



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CAMBIOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS DE LÍNEAS DE  
*ARABIDOPSIS* CON DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD AL FRÍO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**DIANA CASTRO RÍOS**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. AGOSTO, 2016**



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: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

**SECRETARIO:** Profesor: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG

**2° SUPLENTE:** Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

**SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL  
TEMA:**

**LABORATORIO 101, DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESORA:**

**DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ**

---

**SUPERVISOR TECNICO:**

**M. EN C. LIZBETH E. GUTIÉRREZ ANGOA**

---

**SUSTENTANTE:**

**DIANA CASTRO RÍOS**

---

## RECONOCIMIENTOS

A la M. en C. Lizbeth E. Gutiérrez Angoa por su enorme aporte al desarrollo de este trabajo, mediante la asesoría técnica en todas las metodologías experimentales y no experimentales.

A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y a la Dra. Carolina Peña Montes (Facultad de Química, UNAM) por su enseñanza, apoyo y asesoría para el desarrollo de la técnica de qPCR y por su disposición continua durante el desarrollo de las determinaciones y su análisis.

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

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto (Facultad de Química, UNAM) por el gran apoyo brindado durante el desarrollo de los experimentos en el qPCR.

Al Dr. Edgar Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska- Lincoln, E.U.A.), por proporcionarnos las semillas de las mutantes *Atlcb2a-1* y *sbh1-1*.

Al Dr. Ángel Arturo Guevara García (IBT, UNAM), por la donación de la mutante *mpk6*.

Al Dr. Néstor Carrillo (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina), por haber proporcionado la línea transgénica *pflid18-18*.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra (Facultad de Química, UNAM), por su participación en los cultivos de plantas y en parte de la instrumentación utilizada en este trabajo.

- Este proyecto de tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de la Facultad de Química a través de los proyectos PAIP 5000 9115, de la Facultad de Química, PAPIIT IN222815, de la DGAPA, UNAM y 238368 y 252001 del CONACYT.
- La alumna Diana Castro Ríos recibió becas por parte de: la DGAPA, UNAM, proyecto PAPIIT IN222815 y CONACYT 238368.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1. Las bajas temperaturas y el desarrollo de las plantas	4
1.2. Respuestas adaptativas de las plantas a bajas temperaturas	5
1.3. La membrana plasmática como receptor de las bajas temperaturas en plantas	6
1.4 Vía de transducción de señales en respuesta a las bajas temperaturas	7
1.4.a Segundos mensajeros lipídicos	9
1.4.b MAP cinasas	10
1.4.c Especies reactivas de oxígeno.	11
1.5. Genes de respuesta a frío	12
1.6. Remodelación de los lípidos de la membrana de <i>A. thaliana</i> tras la aclimatación al frío	14
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>16</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>18</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>18</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
6.1 Material biológico	20
6.1.a Germinación de las semillas de <i>A. thaliana</i>	21
6.1.b Crecimiento de las plantas adultas	22
6.2. Exposición de las plantas a 4°C y recolección de muestra	22
6.3. Registro fenotípico de efecto del tratamiento de aclimatación	22
6.4. Extracción de RNA	23
6.5. Verificación de la calidad del RNA y calibración	24
6.6. Síntesis de DNA complementario (cDNA)	24
6.7. Amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final	25
6.8. Estimación relativa de los niveles de transcritos de <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> por densitometría	26
6.9. Reacción de PCR tiempo real	26
6.9.a Evaluación de la especificidad de la reacción	27

6.9.b Eficiencia del método .....	27
6.9.c Cuantificación de la expresión de <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> por PCR tiempo real .....	28
6.10. Verificación de las secuencias amplificadas .....	28
6.10.a Purificación del producto de PCR .....	28
6.10.b Reacción de ligación.....	29
6.10.c Transformación.....	29
6.10.d Selección de las células transformantes .....	30
6.10.e Extracción de plásmido (Kit Zymo Research).....	30
6.10.f Digestión del plásmido .....	31
7. RESULTADOS .....	33
7.1 Determinación de los tiempos de exposición a 4°C con cambios en la expresión de los genes <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> en plantas silvestres de <i>A. thaliana</i> .....	33
7.2. Efectos fenotípicos de la exposición a 4°C en las líneas mutantes de <i>A. thaliana</i> ...	36
7.3. Determinación de los niveles de transcritos de los genes <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> en las líneas mutantes de <i>A. thaliana</i> por PCR punto final .....	37
7.4 Determinación de los niveles de transcritos de los genes <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> en las líneas mutantes de <i>A. thaliana</i> por PCR tiempo real .....	39
8. DISCUSIÓN .....	44
8.1 Curva de expresión temporal de los genes <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> en plantas expuestas a 4°C .....	44
8.2 Efecto de la exposición de las plantas silvestres a la baja temperatura en la expresión de <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> a las 4 h y 7 d.....	46
8.3 Efecto de la baja temperatura en la expresión de <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> en las plantas del genotipo <i>lcb2a-1</i> .....	46
8.4 Efecto de la baja temperatura en la expresión de <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> en las plantas del genotipo <i>sbh1-1</i> .....	47
8.5 Efecto de la baja temperatura en la expresión de <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> en las plantas del genotipo <i>mpk6</i> .....	48
8.6 Efecto de la baja temperatura en la expresión de <i>CBF3</i> y <i>COR15a</i> en las plantas del genotipo <i>pflid18-18</i> .....	49
9. CONCLUSIONES PARTICULARES .....	50
10. CONCLUSIÓN GENERAL .....	50
11. Perspectivas.....	51
12. ANEXOS .....	52
13. REFERENCIAS .....	56

## ABREVIATURAS

<b>ADNAP2/EREBP</b>	<b>Ethylene-responsive element binding proteins / Apetala 2</b>
<b>BCL</b>	<b>Bases de cadena larga</b>
<b>CAMTA</b>	<b>Calmodulin-binding transcription activator</b>
<b>CBF</b>	<b>C-repeat binding factor</b>
<b>Cer-P</b>	<b>Ceramida fosfato</b>
<b>COR</b>	<b>Cold regulated</b>
<b>DAG</b>	<b>Diacilglicerol</b>
<b>DEPC</b>	<b>Dietilpirocarbonato</b>
<b>DGK</b>	<b>Diacilglicerol cinasa</b>
<b>ERO</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrógeno</b>
<b>ICE1</b>	<b>Inducer of CBF expression 1</b>
<b>IP<sub>3</sub></b>	<b>Inositol 1, 4, 5-trifosfato</b>
<b>MAP</b>	<b>Proteína activada por mitógeno</b>
<b>MAPK</b>	<b>Proteína cinasa activada por mitógeno</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>Ión súper oxido</b>
<b>OH<sup>·</sup></b>	<b>Hidroxilo</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>
<b>PF</b>	<b>Primer forward</b>
<b>PHS-P</b>	<b>Fitoesfingosina fosfato</b>
<b>PIP<sub>2</sub></b>	<b>Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato</b>
<b>PIPs</b>	<b>Fosfoinosítidos</b>
<b>PLC</b>	<b>Fosfolipasa C</b>
<b>PLD</b>	<b>Fosfolipasa D</b>
<b>PR</b>	<b>Primer reverse</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>
<b>SPT</b>	<b>Serina palmitoiltransferasa</b>
<b>TUB</b>	<b>Tubulina</b>

**MGDG**

**NA**

**AC**

**FAD**

**Monogalactosildiacylglicerol**

**No aclimatación**

**Aclimatación**

**Ácido graso desaturasa**

## RESUMEN

La respuesta de las plantas a las bajas temperaturas es un sistema complejo en el que se encuentran involucrados muchos elementos tales como bases de cadena larga (BCL), ácido fosfatídico, especies reactivas de oxígeno (ERO), fitoesfingosina fosfato (PHS-P) y algunas proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), además de muchos otros elementos celulares. Existen plantas de clima templado que pueden sobrevivir a temperaturas congelantes, después de una previa exposición a temperaturas bajas sin llegar al congelamiento, este proceso se conoce como aclimatación e involucra una gran cantidad de cambios fisiológicos y bioquímicos que le permiten a la planta responder de manera oportuna ante el estrés por frío.

El objetivo de este trabajo fue determinar si existen diferencias en el nivel de transcripción de dos genes involucrados en la respuesta a baja temperatura: *CBF3*, un factor de transcripción y *COR15a*, un gen funcional que codifica para una proteína de membrana del cloroplasto. La expresión de estos dos genes se estudió en plantas silvestres y líneas mutantes de *A. thaliana* que poseen deficiencias en esfingolípidos, MAPK y ERO de cloroplasto. Para ello se determinaron dos tiempos de exposición a 4°C, un tiempo corto de 4 h y un tiempo largo de 7 d.

Se encontró en la planta silvestre inducción del gen *CBF3* a las 4 h que disminuyó pasados los 7 d. En cuando al gen *COR15a* se observó un pequeño aumento a los 7 d, estos resultados fueron similares a los encontrados en la planta *pfl18-18*, lo que coincide con la respuesta de los genes y el fenotipo de sobrevivencia al reto congelante que se presenta en los antecedentes, aunque la mutante *pfl18-18* sobrevive aun sin previa aclimatación. En la línea mutante *lcb2a-1* no se encontraron diferencias en ninguno de los dos genes, sin embargo la respuesta fenotípica es sobrevivencia aún sin aclimatación previa. En la línea *sbh1-1* y *mpk6* se encontró la inducción del gen *CBF3* a las 4 h, sin embargo no hubo inducción del gen *COR15a* como se esperaba, lo que sugiere que tanto las BCL como la cinasa MPK6 podrían estar participando en la respuesta *CBF3-COR15a*, esta ausencia de activación del gen *COR15a* coincide con fenotipos de no sobrevivencia al reto congelante después de haber estado en condiciones de aclimatación. En cuanto a las ROS los resultados sugieren que no participan en la respuesta de *CBF3* y *COR15a*

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Las bajas temperaturas y el desarrollo de las plantas

Los principales factores ambientales que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas son la temperatura, la luz y la disponibilidad de agua (Janská et al., 2010). Con respecto a la temperatura, las plantas tienen una temperatura óptima de crecimiento. Sin embargo, están expuestas a cambios severos en corto y largo plazos, tales como las temperaturas que hay durante el día y las estaciones del año, respectivamente. Las respuestas de las plantas a las variaciones de temperatura se pueden expresar en términos de su tasa de crecimiento: la temperatura óptima que permite la mayor tasa de crecimiento, la temperatura máxima y mínima que permiten un crecimiento regular y por último temperaturas extremas que limitan el crecimiento de las plantas (Fitter y Hay, 1981). Cuando las condiciones ambientales se desvían del rango óptimo ocurren cambios fisiológicos, bioquímicos y metabólicos en las plantas.

La susceptibilidad a las temperaturas bajas y al congelamiento limita la distribución geográfica de los cultivos. De acuerdo a la capacidad que poseen las plantas a resistir el estrés por frío se pueden dividir en dos grupos: tolerantes y susceptibles. Las plantas que crecen en zonas tropicales o subtropicales son generalmente susceptibles a las bajas temperaturas, mientras que las plantas que habitan climas templados son tolerantes, lo que les permite sobrevivir a temperaturas congelantes de hasta  $-30^{\circ}\text{C}$  (Solanke y Sharma, 2008). La mayoría de las plantas de clima templado desarrollan un grado de tolerancia al frío cuando experimentan de forma gradual las temperaturas bajas gracias a los cambios estacionales (Janská et al., 2010).

Las bajas temperaturas están definidas entre los  $0$  y  $15^{\circ}\text{C}$  (Theocharis et al., 2012).y a nivel molecular tienen efectos biológicos directos en los procesos termodinámicos, de estabilidad y función de biomoléculas, por lo que conducen a una alteración de los procesos celulares como la fotosíntesis, el transporte inter- e intra-celular de solutos y en el balance de producción-neutralización de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Preston y Sandve, 2013).

Un efecto visible del daño por baja temperatura es la clorosis en las hojas, este fenómeno se desencadena debido a que la energía de la luz capturada por la planta no es utilizada y activa moléculas de oxígeno produciendo radicales libres que causan clorosis y posteriormente necrosis en la hoja, por ejemplo, en maíz se sabe que bastan temperaturas entre  $10-15^{\circ}\text{C}$  para producir estos efectos fisiológicos en las hojas (Revilla et al., 2005). Por lo tanto, el estrés por frío causa efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Chinnusamy et al.,

2007). Este tipo de estrés ambiental es uno de los más severos, ya que puede llevar a la muerte de la planta.

A temperaturas sub-cero o de congelamiento, tomando como criterio la temperatura de congelación del agua, el daño en las plantas es principalmente una consecuencia de la desestabilización de la membrana plasmática, resultado de la deshidratación inducida por congelamiento (Stenpokus, 1984), que es producida debido a la formación de hielo en el espacio apoplástico. Por la formación de hielo en esta región, se tiene una alta concentración de solutos en comparación con el interior de la célula, generándose un gradiente osmótico entre el apoplasto y la célula, lo que provoca que el agua citoplasmática migre hacia al exterior de la célula, contribuyendo a la extensión de los cristales de hielo y a la deshidratación. Esta deshidratación por el congelamiento propicia la interposición de los lípidos de las membranas y durante la rehidratación intentan regresar a su conformación membranal original, llevando a la fractura de las membranas (Sharma et al., 2005). Además, la tensión mecánica formada entre la pared celular y la membrana plasmática conduce a la ruptura de las células (Mahajan y Tuteja, 2005).

## **1.2. Respuestas adaptativas de las plantas a bajas temperaturas**

El estrés por baja temperatura en las plantas trae como consecuencia una modificación en su metabolismo en dos maneras; en primera instancia, la planta intentará realizar un ajuste en su metabolismo celular, el cual ha sido alterado por el cambio de temperatura generando cambios en las propiedades de la membrana, la activación de canales iónicos y enzimas, la acumulación de solutos y segundos mensajeros; en segundo plano, las plantas harán posibles modificaciones en el metabolismo que están principalmente enfocadas a mecanismos de tolerancia. Al respecto, se piensa que muchos metabolitos podrían contribuir a la inducción de tolerancia al estrés por frío (Yadav, 2009).

Como estrategia de protección a las bajas temperaturas nocturnas, algunas especies de plantas acumulan calor residual durante el día y lo disipan lentamente durante la noche (Nilsen y Orcutt, 1996), evitando de esta manera, que se ocasione daño por las bajas temperaturas de la noche.

Existen plantas de clima templado que tienen el potencial de incrementar su tolerancia al congelamiento tras una previa exposición a temperaturas bajas no congelantes, un proceso llamado aclimatación al frío. Este es un proceso complejo que involucra un gran número de cambios bioquímicos y fisiológicos, entre ellos: la acumulación de azúcares (Thomashow, 1999). Se sabe que durante este proceso de aclimatación al frío existe la acumulación de 325

metabolitos. Algunos de ellos son: glicina betaína, prolina, fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa, ascorbato y compuestos del ciclo de Krebs (Cook et al., 2004). La acumulación de metabolitos en plantas se conoce con la función de osmoprotección y ciertos metabolitos actúan como señalizadores para reconfigurar la expresión génica (Yadav, 2009).

Otros cambios dentro de este proceso de aclimatación al frío son la expresión de genes que codifican para el metabolismo de aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, nucleótidos y metabolitos secundarios (Sharma et al., 2005), que en conjunto permiten que algunas plantas sean tolerantes a las bajas temperaturas. Para que sucedan estas respuestas metabólicas se debe desencadenar río arriba la percepción de la señal que debería estar dirigida por algún receptor de temperatura.

### **1.3. La membrana plasmática como receptor de las bajas temperaturas en plantas**

Para poder definir la percepción, es importante definir a la temperatura como un factor físico que puede incidir en cambios termodinámicos a nivel de moléculas y a nivel supramolecular en las membranas celulares y estructuras de cromosomas; entonces la percepción queda como un hecho previo que controla estos cambios (Ruelland y Zachowski, 2010).

La membrana plasmática de las plantas se ha postulado como posible receptor, ya que es la barrera que separa el interior de la célula del exterior y también por su capacidad de rigidizarse en temperaturas bajas (Sharma et al., 2005; Janská et al., 2010; Ruelland y Zachowski, 2010; Miura y Furamoto, 2013).

Estudios con agentes como el dimetil sulfóxido y alcohol bencílico que hacen a las membranas rígidas o fluidas, respectivamente, revelan que la rigidización de la membrana plasmática genera la reorganización de los filamentos de actina, lo que lleva a la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  (Sharma et al., 2005) y además puede inducir la expresión de genes de respuesta a frío, como los cold regulated (COR), mientras que al hacer la membrana más fluida se evita la activación de dichos genes (Miura y Furamoto, 2013). Estos datos sugieren que la membrana podría ser el receptor de las bajas temperaturas en plantas.

En cianobacterias se sugiere que la membrana plasmática es quien percibe la temperatura a través de cambios en la fluidez de la misma (Knight et al., 2012). En *Synechocystis sp.* se sabe que una histidina cinasa específica (Hikk33) es quien percibe los cambios en la fluidez de la membrana plasmática y regula a genes en respuesta a baja temperatura y estrés osmótico. Un posible mecanismo de acción de Hikk33 es un cambio en la conformación de esta proteína que depende del estado físico de los lípidos de membrana, o sea, de la fluidez de la membrana (Mikami et al., 2002).

#### **1.4 Vía de transducción de señales en respuesta a las bajas temperaturas**

Los mecanismos moleculares de respuesta a las bajas temperaturas pueden estar organizados en una vía de transducción cuyos componentes básicos son el estímulo o señal, el receptor a esa señal, los transductores que continúen transmitiendo la señal originada a partir del estímulo, factores de transcripción que permitan que genes específicos se activen, transcriban y traduzcan en proteínas funcionales que respondan ante ese estímulo.

Un ejemplo de vía de transducción en plantas que se conoce bien es la vía del etileno, la cual es activada cuando la planta se encuentra en ambientes que causan estrés tanto biótico como abiótico o bien como parte de su desarrollo, ya que el etileno además de transductor de señal es una hormona de la planta (Wu et al., 2015). El receptor a etileno es la proteína ETR1, que se encuentra en la membrana de retículo endoplásmico y tiene un sitio de unión a etileno; cuando el etileno se encuentra presente, se une a receptores de membrana como: ETR1, ETR2, EIN4, ERS1, entonces ERS2 interacciona con EIN2 que es una proteína de membrana que regula y enciende los factores de transcripción EIN3 y EIL1, éstos finalmente inducen la expresión de genes específicos de respuesta a etileno. Cuando el etileno no se encuentra presente, el receptor interactúa con CTR1, una cinasa que enciende la cascada de proteínas activadas por mitógeno (MAP) cinasas que culminan en la inactivación de EIN2.

La vía por la que las bajas temperaturas son percibidas en las plantas aún no se ha dilucidado del todo. Sin embargo, ya se han descrito algunos elementos importantes que participan en la vía en la Figura 1 se presentan algunos. Se sabe que una vez que el frío es percibido, se activan fosfolipasas como la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), el IP<sub>3</sub> se une a canales de Ca<sup>2+</sup> y con ello aumenta la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico además, otros segundos mensajeros como la fitoesfingosina fosfato (PHS-P), el ácido fosfatídico y las ERO también aumentan su concentración.

Este conjunto de segundos mensajeros hacen que, tanto proteínas cinasas como fosfatasas se activen secuencialmente. Dentro de estas cinasas, se han descrito cascadas de proteína activada por mitógeno (MAP) cinasas (Ichimura et al., 2000). De un total de 82 genes alterados por frío, 32 genes son alterados por cascadas de señalización activadas por fosforilación y defosforilación (Lee Byeong-ha et al., 2005), lo que lleva a la expresión de factores de transcripción que son proteínas de unión a DNA que tienen como función activar a genes específicos que se traducen en proteínas funcionales que coadyuvan a la sobrevivencia a bajas temperaturas.

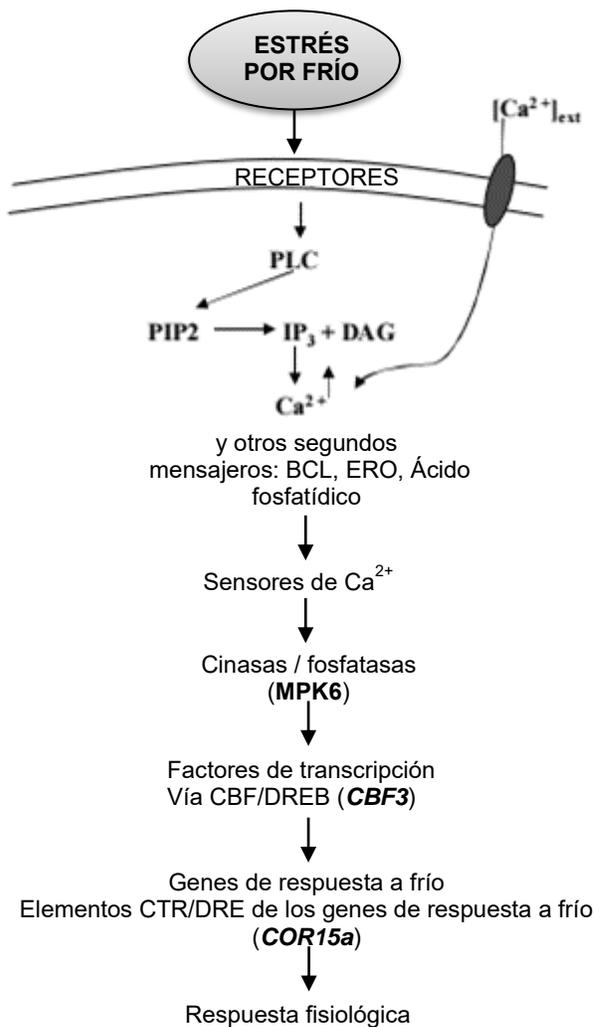


Figura 1. Vía de transducción de la señal de frío. La señal de frío es percibida por uno o varios receptores en la membrana plasmática, los cuales activan a la PLC y la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> para generar IP<sub>3</sub> y DAG. Tras la exposición a frío, aumentan los niveles de calcio citoplasmático, que son regulados a través del movimiento de los iones de Ca<sup>2+</sup> del apoplasto o de fuentes intracelulares, mediado por IP<sub>3</sub>. Este cambio en los niveles de calcio y la acumulación de otras moléculas señalizadoras como BCL, ácido fosfatídico y ERO, es percibido por sensores de calcio y otros componentes señalizadores, que río abajo interactúan con cinasas y fosfatasas; estas proteínas afectan gran parte de los genes que conllevan a la respuesta fisiológica. PLC, (Fosfolipasa C); PIP<sub>2</sub>, (Fosfoinosítidos); IP<sub>3</sub>, (Inositol 1, 4, 5 trifosfato), DAG, (diacilglicerol. (Modificado de Mahajan et al., 2005).

#### 1.4.a Segundos mensajeros lipídicos

Los lípidos y moléculas derivadas de ellos son participantes importantes en la respuesta a bajas temperaturas y también ante otros tipos de estrés abiótico y biótico (Meijer y Munnik, 2003). Un derivado de los fosfolípidos que se ha estudiado en frío es el ácido fosfatídico.

Se sabe que la acumulación de ácido fosfatídico es una de las primeras respuestas de la planta ante el frío (Ruelland et al., 2002; Arisz et al., 2013), este ácido puede provenir directamente de la hidrólisis de glicerolípidos de la membrana por la acción de la fosfolipasa D (PLD); o bien por la PLC la cual hidroliza fosfoinosítidos (PPIs) a partir de DAG, que posteriormente es fosforilado por la diacilglicerol cinasa (DGK) resultando finalmente el ácido fosfatídico (Arisz et al., 2013). Las PLC y PLD son enzimas en plantas que directa o indirectamente pueden percibir la entrada de  $Ca^{2+}$  al citosol por la exposición de plantas a las bajas temperaturas (Sharma et al., 2005). Debido a que el ácido fosfatídico es un precursor de glicerofosfolípidos, triacilgliceroles y galactolípidos, su presencia es determinante en la producción de lípidos y en la composición de la membrana (Arisz et al., 2013).

Los esfingolípidos poseen función de moléculas señalizadoras. Las bases de cadena larga (BCL), son intermediarios en la biosíntesis de esfingolípidos, funcionan como segundos mensajeros en células eucariotas y se sabe que participan en procesos de control fundamentales como la muerte, proliferación y diferenciación celulares (Shi et al., 2007). Estas especies lipídicas también están implicadas en el estrés por frío en plantas (Cantrel et al., 2011; Chen et al., 2012; Dutilleul et al., 2012; Guillas et al., 2011). Recientemente se reportó que la PHS-P y la ceramida fosfato (Cer-P) se incrementan transitoria y rápidamente tras la exposición de las plantas al frío en *A. thaliana* (Guillas et al., 2011, Dutilleul et al., 2015).

Específicamente, en condiciones de frío, la cinasa LCBK2 fosforila a fitoesfingosina (PHS) para producir PHS-P, lo que hace que los niveles de esta BCL fosforilada aumenten transitoriamente en condiciones de frío. Se sabe que corriente abajo de esta, hay una activación de la MPK6 (Dutilleul et al., 2012).

Se sabe que el aumento en los niveles de Cer-P y PHS-P en respuesta a frío, afecta la respuesta de genes específicos, como el caso de *NOI3*. Este gen codifica para una proteína de función desconocida que pertenece a una familia de 11 proteínas más, una de ellas, RIN4, quien es componente clave en la resistencia a patógenos (Dutilleul et al., 2012). Por lo que la función de *NOI3* podría tener un papel importante en la respuesta a las bajas temperaturas en plantas (Dutilleul et al., 2015).

#### **1.4.b MAP cinasas**

Las cascadas de cinasas de proteínas activadas por mitógeno o MAP cinasas son bloques transductores muy comunes en vías de transducción de señales que van desde la superficie celular al núcleo, por lo que juegan un papel fundamental en la regulación de cambios fisiológicos y bioquímicos asociados a un estímulo extracelular (Ichimura et al., 2000). Se encuentran integradas por tres elementos consecutivos: MAPKKK, MAPKK y MAPK (MAP cinasa), que son proteínas cinasas que se van activando en la secuencia mencionada mediante fosforilaciones.

Las MAPKKKs requieren componentes intermediarios que las activen como proteínas cinasas y que fosforilen motivos de la MAPKKK, como pueden ser cierres de leucina, secuencias de unión a proteínas G o los residuos de fosforilación serina/treonina. Ya activadas, las MAPKKK fosforilan a su sustrato, la MAPKK, en residuos serina/treonina que se encuentran dentro de dominios conservados en su estructura primaria. Finalmente, las MAPKK activan al último elemento, la MAPK, fosforiándola en los residuos de tirosina y treonina.

Una vez activada, la MAPK fosforila directamente a las proteínas que contengan el motivo fosfo-receptor serina/treonina-prolina y regiones denominadas sitios de acoplamiento. Estas fosforilaciones pueden suceder tanto en el citoplasma como dentro del núcleo, ya que los blancos pueden ser factores o co-rreguladores de la transcripción de genes (Saucedo y Gavilanes, 2005).

Se sabe que la acumulación de PHS-P en respuesta a las bajas temperaturas, se requiere para que rio abajo se active MPK6 (Dutilleul, 2012), sin embargo, esto no indica que en respuesta a bajas temperaturas no estén involucradas otras MAPKs, ya se reportó que MAPK9 y MAPK12 participan en el cierre de estomas, reduciendo este cierre cuando la planta carece de ambas MAPKs (Saucedo et al., 2015).

Se sabe que durante la exposición a frío, la AtMKK2 (MAP cinasa cinasa 2) aumenta su expresión activando a la AtMPK6, la cual induce la expresión de los factores de transcripción CBF (C-repeat binding factor), que son proteínas que regulan la expresión de genes, estos productos proteicos están involucrados en el metabolismo de osmolitos, la desintoxicación de ERO, el transporte a través de membranas, la regulación de factores de transcripción y muchos otros genes que se sabe tienen función protectora en la célula (Chinnusamy et al., 2007).

#### **1.4.c Especies reactivas de oxígeno.**

Las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de oxígeno ( $H_2O_2$ ), el ión súper óxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y los radicales libres, que se producen como subproductos del metabolismo central de la planta, se producen en la membrana plasmática, cloroplasto, mitocondria y peroxisomas. Sin embargo, la fuente más importante de ERO en plantas es el cloroplasto. Las plantas poseen sistemas antioxidantes que les permiten evitar el daño por oxidación manteniendo un equilibrio entre la producción de ERO y la de antioxidantes (Apel y Hirt, 2004).

En condiciones de estrés por frío se genera un estallido oxidante, es decir existe un aumento de ERO transitorio que es percibido por la planta, entonces se activan los sistemas que tienen por objetivo eliminar a las ERO producidas (Solanke y Sharma, 2008). Sin embargo, las ERO no solo son productos tóxicos para la célula, también funcionan como moléculas señalizadoras en respuesta a estrés abiótico y biótico (Maruta et al., 2012). Por ejemplo, se sabe que el  $H_2O_2$  generado en el cloroplasto, puede poseer una actividad de señalización en núcleo que regula la respuesta ante un estrés ambiental y que los niveles de esta molécula están regulados por la ascorbato peroxidasa de la membrana del tilacoide, la cual reduce el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y funciona como monitor del estrés oxidativo.

Esta peroxidasa también se encuentra asociada a la oxidación de proteínas en el cloroplasto y además modifica la respuesta de los genes, suprimiendo al *CBF1* (C-repeat binding factor 1), un factor de transcripción central en condiciones de temperatura baja. La supresión de este gen da como resultado una alta sensibilidad de las plantas al frío (Maruta et al., 2012). Otra especie oxidante es el óxido nítrico (NO), una molécula gaseosa pequeña que se incrementa en respuesta a bajas temperaturas en plantas y actúa regulando la formación de PHS-P y Cer-P de manera negativa (Cantrel et al., 2011; Guillas et al., 2011). También se ha visto que el NO regula la activación los factores de transcripción CBF, anulando la expresión de *CBF1* y *CBF3* en condiciones de frío (Cantrel et al., 2011).

### 1.5. Genes de respuesta a frío

Ya en 1970 se había propuesto que la aclimatación al frío involucra alteraciones en la expresión génica (Weiser, 1970). Hasta ahora la vía regulatoria de la expresión génica en respuesta a frío mejor entendida y que tiene un papel en la tolerancia al congelamiento es la vía CBF de *A. thaliana*. CBF1, CBF2 y CBF3 pertenecen a la familia de unión a ADNAP2/EREBP (ethylene-responsive element binding proteins / Apetala 2). Los genes *CBF* se encuentran organizados en tándem dentro del cromosoma IV de *A. thaliana* (Medina et al., 1999) y codifican para polipéptidos con una masa cercana a los 24 kDa y una alta similitud entre ellos (85% aproximadamente) (Medina et al., 2011). Estos factores de transcripción se unen a elementos regulatorios en los genes que responden a baja temperatura y que están presentes en los promotores de muchos genes inducibles por frío, por ejemplo *COR15a*, *COR47*, *ERD10*, entre otros (Thomashow et al., 2001).

Los factores de transcripción CBF controlan la expresión de más 100 genes (Park et al., 2015), por lo que es conocido como regulón CBF. Se informó que *CBF2* es inducido poco después que *CBF1* y *CBF3*; en plantas que no expresan *CBF2*, se encontraron altos niveles de transcrito de *CBF1* y *CBF3* con fenotipos más tolerantes al frío, por lo que se sugiere a *CBF2* como regulador negativo de los dos genes mencionados (Thomashow, 2010).

La forma en la que esta vía de expresión génica se enciende aún no se ha dilucidado del todo. Sin embargo, se conocen algunos elementos que participan en la vía, uno de los principales componentes es el  $Ca^{2+}$ , el cual incrementa su concentración en citosol en respuesta a bajas temperaturas (Sanders et al., 2002; Du y Poovaiah, 2005). Dentro de la célula, el  $Ca^{2+}$  es identificado por diferentes sensores que responden a las señales del ión, uno de estos sensores es CAMTA (calmodulin-binding transcription activator), que puede regular la expresión de los genes que posean en su promotor al elemento CG-1, como es el caso de los CBF (Doherty et al., 2009).

Por otro lado, se sabe que las bajas temperaturas activan a la proteína ICE1 (por sus siglas en inglés, inducer of CBF expression 1), la cual es un factor de transcripción que se expresa constitutivamente en el núcleo y que en condiciones de frío induce la expresión de los genes *CBF* (Chinnusamy et al., 2007) por reconocimiento de secuencias tipo MYC (o caja ICE) que se encuentran en la zona promotora de los genes *CBF*. Esto sugiere que ocurren modificaciones en ICE1 para que esta pueda activar genes río abajo en respuesta a las bajas temperaturas

(Mahajan y Tuteja, 2005). Un análisis del transcriptoma de una línea mutante de *A. thaliana* dominante en *ICE* reveló que se afectó la expresión del 46% de los genes de factores de transcripción regulados en frío (Chinnusamy et al., 2007).

Una vez que ICE1 se une al elemento regulatorio de frío en los genes *CBF*, estos genes se expresan y traducen en proteínas para después unirse a la zona regulatoria de los genes *COR*, activando su expresión (Thomashow et al., 2001). Los genes *COR* codifican para proteínas con funciones específicas que permiten a las plantas contender con las temperaturas congelantes.

La clase de proteínas que se codifican a partir de los genes *COR* conforman una familia muy grande de proteínas hidrofílicas, con una composición simple que contiene unos cuantos aminoácidos conformando una secuencia motivo repetida. Algunos de estos genes codifican para proteínas con capacidad predicha para formar  $\alpha$ -hélices anfipáticas, como es el caso de *COR15a* y genes similares en otras especies como en alfalfa *Cas15* y en trigo *WCS120* (Mahajan y Tuteja, 2005).

El gen *COR15a* codifica para una proteína de 15 kDa que va dirigida al cloroplasto, antes de ser funcional es procesada obteniendo un polipéptido de 9.4 kDa designado como COR15am y se sabe que disminuye el daño a la membrana debido a que impide la formación de la fase hexagonal II, que es un daño estructural de la membrana inducido por el congelamiento. Sin embargo, COR15am también podría actuar en conjunto con otras proteínas codificadas por genes *COR* (Thomashow et al., 2001).

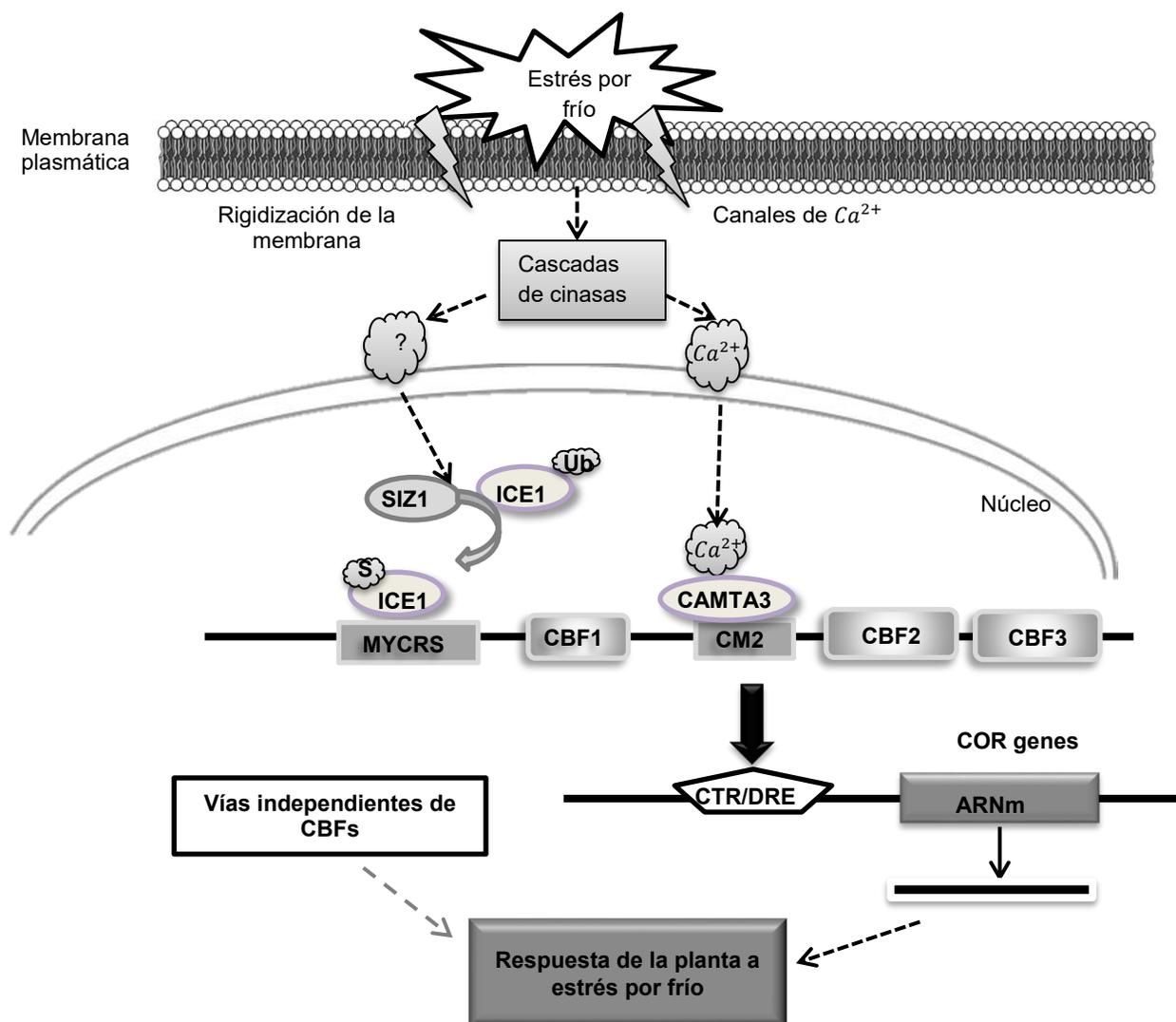


Figura 2. Regulación de la vía de señalización de CBF durante la aclimatación al frío. En esta vía, las bajas temperaturas inducen un aumento del  $Ca^{2+}$  citosólico lo que lleva a la activación de factores de transcripción, tales como ICE1 y CAMTA, estas proteínas activan la expresión de los CBF que pueden unirse a elementos CRT / DRE en las regiones promotoras de los genes COR y activar su transcripción. ICE1, inducer of CBF expression 1; CBF, C-repeat binding factor; CAMTA3, calmodulin-binding transcription activator. CM2, conserved DNA motif2. CBF, C-repeat binding factor. Ub, ubiquitin. S, sumoylation. MYCRS, MYC recognition sequence. CTR/DRE, C repeat/dehydration-responsive. COR, cold regulated (Shi et al., 2014).

### 1.6. Remodelación de los lípidos de la membrana de *A. thaliana* tras la aclimatación al frío

La membrana plasmática comúnmente contiene en altas proporciones de fosfolípidos, esteroides libres, esteroides glucosilados y cerebrósidos; en *A. thaliana* un 47% son fosfolípidos, 38% esteroides libres, 7% cerebrósidos y 8% esteroides glucosilados. Los fosfolípidos más abundantes

son fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina que se presentan en más de 15 especies distintas con estructuras saturadas y monoinsaturadas (Uemura y Steponkus, 1999).

En un estudio en protoplastos de *A. thaliana* se determinó que durante la aclimatación, la composición lipídica de la membrana plasmática cambia, demostrándose que se incrementa la proporción de fosfolípidos especialmente en las especies di-insaturadas de fosfatidilcolina y fosfatodiletanolamina, aunque siguen prevaleciendo las especies mono-insaturadas. También disminuyen los cerebrósidos, un tipo de esfingolípido; los esteroides libres disminuyen y en pequeña proporción lo hacen los esteroides glucosilados (Uemura et al., 1995; Uemura y Steponkus, 1999). Estos cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática tras la aclimatación se relacionaron directamente con una disminución del daño causado por el congelamiento que se da cuando el medio comienza a descongelarse y antes de que el protoplasto intente regresar a su forma original.

Otro efecto estudiado en los protoplastos fue la pérdida de permeabilidad, que se da por la fusión de las bicapas y formación de fases lipídicas alternativas, lo cual también disminuyó en condiciones de aclimatación, sin embargo, esto no puede ser atribuido directamente a la remodelación de lípidos en la membrana, ya que este fenómeno está influenciado por las características de fisicoquímicas de las membranas (Uemura y Steponkus, 1999).

Una ruta por la cual puede ser modificada la composición de los lípidos de la membrana plasmática es la biosíntesis de glicerolípidos, vía en la cual la desaturación del ácido graso representa un paso central y se da en respuesta a las fluctuaciones de la temperatura; sin embargo, la relación entre desaturasas y ácidos grasos insaturados en función de la temperatura no correlaciona. Los estudios en *A. thaliana* revelaron que en condiciones de baja temperatura se favoreció la síntesis de monogalactosildiacilglicerol (MGDG) lo cual correlaciona con una mayor expresión de la ácido graso desaturasa 5 (FAD5). En FAD8 se describió que existe evidencia de regulación transcripcional y post-traducciona en condiciones de alta temperatura (Matsuda et al., 2005). Por ello los lípidos de membrana son de particular interés en condiciones de baja temperatura, ya que ocurren diversos cambios en ella.

## 2. ANTECEDENTES

Las diversas vías de señalización y expresión génica encendidas durante la aclimatación al frío llevan a diversos cambios fisiológicos y bioquímicos en las plantas (Sharma et al., 2005). Al finalizar este proceso, algunas plantas son capaces de sobrevivir a temperaturas congelantes letales como es el caso de *A. thaliana*. En nuestro laboratorio se determinó que tras una semana de exposición a 4°C (aclimatación) las plantas silvestres de *A. thaliana* fueron capaces de sobrevivir a un reto de congelación de -15°C por 80 min, en comparación con las plantas silvestres que no se expusieron a 4°C (controles, no aclimatación), la cuales presentaron un fenotipo de muerte tras el mismo reto.

En nuestro laboratorio disponemos de plantas de *A. thaliana* que poseen modificaciones en su genoma: la línea *lcb2a-1* posee una inserción de un transposón en el gen que codifica para la subunidad LCB2a de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) (Dietrich et al., 2008); la línea *sbh1-1* contiene una inserción de T-DNA en el gen que codifica para la hidroxilasa 1 de bases esfingoideas (bases de cadena larga) (Chen et al., 2008); la mutante *mpk6* contiene también una inserción de T-DNA en el gen que codifica para la MPK6 (Saucedo-García et al., 2011) y la línea *pfl18-18* que contiene una inserción del gen que codifica para la flavodoxina bacteriana (Tognetti et al., 2006).

Anteriormente en el laboratorio, Cano-Ramírez (2014) encontró que estos genotipos de *A. thaliana* presentaron diferencias en la resistencia al congelamiento después de los tratamientos de no aclimatación (NA) y de aclimatación (AC). Se observaron algunas plantas con fenotipos de sobrevivencia, reflejo de resistencia al congelamiento (aclimatación exitosa) y plantas que no resistieron al reto (aclimatación no exitosa). La planta silvestre NA presentó un fenotipo de muerte después del reto congelante, mientras que la planta AC presentó un fenotipo de sobrevivencia, infiriéndose que la aclimatación ayudó a la planta silvestre a contender con las temperaturas congelantes. En cuanto a línea mutante *lcb2a-1* y *pfl18-18* se encontró que el grupo no aclimatado sobrevivió sin tener previa aclimatación y también cuando fueron aclimatadas. En las líneas *sbh1-1* y *mpk6* se encontró una nula sobrevivencia al reto congelante con o sin aclimatación. En la Figura 3 se presentan los fenotipos de recuperación de plantas no aclimatadas y aclimatadas sometidas al reto congelante.

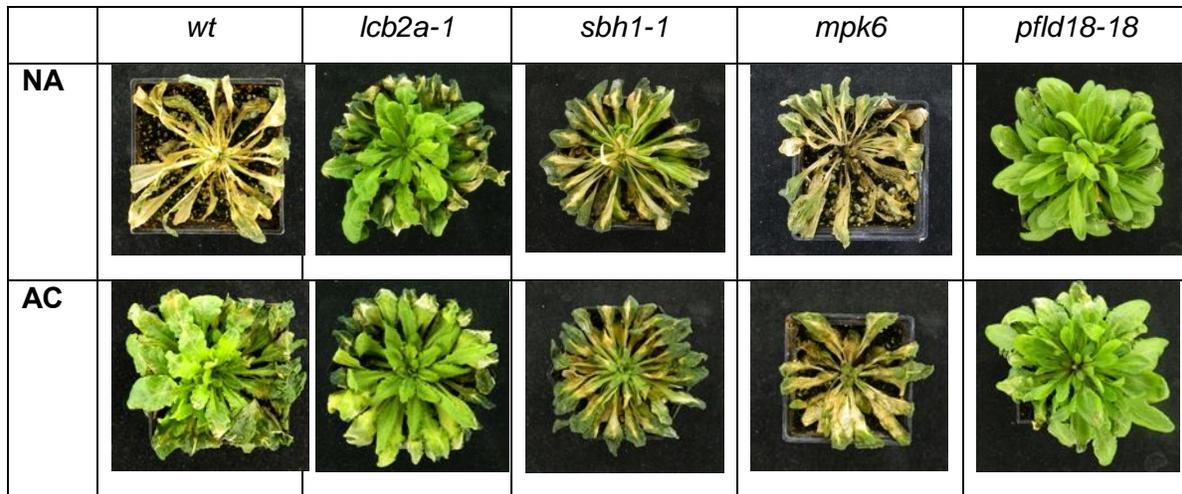


Figura 3. Fenotipos de sobrevivencia de plantas no aclimatadas y aclimatadas de *A. thaliana* silvestre y líneas mutantes. Las plantas se sometieron a una semana de condiciones de no aclimatación (NA) o aclimatación (AC), luego a un reto congelante de 80 min. Se dejó transcurrir una semana a 22°C y se tomó el fenotipo de recuperación que es el que se presenta (Cano Ramírez, 2014).

Los datos anteriores sugieren que las diferentes perturbaciones en el genoma de las líneas mutantes están involucradas en el desarrollo de una respuesta exitosa a la aclimatación. Por ello, las mutaciones en los genes probablemente involucran un efecto en elementos de la respuesta al frío o bien que estos elementos modifiquen la expresión de genes que se expresan en respuesta a frío.

### 3. HIPÓTESIS

- La respuesta al frío incluye vías de señalización que contienen esfingolípidos, MAP cinasas y ERO como elementos transductores que modifican la expresión de los genes *CBF3* y *COR15a*.

### 4. OBJETIVO GENERAL

- Determinar si existe diferencia en los niveles de transcrito de los genes *CBF3* y *COR15a* en respuesta al frío entre las plantas silvestres y las líneas mutantes de *A. thaliana* deficientes en esfingolípidos, MPK6 y ERO del cloroplasto.

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Germinar y crecer plantas adultas de *A. thaliana* genotipo silvestre (*wt*), y de las líneas mutantes *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk6* y *pfl18-18*.
- Determinar los tiempos de exposición a 4°C en los cuales se observen cambios en los niveles de transcripción de los genes de respuesta a frío: *CBF3* y *COR15a* en la planta silvestre de *A. thaliana*
- Determinar la expresión del gen de *TUB* (gen de referencia) en los tiempos de exposición a frío utilizados y verificar su expresión constitutiva.
- Exponer a 4°C las plantas de *A. thaliana* de genotipo silvestre y mutantes por 0 h, 4 h y 7 d.
- Determinar los fenotipos de plantas mutantes y silvestres a los tiempos de exposición a 4°C.
- Recolectar hojas de las plantas silvestres y líneas mutantes que fueron expuestas a 4°C por los tiempos establecidos.
- Extraer RNA a partir de hojas de plantas adultas tanto de *wt* como de las líneas mutantes *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk6* y *pfl18-18* en exposición a 4°C.
- Obtener el cDNA correspondiente de cada muestra de RNA.
- Determinar los niveles de transcritos de los genes: *CBF3* y *COR15a* en las plantas silvestres de *A. thaliana* y en las líneas mutantes mencionadas.
- Determinar los niveles de transcritos mencionados por las técnicas de PCR tiempo final y PCR tiempo real.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para responder a la hipótesis planteada, se siguió la estrategia experimental resumida en la Figura 4, la cual se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se determinaron los tiempos de exposición a 4°C necesarios para observar cambios evidentes en los niveles de los transcritos de los genes *CBF3* y *COR15a* en las plantas silvestres de *A. thaliana*. Estas plantas se expusieron por: 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 2 d, 5 d y 7 d a 4°C, posterior a ello se recolectaron y se almacenaron hojas de cada una de las plantas para la extracción de RNA y a partir de este material genético se realizó la retro transcripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para así analizar la expresión de *CBF3* y *COR15a*. En la segunda etapa, utilizando los tiempos determinados en la primera etapa (4 h y 7 d), se sometieron a 4°C tanto plantas del genotipo silvestre como de líneas mutantes y de la misma manera se analizó la expresión de los dos genes de respuesta a frío y se incluyó un ensayo en PCR tiempo real. Por último se verificó la identidad de los productos de PCR analizados.

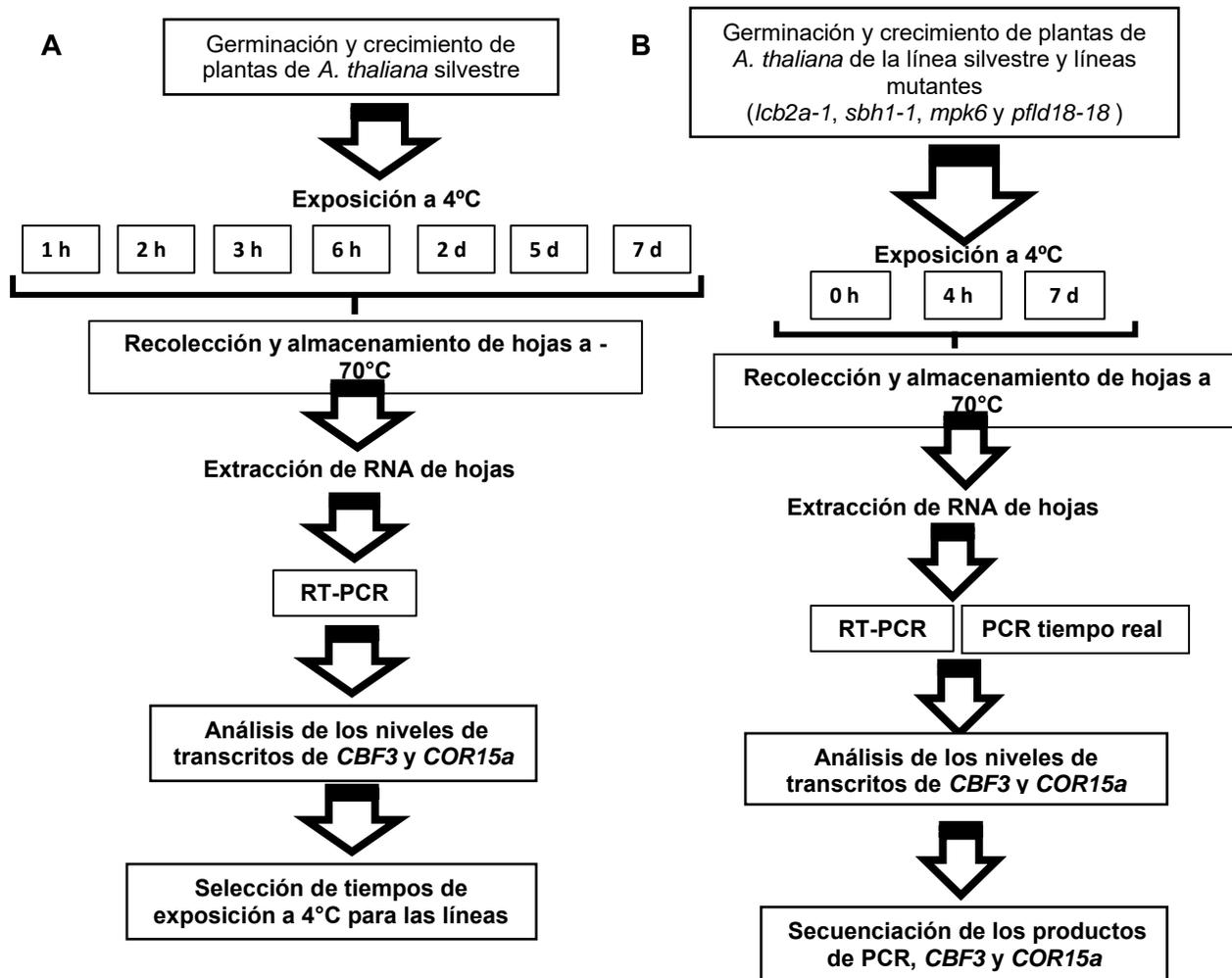


Figura 4. Estrategia experimental. A. En la primera etapa, las plantas silvestres de *A. thaliana* se sometieron a 4°C por 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 2 d, 5 d o 7 d, se colectaron hojas de cada una de estas plantas y se almacenaron a -70°C hasta la extracción del RNA. A partir de este material genético se elaboró la RT-PCR y se analizaron los niveles de expresión de los genes *CBF3* y *COR15a*. B. En la segunda etapa. La planta silvestre y las líneas mutantes se expusieron a 4°C por 0 h, 4 h y 7 d y en todas estas muestras se analizó la expresión de los genes *CBF3* y *COR15a* de la misma forma que con las muestras de la primera etapa. Finalmente se verificó por secuenciación la identidad de los productos de PCR

En este trabajo se utilizaron plantas silvestres de *A. thaliana* y cuatro líneas con genotipos modificados. En la tabla 1 siguiente se describen los genotipos utilizados en este estudio:

Tabla 1. Características genotípicas y fenotípicas de plantas de *A. thaliana* modificadas genéticamente y usadas en este trabajo.

<b>Genotipo de <i>A. thaliana</i></b>	<b>Construcción genética</b>	<b>Características</b>	<b>Contenido de esfingolípidos</b>
Silvestre (wt)	No tiene modificaciones	Normal	Basal
<i>lcb2a-1</i>	Inserción de trasposón en el gen que codifica para la subunidad LCB2A de la enzima SPT	Implicada en la gametogénesis y embriogénesis. Menos sensible a fumonisina (Dietrich et al., 2008).	Basal
<i>sbh1-1</i>	Inserción de T-DNA en el gen que codifica para la hidroxilasa 1 de bases de cadena larga	Menor contenido de LCB trihidroxiladas (Chen et al., 2008).	30% menos de esfingolípidos trihidroxilados y 2 veces más contenido de esfingolípidos dihidroxilados que la silvestre
<i>mpk6</i>	Inserción de T-DNA en el gen que codifica para la MAP cinasa 6	Carece de la expresión de la MPK6 (Dutilleul et al., 2012).	Basal
<i>pfl18-18</i>	Inserción del gen que codifica para la flavodoxina bacteriana en cloroplasto	Posee una reducción de las ERO de cloroplasto (Tognetti et al., 2006).	Basal

### 6.1.a Germinación de las semillas de *A. thaliana*

Las semillas de las plantas utilizadas en este trabajo se germinaron en un sustrato compuesto de 1 1/2 partes de Mix 3 Agregate Plus (Sunshine, sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), 1/2 parte de agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C. V.; Tlalnepantla, Edo. de México) y 1/2 partes de vermiculita Premium Grade (Sunshine, sun Gro Horticulture; Canada Ltd.). Al sustrato mezclado se le agregó agua suficiente para humedecerlo y con él se llenaron macetas de plástico de 100 mL de capacidad, previamente lavadas y enjuagadas con HClO<sub>4</sub> (Clorallex®) al 30%. Las semillas de *A. thaliana* Col-0 (wt) y de todas las líneas mutantes usadas en este estudio, se espolvorearon con los dedos sobre la superficie de cada maceta. Una vez

sembradas, todas las macetas se colocaron en una charola negra y se les puso un domo transparente para conservar la humedad. Se ubicaron en una cámara a 22°C con un foto periodo de 8 h luz y 16 h oscuridad y a partir de entonces se regaron cada tercer día con una solución nutritiva de Hoagland.

### **6.1.b Crecimiento de las plantas adultas**

Una vez germinadas las semillas de *A. thaliana*, se dejaron crecer al estadio de plántulas hasta las tres semanas. Posterior a ello, las plántulas se transfirieron a macetas con sustrato recién preparado como se detalló anteriormente. Se colocaron de 1 a 3 plántulas por maceta. Para esto, con ayuda de una espátula y pinzas se tomó un cuadrante del área sembrada y con cuidado se separaron las plántulas cuidando de no dañar sus raíces. Con la espátula se hizo una pequeña excavación en el sustrato y se enterró la raíz de la plántula dejando la parte aérea de la planta intacta. Todas las macetas se colocaron en charolas, se cubrieron con un domo transparente y se ubicaron nuevamente en el invernadero con fotoperiodo de 8 h luz y 16 h de oscuridad a 22°C. Al convertirse en plantas adultas (aproximadamente 3 semanas después de ser trasplantadas), se les removió el domo transparente y se comenzó a usar una regadera para su riego con la solución nutritiva de Hoagland.

### **6.2. Exposición de las plantas a 4°C y recolección de muestra**

Para el experimento donde se realizó la determinación de los tiempos de exposición a 4°C, las plantas adultas de genotipo silvestre de *A. thaliana* de aproximadamente 16 semanas de edad y que crecieron a 22°C se expusieron a 4°C por 1 h, 3 h, 6 h, 2 d, 5 d y 7 d. Una vez recibido el tratamiento de frío se recolectaron las hojas y se almacenaron a -70°C hasta el momento de extracción del RNA. Como control se recolectaron hojas de plantas sin tratamiento de frío.

Para el experimento donde se analizaron las líneas mutantes *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk6* y *pfl18-18*, estas plantas y las del genotipo silvestre se sometieron a 4°C por 4 h y 7 d. Una vez recibido dicho tratamiento se recolectaron las hojas y se almacenaron a -70°C hasta el momento de extracción del RNA. Como control se recolectaron hojas de plantas sin tratamiento de frío.

### **6.3. Registro fenotípico de efecto del tratamiento de aclimatación**

Una vez que se llevaron a cabo los respectivos tratamientos de 22°C y 4°C a 4 h y 7 d, se realizó el registro fotográfico de cada grupo de plantas, el cual fue llevado a cabo con una cámara Nikon modelo L120 a una exposición  $\pm 1$ ; utilizando una fuente de luz blanca para la iluminación.

#### **6.4. Extracción de RNA**

Para este procedimiento se ocupó material de vidrio esterilizado a 120°C/1 h y el agua utilizada se preparó previamente disolviendo 1 mL de Dietilpirocarbonato (DEPC) 6.9 M en 1 L de agua estéril, se dejó disolver toda la noche con un agitador magnético y posteriormente se esterilizó a 120°C/1 h. Todas las centrifugaciones se realizaron a 13,981.7 g a 4°C

Primero se colocó la muestra de hojas en un mortero y se pulverizó con nitrógeno líquido hasta dejar un polvo muy fino. Se agregaron 3 volúmenes de la solución de Trizol (Invitrogen) en relación al peso de la muestra (100 mg muestra / 300 µL de Trizol) y se homogenizó el tejido hasta obtener una solución uniforme, que se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, después se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó durante 15 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 200 µL de fenol-cloroformo, se agitó por 15 s y luego se centrifugó durante 15 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo eppendorf y se adicionaron 400 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente con un vortex y se centrifugó durante 10 min. El sobrenadante se separó y se agregó un volumen de isopropanol igual al del sobrenadante; se mezcló muy bien y se incubó a -20°C toda la noche. Luego se centrifugó durante 10 min, se decantó el sobrenadante y el botón se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el botón a temperatura ambiente por 5 min, se disolvió en 500 µL de H<sub>2</sub>O DEPC y se adicionaron 167 µL de LiCl 8 M (4°C), nuevamente se incubó a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se mezcló la muestra, se centrifugó por 15 min, se decantó y después se disolvió el botón en 250 µL de H<sub>2</sub>O DEPC, se agregaron 500 µL de etanol al 95 % y 25 µL de acetato de sodio 3 M, se incubó toda la noche a -70°C. Seguido de lo anterior, la muestra se centrifugó por 20 min, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 mL de etanol al 70 %. Posteriormente se centrifugó por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el botón se secó a temperatura ambiente por 5 min, una vez seco, se resuspendió en 100 µL de H<sub>2</sub>O DEPC y después se centrifugó por 5 min, se tomaron sólo 90 µL de la muestra y se cuantificó RNA total espectrofotométricamente con ayuda del equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se almacenó a -70°C.

Las muestras se alicuotaron en tubos con concentraciones de RNA de 200 ng/µL en un volumen de 100 µL, con las que se trabajó dejando siempre en congelación al stock de la extracción.

### 6.5. Verificación de la calidad del RNA y calibración

Una vez extraído el material genético, se cargó el volumen equivalente a 1 µg/µL de RNA de todas las muestras en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a 0.5 µg/µL, el RNA se mezcló con amortiguador de carga 6X (Loading Thermo Scientific). La electroforesis del gel de agarosa que contenía al RNA se realizó aplicando 65 volts por aproximadamente 30 min con amortiguador TAE 1X como amortiguador de corrida. Una vez revelado el gel, se buscó que las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S se lograran distinguir, lucieran discretas y bien definidas, con lo cual nos aseguramos de la pureza e integridad del RNA aislado. Para la calibración del material genético se realizó la densitometría de las bandas correspondientes al RNAr 18S de las diferentes muestras. Se buscó que los valores de densitometría coincidieran entre las muestras, no difiriendo en más del 15% del valor numérico entre una y otra muestra de RNA. El proceso de calibración permite partir de una cantidad similar de RNA en todas las muestras obtenidas y por tanto, esperar una cantidad similar de cDNA de las mismas. La imagen se capturó en el equipo CHEMIDOC MP, modelo 400R-PRO, seguido de esto se realizó la densitometría con ayuda del software Carestream Molecular Imaging Software v.5.0.2.30.

### 6.6. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para la síntesis de DNA complementario, se colocó el volumen equivalente a 1 µg de RNA de cada muestra en un tubo estéril, se añadió 1 µL de oligo dT (61 µM), se desnaturalizó a 70°C por 5 min y se enfrió en hielo por 5 min. Mientras tanto se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a la Tabla 2. Se adicionó la mezcla de reacción y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 min para que ocurra el alineamiento. Luego se incubó a 42°C por 60 min para la síntesis del cDNA. Para inactivar la enzima RT se incubó a 70°C por 15 min, el cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

Tabla 2. Mezcla de reacción para realizar la retro-transcripción.

Reactivo	Volumen (µL)
Amortiguador Improm II 5x	4
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.4
dNTP's(10 mM)	1
Transcriptasa Reversa	1
H <sub>2</sub> O DEPC	6.6

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), Dietilpirocarbonato (DEPC).

### 6.7. Amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

Para la realización de la PCR se utilizaron 3 pares de oligonucleótidos que flanquearon secuencias específicas de nuestros genes blanco; *TUB*, *CBF3* y *COR15a*. En la Tabla 3 se presentan las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la PCR, se muestra también el tamaño de los amplicones generados de cada gen.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Producto de PCR
<i>TUB</i>	PF_AAATCACAGCACTTGCACCA PR_CAGCCTTTGATTTCAATTTGC	481 pb
<i>CBF3</i>	PF_AAGAAGTTTCGTGAGACTCG PR_AACGATACGTCGTCATCATC	518 pb
<i>COR15a</i>	PF_AGAAAACCTCAGTTCGTCGTC PR_TACTTTGTGGCATCCTTAGC	322 pb

Tubulina *TUB*, C-repeat binding factor 3 *CBF3*, Cold regulated 15a *COR15a*.

Se utilizó 1 µL de cDNA diluido en 4 µL de agua, a este se le agregó la mezcla de reacción que se muestra a continuación.

Tabla 4. Reactivos y volúmenes utilizados para las reacciones de PCR

Reactivo	Volumen (µL) para 1 reacción
Amortiguador 5x Taq	4
dNTP's (10 µM)	0.4
Oligonucleótido sentido (10 µM)	2
Oligonucleótido antisentido (10 µM)	2
G <sub>o</sub> Taq polimerasa	0.2
H <sub>2</sub> O	6.4

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's)

Se utilizó un termociclador Gene Amp PCR System 9700, las condiciones de termociclado fueron 5 min a 94°C para lograr la desnaturalización del DNA, 40 s como desnaturalización en cada ciclo, 40 s a 58°C como temperatura de alineamiento y 40 s a 72°C para polimerizar en

cada ciclo, por último 4 min a 72°C como polimerización final. Para la amplificación de los genes *TUB* y *CBF3* se utilizaron 33 ciclos y para el gen *COR15a* se utilizaron 28 ciclos.

#### **6.8. Estimación relativa de los niveles de transcritos de *CBF3* y *COR15a* por densitometría**

Para determinar los posibles cambios en la expresión de los genes en estudio, se utilizó como gen de referencia al de *TUBULINA (TUB)*, cuya expresión no cambia en las condiciones de exposición al frío.

Los productos de los genes amplificados por PCR se separaron en un gel de agarosa con bromuro de etidio 0.5 µg/µL. La electroforesis del gel de agarosa que contenía los productos de PCR se realizó aplicando 65 volts por aproximadamente 30 min con amortiguador TAE 1X como amortiguador de corrida. Se reveló por exposición a luz ultravioleta y la imagen generada se capturó en el equipo CHEMIDOC MP, modelo 400R-PRO luego se analizó por densitometría con ayuda del software Carestream Molecular Imaging Software v.5.0.2.30 obteniéndose valores numéricos de la intensidad de las bandas.

Estos valores se asociaron al nivel de expresión, considerando la expresión del gen de referencia en las mismas condiciones. La comparación se estableció entre los diferentes tiempos de exposición a 4°C. Se realizaron dos PCR por cada uno de los genes en cada lote de plantas.

#### **6.9. Reacción de PCR tiempo real**

Con el propósito de corroborar los niveles de expresión determinados por PCR punto final, se utilizaron las muestras de RNA de las plantas silvestres y líneas mutantes expuestas por 0h, 4h y 7d para ser analizadas por PCR tiempo real. Se utilizaron los oligonucleótidos que se presentan en la Tabla 5 y se utilizó el termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la PCR tiempo real, se muestra también el tamaño de los amplicones generados de cada gen

Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Producto de PCR
<i>TUB</i>	PF_GTTCTCAGCAGTACCGTTCC PR_CTCCACAAAGTAGGACGAGTTC	178 pb
<i>CBF3</i>	PF_CAACTTGCGCTAAGGACA PR_ATGAGGCGATGTTTGAGA	162 pb
<i>COR15a</i>	PF_AACGAGGCCACAAAGAAAGC PR_GCAGATACATTGGGTAAAGAAGCTG	113 pb

Tubulina *TUB*, C-repeat binding factor 3 *CBF3*, Cold regulated 15a *COR15a*.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L, utilizando los reactivos y cantidades que aparecen en la Tabla 6. En cuanto a las condiciones del equipo se programó una temperatura de disociación de 95°C, una de alineamiento de 61°C para todos los genes. Tabla 6. Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de PCR tiempo real

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)	
Mezcla de reacción KAPA SYBR FAST	10.0	
ROX Reference Dye Low	0.4	
Oligonucleótido sentido	0.4	
Oligonucleótido antisentido	0.4	
cDNA	1.0	
H <sub>2</sub> O libre de DNAsas	7.7	

DNA complementario (cDNA), Fluoroforo ROX.

### 6.9.a Evaluación de la especificidad de la reacción

Previamente a la cuantificación, se llevó a cabo la estandarización de la técnica, en la cual se evaluó la especificidad de los oligonucleótidos y se estableció la eficiencia de cada curva de amplificación.

### 6.9.b Eficiencia del método

Para validar el método de PCR tiempo real, se realizaron curvas estándar con diluciones seriadas de cDNA en cada punto de la curva se colocó la dilución correspondiente, esto se

determinó por triplicado. Se verificó que la muestra concentrada y las diluidas amplificaran correspondientemente a la concentración de cDNA utilizada. Para obtener la eficiencia de cada curva se utilizó la siguiente ecuación, tomando en cuenta la pendiente que la gráfica de  $C_T$  vs Log Concentración de cDNA, la pendiente de esta curva debe tener valores cercanos a -3.32.

$$\%E = [(10^{-1/m}) - 1] \times 100$$

m, corresponde a la pendiente de la curva  $C_T$  vs Log Concentración. Considerando como eficiente una curva con valor mayor al 90%.

### 6.9.c Cuantificación de la expresión de *CBF3* y *COR15a* por PCR tiempo real

Para realizar la cuantificación relativa de la expresión de nuestros dos genes de interés se empleó el Método Pfaff el cual considera las eficiencias de cada gen.

$$\frac{(1 + E_{gen\ de\ interes})^{\Delta Cq_{gen\ de\ interes}}}{(1 + E_{gen\ calibrador})^{\Delta Cq_{del\ gen\ calibrador}}}$$

Gen de interés, *CBF3* o *COR15a*, respectivamente.

$$\Delta Cq_{gen\ de\ interes} = C_{T\ condición\ control} - C_{T\ tratamiento}$$

$$\Delta Cq_{gen\ calibrador} = C_{T\ condición\ control} - C_{T\ tratamiento}$$

$$E_{gen\ de\ interes} = \text{Eficiencia de } CBF3 \text{ o } COR15a$$

$$E_{gen\ calibrador} = \text{Eficiencia de } TUB$$

## 6.10. Verificación de las secuencias amplificadas

Esto se llevó a cabo por clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR. Los resultados de dichas secuenciaciones se presentan en la sección de anexos de esta tesis.

### 6.10.a Purificación del producto de PCR

Se amplificó por sextuplicado la secuencia a clonar y los productos de PCR se depositaron en un gel de agarosa al 2.0% con bromuro de etidio 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . La electroforesis del gel se realizó aplicando 65 volts por aproximadamente 30 min con amortiguador TAE 1X como amortiguador de corrida. A continuación se cortaron las bandas del gel correspondientes a los fragmentos amplificados y se depositaron en un tubo de 1.5 mL. Se purificó el producto de PCR con el protocolo de Qiagen.

Se cuantificó con ayuda del espectrofotómetro Nanodrop 2000 Thermo Scientific. Para verificar la purificación del producto de PCR se realizó un gel de agarosa al 2.0%.

### 6.10.b Reacción de ligación

Para poder ligar el producto de PCR a un vector, se realizó la reacción utilizando como vector pGEM-Easy de Promega.

Primero se calcularon las cantidades para obtener la relación deseada de inserto/vector con la siguiente fórmula, se recomienda que la proporción sea (6/1).

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{tamaño inserto kb}}{\text{Tamaño vector kb}} \times \text{proporción molar inserto: vector} = \text{ng del inserto}$$

Una vez teniendo las cantidades necesarias, se adicionaron los reactivos faltantes de acuerdo a la Tabla 7, se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido este tiempo se dejó a 4°C toda la noche.

Tabla 7. Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de ligación.

Reactivos	Para 1 reacción
2x Amortiguador de ligación rápida	5 µL
pGEM-Easy (50 ng)	1 µL
PCR producto	
T4 DNA ligasa	1 µL
H <sub>2</sub> O	cbp 10 µL

Vector (pGEM-Easy), producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR producto)

### 6.10.c Transformación

Las células competentes de *E. coli* de la cepa DH5α mantenidas a -70°C se descongelaron en hielo y se adicionó la mezcla de la reacción de ligación (10 µL). Se mantuvieron por 20 min en hielo.

Se dio un choque térmico a las células exactamente a 42°C por 45-50 s en baño de agua. Inmediatamente se regresaron al hielo por 2 min. Se adicionó medio 800 µL Caldo Súper Óptimo (SOC) estéril; 640 µL de medio Luria Bertani (LB) y 160 µL de glucosa 0.1 M. Se incubó por 2 h a 37°C con agitación a 3.3 g.

Mientras tanto se prepararon cajas con medio LB y ampicilina: Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de Isopropílico  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 100 mM y 20  $\mu\text{L}$  5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) 50 mg/ $\mu\text{L}$ . Se colocaron en la caja y se esparcieron con varilla de vidrio hasta que fueron adsorbidos.

Por otro lado las células competentes fueron centrifugadas a 13981.7 g por 1 min. Se eliminó el sobrenadante. Se adicionó al botón 150  $\mu\text{L}$  de medio LB para resuspender las células. Luego se plaquearon 2 cajas con medio LB y ampicilina, en una caja se colocaron 150  $\mu\text{L}$  de las células resuspendidas y los 50  $\mu\text{L}$  restantes se sembraron en la otra caja, se esparció con varilla de vidrio hasta que se adsorbieron en el agar. Se incubaron a 37°C toda la noche (12-24 h). Luego fueron llevadas a 4°C para permitir el desarrollo de color de las colonias existentes.

#### **6.10.d Selección de las células transformantes**

La clonación exitosa de un inserto en el vector pGEM-T significa que se interrumpe la secuencia que codifica a la  $\beta$ -galactosidasa, por lo que las clonas recombinantes pueden ser identificadas por la selección del color en la placa indicadora. Usualmente, las clonas que contienen un producto de PCR producen colonias blancas, pero las colonias azules pueden resultar de fragmentos que son clonados en el marco con el gen *lacZ*.

Se seleccionaron 3 colonias blancas y 1 colonia azul. Se sembraron las colonias seleccionadas en medio líquido a 37°C toda la noche (12-24 h).

#### **6.10.e Extracción de plásmido (Kit Zymo Research)**

De cada cultivo en medio líquido se tomaron 1.4 mL de medio de cultivo y se colocaron en un tubo de 1.5 mL, se centrifugó por 1 min a 13981.7 g, se decantó el sobrenadante. Se repitieron estos pasos dos veces más. Se volvió a centrifugar a 13,981.7 g por 30 s para quitar el exceso de medio. Se resuspendió el pellet en 600  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE (primero con la micropipeta y luego en vortex).

Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del amortiguador azul de lisis (sin agitar, sólo invirtiendo). Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de amortiguador amarillo de neutralización (frío) (sin dejar pasar de 3-5 min entre la adición del amortiguador azul y el buffer amarillo). Se centrifugó a 13,981.7 g por 4 min y se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 900  $\mu\text{L}$ ), se volvió a centrifugar 2 min y se recuperó el sobrenadante.

Ahora se colocó la solución en la columna Zymo-spin y la columna se colocó en el tubo de colecta, se centrifugó 15 s a 13981.7 g. Se descartó el sobrenadante. Se adicionaron a la columna 200  $\mu$ L del amortiguador Endo-wash y se centrifugó 30 s a 13,981.7 g. Se adicionó a la columna 400  $\mu$ L del buffer Zupply-wash y se centrifugó a 13,981.7 g por 1 min. Se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 mL y se adicionaron 30  $\mu$ L de agua estéril directamente a la matriz, dejó reposar 1 min y se centrifugó por 30 s.

El filtrado se transfirió a otro tubo de 1.5 mL, se cuantificó con ayuda del Nanodrop 2000 Thermo Scientific y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **6.10.f Digestión del plásmido**

Para verificar que nuestro producto de PCR se encuentra dentro del vector se realizó la digestión del mismo. Primero se calculó el volumen necesario para colocar 300 ng de plásmido en la reacción. Se colocaron en un tubo de 1.5 mL el volumen calculado de DNA plasmídico y el agua, se homogeneizó.

Se calentó a  $92^{\circ}\text{C}$  por 5 min, luego se enfrió en hielo por 5 min. Posteriormente se adicionó la cantidad establecida de amortiguador y enzima de acuerdo a la Tabla 8, luego se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h para llevar a cabo la digestión del vector.

Tabla 8. Reactivos y volúmenes utilizados para realizar la digestión del vector

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen para 1 reacción</b>
DNA plasmídico	
Amortiguador	1.5 $\mu$ L
EcoR1	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	cbp 15 $\mu$ L

Enzima de restricción (EcoR1).

Para corroborar que el plásmido y el producto de PCR se encuentren en el fragmento cortado por EcoR1, se depositaron las muestras en un gel de agarosa al 1.5%, en donde se observó el plásmido en 3,000 pb y el producto PCR.

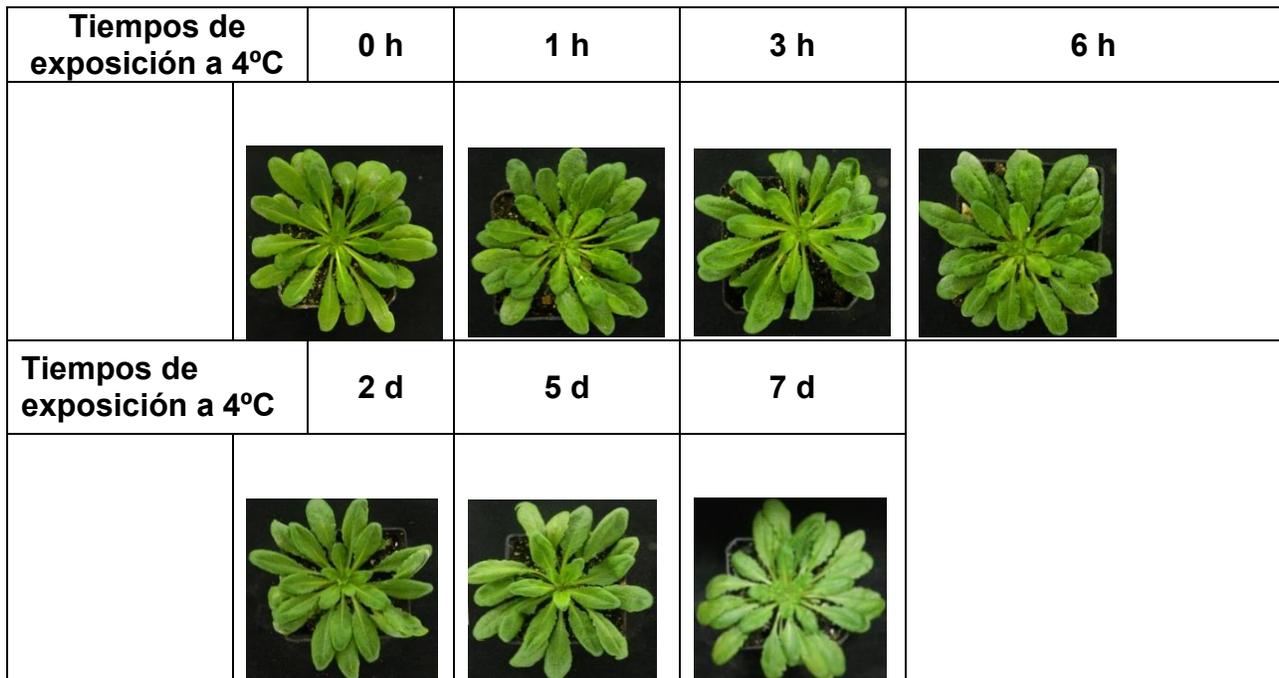
### **6.11. Procedimientos estadísticos**

Todas las determinaciones se realizaron a partir de dos lotes de plantas, con 15 plantas por cada lote. Los valores son expresados como promedios  $\pm$  error estándar. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de ANOVA de múltiples comparaciones usando herramientas de Excel 2010. Se utilizaron valores de  $\alpha=0.05$  para considerarse significativos.

## 7. RESULTADOS

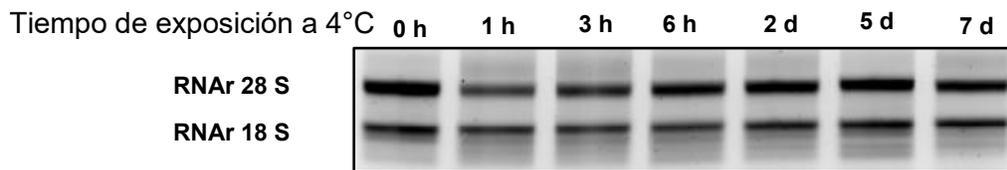
### 7.1 Determinación de los tiempos de exposición a 4°C con cambios en la expresión de los genes *CBF3* y *COR15a* en plantas silvestres de *A. thaliana*

En estudios anteriores se ha demostrado que en plantas de *A. thaliana* hay una rápida acumulación de los transcritos de los genes *CBF* por la exposición a bajas temperaturas y que este aumento lleva a la expresión de genes como el gen *COR15a* (Thomashow, 1999; Sharma et al., 2005; Shi et al., 2014). En este trabajo se determinaron los tiempos de exposición a 4°C a los cuales los genes *CBF3* y *COR15a* pudieran mostrar cambios significativos en su expresión en las plantas silvestres para a partir de ello analizar los patrones correspondientes en las distintas líneas mutantes descritas en el apartado de Materiales y Métodos de esta tesis. Las plantas silvestres de *A. thaliana* se sometieron a 4°C por diferentes tiempos: 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 2 d, 5 d y 7 d y se realizó un registro fotográfico de cada una de las plantas. Como se observa en la Figura 5, el fenotipo de las plantas silvestres fue muy similar con o sin exposición a 4°C, tanto a tiempos cortos (1 h) como a tiempos largos (7 d), en ninguna planta se observó fenotipo de daño.



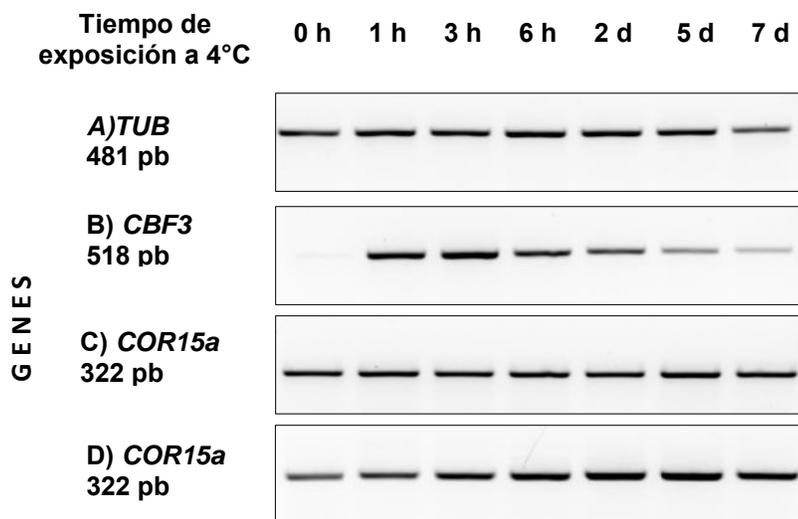
**Figura 5. Efectos Fenotípicos de plantas adultas de *A. thaliana* con diferentes tratamientos de exposición a 4°C. Planta silvestre 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 2 d, 5 d y 7 d a 4°C.**

A partir de estas plantas se obtuvo el RNA total de las hojas y posteriormente el cDNA. En la Figura 6, se observa la calibración del RNA total mediante geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio; se calibró la cantidad de RNA total presente en las muestras, de tal forma que la intensidad de la banda correspondiente al RNAr 18S de cada muestra no difiriera en más del 14% con las demás. Lo anterior fue con el objetivo de obtener el cDNA a partir de la misma cantidad de RNA en todas las muestras de los diferentes tiempos de exposición a 4°C. Como se puede observar, las cantidades de RNA de las diferentes muestras fueron muy semejantes.



**Figura 6. Calibración de la cantidad de RNA total de plantas silvestres de *A. thaliana* sometidas a 4°C por diferentes tiempos.** Las plantas adultas del genotipo silvestre se sometieron a 4°C por 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 2 d, 5 d y 7 d, se obtuvo el RNA total de los diferentes tiempos de exposición, se separó en un gel de agarosa (2%) y se tiñó con bromuro de etidio. Bandas correspondientes al RNAr 28S (banda superior) y RNAr 18S (banda inferior).

Una vez calibrado el RNA total se sintetizó el cDNA a partir del RNA de las muestras presentadas en la Figura 6, por lo que se usaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR las secuencias de los genes de *CBF3*, *COR15a* y *TUB* (Figura 7), éste último se utilizó como gen de referencia (Argawal et al., 2006). Como se presenta en la Figura 7A, la intensidad de la banda correspondiente a la amplificación del gen de *TUB* fue similar en todos los tiempos de exposición a 4°C, con excepción de la muestra que se expuso por 7 d a 4°C, la cual parece ser un poco más tenue. Con respecto a la expresión del gen *CBF3* (Figura 7B), se observó una mínima intensidad de la banda a las 0 h de exposición a 4°C, y ésta intensidad de la banda fue aumentando gradualmente alcanzando un máximo a las 3 h de exposición a 4°C, posteriormente hubo una disminución gradual de la intensidad de la banda a partir de las 6 h y hasta los 7 d a 4°C.



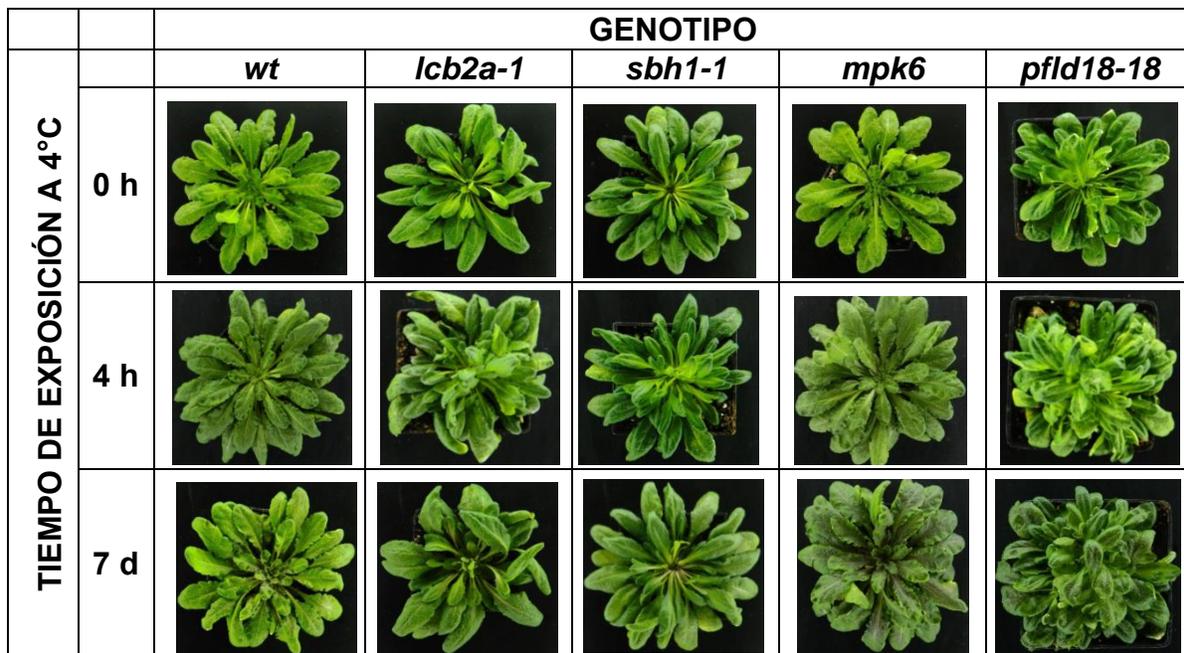
**Figura 7. Amplificación de los genes *TUB*, *CBF3* y *COR15a* en las muestras de plantas silvestres de *A. thaliana* tratadas por diferentes tiempos a 4°C.** Las plantas silvestres se sometieron a 4°C por 0 h, 3 h, 6 h, 2 d, 5 d y 7 d, de cada una de ellas se obtuvo el RNA y se calibró la cantidad de RNA total, se sintetizó el cDNA y posteriormente se amplificaron por PCR las secuencias específicas del gen. A) Gen de referencia *TUB*, B) Gen *CBF3*, C) Gen *COR15a* (33 ciclos de amplificación) y D) Gen *COR15a* (28 ciclos de amplificación). Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% y fue teñido con bromuro de etidio. El tamaño de la amplificación se muestra debajo del nombre de cada gen.

Por último, para analizar la expresión del gen *COR15a*, se probaron dos ciclos diferentes de amplificación por PCR, ya que como se puede observar en la Figura 7C, este gen se encontró en niveles de transcripción muy altos (bandas muy intensas) en todos los tiempos de tratamiento con frío e incluso en las plantas que no se sometieron a 4°C, por ello se realizó otra amplificación, ahora a 28 ciclos, lo cual nos permitió observar que en las plantas que no se sometieron a 4°C el gen *COR15a* ya estaba expresado. Sin embargo, ahora se pudo observar que con el tratamiento de frío aumentó la expresión desde la primera hora del tratamiento, evidenciándose un aumento gradual en la intensidad de la banda desde las 6 h hasta los 2 d y que se mantuvo aún a tiempos mayores (2 d, 5 d y 7 d).

En resumen, al menos durante las primeras 6 h de tratamiento a 4°C se observó un aumento en la expresión de los genes *CBF3* y *COR15a* en plantas silvestres de *A. thaliana*. Por lo que los tiempos elegidos de exposición a 4°C fueron 4 h y 7 d, este último se eligió ya que se determinó anteriormente en el laboratorio como el tiempo en el que se ha observado fenotípicamente el proceso aclimatación.

## 7.2. Efectos fenotípicos de la exposición a 4°C en las líneas mutantes de *A. thaliana*.

Para relacionar la dinámica de la expresión de los genes en las líneas mutantes con la de los fenotipos correspondientes, se realizó el registro fotográfico de las plantas mutantes *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk6* y *pfl18-18* expuestas a 4°C por 4 h y 7 d. En la Figura 8 se puede observar que las plantas no presentaron daños por exposición a frío ya sea por 4 h o 7 d. Si bien se apreció una coloración morada en las plantas de los genotipos *mpk6* y *pfl18-18* a los tiempos de 7 d en ambas plantas.



**Figura 8. Efectos fenotípicos de plantas adultas de *A. thaliana* con diferentes tratamientos de exposición a 4°C.** Planta silvestre y las líneas mutantes: *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk6* y *pfl18-18* se expusieron a 0 h, 4 h y 7 d a 4°C. Registro fotográfico de 1 experimento representativo de 2 repeticiones independientes, usando de una a tres plantas de cada línea, por experimento.

### 7.3. Determinación de los niveles de transcritos de los genes *CBF3* y *COR15a* en las líneas mutantes de *A. thaliana* por PCR punto final

Una vez expuestas a 4°C por 0 h, 4 h y 7 d tanto las plantas silvestres como las líneas mutantes *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk6* y *pflid18-18*, se extrajo el RNA de todas las muestras de las plantas, se procedió a calibrar el RNA total con la banda correspondiente al RNAr 18S y se sintetizó el cDNA. Para verificar que la extracción de RNA no contuviera DNA genómico, se realizó la PCR con RNA total extraído la ausencia de la amplificación del gen de *TUB*. El resultado nos indicó la ausencia de DNA genómico (anexo A).

Una vez realizado el control negativo de la presencia de DNA geonómico, podíamos asegurar que los productos de PCR toman como templado al cDNA, por lo que ahora se amplificaron los genes de interés *CBF3* y *COR15a* y se exploraron cambios en la transcripción de estos genes con respecto al gen de referencia *TUB*.

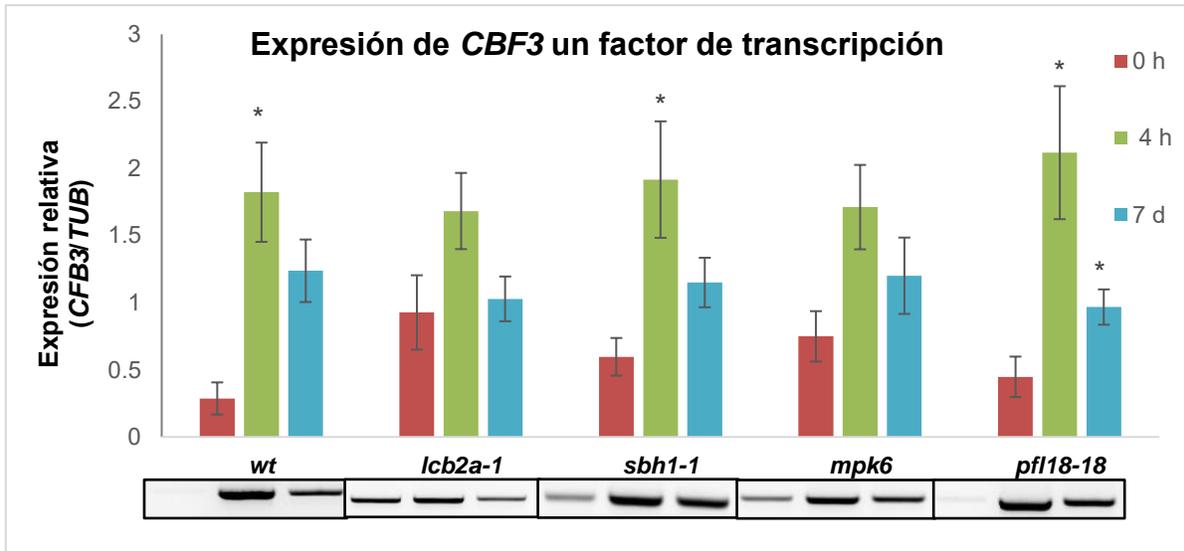
En las Figuras 9 y 10 se presentan las gráficas con el nivel de expresión de los genes *CBF3* y *COR15a*, respectivamente. También se observan debajo de cada gráfica las fotografías de los geles de agarosa a partir de los cuales se hicieron las densitometrías.

En la planta silvestre (*wt*) el transcrito del gen *CBF3* al tiempo 0 h se observó con un bajo nivel. Cuando la planta se expuso a 4°C por 4 h el transcrito de este gen aumentó seis veces con respecto su nivel de expresión a las 0 h, permaneciendo en ese nivel hasta los 7 d. En cuanto a la expresión del gen *COR15a* (Figura 10) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de este gen por el tratamiento de frío ni a 4 h o a 7 d.

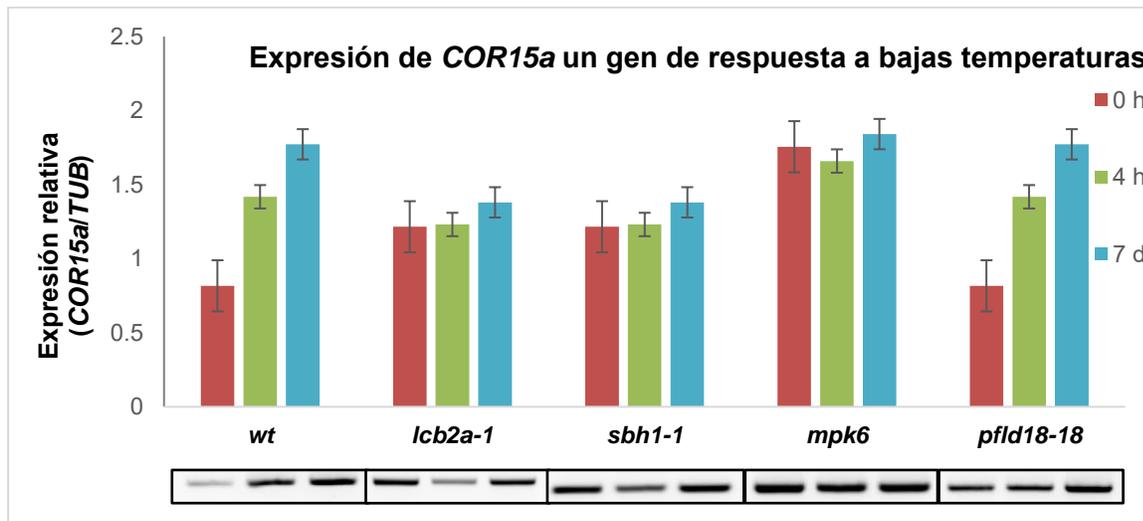
En las líneas mutantes *lcb2a-1* y *mpk6* no se observó un cambio significativo en los niveles de los transcritos de *CBF3* y *COR15a* a los diferentes tiempos de exposición a 4°C (0 h, 4 h y 7 d). Tampoco se obtuvo una diferencia significativa al comparar los niveles de los transcritos con los de la planta silvestre.

En la mutante *sbh1-1* se observó un aumento del triple en la expresión del gen *CBF3* a las 4 h con respecto al nivel de expresión a las 0 h. En cuanto a *COR15a* no se observaron diferencias significativas en la cantidad de transcrito presente en ninguno de los tratamientos de frío.

En la línea *pfl18-18* se observó un aumento de 5 veces la cantidad de transcrito de las 0 h a 4 h a 4°C. Sin embargo este nivel de transcrito disminuyó significativamente después de los 7 d.



**Figura 9. Expresión relativa de los transcritos de *CBF3* en plantas silvestres y líneas mutantes de *A. thaliana* a diferentes tiempos de exposición a 4°C.** Se realizaron mediciones del transcrito de *CBF3* en plantas adultas silvestres y cuatro líneas mutantes después de la exposición a 4°C. Se muestran en el gráfico las mediciones de los niveles de transcrito de *CBF3* con respecto a *TUB*. Los valores graficados son el promedio de 4 determinaciones  $\pm$  EE de dos muestras independientes por cada condición.

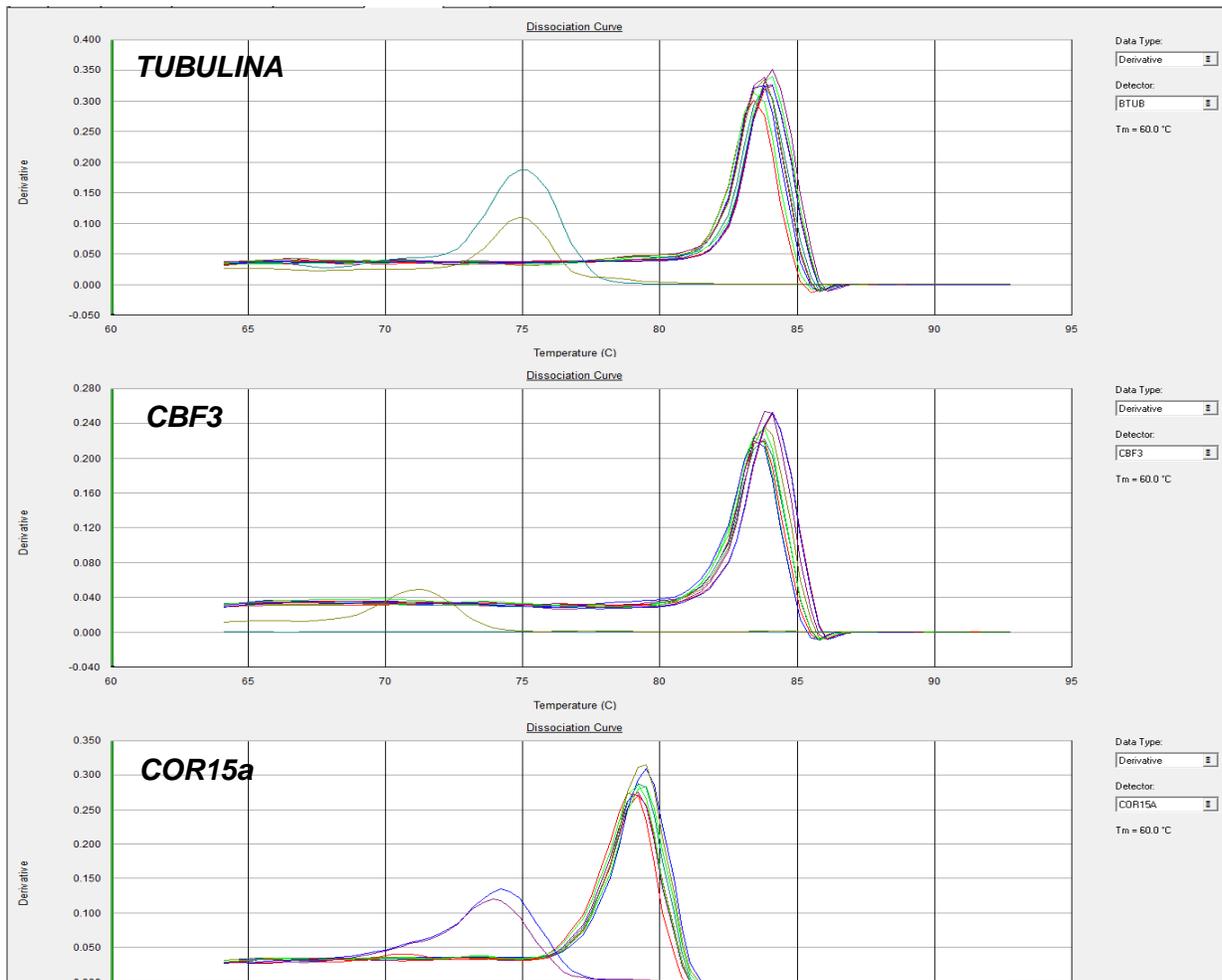


**Figura 10. Expresión relativa de los transcritos del gen *COR15a* en la planta silvestre (*wt*) y en las líneas mutantes de *A. thaliana* a diferentes tiempos de exposición a 4°C.** Se realizaron mediciones del transcrito de *COR15a* en plantas adultas silvestres y cuatro líneas mutantes después de la exposición a 4°C. Se muestran en el gráfico las mediciones de los niveles de transcrito de *COR15a* con respecto a *TUB*. Los valores graficados son el promedio de 4 determinaciones  $\pm$  EE de dos muestras independientes por cada condición.

#### 7.4 Determinación de los niveles de transcritos de los genes *CBF3* y *COR15a* en las líneas mutantes de *A. thaliana* por PCR tiempo real

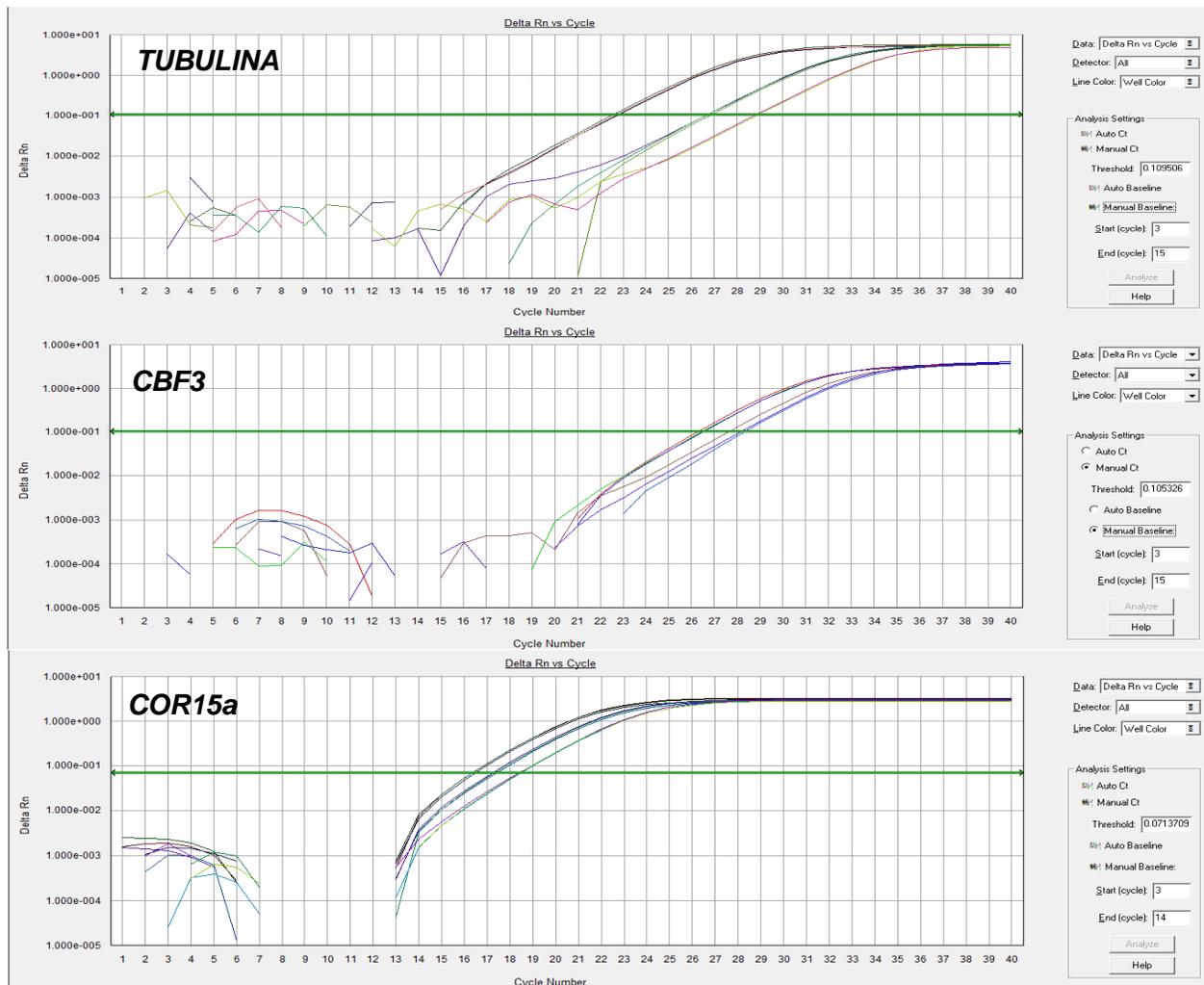
Debido a que los resultados anteriores revelaron datos con una dispersión amplia, se procedió a corroborarlos utilizando una técnica más fina, PCR tiempo real. Para ello lo primero que se realizó fueron las curvas de calibración para cada par de oligonucleótidos utilizados.

Para validar esta técnica con nuestros genes, se analizó que los oligonucleótidos no formaran productos inespecíficos ni dímeros. Se encontró que aún utilizando la concentración mínima de oligonucleótidos, se formaron dímeros, sin embargo estos fueron distinguibles del producto de PCR por lo que lo anterior no interfirió con la cuantificación. En la Figura 11 se observa la curva de disociación del gen *TUB*, *CBF3* y *COR15a*.



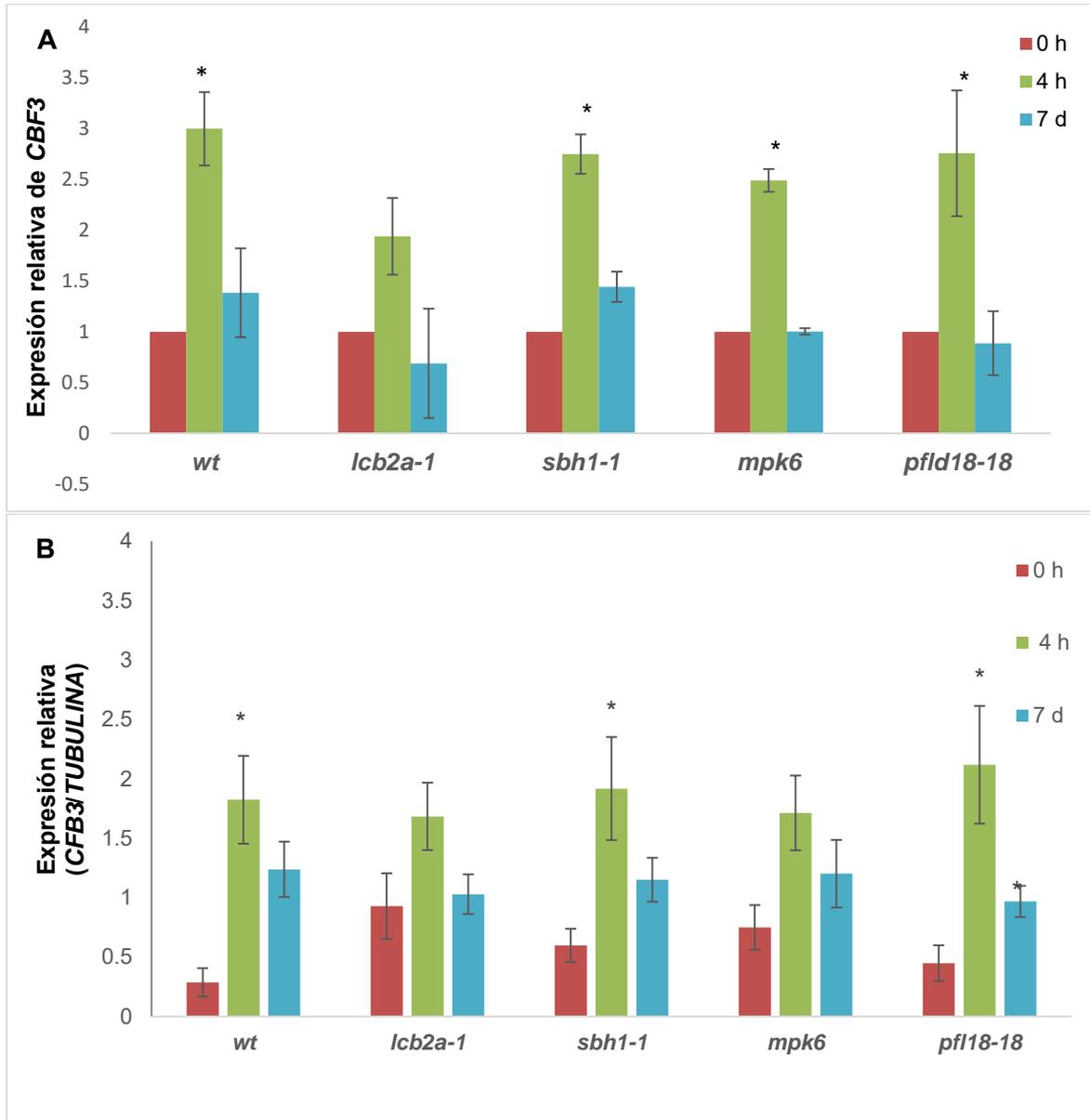
**Figura 11. Curva de disociación de los oligonucleótidos empleados para la detección de *TUB*, *CBF3* y *COR15a*. Se observa que el pico de disociación es distinguible entre el producto de PCR y los dímeros en los tres pares de oligonucleótidos.**

Se demostró la eficiencia de amplificación para cada uno de los pares de oligonucleótidos. Para *TUB* se obtuvo una eficiencia de 107.0%, para *CBF3* 112.0% y para *COR15a* 96.7%. En la Figura 12 se presentan las amplificaciones de la curva estándar correspondiente a cada gen.



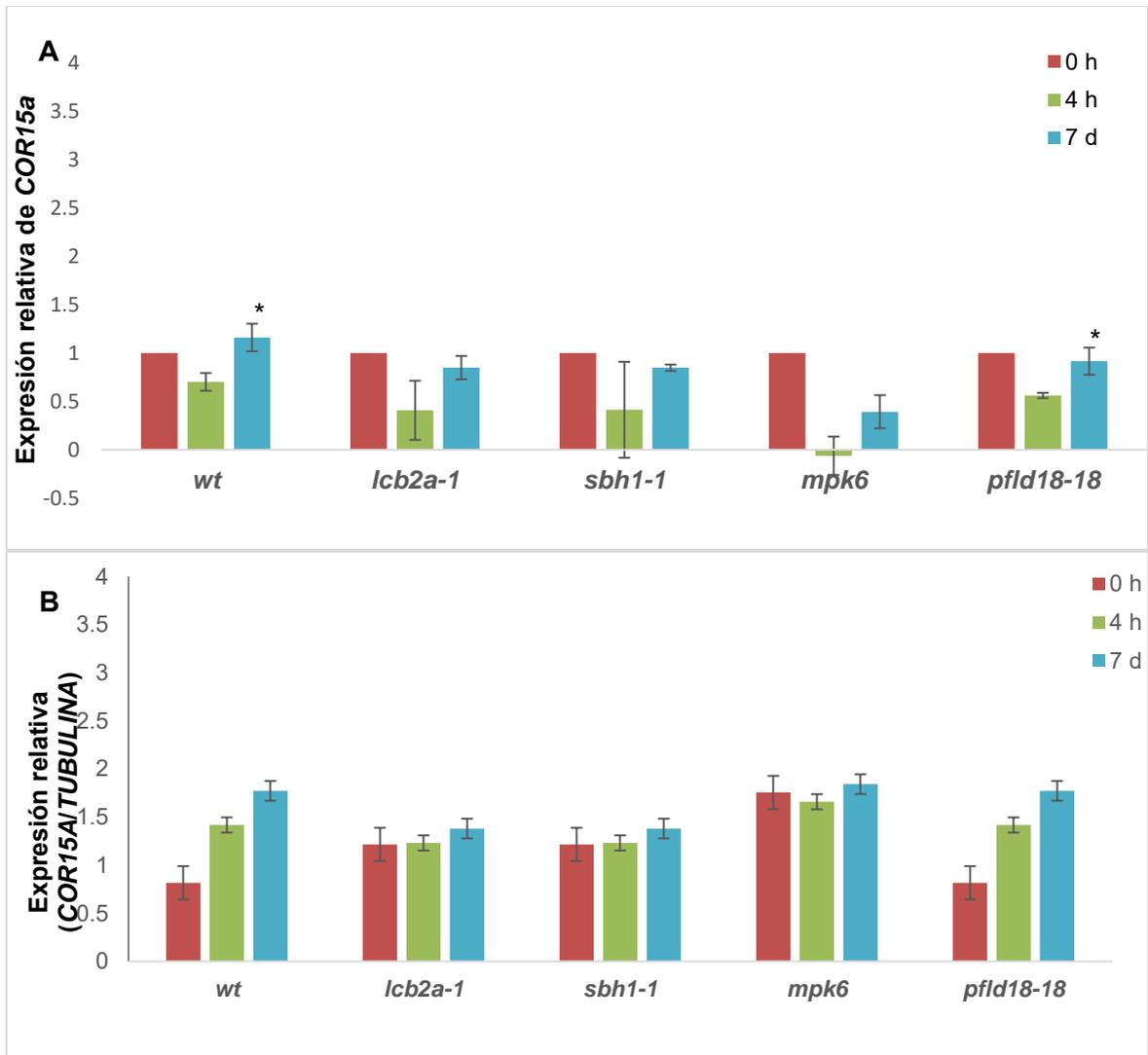
**Figura 12. Curva estándar con diluciones seriadas de cDNA de *TUB*, *CBF3* y *COR15a*. Se observan amplificaciones de cada dilución que corresponden.**

Una vez que se obtuvieron las curvas con la eficiencia óptima, se cuantificaron las muestras que se utilizaron en PCR punto final tanto de la planta silvestre como de las líneas mutantes. En las Figuras 13A y 14A se observan las gráficas correspondientes a los niveles de transcritos de los genes *CBF3* y *COR15a*, respectivamente.



**Figura 13. Expresión relativa de los transcritos de *CBF3* en plantas silvestres y líneas mutantes de *A. thaliana* a diferentes tiempos de exposición a 4°C.** A, Niveles de expresión de *CBF3* determinados por PCR tiempo real. En B, para fines comparativos se muestra nuevamente la expresión de *CBF3* obtenida previamente mediante PCR punto final. Los valores graficados en PCR tiempo real son promedio de 4 determinaciones  $\pm$  EE de dos muestras independientes por cada condición.

En la Figura 13A observamos las gráficas correspondientes a los niveles de transcrito del gen *CBF3* tanto en la planta silvestre como de las líneas mutantes. A las 4 h de exposición a 4°C se observó en la planta silvestre y en la línea mutante *pflid18-18* que el transcrito de *CBF3* aumentó 2.9 y 2.7 veces, respectivamente, con respecto a su nivel de expresión a las 0 h. A los 7 d se disminuyó el nivel de transcrito en la planta silvestre a 1.3 veces con respecto al nivel de las 0 h y en *pflid18-18* 0.8 veces. En las mutantes *sbh1-1* y *mpk6* se observó que a las 4 h existió un aumento de 2.7 y 2.4 veces, respectivamente, más expresado que en el tiempo de 0 h. A los 7 d, el transcrito de *CBF3* disminuyó a 1.4 veces en *sbh1-1* y a 1 veces en *mpk6* con respecto al tiempo 0 h. En la línea mutante *lcb2a-1* no existió cambio en la expresión de *CBF3*. Comparando los resultados obtenidos con ambas técnicas experimentales, la PCR punto final y la PCR tiempo real, se observó que existió congruencia en tres de los resultados, encontrándose diferencias estadísticas significativas en la planta silvestre y en las mutantes *sbh1-1* y *pflid18-18*. Sin embargo, en *mpk6* solo se encontró diferencia significativa con la técnica de PCR tiempo real.



**Figura 14. Expresión relativa de los transcritos de *COR15a* en plantas silvestres y líneas mutantes de *A. thaliana* a diferentes tiempos de exposición a 4°C.** A. Niveles de expresión de *COR15a* por PCR tiempo real. En B, para fines comparativos se muestra nuevamente la expresión de *COR15a* mediante PCR punto final. Los valores graficados en PCR tiempo real son promedio de 4 determinaciones  $\pm$  EE de dos muestras independientes por cada condición.

En la Figura 14A se presentan los resultados del gen *COR15a*. Se observó en la planta silvestre y en la línea mutante *pfd18-18* que hubo un aumento significativo del transcrito entre las 4 h y los 7 d, expresándose 1.16 veces más en la planta silvestre que al tiempo 0 h y en la línea *pfd18-18* 0.91 veces más que en el tiempo 0 h. En cuanto a las líneas mutantes *lcb2a-1*, *sbh1-1* y *mpk6*, no se lograron encontrar diferencias significativas en la expresión de *CBF3* en los tiempos estudiados. Comparando estos con los resultados con la PCR punto final se observó

que la tendencia de este método no era equívoca, observamos gráficos similares en PCR tiempo real, la diferencia ocurrió en los datos numéricos arrojados, que resultaron ser menos dispersos y con ello se logró evidenciar en que líneas mutantes hubo diferencias.

## **8. DISCUSIÓN**

La exposición a bajas temperaturas es un tipo de estrés ambiental al cual se encuentran expuestas las plantas en todo momento, ya sea por cambios diurnos, estacionales o bien por su latitud geográfica. Aunque se desconoce el o los receptores de temperatura en plantas, se tiene conocimiento de algunos elementos que participan ante este estrés, como el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico que sucede con tan solo 10 s de tratamiento en frío (Sharma et al., 2005); también ocurren fenómenos de fosforilación y de desfosforilación de proteínas en un periodo de 15 min y que son llevados a cabo por MAPK (Sharma et al., 2005). Otro evento que ocurre tras la exposición al frío es la expresión de genes específicos: por ejemplo, la proteína ICE es modificada post-traduccionalmente para activar al regulón CBF que aumenta su expresión de manera rápida y transitoria en condiciones de baja temperatura (Gilmour et al., 1998; Medina et al. 2011), estos genes codifican a factores de transcripción que activan genes que contienen elementos CTR (del inglés C-repeat) como *LTI* (del inglés low temperature-induced), *KIN* (del inglés cold-inducible), *ERD* (early dehydration-inducible) y *COR* (Sharma et al., 2005).

En este trabajo de tesis se estudió la expresión de dos genes relevantes en el proceso de respuesta a bajas temperaturas: los genes *CBF3* y *COR15a*. La expresión se estudió comparativamente en plantas silvestres y plantas con diversos genotipos en los que los genes modificados codifican para enzimas de la síntesis de esfingolípidos, MAP cinasas y una enzima implicada en la formación de especies reactivas de oxígeno. Con el propósito de hacer más precisas las estimaciones de la expresión de los genes, estos se analizaron por dos técnicas: el PCR punto final y el PCR en tiempo real.

### **8.1 Curva de expresión temporal de los genes *CBF3* y *COR15a* en plantas expuestas a 4°C**

La primera parte experimental consistió en establecer la temporalidad de la expresión de los genes *CBF3* y *COR15a* cuando las plantas de *A. thaliana* se exponen a baja temperatura. De esta manera, se seleccionaron los tiempos en los que podría hacerse un análisis más detallado de su expresión. Los tiempos muestreados fueron 1 h, 3 h, 6 h, 2 d, 5 d y 7 d, después de haber

expuesto las plantas a 4°C. En el caso del factor de transcripción *CBF3* se observó un aumento transitorio en el transcrito del gen en las plantas silvestres: un aumento considerable a las 4 h y luego una disminución paulatina hasta los 7 d. Este aumento coincidió con lo ya descrito, pues previamente se ha demostrado que 3 y 4 h de exposición a 4°C fueron suficientes para observar aumentos del transcrito del gen en plántulas de *A. thaliana* (Fowler y Thomashow, 2002; Cook et al., 2004; Kim et al., 2015).

Pasadas las 6 h, el transcrito del gen disminuyó, lo cual también correlacionó con lo encontrado por Fowler y Thomashow (2002) y Cook et al. (2004), quienes demostraron que a las 8 h, el gen *CBF3* disminuyó considerablemente su expresión y continuó así hasta las 24 h. Se menciona a la vía CBF como un elemento importante que desencadena la activación de la síntesis de metabolitos crioprotectores como glucosa, fructosa y prolina, entre otros (Cook et al., 2004), es decir, se le apropia a *CBF3* la función biológica de factor de transcripción. Los tiempos tempranos de expresión del gen después del estímulo de frío son consistentes con esta función.

En el estudio de la expresión de *COR15a* en plantas silvestres, se encontró un ligero aumento después de las 6 h y se mantuvo hasta los 7 d. De acuerdo a lo reportado anteriormente para este gen de respuesta a frío, este gen comienza a aumentar su transcripción desde las 8 h, alcanzando el nivel de expresión más alto a las 24 h (Kim et al., 2015), luego disminuye repentinamente después de las 72 h y a los 7 d continúa disminuyendo, sin embargo, los niveles de expresión de este gen continúan aumentados (Cook et al., 2004). Lo descrito en este trabajo coincide con lo anterior. Sin embargo, encontramos que la edad de la planta es un factor importante en la determinación de este gen, ya que su producto es una proteína importante en el desarrollo, clasificándose como proteína LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant), en semilla y después en algunos tejidos vegetativos se encuentra altamente expresada (Salleh et al., 2012; Sasaki et al., 2013).

La expresión encontrada de *COR15a* en esta tesis coincidió con el proceso biológico que se le atribuye, ya que de acuerdo a lo descrito, se sabe que *CBF3* se une a zonas promotoras de los genes *COR* (Gilmour et al., 1998; Chinnusamy et al., 2007). En este caso de *COR15a* que comienza a expresarse después de 4 h de tratamiento en bajas temperaturas (Cook et al., 2004) por lo que la vía que se propone es que el regulón CBF activa familias de genes que son partícipes del proceso de aclimatación.

Con estos resultados, se seleccionaron 0 h, 4 h y 7 días, como los tiempos en los que se tomaron muestras de las plantas expuestas a 4 °C para determinar los niveles de transcrito de los genes *CBF3* y *COR15a*.

### **8.2 Efecto de la exposición de las plantas silvestres a la baja temperatura en la expresión de *CBF3* y *COR15a* a las 4 h y 7 d**

Con los tiempos de expresión seleccionados tras la exposición a 4°C y que fueron 0 h como control más 4 h y 7 d, se observó nuevamente el nivel de transcrito de *CBF3*, encontrándose que el gen estaba inducido a las 4 h con una diferencia estadísticamente significativa y que a los 7 d los niveles del transcrito ya habían disminuido. Lo anterior fue observado por ambos métodos: PCR punto final y PCR tiempo real. Este resultado coincidió con lo antes obtenido en la curva de tiempo y con lo descrito en la literatura.

En cuanto al gen *COR15a* se observó que en la cuantificación por PCR punto final no hubo cambios en los niveles del transcrito en los tiempos estudiados, 4 h y 7 d, sin embargo, por PCR en tiempo real se observó diferencia a los 7 d de exposición a 4°C, encontrando niveles de transcrito mayores que en los tiempos de 0 h y 4 h. Lo cual coincide con lo encontrado en la literatura que reporta que la expresión de *CBF3* estimuló la expresión de genes como *COR15a* y *RD29* (Mahajan y Tuteja, 2005). Esta respuesta en la transcripción del gen *COR15a* en la planta silvestre correlaciona con el modelo de la vía en la que la activación de los genes COR se genera gracias al regulón CBF, en este caso, de *CBF3* que activa a *COR15a*. Por ello, la funcionalidad de esta vía puede ser un factor que favoreció que en la planta se pudiera llevar a cabo el proceso de aclimatación exitoso, pues al retarla a temperaturas congelantes, ésta sobrevivió.

### **8.3 Efecto de la baja temperatura en la expresión de *CBF3* y *COR15a* en las plantas del genotipo *lcb2a-1***

Las plantas de *A. thaliana* contienen un alto contenido de esfingolípidos trihidroxilados en sus BCL; estas componen cerca del 90% de las BCL de los esfingolípidos complejos en hoja. Las BCL son derivadas de la condensación de palmitoil-CoA con la serina, llevada a cabo por la SPT, la cual es un heterodímero formado por dos subunidades: la LCB1 y LCB2. Esta última se encuentra como dos isoformas, la LCB2a y la LCB2b. La mayoría de los complejos proteicos se encuentran formados por LCB1-LCB2a, heterodímero encargado de formar la cadena de la BCL que contiene 18 carbonos y 2 grupos hidroxilo, en los carbonos 1 y 3 (Chen et al., 2008), el tercer grupo hidroxilo es añadido en el carbono 4, como paso inmediato después de la síntesis

de la BCL. A cargo de esta hidroxilación se encuentra la hidroxilasa de base esfingoidea (SBH) de la cual *A. thaliana* contiene dos genes que codifican para la SBH1 y SBH2 las cuales son isoformas de la enzima (Chen et al., 2008).

En la planta mutante *lcb2a-1*, que carece de la expresión de la subunidad LCB2a, los niveles de esfingolípidos no se encuentran alterados. Los resultados semicuantitativos y cuantitativos de los niveles de transcripción del gen *CBF3* y el gen *COR15a* en esta planta indican que no hubo inducción de la expresión de los genes, si bien, sus niveles ya están por arriba de los de la planta silvestres, es decir, ya están constitutivamente expresados. Estos resultados sugieren que la presencia del gen *LCB2a* podría ser un factor que se encuentre involucrado en esta respuesta a bajas temperaturas; como en el caso de la respuesta de muerte celular programada que se reportó en 2011, en donde el gen *LCB2a* se encuentra involucrado como mediador de la síntesis y acumulación de BCL, como segundos mensajeros (Saucedo et al., 2011). En este caso, el gen *LCB2a* sería un regulador negativo de la expresión de los genes *CBF3* y *COR15a*.

En los fenotipos obtenidos por Cano-Ramírez en 2014 (presentados en los antecedentes), se observó que la planta mutante *lcb2a-1* sobrevivió a las temperaturas congelantes aun sin haber experimentado el proceso de aclimatación, por lo que surge la posibilidad de que la activación de los genes *CBF3* y *COR15a* en esta línea de Arabidopsis, ya estaba inducida. No se puede descartar que la inducción pueda ser tardía y que los tiempos de muestreo no hayan sido los adecuados para esta línea mutante.

#### **8.4 Efecto de la baja temperatura en la expresión de *CBF3* y *COR15a* en las plantas del genotipo *sbh1-1***

En la planta *sbh1-1*, a través de una inserción de T-DNA, se evitó la expresión de la isoforma SBH1, por lo cual la hoja contiene reducidos los niveles de BCL trihidroxiladas en un 50% aproximadamente que compensa con esfingolípidos dihidroxilados (Chen et al., 2008). Los resultados en PCR punto final y en PCR tiempo real revelaron que el gen *CBF3* tuvo cambios significativos. En 4 h se observó la inducción del gen y a los 7 d una disminución del transcrito, mientras que en el gen *COR15a* no hubo cambios en los tiempos seleccionados de 4 h y 7d, lo cual fue inesperado ya que según lo descrito, si existe inducción del gen *CBF3*, el gen *COR15a* debió haber aumentado su expresión.

Estos resultados sugieren que aún en los niveles reducidos de BCL trihidroxiladas, se puede encontrar suficiente PHS-P para llevar a cabo la respuesta del encendido de genes en respuesta a baja temperatura. (Dutilleul et al., 2012), señaló a la PHS-P, que es una BCL trihidroxilada fosforilada, como la BCL que se acumula en respuesta a baja temperatura lo que permite la activación de la MPK6. En la muerte celular programada, la esfinganina, una BCL, permitió la activación corriente arriba de la MPK6 (Saucedo-García et al., 2011), por lo que las BCL son importantes transductores de señal. Sin embargo, en esta tesis, la disminución de BCL trihidroxiladas no afectó la expresión del factor de transcripción *CBF3*, lo cual sí podría estar afectando negativamente la expresión de *COR15a* y con ello contribuir a que la planta sea incapaz de poder llevar a cabo el fenómeno de aclimatación y con ello no poder sobrevivir temperaturas congelantes.

### **8.5 Efecto de la baja temperatura en la expresión de *CBF3* y *COR15a* en las plantas del genotipo *mpk6***

Lo encontrado en las determinaciones del transcrito del gen *CBF3* en la línea *mpk6*, fue la inducción a las 4 h en resultados de PCR tiempo real; en PCR punto final se observó una tendencia similar, sin embargo, la dispersión de los datos numéricos impidió encontrar una diferencia estadísticamente significativa. El incremento en la cantidad de transcrito del gen a las 4 h de exposición a 4°C coincide con la respuesta que se encontró en la planta silvestre. En la transcripción del gen *COR15a*, no se observaron diferencias en los tiempos establecidos, por ninguno de los dos métodos utilizados.

La línea mutante *mpk6*, carece de la expresión de la cinasa MPK6. En condiciones de baja temperatura se reportó que se requiere la activación de esta cinasa y para ello es necesaria la acumulación de PHS-P (Dutilleul et al., 2012). Esta cinasa también fue reportada en la vía de muerte celular programada y requiere la señalización de una BCL (Saucedo et al., 2011), por lo que MPK6 resulta ser un transductor en común dos distintas vías. Por lo anterior y debido a que en el gen *COR15a* no se encontró la respuesta esperada, es decir, un aumento en los niveles de transcrito del gen posterior a la inducción de *CBF3*, existe la posibilidad de que la cinasa MPK6 se encuentre participando río abajo de la expresión de *CBF3*, lo que probablemente impida que se lleve a cabo la activación del gen *COR15a*. Esto sería uno de los múltiples factores que impide a la planta mutante aclimatarse de manera exitosa y sobrevivir temperaturas congelantes, que es el fenotipo que se observa en esta línea.

## **8.6 Efecto de la baja temperatura en la expresión de *CBF3* y *COR15a* en las plantas del genotipo *pflid18-18***

En las plantas *pflid18-18* se expresa en el cloroplasto una flavodoxina bacteriana, que sustituye a la ferredoxina; el papel de la flavodoxina es donar equivalentes reductores en las reacciones de óxido-reducción y esta mutante contiene cantidades altas de flavodoxina, por lo que existe la generación de peroxiredoxina, la cual reduce  $H_2O_2$  y peróxidos orgánicos. Estos compuestos, susceptibles de generarse en el cloroplasto, disminuirían por lo tanto en esta mutante (Tognetti et al., 2008). En esta línea mutante se encontró que los niveles de transcrito del gen *CBF3* son muy parecidos a los que presentó la planta silvestre. Estos resultados fueron consistentes en ambos métodos: PCR punto final y PCR tiempo real, lo cual permite tener seguridad de lo observado. Se encontró una inducción del gen a las 4 h y una disminución a los 7 d. Con respecto a la expresión de *COR15a* se encontró un aumento del transcrito a los 7 d de exposición a 4°C con el método de PCR tiempo real. Con el procedimiento de PCR punto final se encontró que aunque la tendencia sugería este aumento, no pudo ser comprobado estadísticamente. Estos resultados también revelaron similitud con los obtenidos para planta silvestre.

En condiciones de baja temperatura se ha descrito que se da un estallido oxidativo, caracterizado por la presencia de ión superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales libres (Saucedo et al., 2015), con los resultados encontrados se puede sugerir que las ERO del cloroplasto no participan en la vía *CBF3-COR15a*. Sin embargo, para *CBF1* se encontraron evidencias que sugieren que la presencia de  $H_2O_2$  es importante para activar a este gen (Maruta et al., 2012), por lo que no podemos descartar la participación de la ERO de otras fuentes celulares en esta vía de respuesta génica.

Es importante recordar que existen vías independientes de CBF, es decir, no requieren la expresión de un factor de transcripción CBF, la vía CBF solo controla un 12% de los genes regulados en bajas temperaturas (Flower y Thomashow, 2002), por lo que la respuesta de la planta a las bajas temperatura no depende de un solo factor y vía.

## 9. CONCLUSIONES PARTICULARES

- Se confirmó que *CBF3* es un gen inducible por bajas temperaturas, en plantas adultas de *A. thaliana* bastan 4 h de exposición a 4°C para lograr observar su inducción.
- Se confirmó que existe un aumento del transcrito del gen *COR15a* en plantas adultas silvestres de *A. thaliana* a los 7 d de exposición a 4°C.
- La expresión del gen *LCB2a* está participando como regulador negativo en la expresión de *CBF3* y *COR15a*.
- Las BCL trihidroxiladas son segundos mensajeros que se requieren para llevar a cabo la activación y expresión de *COR15a*.
- La presencia de MPK6 es requerida para la expresión de *COR15a* pero no para la expresión de *CBF3*.
- La generación de ERO de cloroplasto no modificaron la expresión de *CBF3* y *COR15a*.

## 10. CONCLUSIÓN GENERAL

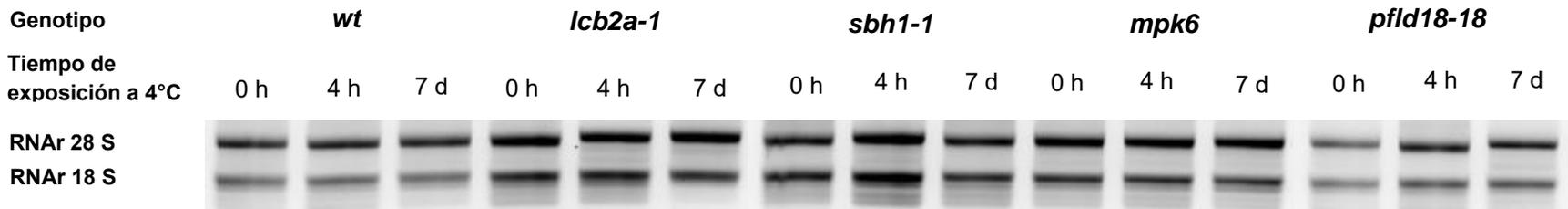
La respuesta a bajas temperaturas es un complejo mecanismo en el que se encuentran involucrados gran cantidad de segundos mensajeros, cinasas, proteínas y genes en este trabajo se cuantificaron dos genes involucrados con frío en líneas mutantes de *A. thaliana*. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que tres líneas mutantes muestran diferencias comparadas con la planta silvestre: línea *lcb2a-*, *sbh1-1* y *mpk6*. Lo que nos sugiere que el gen *LCB2a* pudiera tener injerencia sobre la cascada de señalización *CBF3-COR15a*. Los resultados también son sugerentes de que las BCL trihidroxiladas y la cinasa MPK6, que son segundos mensajeros y elemento transductor respectivamente, se requieren para poder llevar a cabo la activación de la expresión del gen *COR15a*. Igualmente, los resultados sugieren que las ERO del cloroplasto no están implicadas en la expresión de los dos genes estudiados.

## 11. PERSPECTIVAS

- Determinar los niveles de PHS-P en las plantas adultas silvestres y mutantes a los tiempos estudiados de exposición a frío y corroborar su aumento.
- Determinar la cantidad de proteína CBF3 en todas las líneas utilizadas para correlacionarla con lo que se observa en los fenotipos y en los niveles de transcrito.
- Determinar la cantidad de proteína COR15a en todas las líneas utilizadas en este trabajo y relacionarla con fenotipos de sobrevivencia.
- Determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno de las plantas silvestres y líneas mutantes a los tiempos de exposición a 4°C seleccionados.

## 12. ANEXOS

### ANEXO A

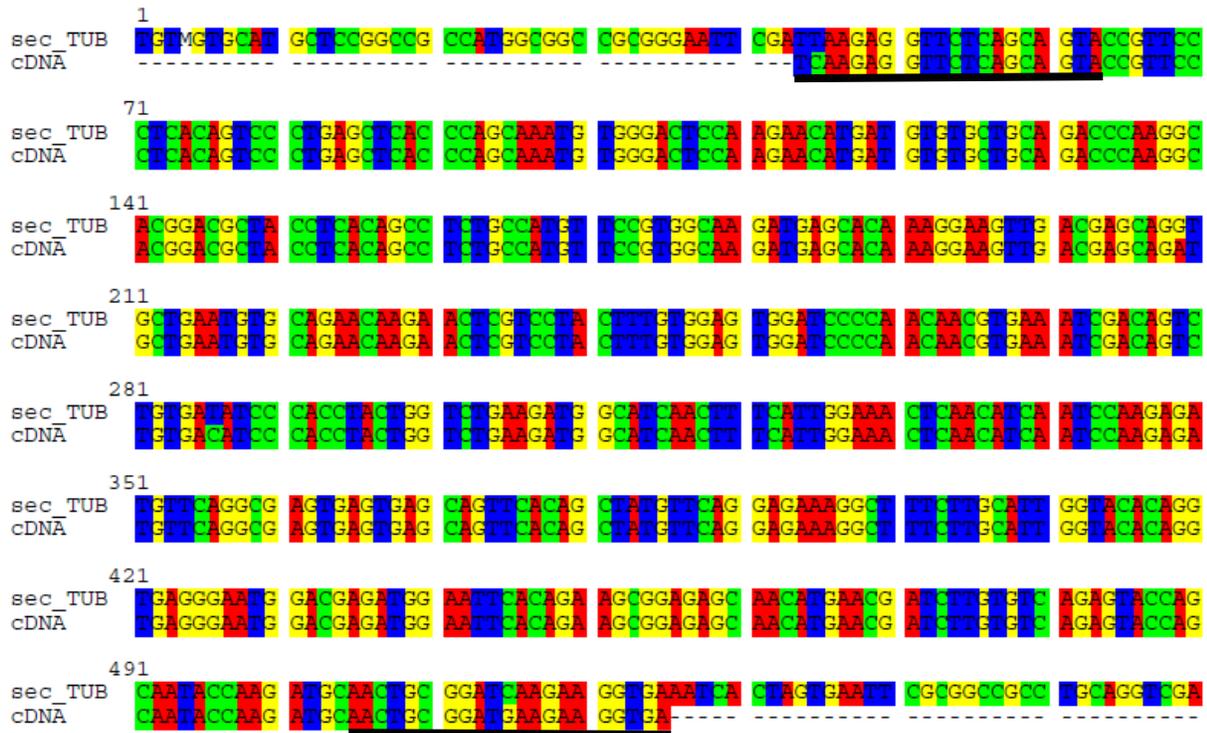


**Calibración de la cantidad de RNA total de plantas silvestres y líneas mutantes sometidas a 4°C por diferentes tiempos de exposición.** Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, muestran el RNA total extraído a partir de hojas de *A. thaliana*.



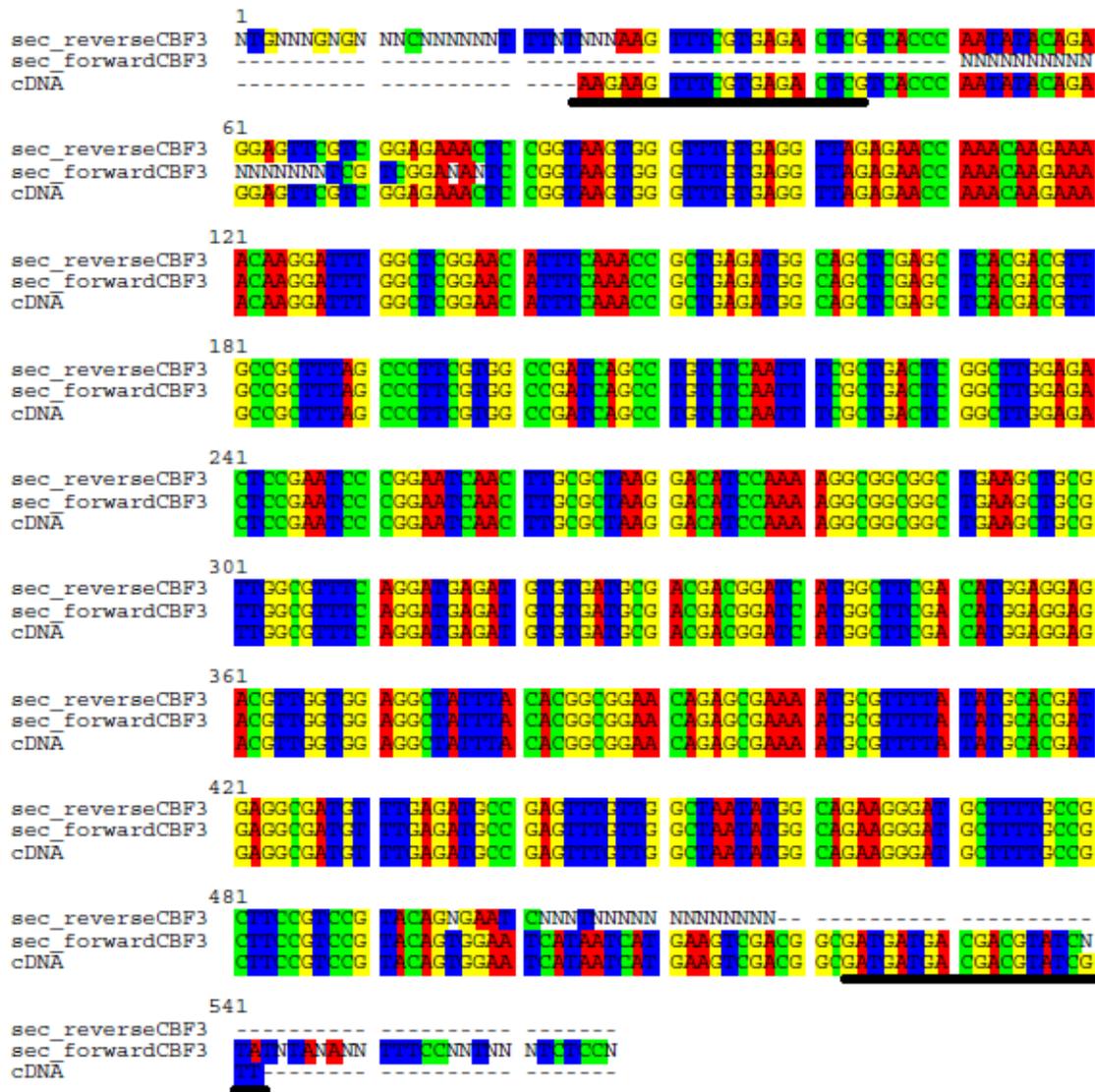
**Control negativo de la presencia de DNA genómico.** Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio que muestran productos de amplificación en cDNA correspondientes al gen *TUB* y en RNA no se observan productos de amplificación debido a la ausencia de DNA genómico.

## ANEXO B



**Análisis del producto de PCR de *TUB*.** Se muestra la comparación entre el cDNA de *TUB* con el producto de PCR obtenido (sec\_TUB). En líneas negras se muestran las zonas flanqueadas por los primers. En colores se muestran las distintas bases nitrogenadas.

## ANEXO B continuación



**Análisis del producto de PCR de CBF3.** Se muestra la comparación entre el cDNA de CBF3 con el producto de PCR obtenido de las dos reacciones de secuenciación forward y reverse (sec\_forwardCBF3, sec\_reverseCBF3). En líneas negras se muestran las zonas flanqueadas por los primers. En colores se muestran las distintas bases nitrogenadas.

## ANEXO B continuación

```

1
sec_reverseCOR15a  NNCNNC NNNN NCCNNNNN AA ANNCNNN CT AGAAAACTCA GTTCTCGTC GTTCTCAAC
sec_forwardCOR15a  -----
cDNA              ----- AGAAAACTCA GTTCTCGTC GTTCTCAAC

61
sec_reverseCOR15a  GCAGAAAGTC GTTATTTAC GCGGCTAAAG GTGACGGCAA CATCCTCGAT GACCTCAACG
sec_forwardCOR15a  NN CN NNNN C GTTATTTAC GCGGCTAAAG GTGACGGCAA CATCCTCGAT GACCTCAACG
cDNA              GCAGAAAGTC GTTATTTAC GCGGCTAAAG GTGACGGCAA CATCCTCGAT GACCTCAACG

121
sec_reverseCOR15a  AGGCCACAAA GAAAGCTTCA GATTTCTGTA CCGATAAAAC AAAAGAGGCA TTAGCAGATG
sec_forwardCOR15a  AGGCCACAAA GAAAGCTTCA GATTTCTGTA CCGATAAAAC AAAAGAGGCA TTAGCAGATG
cDNA              AGGCCACAAA GAAAGCTTCA GATTTCTGTA CCGATAAAAC AAAAGAGGCA TTAGCAGATG

181
sec_reverseCOR15a  GTGAGAAAGC GAAAGACTAC GTTCTTGAAA AAAACAGTGA AACCGCAGAT ACATGGGTA
sec_forwardCOR15a  GTGAGAAAGC GAAAGACTAC GTTCTTGAAA AAAACAGTGA AACCGCAGAT ACATGGGTA
cDNA              GTGAGAAAGC GAAAGACTAC GTTCTTGAAA AAAACAGTGA AACCGCAGAT ACATGGGTA

241
sec_reverseCOR15a  AAGAAGN TGA GAAAGCTGCG GCGTATCTGG AGGAGAAAGG AAAAGAAGCC GCAAA C AAGG
sec_forwardCOR15a  AAGAAGCTGA GAAAGCTGCG GCGTATCTGG AGGAGAAAGG AAAAGAAGCC GCAAA C AAGG
cDNA              AAGAAGCTGA GAAAGCTGCG GCGTATCTGG AGGAGAAAGG AAAAGAAGCC GCAAA C AAGG

301
sec_reverseCOR15a  CGGCAGATTC GNNNNNNNNN NNNN-----
sec_forwardCOR15a  CGGCAGAGTT CGGGAGGCT AAAGCAGGAG AGGCTAAGGA TGCCCAAAAG TAAAACTGG
cDNA              CGGCAGATTC CGGGAGGCT AAAGCAGGAG AGGCTAAGGA TGCCCAAAAG TAAAACTGG

```

**Análisis del producto de PCR de *COR15a*.** Se muestra la comparación entre el cDNA de *COR15a* con el producto de PCR obtenido de las dos reacciones de secuenciación forward y reverse (sec\_forwardCOR15a, sec\_reverseCOR15a). En líneas negras se muestran las zonas flanqueadas por los primers. En colores se muestran las distintas bases nitrogenadas.

### 13. REFERENCIAS

1. Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology* 55, 373-399.
2. Arisz S.A., van Wijk R., Roels W., Zhu J.K., Haring M.A., Munnik T. (2013) Rapid phosphatidic acid accumulation in response to low temperature stress in *Arabidopsis* is generated through diacylglycerol kinase. *Frontiers in Plant Science* 4, 1-15.
3. Cano Ramirez D.L. (2014) Contribución de los esfingolípidos a la fluidez de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*, UNAM.
4. Cantrel C., Vazquez T., Puyaubert J., Rezé N., Lesch M., Kaiser W. M., Dutilleul C., Guillas I., Zachowski A., Baudouin E. (2011) Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 189, 415-427.
5. Chen M., Markham J.E., Cahoon, E.B. (2012) Sphingolipid  $\Delta 8$  unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 69, 769-781.
6. Chen M., Markham J.E., Dietrich C.R., Jaworski J.G., Cahoon E.B. (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 1862-1878.
7. Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K. (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 12, 444-451.
8. Cook D., Fowler S., Fiehn O., Thomashow F.M. (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15243-15248.
9. Dietrich C.R., Han G., Chen M., Berg R.H., Dunn T.M., Cahoon E.B. (2008) Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis* LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *The Plant Journal* 54 284-298.
10. Doherty C. J., Van Buskirk H.A., Myers S.J., Thomashow M.F. (2009) Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *The Plant Cell* 21, 972-984.

11. Du L., Poovaiah B.W. (2005)  $Ca^{2+}$ /calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth. *Nature* 437, 741–745.
12. Dutilleul C., Benhassaine-Kesri G., Demandre C., Rezé N., Launay A., Pelletier S., Zachowski A., Baudouin E., Guillas I. (2012) Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and Arabidopsis response to chilling. *New Phytologist* 194, 181-19.
13. Dutilleul C., Chavarria H., Rezé N., Sotta B., Baudouin E., Guillas I. (2015) Evidence for ACD5 ceramide kinase activity involvement in Arabidopsis response to cold stress. *Plant, Cell & Environment* 38, 2688-2697.
14. Fitter H. A., Hay K.M. Robert (1987) *Environmental physiology of plants*. Academic Press. Londres. Pp 193-197.
15. Fowler S., Thomashow M. F. (2002). Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the *CBF* cold response pathway. *The Plant Cell* 14, 1675-1690.
16. Guillas I., Zachowski A., Baudouin E. (2011) A matter of fat: interaction between nitric oxide and sphingolipid signaling in plant cold response. *Plant Signaling & Behavior* 6, 140-142.
17. Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000) Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal* 24, 655-665.
18. Janská A., Marsík P., Zelenkova S., Ovesná J. (2010) Cold stress and acclimation- what is it important for metabolic adjustment? *Plant Biology* 12, 395-405.
19. Knight R. Marc, Knight H. (2012) Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist* 195, 737-751.
20. Lee Byeong-ha, David A. Henderson, Jian-Kang Zhu (2005) The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell* 17, 3155-3175.
21. Mahajan S., Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139-158.
22. Maruta T., Noshi M., Tanouchi A., Tamoi M., Yabuta Y., Yoshimura K., Shigeoka S. (2012)  $H_2O_2$ -triggered retrograde signaling from chloroplasts to nucleus plays specific role in response to stress. *Journal of Biological Chemistry* 287, 11717-11729.
23. Medina J., Bagues M., Terol J., Pérez-Alonso M., Salinas J. (1999) The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology* 119, 463-470.

24. Medina J., Catalá R., Salinas J. (2011) The CBFs: three Arabidopsis transcription factors to cold acclimate. *Plant Science* 180, 3-11.
25. Meijer H.J., Munnik T. (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54, 265-306.
26. Nilsen T. E., Ocurtt M. D.(1996) *The Physiology of Plants under Stress Vol. 1 Abiotic factors*.
27. Park S., Lee C.M., Doherty C.J., Gilmour S.J., Kim Y., Thomashow M.F. (2015) Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *The Plant Journal* 82, 193-207.
28. Preston C.J., Sandve R.S. (2013) Adaptation to seasonality and the winter freeze. *Frontiers in Plant Science* 4, doi: 10.3389/fpls.2013.00167.
29. Revilla P., Butrón A., Cartea M. Elena, Malvar R. Ana, Ordás Amando (2005) Breeding for cold tolerance. In: *abiotic stress: plant resistance, through breeding and molecular approaches* (Ashraf M., Harris P. J. C.) Ed. Food Products Press. Pp 749-751
30. Ruelland E., Cantrel C., Gawer M., Kader J.C., Zachowski A. (2002) Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in Arabidopsis suspension cells. *Plant Physiology* 130, 999-1007.
31. Ruelland E., Zachowski A. (2010) How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany* 69, 225-232.
32. Salleh F.M., Evans K., Goodall B., Machin H., Mowla S.B., Mur L.A., Rogers H.J. (2012) A novel function for a redox-related LEA protein (SAG21/AtLEA5) in root development and biotic stress responses. *Plant Cell & Environment* 35, 418-429.
33. Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., Harper J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell* 14, S401–S417.
34. Sasaki K., Christov N.K., Tsuda S., Imai R. (2013) Identification of a novel LEA protein involved in freezing tolerance in wheat. *Plant and Cell Physiology* pct 164.
35. Saucedo García M., Gavilanes Ruíz M. (2005) Las MAP cinasas: Elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. *Revista de Educación Bioquímica* 24, 4-11.
36. Saucedo-García M., Gavilanes-Ruíz M., Arce-Cervantes O. (2015) Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs, and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 6.
37. Sharma P., Sharma N., Deswal R. (2005) The molecular biology of the low-temperature response in plants. *BioEssays* 27, 1048-1059.

38. Shi L., Bielawski J., Mu J., Dong H., Teng C., Zhang J., Zuo, J. (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Research* 17, 1030-1040.
39. Shi Y., Ding Y., Yang, S. (2014) Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation. *Plant and Cell Physiology* doi:10.1093/pcp/pcu115.
40. Solanke U.A., Sharma K.A. (2008) Signal transduction during cold stress in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14, 69-79.
41. Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. (1997) *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 1035-1040.
42. Theocharis A., Clément C., Barka A.E. (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta* 235, 1091-1105.
43. Thomashow F. M. (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 571-599.
44. Thomashow F. M. (2010) Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiology* 154, 571-577.
45. Thomashow F.M., Gilmour S.J., Stockinger E.J., Jaglo-Ottosen K.R., Zarka D.G. (2001) Role of the *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 112,171-175.
46. Tognetti V.B., Palatnik J.F., Fillat M.F., Melzer M., Hajirezaei M.R., Valle E.M., Carrillo N. (2006) Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance. *The Plant Cell* 18, 2035-2050.
47. Uemura M., Joshep R. A., Steponkus L.P. (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 109, 15-30.
48. Weiser C.J. (1970) Cold resistance and injury in woody plants knowledge of hardy plant adaptations to freezing stress may help us to reduce winter damage. *Science* 169, 1269-1278.
49. Wu J., Wu J., Yin J., Zheng P., Yao N. (2015) Ethylene modulates sphingolipid synthesis in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 6, doi: 10.3389/fpls.2015.01122.
50. Yadav Kumar S. (2009) Cold stress tolerance mechanisms in plants. *Agronomy of Sustainable Development* 30,515-527.