otro microtubo y se le agregaron 400 µL de CHCl<sub>3</sub> frío; se agitó unas 15 veces y se centrifugó una vez más a 13 000 g por 5 min a 4 °C.
8. La fase acuosa (superior) se transfirió a otro microtubo y se le agregaron 200 µL de isopropanol frío, se agitó en vortex por 10 s y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Una vez pasado ese tiempo, se centrifugó nuevamente a 13 000 g por 15 min, 4 °C.
9. El sobrenadante se desechó y al botón se le agregó 1 mL de EtOH 70 % frío, se agitó en vortex por 10 s y se centrifugó a 13 000 g por 5 min, 4 °C. Esto se repitió una vez más.
10. El sobrenadante se desechó y se evaporó el resto del EtOH a T ambiente.
11. El botón se resuspendió en 40 µL de agua libre de nucleasas y se agitó en vortex por 5 s.
12. Finalmente, se centrifugó a 13 000 g por 2 min, 4 °C y se obtuvo el sobrenadante.

### **Determinación de la concentración, integridad y pureza del RNA Total**

Se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop UV-Vis 2000 (Thermo Scientific) para medir la concentración de RNA total y los cocientes de absorbancia 260/280 y 260/230, los cuales indican la pureza de RNA. Un coeficiente de ~ 2.0 generalmente se acepta como "puro" para el RNA (Koetsier y Cantor, 2019).

### **Electroforesis en geles de agarosa**

Asimismo, para observar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa del RNA aislado de los diferentes genotipos, acorde a lo siguiente:

1. Primero se tomaron 700 mg de agarosa y se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL exclusivo para este proceso.
2. En una probeta se mezclaron 34.3 mL de agua DEPC y 700  $\mu$ L de amortiguador TAE 50X. El contenido de la probeta se agregó en el matraz.
3. El matraz se calentó poco a poco, en intervalos de 10 s en un microondas hasta disolver, evitando la ebullición violenta de la mezcla.
4. La mezcla se dejó entibiar y posteriormente se le agregaron 35  $\mu$ L de bromuro de etidio (0.5 mg/mL). Nota: El bromuro de etidio debe manejarse con mucho cuidado ya que es un potente mutagénico, es nocivo por ingestión, tóxico por inhalación e irritante para los ojos, la piel y las vías respiratorias.
5. La mezcla tibia de agarosa/amortiguador se vertió con mucho cuidado evitando hacer burbujas y posteriormente se colocaron los peines.
6. La mezcla se dejó enfriar hasta que el gel solidificó.

Para la preparación de la muestra, en un microtubo se agregaron 5  $\mu$ L de colorante (Loading Dye), 1000 ng de RNA (muestra) y suficiente agua DEPC para obtener un volumen final de 30  $\mu$ L.

Los 30  $\mu$ L de las muestras se depositaron según el carril que le corresponda y se corrió la electroforesis a 85 mV por 40 a 60 min. Para observar las bandas de RNA y comprobar su integridad se utilizó un transiluminador UV o un equipo ChemiDoc MP.

### **Síntesis de cDNA**

La síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir del RNA templado se realizó mediante un proceso denominado transcripción inversa o retrotranscripción. Para obtener 8  $\mu$ g de cDNA se utilizaron las siguientes cantidades:

- 8000 ng del RNA templado
- 8  $\mu$ L de oligo dT (20 mM)
- El volumen necesario de agua libre de nucleasas para obtener 80  $\mu$ L

Una vez agregados estos reactivos en un tubo PCR se procedió con una fase de desnaturalización del RNA a 70 °C por 5 min y posteriormente la mezcla se enfrió a 4 °C por 5 min. Luego, a cada tubo se le agregaron los siguientes reactivos:

- 32  $\mu$ L amortiguador IMPROM II (Promega)
- 19.2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- 8  $\mu$ L de dNTPs 10 mM (Promega)

- 8  $\mu$ L de la enzima retrotranscriptasa reversa (RT) (Promega)
- 12.8  $\mu$ L de agua libre de nucleasas

Las muestras se colocaron en el termociclador MiniPCR<sup>®</sup> y se sometieron a las condiciones que se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones para la síntesis de cDNA

Temperatura (° C)	Tiempo (min)
25	5
42	70
70	15
4	$\infty$

### **Cuantificación de la Expresión Génica de HSPs por PCR cuantitativo**

Se analizaron los niveles de transcrito de los genes que codifican para las proteínas HSP70 y HSFA2 en las hojas de plantas silvestres y de mutantes que contienen diferente cantidad de esfingolípidos o que carecen de MAP cinasas, las cuales fueron expuestas a los diferentes tratamientos térmicos.

Para diseñar los oligonucleótidos se utilizaron las herramientas Primer3Plus (Untergasser A et al. 2007) y Pick Primer en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Coulouris, 2012) usando como molde las secuencias específicas de los genes estudiados, obtenidas de EnsambIPlants (Kersey et al. 2018). Todos los oligonucleótidos se diseñaron a partir de las recomendaciones de Kim et al (2013) (Tabla 7) y se comprobó que ningún oligonucleótido formara estructuras secundarias, homodímeros, ni heterodímeros utilizando la herramienta OligoAnalyzer Tool de Integrated DNA Technologies (IDT). Por último, se utilizó la herramienta Nucleotid-BLAST para determinar la especificidad de cada par de oligonucleótidos.

Se utilizaron diferentes muestras de cDNA diluidas 10x para cuantificar los transcritos por medio de una PCR en tiempo real. Para la reacción se utilizó SYBR Green Master Mix de Applied Biosystems y un par de oligonucleótidos específicos para cada gen a una concentración de 10  $\mu$ M, los cuales se muestran en la Tabla 8. Como genes de referencia se usaron el gen que codifica para la proteína de la superfamilia de oxigenasas dependiente de 2-oxoglutarato (2OG) y Fe (II) [OGIO, por sus siglas en inglés] y el gen que codifica para la proteína DWD hipersensible a ABA 1 (DWA1, por sus siglas en inglés; Škiljaica A et al. 2022).

**Tabla 7.** Criterios de diseño recomendados para oligonucleótidos de PCR en tiempo real.

Tomado de Kim J et al. 2013.

Criterios de diseño de oligonucleótidos	Recomendaciones
Longitud	16–24 nucleótidos
Contenido de GC	45–65%
Temperatura de fusión del oligonucleótido	55–62 °C
Diferencia de la temperatura de fusión entre oligonucleótidos	≤2 °C
Longitud del producto de PCR	100–500 pb
Temperatura de fusión del producto PCR	≤85 °C
Corridas de un solo nucleótido (poli-X)	≤3 nucleótidos; evitar poli-C o regiones poli-G
Complementariedad intramolecular	≤5 apareamiento continuo de bases; estrictamente evitado en el extremo 3'
Complementariedad intermolecular	≤5 apareamiento continuo de bases

**Tabla 8.** Oligonucleótidos utilizados en la evaluación de los transcritos de HSP17.6, HSP70-4, HSP70-5, HSP101 y los genes de referencia

No. ACCESO	NOMBRE CLAVE	SECUENCIA	NO. BASES	Tm(°C)	Tamaño del producto	Autor
AT1G53540.1	qHSP17.6_FW	GGGACTGAGGAAGGAAGAGG	20	56.7	242	David Fernando Barrera Gómez
AT1G53540.1	qHSP17.6_RV	CTGGCTTTTTCTCTGGCACC	20	56.6		
AT3G12580.1	qHSP70-4_FW	TGTCACCTCTGTCTCTGG	20	56.2	169	David Fernando Barrera Gómez
AT3G12580.1	qHSP70-4_RV	CTTTGTTGCTGCCCTCTCTC	20	55.7		
AT1G16030.1	qHSP70-5_FW	CACGATGTTGTTCTGGTTGG	20	54.2	229	David Fernando Barrera Gómez
AT1G16030.1	qHSP70-5_RV	CACCTGCTGTCTCAAGTCCA	20	57.0		
AT1G74310.2	qHSP101_FW	GAAGTTGAGGACGCTGAAGG	20	55.7	249	David Fernando Barrera Gómez
AT1G74310.2	qHSP101_RV	AATGGTGTCTCAGGCACACTTG	20	55.8		
AT5G51880.1	qOGIO_FW	ATCCAAGAGCAGTTCAAGCAAG	22	55.6	130	Škiljaica et al 2022
AT5G51880.1	qOGIO_RV	GAGAGCCATACCTTCCACTG	20	54.8		
AT2G19430.1	qDWA1_FW	AGTTGTGGTGATGATGGTAGAG	22	54.2	176	Škiljaica et al 2022
AT2G19430.1	qDWA1_RV	ACAGACATGGCATTGATCTCAG	22	55.0		
AT5G62690	qTUB2-FW	GTTCTCAGCAGTACCGTTCC	20	55.4	178	Ponce-Pineda et al. 2021
AT5G62690	qTUB2-RV	CTCCACAAAGTAGGACGAGTTC	22	54.9		
AT5G20620	qUBQ4-FW	CAACCCTTCATTTGGTGCTT	20	53.8	162	Ponce-Pineda et al. 2021
AT5G20620	qUBQ4-RV	GTCTCTGCTGATCTGGTGGA	20	56.3		
AT3G18780.2	qACT2-FW	TGTGTGTGACAACTCTCTGG	21	54.8	180	Marlon Adrián Pulido Torres
AT3G18780.2	qACT2-RV	GAGGCATCAATTCGATCACTCAG	23	55.7		

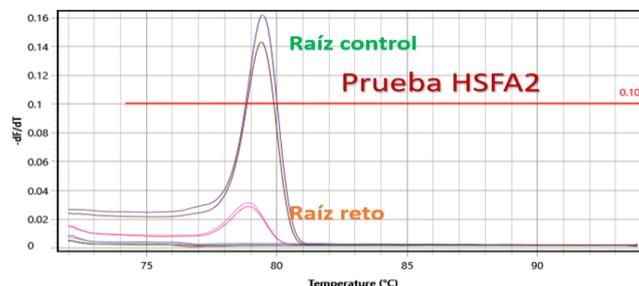
Se efectuó una reacción de PCR cuantitativo con el fin de analizar la correcta amplificación de los transcritos con los oligonucleótidos diseñados y verificar que estos no formaran productos inespecíficos. La mezcla de reacción se preparó utilizando 10 µL SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 2 µL de cDNA (1000 ng/µL), 0.3 µL del oligonucleótido sentido (10 mM), 0.3 µL del oligonucleótido reverso o antisentido (10 mM) y agua libre de

nucleasas suficiente para alcanzar un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , utilizando como control negativo la mezcla de reacción sin cDNA. Se realizaron 40 ciclos de amplificación de acuerdo con las condiciones especificadas por el proveedor, las cuales se muestran en la Tabla 9. Todas las reacciones se llevaron por duplicado en un termociclador MicPCR®.

**Tabla 9.** Condiciones utilizadas para la qPCR

Condiciones	Temperatura	Tiempo
Fase de espera	50 °C	2 min
	95 °C	10 min
Fase cíclica	95 °C	15 s
	60 °C	60 s
Fase de curva de disociación	95 °C	15 s
	60 °C	60 s
	95 °C	15 s

Una vez evaluados los oligonucleótidos, se eligieron aquellos pares que presentaron un solo pico de amplificación en la curva de disociación como se ejemplifica en la Fig. 43.

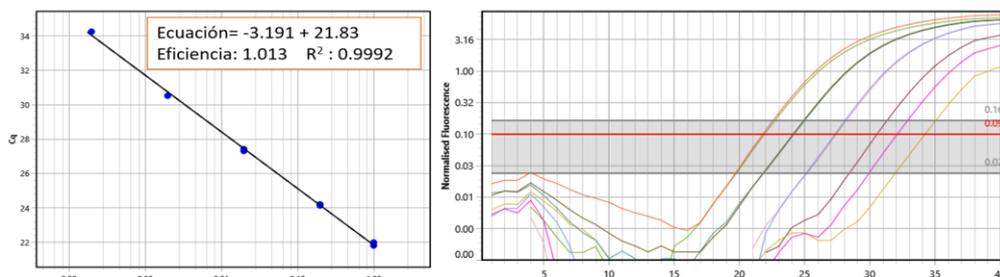


**Fig. 43.** Curva de disociación obtenida con los oligonucleótidos diseñados para el gen HSFA2.

Con los pares de oligonucleótidos elegidos, se realizó una curva de calibración (Fig. 44) a partir de diferentes concentraciones de cDNA obtenidas por medio de una serie de diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000), con el propósito de obtener el valor del Threshold line, el cual nos indica el umbral dentro de la región lineal de la curva de amplificación, que representa el rango logarítmico-lineal detectable de la PCR.

Una curva de calibración se considera correcta si cumple con los siguientes parámetros:

- Pendiente entre -2.8 y -3.2
- Eficiencia entre 95 % y 130 %
- Coeficiente de correlación cercano a 0.99.



**Fig. 44.** Ejemplo de una curva de calibración de un par de oligonucleótidos.

La relación de transcritos se calculó utilizando la modificación de Hellemans (Hellemans et al. 2007) al modelo desarrollado por Pfaffl (Pfaffl M, 2001), como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio transcripts} = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{\sqrt[j]{\prod_0^j E_{\text{ref}_0}^{\Delta CP_{\text{ref}_0}(\text{control-sample})}}}$$

donde  $E_{\text{target}}$  es la eficiencia de amplificación del gen objetivo,  $\Delta CP_{\text{target}}$  es la diferencia de Ct entre la muestra control y las tratadas,  $E_{\text{ref}}$  es la eficiencia de amplificación de un gen de referencia y  $\Delta CP_{\text{ref}}$  es la diferencia de Ct de un gen de referencia entre la muestra control y las tratadas.

Para esta ecuación, la eficiencia se calculó de la siguiente manera:

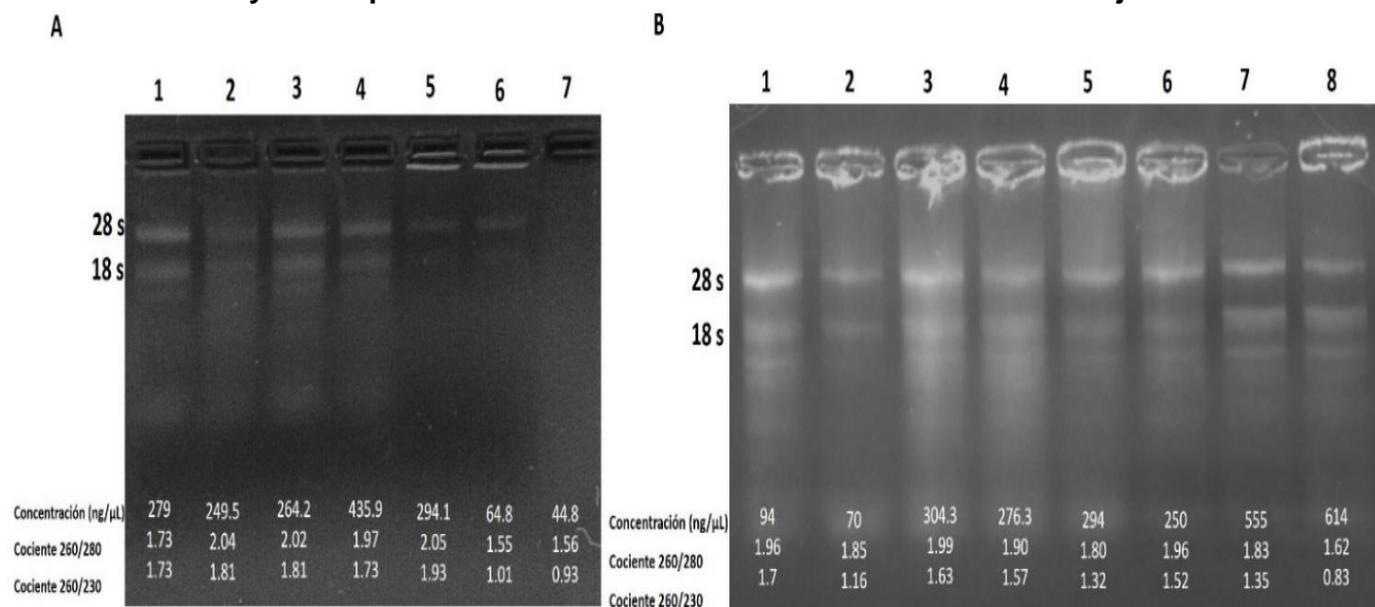
$$E = 10^{-\left(\frac{1}{m}\right)}$$

donde E es la eficiencia de amplificación del gen objetivo y m es la pendiente obtenida de la curva de calibración.

## Resultados

Con el objetivo de obtener una buena cantidad y calidad de RNA extraído de plántulas de seis días de edad, se realizó una serie de extracciones de RNA, donde se utilizaron diferentes cantidades de TRIzol, cloroformo y etanol, asimismo, se cambió el orden del reactivo (primero se precipito con alcohol isopropílico y posteriormente se realizaron separaciones del RNA con cloroformo y lavados con etanol). La Fig. 45 muestra un gel de agarosa al 2 %, donde se cargaron las muestras de los ensayos de optimización. La mayor parte de las muestras revelaron claramente las bandas del RNA ribosomal 28S y 18S, pero acompañado de más bandas lo cual es un indicativo de RNA degradado o que existen contaminantes. Las Tablas 10 y 11 muestran el peso del tejido de cada tratamiento, la concentración de RNA obtenida, los cocientes 260/280 y 260/230, los  $\mu\text{g}$  de RNA obtenidos y el rendimiento obtenido (mg de RNA por mg de tejido) de dos ensayos de optimización respectivamente. Se encontró que los rendimientos de los ensayos cuando se utilizó un volumen 1:1.5 de TRIzol son muy similares y hacer tres lavados con cloroformo mejoró el rendimiento. No obstante, se presentaron múltiples bandas en el gel de agarosa. Con estos resultados se estimó la cantidad de TRIzol y el número de lavados que se tenían que utilizar para tener un RNA de buena calidad y cantidad.

## Ensayos de optimización de la técnica de extracción de RNA en hojas



**Fig. 45.** Geles de agarosa de los dos ensayos de optimización realizados para la técnica de extracción de RNA. A. Primer ensayo de optimización. B. Segundo ensayo de optimización.

**Tabla 10.** Cuantificación de RNA del primer ensayo de optimización.

Muestra	Tratamiento	Peso del tejido (mg)	Trizol (μL)	Concentración de RNA (ng/μL)	Cociente 260/280	Cociente 260/230	Rendimiento (mg RNA/mg tejido)
1	Trizol (cambio 1)	54.4	81.6	64.8	1.55	1.01	$3.57 \times 10^{-5}$
2	Trizol (cambio 2)	64.6	97	44.8	1.56	0.92	$2.08 \times 10^{-5}$
3	Trizol (1:1.2)	68	81.6	279	1.73	1.73	$1.23 \times 10^{-4}$
4	Trizol (1:1.4)	64	89.6	249.5	2.04	1.81	$1.17 \times 10^{-4}$
5	Trizol (1:1.5) 2 lavados CH <sub>3</sub> Cl	51	76.5	264.2	2.02	1.81	$1.55 \times 10^{-4}$
6	Trizol (1:1.5) 3 lavados CH <sub>3</sub> Cl	71	106.5	435.9	1.97	1.77	$1.84 \times 10^{-4}$
7	Trizol (1:1.5) 2 lavados CH <sub>3</sub> Cl, 3 etOH	52	78	294.1	2.05	1.93	$1.70 \times 10^{-4}$

**Tabla 11.** Cuantificación del RNA del segundo ensayo de optimización.

Muestra	Tratamiento	Peso del tejido (mg)	Trizol (μL)	Concentración de RNA (ng/μL)	Cociente 260/280	Cociente 260/230	Rendimiento (mg RNA/mg tejido)
1	Trizol (1:1.5) 2 lavados CH <sub>3</sub> Cl	57	85.5	294	1.96	1.7	$4.95 \times 10^{-5}$
2	Trizol (1:1.5) 2 lavados CH <sub>3</sub> Cl	66	99	70	1.85	1.16	$3.18 \times 10^{-5}$
3	Trizol (1:1.5) 3 lavados CH <sub>3</sub> Cl	50	75	304.3	1.99	1.63	$1.83 \times 10^{-4}$
4	Trizol (1:1.5) 3 lavados CH <sub>3</sub> Cl	52	78	276.3	1.9	1.57	$1.59 \times 10^{-4}$

5	Trizol (1:1.5) 2 lavados CH <sub>3</sub> Cl, 3 etOH	43	64.5	294	1.8	1.32	2.05 x10 <sup>-4</sup>
6	Trizol (1:1.5) 2 lavados CH <sub>3</sub> Cl, 3 etOH	50	75	250	1.96	1.52	1.50 x10 <sup>-4</sup>
7	Trizol (1:3) 2 lavados CH <sub>3</sub> Cl	53	79.5	555	1.83	1.35	3.14 x10 <sup>-4</sup>
8	Trizol (1:3) 2 lavados CH <sub>3</sub> Cl	51	76.5	614	1.62	0.83	3.61 x10 <sup>-4</sup>

## Aislamiento de RNA

Para la extracción de RNA se sembraron aproximadamente 40 semillas en cajas de Petri cuadradas, se utilizaron 3 cajas Petri para cada réplica biológica de los genotipos wt, *sbh1-1* y *mpk6* de cada tratamiento de calor. Una vez optimizado el procedimiento de extracción de RNA, se utilizó la relación de tejido-TRIzol 1:1. Las Tablas 12, 13 y 14 muestran el peso del tejido de cada tratamiento, la concentración de RNA obtenida, los cocientes 260/280 y 260/230, los µg de RNA obtenidos y el rendimiento obtenido (mg de RNA por mg de tejido) de tres réplicas biológicas de los genotipos wt, *sbh1-1* y *mpk6* respectivamente. Se encontró que los rendimientos de las réplicas biológicas 2 y 3 para cada tratamiento son muy similares, no obstante, la condición de reto siempre generó un rendimiento menor. Con estos resultados se estimaron las cantidades de tejido necesarias para obtener RNA suficiente para realizar las pruebas de qPCR.

**Tabla 12.** Rendimiento del RNA total aislado por cantidad de tejido en tres réplicas biológicas, con los cuatro tratamientos térmicos el genotipo wt.

	wt											
	Réplica biológica 1				Réplica biológica 2				Réplica biológica 3			
	Control	Aclimatación	Reto	Aclimatación y reto	Control	Aclimatación	Reto	Aclimatación y reto	Control	Aclimatación	Reto	Aclimatación y reto
Peso del tejido (mg)	188	179	191	177	218	268	213	239	242	275	220	238
Volumen de resuspensión (µL)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Concentración RNA (ng/µL)	125.7	476.1	39.1	373.6	544.3	940.8	496.7	812.4	638.2	814.8	498.2	812.3
Cociente 260/280	1.89	2.03	2.06	2.02	2.00	2.04	1.99	2.03	2.14	2.09	2.00	2.07
Cociente 260/230	2.35	2.20	1.74	2.25	1.65	1.87	1.98	2.18	1.98	2.21	1.60	1.97
Cantidad de RNA (µg)	4.39	16.66	1.36	13.07	19.05	32.92	17.38	28.43	22.33	28.51	17.43	28.43
Rendimiento (mg RNA/mg tejido)	2.34 x10 <sup>-3</sup>	9.31 x10 <sup>-3</sup>	7.16 x10 <sup>-4</sup>	7.39 x10 <sup>-3</sup>	8.74 x10 <sup>-3</sup>	1.23 x10 <sup>-2</sup>	8.16 x10 <sup>-3</sup>	1.19 x10 <sup>-2</sup>	9.23 x10 <sup>-3</sup>	1.04 x10 <sup>-2</sup>	7.93 x10 <sup>-3</sup>	1.19 x10 <sup>-2</sup>

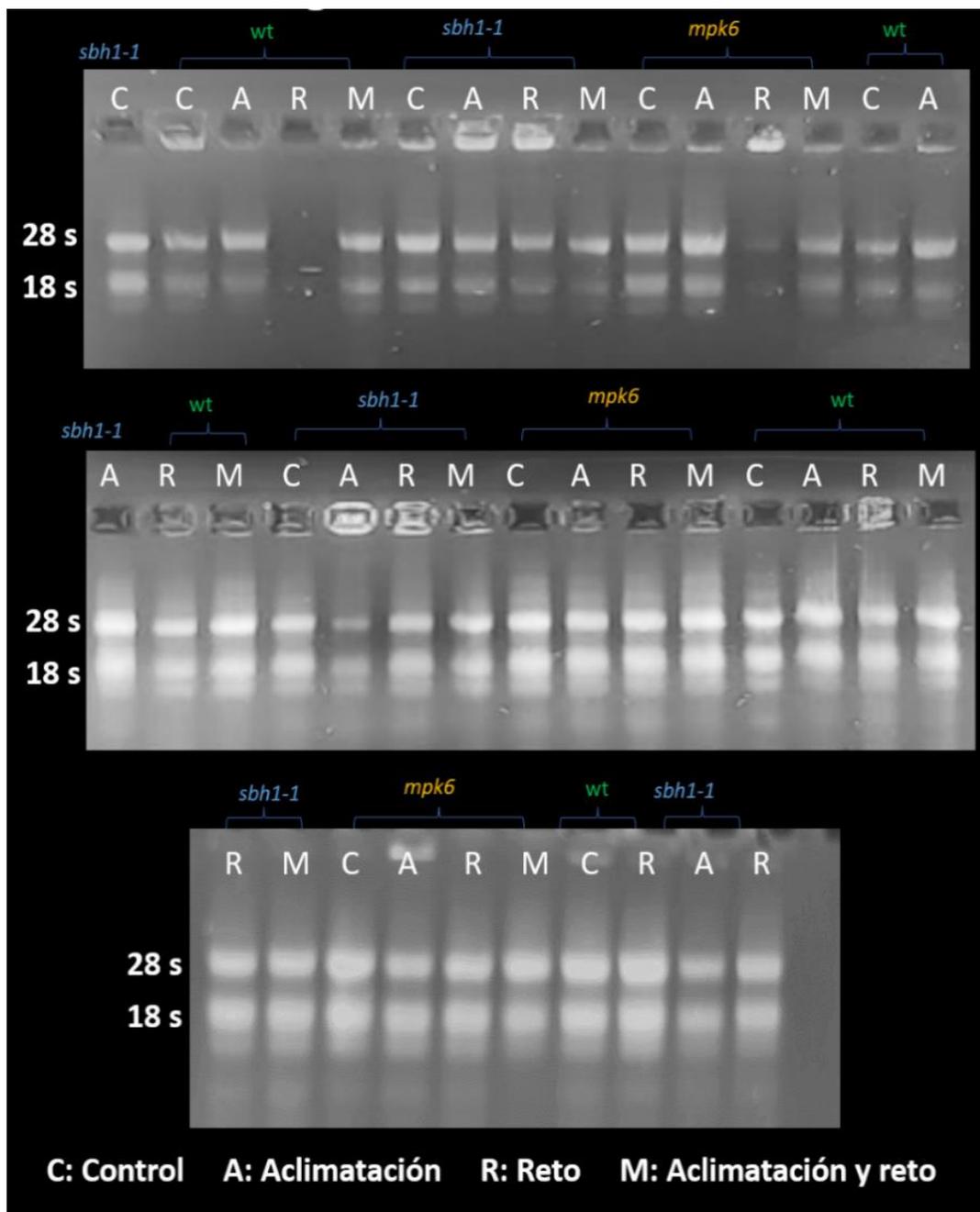
**Tabla 13.** Rendimiento del RNA total aislado por cantidad de tejido en tres réplicas biológicas, con los cuatro tratamientos térmicos el genotipo *sbh1-1*.

	<i>sbh1-1</i>											
	Réplica biológica 1				Réplica biológica 2				Réplica biológica 3			
	Control	Aclimatación	Reto	Aclimatación y reto	Control	Aclimatación	Reto	Aclimatación y reto	Control	Aclimatación	Reto	Aclimatación y reto
Peso del tejido (mg)	195	176	194	251	277	241	250	241	215	240	245	233
Volumen de resuspensión (µL)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Concentración RNA (ng/µL)	515.7	255.1	183.5	844.2	491.7	100.2	282	525.7	603.5	1211.2	499.6	608.8
Cociente 260/280	2.03	1.93	1.89	2.00	2.14	2.09	2.00	2.07	2.08	2.06	2.04	2.10
Cociente 260/230	2.12	1.62	1.73	1.98	1.98	2.21	1.60	1.97	1.96	2.10	2.01	1.86
Cantidad de RNA (µg)	18.05	8.93	6.42	29.55	17.21	3.51	9.87	18.40	21.12	42.39	17.49	21.31
Rendimiento (mg RNA/mg tejido)	9.26 x10 <sup>-3</sup>	5.07 x10 <sup>-3</sup>	3.31 x10 <sup>-3</sup>	1.18 x10 <sup>-2</sup>	6.21 x10 <sup>-3</sup>	1.46 x10 <sup>-3</sup>	3.95 x10 <sup>-3</sup>	7.63 x10 <sup>-3</sup>	9.82 x10 <sup>-3</sup>	1.77 x10 <sup>-3</sup>	7.14 x10 <sup>-3</sup>	9.15 x10 <sup>-3</sup>

**Tabla 14.** Rendimiento del RNA total aislado por cantidad de tejido en tres réplicas biológicas, con los cuatro tratamientos térmicos el genotipo *mpk6*.

	<i>mpk6</i>											
	Réplica biológica 1			Réplica biológica 2			Réplica biológica 3					
	Control	Aclimatación	Reto									
Peso del tejido (mg)	234	218	233	249	243	333	289	343	220	249	228	230
Volumen de resuspensión (µL)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Concentración RNA (ng/µL)	515.2	805.8	133.7	908.9	617.1	879.9	914.6	1448	996.3	381.6	880.3	1234
Cociente 260/280	2.02	2.01	1.94	2.05	2.08	2.00	2.03	2.09	2.10	2.10	2.04	2.07
Cociente 260/230	2.08	2.22	1.28	2.14	1.98	2.08	1.80	2.26	2.00	1.92	2.10	2.04
Cantidad de RNA (µg)	18.032	28.203	4.6795	31.8115	21.5985	30.7965	32.011	50.68	34.8705	13.356	30.8105	43.19
Rendimiento (mg RNA/mg tejido)	7.71 x10 <sup>-3</sup>	1.29 x10 <sup>-2</sup>	2.01 x10 <sup>-3</sup>	1.28 x10 <sup>-2</sup>	8.89 x10 <sup>-3</sup>	9.25 x10 <sup>-3</sup>	1.11 x10 <sup>-2</sup>	1.48 x10 <sup>-2</sup>	1.59 x10 <sup>-2</sup>	5.36 x10 <sup>-3</sup>	1.35 x10 <sup>-2</sup>	1.88 x10 <sup>-2</sup>

Con el objetivo de comprobar la integridad del RNA extraído de todas las muestras, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, donde se cargaron las tres réplicas biológicas de todos los tratamientos de calor de los genotipos *wt*, *sbh1-1* y *mpk6* (Fig. 48). La mayor parte de las muestras revelaron claramente las bandas del RNA ribosomal 28S y 18S, lo cual es un indicativo de que se obtuvo RNA íntegro. Sin embargo, algunas muestras que fueron tratadas a 45 ° C no mostraron dichas bandas, lo cual es un indicativo de que el RNA se degradó o contaminó. Tanto los cocientes de absorbancia 260/280 (Tablas 12, 13 y 14) como el patrón electroforético (Fig. 46) revelaron que se obtuvo RNA con una buena pureza e integridad.

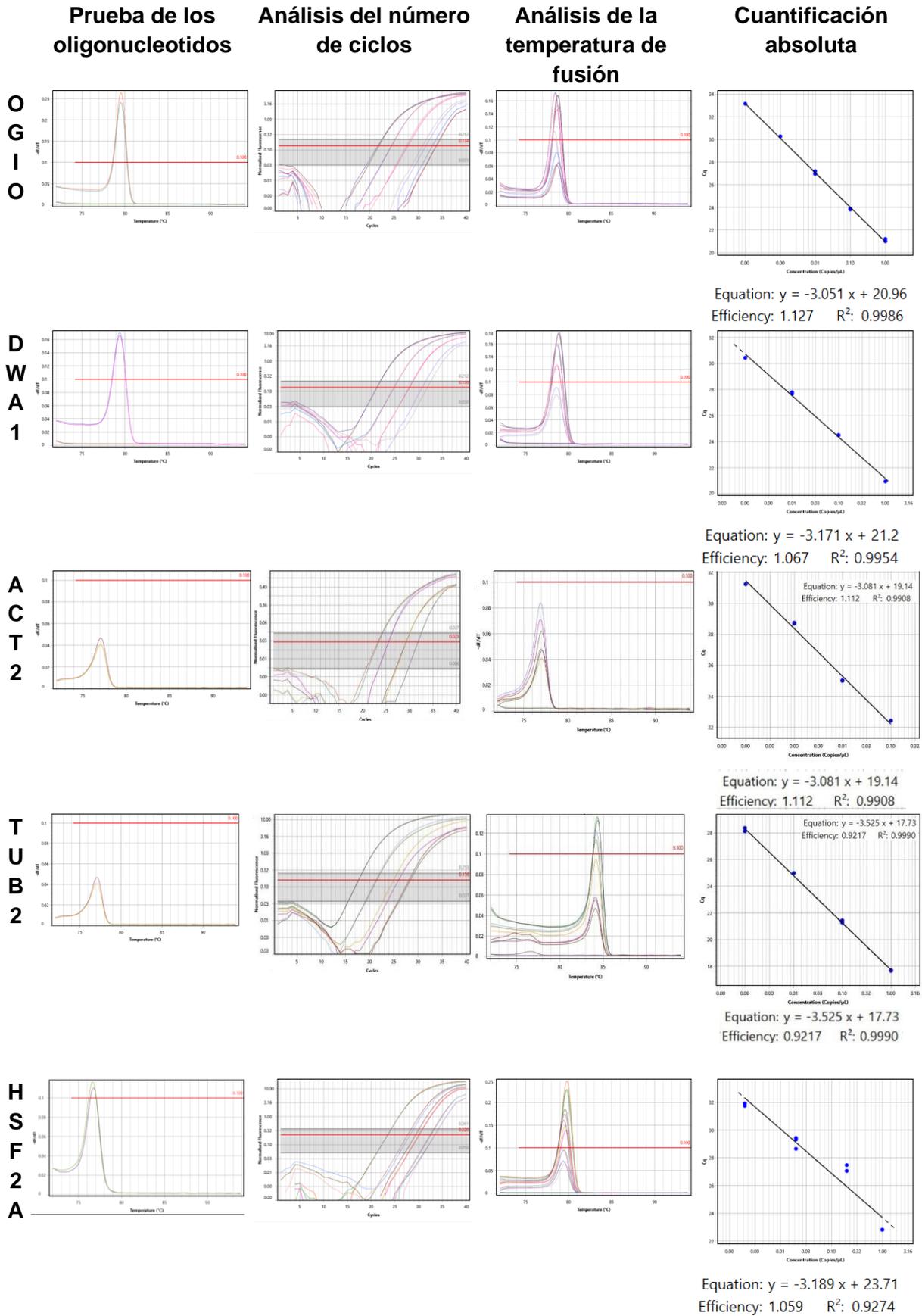


**Fig. 46.** Integridad del RNA total usado para la síntesis de cDNA. C, control; A, aclimatación; R, reto; M, aclimatación y reto. Las bandas corresponden a las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal.

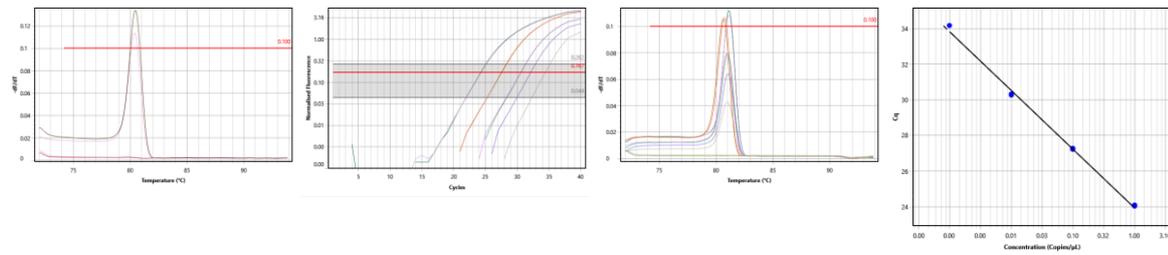
### Evaluación de los oligonucleótidos utilizados

El correcto funcionamiento de los oligonucleótidos diseñados para la evaluación de la expresión de los genes de interés es crucial para obtener resultados confiables y reproducibles. En la Tabla 15 se muestran las pruebas de reconocimiento, así como las curvas de calibración de todos los oligonucleótidos diseñados.

Tabla 15. Pruebas de reconocimiento y curvas de calibración de los oligonucleótidos diseñados.

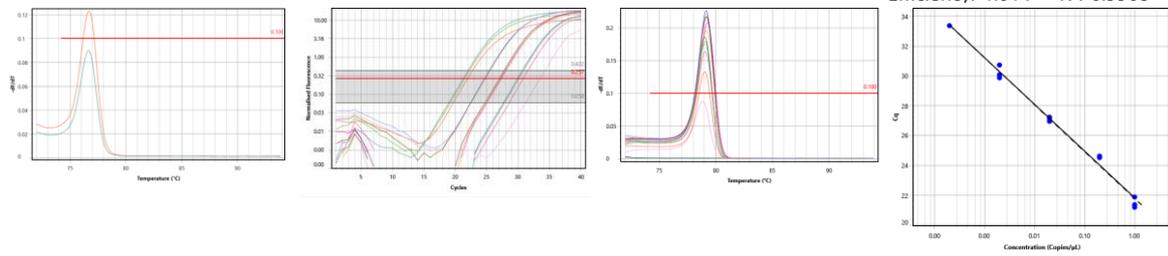


H  
S  
P  
7  
0  
4



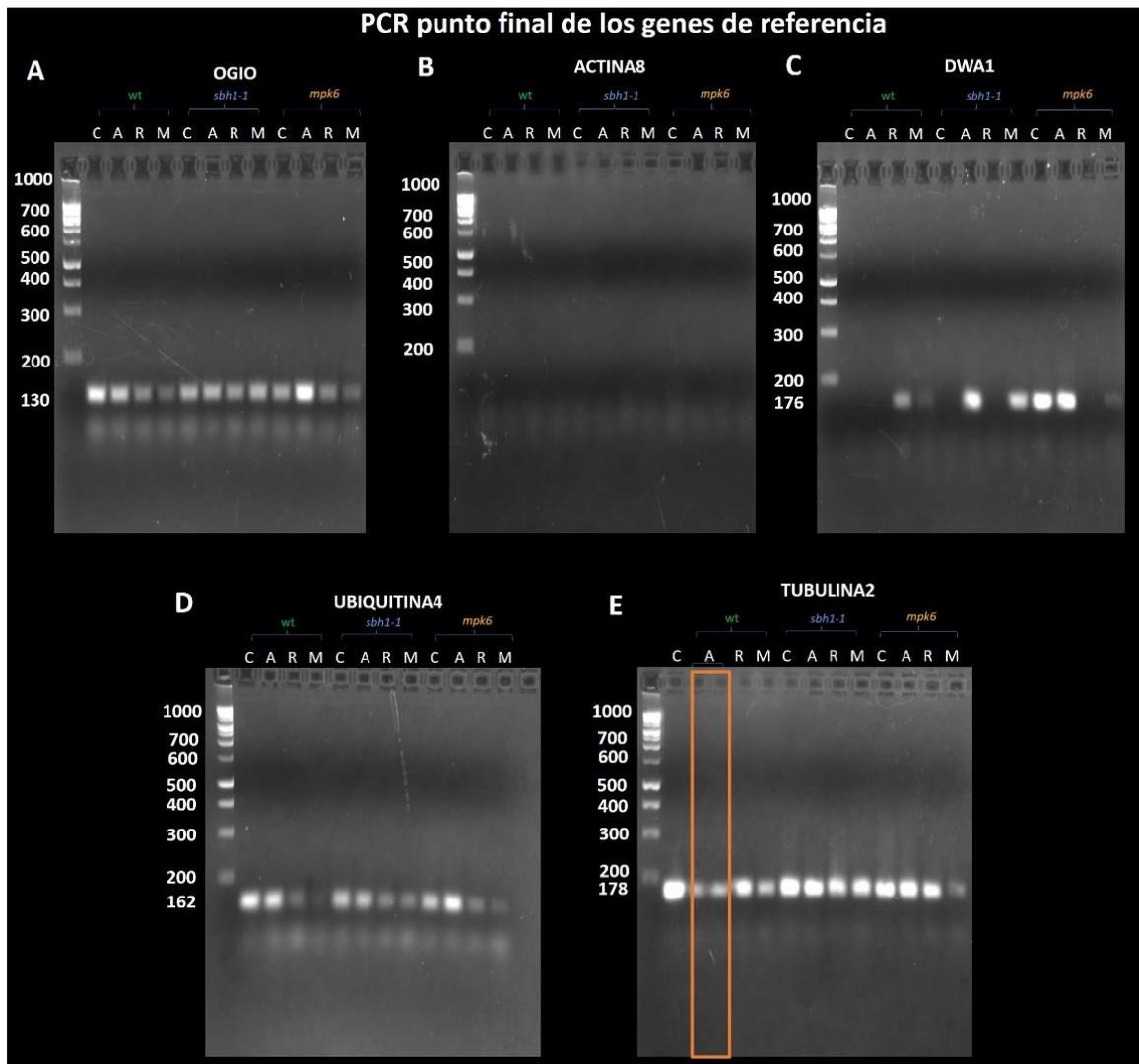
Equation:  $y = -3.29x + 23.96$   
 Efficiency: 1.014  $R^2: 0.9968$

H  
S  
P  
7  
0  
1  
4



Equation:  $y = -3.132x + 21.83$   
 Efficiency: 1.086  $R^2: 0.9888$

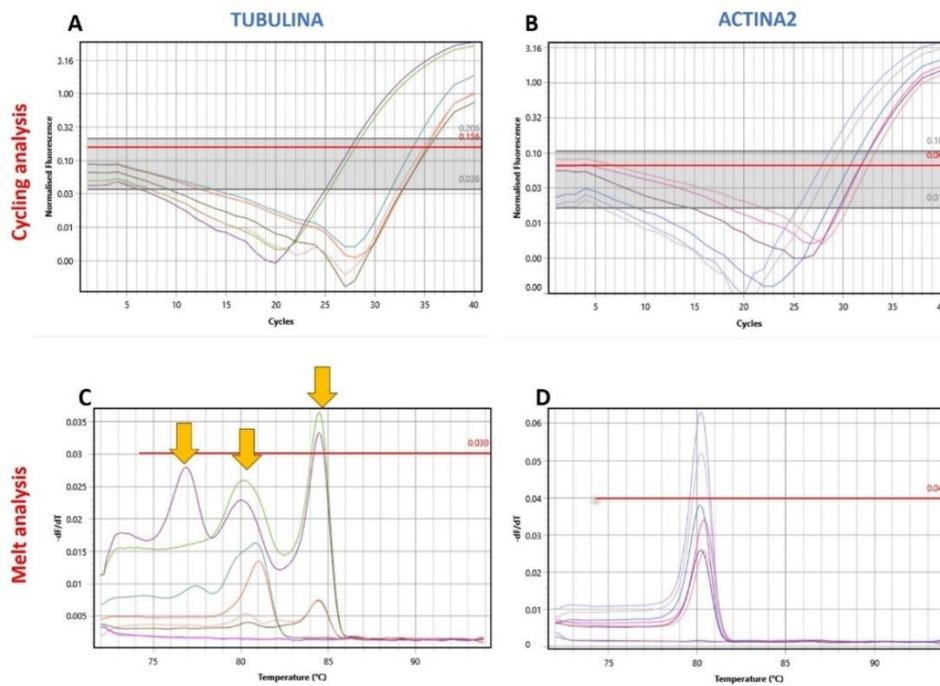
Ya que un gen de referencia no puede variar más de  $\pm 2$  ciclos en todas las muestras y todos los tratamientos para que pueda ser considerado en los cálculos, se realizó la evaluación de los diferentes genes de referencia ante los diferentes tratamientos. Para esto se hizo una PCR punto final y los productos de amplificación obtenidos se cargaron en un gel de agarosa al 2 %. En la Fig. 47 se muestran todos los productos de PCR de los 5 genes de referencia evaluados. Se encontró que los genes de *OGIO*, *UBIQUITINA* y *TUBULINA2* fueron los únicos en los que todos los tratamientos generaron producto de amplificación, sin embargo, la intensidad de las bandas no fue la misma. Algunas muestras generaron bandas de producto de amplificación con el gen *DWA1* (Fig. 47 C), no obstante, el gen de *ACTINA8* no generó producto de amplificación alguno para todas las muestras, lo cual podría deberse a un error experimental o la *ACTINA8* no es un buen gen de referencia.



**Fig. 47.** Producto de PCR punto final evaluado en un gel de agarosa al 2 %. A. Gel de agarosa de la PCR punto final de las muestras del genotipo wt, *sbh1-1* y *mpk6* expuestas a diferentes temperaturas con el gen *OGIO*. B. Gel de agarosa de la PCR punto final de las muestras del genotipo wt, *sbh1-1* y *mpk6* expuestas a diferentes temperaturas con el gen *actina8*. C. Gel de agarosa de la PCR punto final de las muestras del genotipo wt, *sbh1-1* y *mpk6* expuestas a diferentes temperaturas con el gen *DWA1*. D. Gel de agarosa de la PCR punto final de las muestras del genotipo wt, *sbh1-1* y *mpk6* expuestas a diferentes temperaturas con el gen *ubiquitina*. E. Gel de agarosa de la PCR punto final de las muestras del genotipo wt, *sbh1-1* y *mpk6* expuestas a diferentes temperaturas con el gen *tubulina*. Los genes de referencia que se usaron fue el gen que codifica para la proteína de la superfamilia de oxigenasas dependiente de 2-oxoglutarato (2OG) y Fe (II) [*OGIO*, por sus siglas en inglés] y el gen que codifica para la proteína DWD hipersensible a ABA 1 [*DWA1*, por sus siglas en inglés] (Škiljaica A et al. 2022).

La Fig. 47E indicó que la *TUBULINA2* puede ser un buen gen de referencia, ya que la intensidad menor mostrada en la muestra wt aclimatada se debió a un mal cargado de la muestra (rectángulo naranja). Por lo tanto, se realizó una PCR cuantitativa con las muestras de los tratamientos de altas temperaturas de los genotipos wt, *sbh1-1* y *mpk6*. La Fig. 48 A muestra las curvas de amplificación obtenidas para *TUBULINA*, las cuales indicaron una amplia diferencia para las muestras del genotipo wt, además, al analizar las curvas de

disociación (Fig. 48 C), se encontró que se generaban más de un pico por muestra (señalados con flechas amarillas), lo cual puede indicar que el gen no es específico. Igualmente, se analizaron las mismas muestras con los oligonucleótidos diseñados para *ACTINA2* (Fig. 48 B), las cuales también mostraron pequeñas diferencias en las curvas de amplificación, aun así, su curva de disociación mostró un único pico para todas las muestras (Fig. 48 D).



**Fig. 48.** Curvas de amplificación y de disociación del DNA durante los ciclos de calentamiento de los genes de referencia *tubulina* y *actina2*. A. Curva de amplificación de la *tubulina*. B. Curva de amplificación de la *actina2*. C. Curva de disociación del DNA con el gen *tubulina*. D. Curva de disociación del DNA con el gen *actina2*.