



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Plasticidad de la raíz inducida por estrés osmótico en variantes naturales de *Arabidopsis thaliana* y su regulación por los factores epigenéticos ATX1 y CLF

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Pamela Aceves García

TUTOR PRINCIPAL:
Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez
[Instituto de Ecología, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. José Luis Reyes Taboada
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

Ciudad de México, diciembre 2017



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.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez y con la coordinación académico-científica de las Dras. Adriana Garay Arroyo, Berenice García Ponce de León, Elena Álvarez-Buylla Roces, y la coordinación administrativa y logística de Diana Romo Ríos; así como el apoyo de Laura Rodríguez y la Dra. Teresa Romero en la preparación de soluciones, medios y materiales diversos importantes.

Agradezco al Comité Tutor conformado por la Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, el Dr. José Luis Reyes Taboada y el Dr. Ernesto Soto Reyes Solís por su infinito apoyo y valiosos consejos a lo largo de la realización de este proyecto; así como a los miembros del jurado: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, Dra. María del Rocio Cruz Ortega, Dr. Francisco Campos Álvarez y Dr. Felipe Cruz García, por las sugerencias que enriquecieron esta tesis.

Agradezco a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por la realización de los microarreglos; y en especial, a Jorge Ramírez Salcedo por su tiempo y explicación para introducirme en el análisis de los mismos.

Además, agradezco el financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al Congreso de Biología de Plantas 2017 realizado en Honolulu, Hawaii, el cual me permitió conocer las investigaciones más actuales alrededor del mundo e intercambiar conocimientos académicos y personales.

Esta tesis se realizó gracias al apoyo de Beca para Estudios de Maestría del Proyecto “Convocatoria de Becas Nacionales 2015 Segundo Periodo” otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El financiamiento para insumos y otras actividades relevantes a esta investigación provino de proyectos de investigación UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN211516, IN208517, IN205517, IN204217 y CONACYT: 240180, 180380, 2015-01-687.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá, Myrna, la mujer que me ha guiado toda mi vida y que me enseñó el amor incondicional y el respeto de la forma más pura posible; gracias por ser mi pilar, por ser mi mejor ejemplo y haberme dado todo lo que estaba en tus manos. A mi papá, que siempre está ahí para recordarme el fluir de la vida y para inspirarme confianza en mí misma; gracias por tus valiosos consejos, maravillosos viajes y enormes risas. A Frank y Jesse, que ahora son parte de mi familia, no pude tener mejor complemento para mis padres; gracias por brindarme tanto apoyo y cariño, por cuidarme como si fuera suya. A mis abuelitos, Isaura y Guillermo, que son mi adoración y siempre están al tanto de mí y de todos mis proyectos; gracias por sus enseñanzas, por amarme y darme tanto. A mi hermano, Marco, mi mejor compañero de vida, una de las personas que más admiro y con las que más disfruto estar; gracias por tus palabras, tu tiempo y tu amor incondicional. A mis primas Yaz, Karen y Dany, que son mis hermanas también; gracias por las aventuras, por su confianza y cariño, sé que siempre estaremos juntas. A toda mi familia, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, les agradezco su guía constante. Los amo.

A mis amigos de la preparatoria y universidad, cada día me convengo más que ustedes fueron la mejor elección que pude haber hecho. Le dan a mi vida el mejor equilibrio de responsabilidad y diversión; gracias por todos esos momentos innumerables de risas, de compartir nuestros conocimientos y poder sentir su apoyo, aun estando lejos. Gracias por hacer que toda mi etapa estudiantil fuera la mejor de las experiencias.

A mis compañeros de laboratorio, por las buenas charlas, los bailes y su apoyo constante. En especial a Rosario y Stefan, por hacer divertidos los días de trabajo; gracias por siempre escucharme y darme los mejores consejos personales y académicos.

A mi tutora, Marypaz, por guiarme en este largo camino de la ciencia; gracias por tu enorme paciencia, confianza y gran motivación que me transmites a diario. Gracias a ti logré esta meta y todas tus enseñanzas siempre estarán conmigo.

A Missael Jasso, te dedico esta tesis, mi amor, porque fuiste mi mayor inspiración a lo largo del camino, mi gran apoyo y mi mejor crítico; porque nunca me dejaste caer y me recordaste lo capaz que soy y seré. Gracias por acompañarme en este hermoso y efímero viaje llamado vida. Siempre te llevaré conmigo a donde quiera que vaya. Te amo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma máter*.

“El auténtico viaje del descubrimiento no consiste en buscar nuevos paisajes, sino en tener una mirada nueva”

Marcel Proust

ÍNDICE

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 Variación natural de <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
2.2 Efectos generales del déficit hídrico en plantas.	11
2.2.1 La dinámica del agua en la célula vegetal.....	12
2.2.2 Respuestas morfo-fisiológicas ante el déficit hídrico en las plantas.	12
2.2.3 Diversidad de respuestas ante el déficit hídrico en <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.2.4 Estructura de la raíz y el efecto del déficit hídrico.....	15
2.3 Mecanismos moleculares en respuesta al déficit hídrico en <i>Arabidopsis</i>	18
2.4 Regulación epigenética asociada a las respuestas ante el estrés hídrico.	21
2.4.1 Generación de memoria epigenética en respuesta al estrés hídrico.	23
3. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS.....	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos particulares.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Condiciones de crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> e inducción de estrés osmótico.	30
6.2 Tasa de germinación.....	31
6.3 Cinética de crecimiento.	31
6.4 Análisis de las raíces mediante microscopía de luz.	31
6.5 Tratamiento para el estudio de las respuestas de memoria ante el estrés osmótico.	32
6.6 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	32
6.7 PCR semicuantitativa. Comprobación de la metodología usada para inducir estrés osmótico en los ecotipos.....	33
6.8 Análisis de microarreglos.....	34
6.9 PCR cuantitativa (qPCR).....	34
6.10 Análisis estadísticos.....	37

7. RESULTADOS	38
7.1 Análisis de tolerancia al estrés osmótico de los diferentes genotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
7.1.1 Tolerancia diferencial durante la germinación en los ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
7.1.2 Tolerancia diferencial en etapas posteriores del desarrollo entre los ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
7.1.3 Influencia de la pérdida de función de los factores epigenéticos ATX1 y CLF en la tolerancia al estrés osmótico.....	43
7.2 Variación fenotípica en la raíz en respuesta al estrés osmótico.....	45
7.2.1 Efecto del estrés osmótico en el desarrollo de la raíz principal entre los ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
7.2.2 Variación morfológica de la “cicatriz” en respuesta al estrés osmótico entre los ecotipos.....	48
7.2.3 Efecto de la pérdida de función los factores epigenéticos ATX1 y CLF en el desarrollo de la raíz principal bajo estrés osmótico.....	51
7.2.4 Morfología de la “cicatriz” que genera el estrés osmótico en ausencia de los factores epigenéticos ATX1 y CLF.....	53
7.3 Análisis de la expresión génica global en los ecotipos Col-0 y Cvi-0 bajo condiciones control y estrés osmótico.....	55
7.4 Análisis de la expresión diferencial inducida por estrés osmótico mediante PCR cuantitativa.....	62
7.4.1 La influencia de la variabilidad natural en los patrones de expresión en respuesta al estrés osmótico.....	62
7.4.2 El papel de ATX1 en la expresión de genes de respuesta al estrés osmótico en el ecotipo Col-0.....	68
7.5 Evaluación de la generación de memoria ante un segundo evento de estrés osmótico entre los diferentes genotipos.....	70
7.5.1 Respuesta fenotípica ante dos eventos de estrés entre los ecotipos.....	70
7.5.2 Morfología de la “cicatriz” en respuesta a un segundo estímulo de estrés osmótico..	73
7.5.3 Implicaciones epigenéticas en el desarrollo de la “cicatriz” en respuesta a un segundo estímulo osmótico.....	75

7.5.4 La regulación de ATX1 en los genes de respuesta ante un segundo estímulo de estrés osmótico.	79
8. DISCUSIÓN	82
8.1 La tolerancia de Cvi-0 al estrés osmótico.	82
8.2 Modificaciones en la arquitectura de la raíz y su asociación con la tolerancia al estrés osmótico.	85
8.3 Expresión diferencial de los genes de respuesta a estrés osmótico entre los ecotipos Col-0 y Cvi-0.	88
8.4 Respuestas morfológicas y de expresión génica ante un segundo estímulo de estrés osmótico.	91
8.5 El papel de los factores epigenéticos en la respuesta al estrés osmótico.	94
9. CONCLUSIONES.....	97
10. REFERENCIAS	98
11. ANEXO I. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	104
12. ANEXO II. DATOS SUPLEMENTARIOS.....	117
12.1 Comprobación de la metodología usada para inducir estrés.....	117

1. RESUMEN

Las plantas, al ser organismos sésiles, han adquirido a lo largo de su historia evolutiva mecanismos plásticos que les permiten responder adecuadamente ante el déficit hídrico. Estos mecanismos involucran modificaciones morfo-fisiológicas y moleculares que varían con el genotipo. Para evaluar la diversidad de estrategias adaptativas, *Arabidopsis thaliana* resulta un excelente modelo por la amplia gama de genotipos que se encuentran de forma silvestre en distintos sitios geográficos, comúnmente referidos como ecotipos. El ecotipo Cvi-0 habita originalmente en las Islas de Cabo Verde (África) donde se presenta un clima semiárido, y ha llamado especial atención por las respuestas diferenciales que presenta en sus hojas ante el estrés respecto a otros ecotipos; sin embargo, las respuestas que genera la raíz no han sido evaluadas, a pesar de que es un órgano clave en la adaptación a la deshidratación. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la variabilidad natural en la plasticidad de la raíz en respuesta al déficit hídrico, inducido a través de cambios en el potencial osmótico. Los resultados sugieren que el ecotipo Cvi-0 es más tolerante al estrés osmótico y presenta menor afectación en la longitud radicular, un ajuste osmótico más rápido en la raíz y cambios transcripcionales específicos en los genes de respuesta a estrés. Asimismo, debido a que recientemente se ha descrito un importante papel de la epigenética en las respuestas a la deshidratación y la generación de memoria ante estímulos consecutivos, se evaluaron las implicaciones de la regulación de los factores epigenéticos ATX1 y CLF bajo estrés osmótico, sugiriendo que estos factores están involucrados en la tolerancia al estrés, en la capacidad de ajuste osmótico y en la regulación de genes de respuesta, de manera diferencial a lo que sucede en la parte aérea.

Este estudio abre nuevas interrogantes sobre el papel de la raíz, sus modificaciones transcripcionales y la participación de los mecanismos epigenéticos en la variabilidad de respuestas naturales, aportando nueva información al complejo reto de integrar todos los factores que influyen en la respuestas y adaptación de las poblaciones al estrés.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Variación natural de *Arabidopsis thaliana*.

Las diferencias morfológicas, fisiológicas y de desarrollo que se encuentran dentro y entre los taxones es lo que se conoce como “variabilidad fenotípica” (Kalisz y Kramer, 2008). Esta variación presente en las poblaciones de seres vivos ha permitido que los organismos puedan responder de manera diferencial ante las condiciones de su ambiente para sobrevivir. Sus causas son diversas y complejas, e incluyen efectos genéticos y epigenéticos, que se encargan de integrar las señales ambientales para poder dar una respuesta morfo-fisiológica adecuada (Kalisz y Kramer, 2008). Mientras los efectos genéticos corresponden a los cambios que se encuentran en una secuencia a nivel de DNA y que tienen su origen principalmente en las mutaciones y en la recombinación (Futuyma, 1942), los efectos epigenéticos explican los cambios que suceden en la expresión génica sin que haya alteraciones en la secuencia de DNA (Feil y Fraga, 2012). Los mecanismos epigenéticos son muy dinámicos, ya que pueden constituir efectos persistentes a través de las generaciones (Jablonka y Lamb, 2005) o, a diferencia de los cambios genéticos, pueden originar respuestas inmediatas que sean reversibles (Holliday, 2006).

La variabilidad natural que se encuentra en las plantas es un tema que ha fascinado a diversos naturalistas a lo largo de la historia, principalmente debido a la enorme variación de caracteres relacionados con el desarrollo que existe entre las poblaciones (Alonso-Blanco *et al.*, 2005). Para estudiar esta variabilidad, *Arabidopsis thaliana* resulta un excelente modelo por la gran diversidad de fenotipos que encontramos en la especie, así como por la distribución geográfica y ambiental diversa en la que se localizan. Dichas poblaciones que se distribuyen en sitios geográficos específicos y tienen un genotipo y morfología particulares han sido llamadas “variantes naturales”, “accesiones” o “ecotipos”. La palabra ecotipo fue acuñada por Turesson (1922) y la define como: “el producto que surge como resultado de la respuesta genotípica de las ecoespecies a un hábitat particular [...], con capacidad reproductiva entre ellas, pero con impedimento a través de barreras ecológicas con otros”. Es muy interesante notar el uso de la palabra “ecoespecie” en su afán por resaltar que las especies representan unidades que se diferencian “a través de la acción de los factores ecológicos predominantes del hábitat” (Turesson, 1922). Actualmente se utiliza más

comúnmente el término “accesión” para determinar una muestra recolectada en una localización específica, la cual no incluye, pero tampoco excluye la adaptación local. Para fines prácticos de este trabajo, se aludirá al término “ecotipo” para resaltar la diferencia ambiental y geográfica entre las poblaciones de estudio, bajo el supuesto de adaptación de las poblaciones demostrado por Rutter y Fenster (2007) y Weigel (2012), entre otros.

En todo el mundo se han recolectado alrededor de 2000 ecotipos de *A. thaliana*, principalmente en el Hemisferio Norte (América, Europa y Asia) pero con algunos representantes del Hemisferio Sur, como el continente africano (Koornneef *et al.*, 2004). Esta gama tan amplia de características geográficas y ecológicas a la que están sometidos los ecotipos permite que el estudio de los cambios moleculares y morfológicos que sufren en respuesta a transformaciones del medio ambiente sea más integrativo, pues en comparación con el uso de mutantes que se centran generalmente en la respuesta al cambio de un solo gen, la investigación con ecotipos involucra el entendimiento de un gran número de modificaciones genéticas y epigenéticas que suceden al mismo tiempo.

El ecotipo Columbia (Col-0) ha sido el más estudiado alrededor del mundo. Aunque su hábitat de origen suele ser controversial, la historia de este ecotipo se remonta a Landsberg am Lech, Alemania (Koncz *et al.*, 1992; <http://arabidopsis.info/CollectionInfo?id=94>). En este sitio la temperatura promedio anual es de 7.88°C y el promedio de precipitación anual es de 83.38 mm/m; es decir, es considerado un clima templado con precipitaciones constantes (Cfb) de acuerdo a la clasificación climática de Köppen.

El ecotipo Cape Verde Islands (Cvi-0) ha tenido especial interés por la diferencia de respuestas que presentan las hojas ante cambios de concentración en CO₂ (Monda *et al.*, 2011), alta salinidad (Borsani *et al.*, 2001) y a la deshidratación (Bouchabke *et al.*, 2008) respecto a Col-0. Las poblaciones de Cvi-0 se distribuyen en las islas de Cabo Verde, África, a una latitud de 15.11° (norte), longitud de -23.62° (oeste) y altitud de 1200 msnm. Su localización en el Océano Atlántico, separada del continente, da lugar a condiciones ecológicas específicas, con ecosistemas únicos que forman parte de la región florística de Macaronesia, junto con Azores, Madeira y las Islas Canarias (Takhtajan, 1986). Las islas de Cabo Verde son las más secas de la región, su temperatura promedio anual es de 22.58°C y un promedio de precipitación anual de 18.25 mm/m (Aceves-García *et al.*, 2016); es decir, es considerado un clima semiárido cálido (Bsh).

Las poblaciones o variantes naturales que se originan en diversos lugares geográficos han estado sujetos a presiones de selección diferenciales que les ha permitido evolucionar para adaptarse a su ambiente en particular (Verslues y Juenger, 2011). Junto con la selección natural, la plasticidad fenotípica también juega un rol importante en la adaptación de los individuos a través de la modificación de la adecuación (éxito reproductivo). Mientras que la selección natural involucra que la frecuencia de alelos favorables incremente y los desfavorables disminuyan a lo largo de las generaciones; la plasticidad se define como la habilidad de un genotipo individual para expresar diferentes fenotipos cuando se exponen a condiciones ambientales distintas (Pigliucci *et al.*, 2006); y constituye una parte importante de la capacidad de las plantas para sobrevivir a ambientes heterogéneos. Estos dos mecanismos pueden interactuar entre sí para lograr la adaptación del individuo; por ejemplo, si una respuesta plástica aumenta la adecuación de la planta en un ambiente particular y es resultado de un genotipo específico, entonces la plasticidad fenotípica puede evolucionar por selección natural (Grenier *et al.*, 2016).

Por lo tanto, si algunas variantes naturales o ecotipos están adaptados a su ambiente, *e.g.*, condiciones de sequía, las respuestas plásticas que presentarán ante esta condición adversa serán diferenciales a los ecotipos que habiten en zonas con alta precipitación. El análisis de los caracteres involucrados en dicha respuesta es de utilidad para conocer la amplia variabilidad de mecanismos que las plantas son capaces de generar ante condiciones heterogéneas.

2.2 Efectos generales del déficit hídrico en plantas.

Las plantas al ser organismos sésiles constantemente deben adaptar su morfo-fisiología a los cambios ambientales desfavorables que se les presenten. Cualquier factor ambiental que tenga un impacto negativo sobre el desarrollo, la fisiología y/o la adecuación de las plantas es considerado un agente estresante (Lefebvre *et al.*, 2009). Entre todos los factores a los que están sometidos, la limitación hídrica es el principal estrés abiótico que afecta en general el crecimiento de las plantas y su distribución ecológica, y en particular, a la productividad de los cultivos (Reddy *et al.*, 2004). Las plantas experimentan estrés hídrico cuando la tasa de transpiración es muy alta o cuando el suministro de agua a las raíces es limitado (Reddy *et al.*, 2004). La deshidratación puede ocurrir cuando hay un decremento en la disponibilidad de agua (*e.g.* durante la sequía), alteración en el

contenido de soluto (*e.g.* alta salinidad) o por congelamiento (Verslues *et al.*, 2006), lo cual ocasiona la reducción en el contenido de agua y la turgencia celular. Este fenómeno puede ser estudiado en términos de la dinámica del agua en el sistema suelo/planta.

2.2.1 La dinámica del agua en la célula vegetal.

La capacidad de las plantas para absorber el agua depende del movimiento de este líquido desde el suelo hasta las raíces, que está en función de la energía libre de las moléculas de agua por unidad de volumen, lo que se conoce como potencial hídrico. Bajo condiciones hidratadas, el potencial hídrico en el exterior es mayor, lo que indica una alta energía libre de las moléculas que les permite desplazarse hacia un potencial menor dentro de la célula. Cuando ocurre un déficit hídrico, el potencial hídrico en el exterior disminuye (la energía libre del agua es menor) y esto ocasiona que la captura de agua sea limitada para las plantas (Bray, 2001). Se ha reportado que el rango de potencial hídrico que las plantas son capaces de usar oscila entre -0.03 a -1.5 MPa (Claeys *et al.*, 2014).

Aunado a lo anterior, un elemento fundamental que interviene en el potencial hídrico es el potencial osmótico, el cual determina el efecto de la concentración de solutos sobre la energía libre de las moléculas de agua; por ejemplo, a medida que la concentración de solutos aumenta en el suelo, la capacidad de movimiento del agua disminuye y su potencial osmótico se vuelve más negativo (Bray, 2001). Por lo tanto, una forma de inducir déficit hídrico de forma controlada es a través de modificaciones en el potencial osmótico, utilizando un exceso de solutos como manitol o polietilenglicol (PEG) en el medio externo (Verslues *et al.*, 2006; Jones, 2007).

Para lograr sobrevivir al déficit hídrico, las plantas recurren a una gran diversidad de respuestas morfo-fisiológicas y estrategias adaptativas que les permiten evitar la pérdida de agua y/o tolerar bajos potenciales hídricos en sus tejidos.

2.2.2 Respuestas morfo-fisiológicas ante el déficit hídrico en las plantas.

Dentro de las estrategias adaptativas que poseen las plantas se encuentran: a) *La evasión a la deshidratación*, que permite mantener un balance interno entre la pérdida y la toma de agua para evitar perturbaciones fisiológicas. Las respuestas involucran el cierre de los estomas, lo que limita

el proceso de transpiración; el aumento del sistema radicular, que incrementa el contacto de las raíces con el suelo en búsqueda de agua; y modificaciones en la capacidad de almacenamiento y permeabilidad del agua en los tejidos. Esta es una estrategia común durante la etapa del desarrollo vegetativo de las plantas que sufren sequía de intensidad leve a moderada; b) *La tolerancia a la deshidratación*, es la adaptación para sobrevivir a déficits hídricos internos. Para disminuir los efectos negativos del estrés hídrico, las plantas incrementan la producción de proteínas de protección celular como consecuencia de la activación de genes de respuesta a estrés y aquellos implicados en la biosíntesis de ácido abscísico (ABA), una hormona involucrada en la señalización de la respuesta al estrés. Además, las plantas acumulan solutos que no intervienen en los procesos metabólicos generales y contribuyen en la regulación de la presión osmótica para inducir la entrada de agua a la célula, un proceso conocido como “ajuste osmótico”. Estos solutos han sido denominados “osmolitos” y pueden ser orgánicos (como los azúcares, glicina, prolina, etc.) o inorgánicos (K⁺, Na⁺ y Cl⁻, etc.). Otras respuestas para la tolerancia a la deshidratación es el control en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), que se acumulan durante el estrés pero que deben ser eliminadas mediante la actividad de enzimas antioxidantes para evitar la intoxicación celular (Verslues *et al.*, 2006). Esta estrategia la realizan las plantas que se encuentran en estrés hídrico moderado a severo durante su desarrollo; y c) *Escape a la deshidratación*, que le permite a la planta reproducirse y dejar descendencia antes de la sequía. Este es un tipo de estrategia utilizado por plantas anuales con rápido crecimiento y floración temprana que sufren sequía, generalmente severa, al final de su temporada de crecimiento. Las plantas del desierto o algunas variedades de cultivos con floración temprana de arroz, sorgo o trigo presentan esta estrategia de vida (Estrategias revisadas en: Ludlow, 1989; Chaves *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2004; Verslues *et al.*, 2006; Fang y Xiong, 2015). Para que las plantas puedan enfrentarse a la deshidratación requieren de una mezcla de estrategias de evasión y tolerancia que varían con el genotipo (Fig. 1).

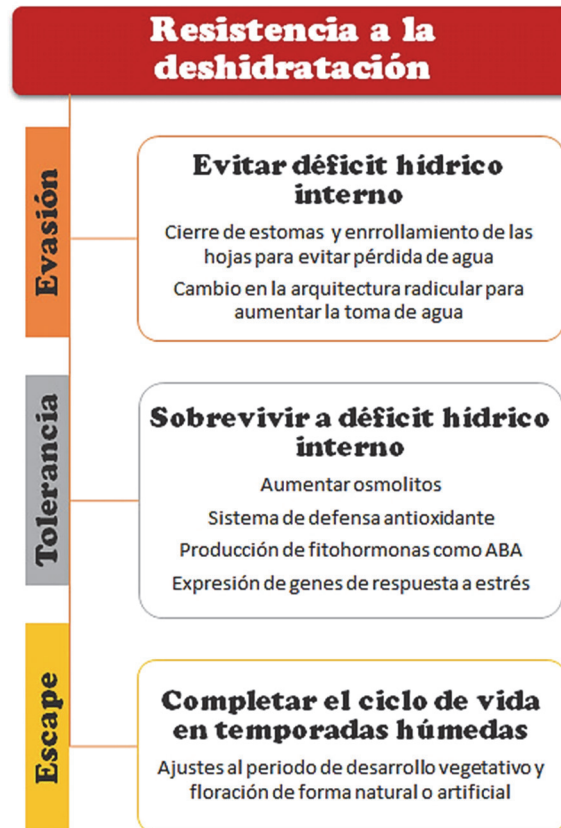


Figura 1. Estrategias principales que siguen las plantas para sobrevivir cuando son expuestas a déficits hídricos. Estas estrategias no son mutuamente excluyentes y se pueden combinar para dar un rango de respuestas. La evasión es la capacidad de las plantas para mantener un alto potencial hídrico interno al equilibrar la pérdida y ganancia de agua; durante la tolerancia, la planta es capaz de sobrevivir a bajos potenciales hídricos internos al activar mecanismos para reducir o reparar los daños debido al estrés; y las plantas que usan el escape son capaces de completar sus ciclos de vida antes de que ocurra el déficit hídrico. Recopilado de Ludlow (1989); Chaves et al. (2003) y Fang y Xiong (2015).

2.2.3 Diversidad de respuestas ante el déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana*.

Las respuestas que se originan ante estos cambios no son iguales para todas las poblaciones de plantas, pues además de otros factores como la severidad, duración del estrés, o la etapa de desarrollo (Bray, 2004; Reddy *et al.*, 2004), los mecanismos genéticos particulares son de suma importancia para originar la respuesta más adecuada (Zhang *et al.*, 2007; Kellermeier *et al.*, 2013; McCormack y Guo, 2014; Ristova y Busch, 2014; Kim *et al.*, 2015; Satbhai *et al.*, 2015). En *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado que la respuesta al estrés hídrico es diferencial para cada

ecotipo. Por ejemplo, Monda *et al.* (2011) observó que después de una hora en baja humedad, el área estomática de Cvi-0 disminuía menos en comparación con Col-0; es decir, este ecotipo permanece con sus estomas más abiertos en estrés hídrico. Esta misma respuesta en Cvi-0 se observó ante cambios de concentración de CO₂ que iban desde 0 hasta las 700ppm, lo cual se vio reflejado en una menor afectación en la conductancia estomática y una menor temperatura de las hojas (Monda *et al.*, 2011). Asombrosamente, a niveles muy elevados de CO₂, Cvi-0 presentó mayor tasa fotosintética que Col-0 y no tuvo perturbaciones metabólicas del nitrógeno (Li *et al.*, 2008). Por otra parte, Bouchabke *et al.* (2008) demostraron que bajo estrés hídrico Cvi-0 tiene una mayor pérdida de agua en la roseta en comparación con el resto de los ecotipos, tanto en control como en tratamiento de deshidratación; sin embargo, el contenido de agua relativo en la hoja permanece inalterable en comparación con las condiciones control.

Sin embargo, todos los estudios anteriormente descritos se han enfocado en las respuestas de las hojas. En la literatura actual, se ha puesto poca atención a las diferencias entre las respuestas de la raíz y la parte aérea sometidas a un estrés hídrico, las cuales son importantes para comprender a distintas escalas los mecanismos involucrados en la resistencia a la deshidratación.

2.2.4 Estructura de la raíz y el efecto del déficit hídrico.

Turner y Jones (1980) demostraron que el ajuste osmótico en la raíz tiene un rol diferente al de la parte aérea, pues al ser el primer órgano en sensor la falta de disponibilidad de agua, su ajuste osmótico ocurre antes, logrando la turgencia necesaria para continuar con el desarrollo y así, reducir los efectos del déficit en las hojas. Cuando el estrés es más severo, el desarrollo de la hoja se detiene; sin embargo, la raíz continúa creciendo aún en potenciales hídricos tan bajos como -1.5 MPa (Hsiao y Xu, 2000). Además, la raíz es el órgano que sufre las mayores transformaciones en la arquitectura para la exploración e incremento de la captura de agua (Wasson *et al.*, 2012). Es por esto que la raíz es un órgano clave en la adaptación a la deshidratación y se requiere dirigir una mayor cantidad de investigaciones particulares en el futuro.

En *A. thaliana*, la raíz primaria presenta una etapa de crecimiento constante mientras el meristemo radicular apical (RAM, por sus siglas en inglés) sea funcional. En el RAM se encuentra el centro quiescente (QC) rodeado por el nicho de células troncales (SCN) que da origen a todos los

tipos celulares que conforman la raíz: columela, epidermis, córtex, endodermis y el haz vascular. Las células de cada tejido se dividen a una alta tasa en el RAM activo y después comienzan a elongarse para finalmente diferenciarse (Fig. 2) (Ivanov y Dubrovsky, 2013). Sin embargo, el RAM puede disminuir su actividad o agotarse bajo ciertas condiciones y el crecimiento de la raíz principal se detiene (Reyes-Hernandez *et al.*, 2014), etapa que puede ser reversible o irreversible (Shishkova *et al.*, 2008). Por ejemplo, a pesar de que el estrés osmótico retarda el crecimiento de la raíz principal en *Arabidopsis*, incluso hasta lo inhibe por completo, éste podría ser un mecanismo para modificar la arquitectura radicular, pues se comienza a generar un aumento de raíces laterales que presentan una mayor tolerancia al estrés que la raíz principal o que las raíces laterales que nunca fueron expuestas (Duan *et al.*, 2010). En trigo se observó que bajo estrés osmótico con PEG el meristemo se agota; es decir, ya no origina células nuevas en el nicho de células troncales y la diferenciación de raíces laterales se da prematuramente. Además, estas raíces jóvenes son más densas y largas para abarcar un área mayor en la absorción de agua (Ji *et al.*, 2014). Esta capacidad de ajuste durante el desarrollo radicular, permite a los individuos modificar su arquitectura hacia las condiciones más favorables y les confiere ventajas en un ambiente de suelo heterogéneo.

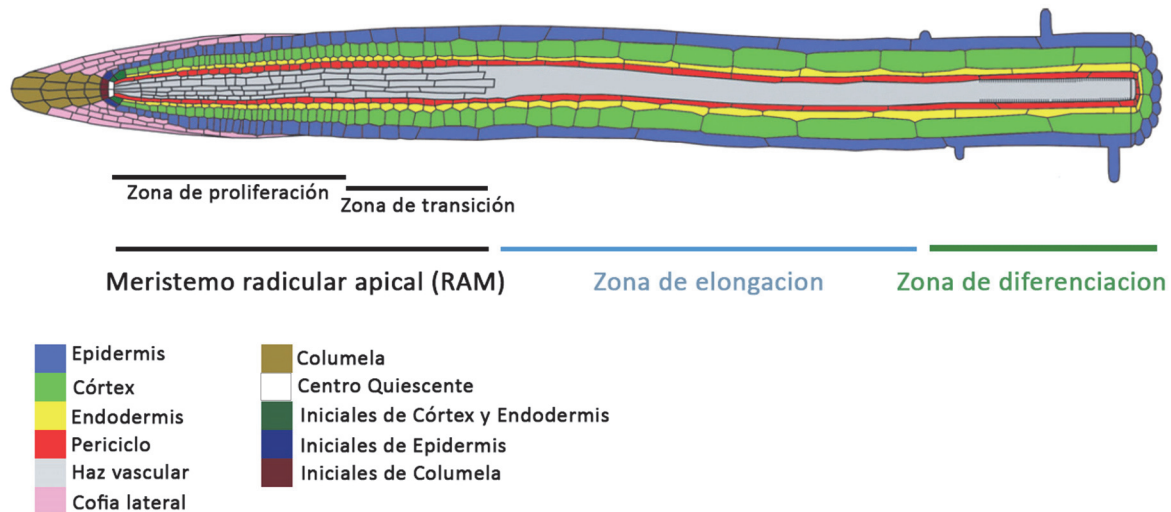


Figura 2. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. La raíz está conformada por tres zonas principales, comenzando por la parte más apical se encuentra: 1) el RAM, conformado por el dominio de proliferación en el cual las células se dividen activamente y por el dominio de transición, en el que las células dejan de dividirse y crecen a una tasa muy baja; 2) zona de elongación, en el cual las células provenientes del meristemo comienzan a expandirse rápidamente y 3) zona de diferenciación, donde las células detienen su crecimiento, adquieren su estado final de diferenciación y comienza el desarrollo de los pelos radiculares. Modificado de Ubeda-Tomas *et al.* (2012).

Los cambios en la arquitectura de la raíz en respuesta al estrés hídrico también es una variable que varía con el genotipo. Por ejemplo, se ha observado en algunos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* que la longitud de la raíz principal es afectada diferencialmente: mientras que en el ecotipo Sha (proveniente de Tadjikistán) el crecimiento de la raíz sufre menores afectaciones ante un bajo potencial hídrico, en *Ler* y *Col-0* el desarrollo radicular es más sensible a la deshidratación (Sharma *et al.*, 2013). Asimismo, aunque no se ha evaluado la morfología radicular en *Cvi-0* bajo estrés hídrico, en condiciones control se encontró que es el ecotipo con la raíz más corta, y que presenta una morfometría diferencial caracterizada por raíces laterales más extendidas. Sorprendentemente, esta morfología tuvo una correlación ($r_s = 60$; $p \text{ value} < 2.2 \times 10^{-16}$) con la menor precipitación del lugar de origen (Aceves-García *et al.*, 2016); lo que abre nuevas preguntas sobre la relación del fenotipo radicular con las condiciones de humedad. Es decir, las diferencias presentes en la raíz de los ecotipos en respuesta al estrés hídrico podrían ser consecuencia de su

adaptación a climas particulares, aunque la falta de información de la variabilidad radicular en esta especie es una limitante para lograr responder estas preguntas.

A pesar de la escasez de investigaciones en el sistema de la raíz, la variabilidad morfológica en las hojas de los ecotipos de *Arabidopsis* ha sido de vital importancia para comenzar a comprender la diversidad de las respuestas que se generan ante los cambios ambientales. Sin embargo, el estudio de los mecanismos moleculares asociados a estos cambios morfológicos y que pudieran influir en la historia evolutiva de cada ecotipo, es un área que ha sido más escasamente descrita (Verslues *et al.*, 2014; Bac-Molenaar *et al.*, 2016; Rymaszewski *et al.*, 2017). No obstante, existen diversas investigaciones realizadas en el ecotipo Col-0 que sirven como referencia para emprender los estudios de las respuestas moleculares que controlan la plasticidad fenotípica. A continuación, se detallarán algunos de estos mecanismos que surgen ante la limitación hídrica, sin perder de vista que la información presente sólo se ha obtenido de la parte aérea de las plantas.

2.3 Mecanismos moleculares en respuesta al déficit hídrico en *Arabidopsis*.

El sometimiento de las plantas a la limitación hídrica tiene un impacto grande en la desregulación de diversos genes, según estudios realizados en el ecotipo Col-0 antes y después de tratamientos de estrés hídrico (Kawaguchi *et al.*, 2004), estrés osmótico (Kreps *et al.*, 2002) o ambos (Seki *et al.*, 2002). Los genes que se inducen o reprimen debido a estos tipos de estrés responden a señalizaciones que se desencadenan en gran parte debido a la presencia de hormonas, como el ácido abscísico (ABA).

El ácido abscísico (ABA) juega un papel muy importante en los procesos de desarrollo y respuestas adaptativas de las plantas, como la síntesis de proteínas y lípidos que se almacenan en la semilla, la tolerancia a la desecación en la semilla, la entrada a la dormancia y la inhibición de la transición a la fase reproductiva (Finkelstein *et al.*, 2002). En particular, la síntesis de ABA es muy importante para la señalización ante el estrés hídrico, pues su acumulación en todos los órganos de la planta permite que se activen respuestas moleculares y fisiológicas como el cierre de los estomas para evitar la pérdida de agua (Hetherington y Woodward, 2003), y la activación de genes que responden a ABA (Iuchi *et al.*, 2001). Las plantas sintetizan ABA por la catálisis de epoxi-carotenoides en diversos pasos. Dentro de estos, la ruptura de 9-cis-isómeros por la 9-cis-

epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED3) para formar xantinas es el primer paso comprometido y altamente regulado, pues esta molécula luego será convertida en ABA por dos oxidasas (Yang y Tan, 2014). En *Arabidopsis*, la pérdida de *NCED3* disminuye la acumulación de ABA bajo estrés hídrico; mientras que la sobre-expresora aumenta la acumulación endógena de ABA y promueve la transcripción de genes inducibles como *RAB18* (RESPONSIVE TO ABA 18) y *RD29B* (RESPONSIVE TO DESICCATION 29B), aumentando la resistencia a la deshidratación (Iuchi *et al.*, 2001). La mayoría de los genes regulados por ABA contienen elementos de respuesta a ABA llamados ABRE (ABA-responsive element) en los promotores de diversos genes, que son reconocidos por factores transcripcionales tipo AREB (ABA responsive element-binding protein). La activación de estos factores depende de una cascada de señalización donde intervienen cinasas específicas que se activan gracias a la presencia de la hormona (Fig. 3). Sin embargo, también se sabe que existe señalización ante este tipo de estrés independiente de ABA (Fujita *et al.*, 2011) dirigida por factores transcripcionales como DREB2 (DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2), que se unen a genes que contienen elementos DRE/CRT (dehydration-responsive element) en sus promotores (Fig. 3). De hecho, muchos genes inducidos por estrés contienen ambos elementos (ABRE y DRE/CRT), como es el caso de *KIN2/COR6.6* (COLD-RESPONSIVE 6.6), *RAB18*, *RD29A* y *RD29B*. Por ejemplo, se sabe que *RD29A* está mayormente regulado por la vía independiente de ABA pues posee más sitios DRE/CRT, mientras que *RD29B* está regulado principalmente por esta hormona gracias a su mayor cantidad de sitios ABRE; ambos codifican para proteínas dehidrinas hidrofílicas que se expresan altamente en hoja y raíz bajo estrés hídrico, salino y al frío, aunque su función exacta no ha sido dilucidada (Msanne *et al.*, 2011). *KIN2/COR6.6* es otro gen inducido por estrés hídrico, osmótico y frío dependiente de ABA (Wang y Cutler, 1995) y *RAB18* es una dehidrina hidrofílica que responde a bajas temperaturas y estrés hídrico (Lang *et al.*, 1994). Otro gen involucrado en la respuesta al estrés es *COR15A* (COLD-REGULATED 15A) que cambia su estructura conformacional en alfa hélices más estables durante el congelamiento y la desecación para protección y estabilización de las membranas internas celulares (Thalhammer y Hinch, 2014). Se cree que este gen también puede responder a ABA, pues sus niveles disminuyen en una mutante deficiente de esta hormona (Xiong *et al.*, 2001). Por otra parte, ANAC019 (NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 19) es una proteína que pertenece a los factores transcripcionales NAC que actúa independientemente de la vía de ABA y se expresa fuertemente bajo deshidratación y

salinidad; su sobre-expresión causa una supervivencia del 63.33% de las plantas ante estrés hídrico en comparación con 15% de las plantas control (Tran *et al.*, 2004).

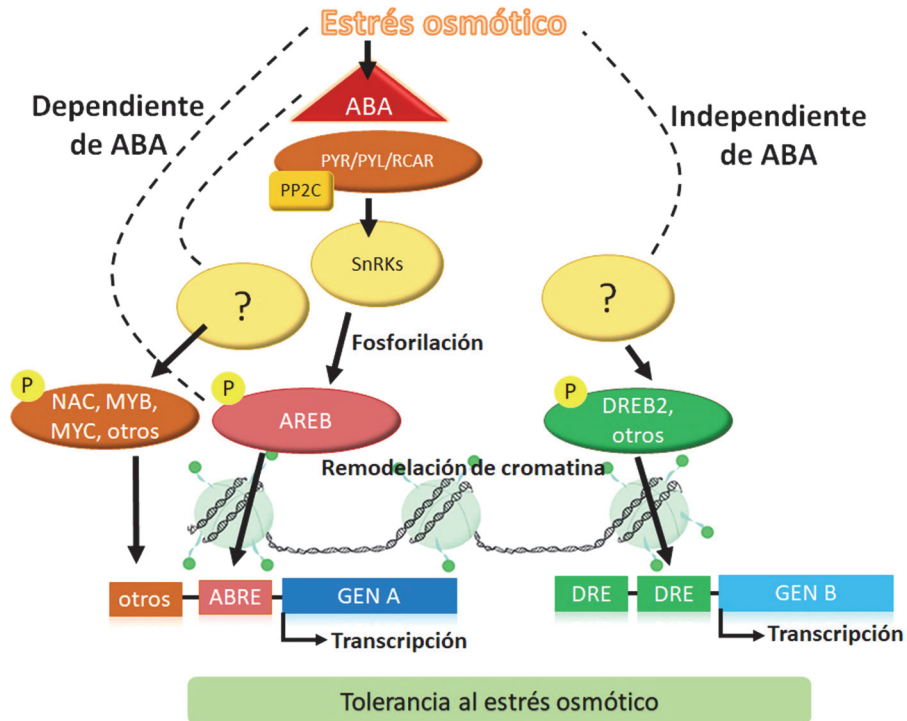


Figura 3. Modelo sobre la regulación genética en respuesta al estrés osmótico. Vía dependiente de ABA: el receptor PYR/PYL/RCAR al sentir la presencia de ABA en respuesta al estrés, recluta a las fosfatasas PP2C (como ABI1) para comenzar la señalización en respuesta a ABA. La cinasa SnRK fosforila los factores de transcripción AREB que reconocen los sitios ABRE en los promotores de genes que responden a ABA para comenzar su transcripción. También existen otros factores transcripcionales dependientes de ABA como NAC, MYB, MYC y otros, que se unen a secuencias específicas de genes de respuesta. Por otro lado, existe la ruta independiente de ABA a través de factores transcripcionales de diversas familias como DREB2 que reconocen los dominios DRE para comenzar la transcripción de genes de respuesta a estrés. La regulación compleja de estos genes de respuesta origina diferentes mecanismos para que la planta pueda tolerar el estrés. Las líneas punteadas indican posibles rutas no demostradas. ABA= ácido abscísico; PYR/PYL/RCAR= Pyrabactin resistance/Pyrabactin-like or regulatory components of ABA receptor; PP2C= protein phosphatase 2C; ABI1= ABA insensitive 1; SNRKs= SNF-related serine/threonine protein kinase; AREB= ABA responsive element-binding protein; FT= factor de transcripción; ABRE= ABA-responsive elements; DRE= dehydration-responsive element. Recopilado de Fujita *et al.* (2011) y Roychoudhury *et al.* (2013).

Como se describió anteriormente, la habilidad de las plantas para tolerar el estrés depende de su reprogramación transcripcional. En esta capacidad de ajuste, los mecanismos epigenéticos juegan un papel fundamental, pues su regulación sobre la cromatina es dinámica y reversible, generando así, una gama de respuestas transcripcionales que pueden surgir de manera rápida y precisa (Han y Wagner, 2014).

2.4 Regulación epigenética asociada a las respuestas ante el estrés hídrico.

Algunas de las diferencias a nivel transcripcional generadas por las condiciones ambientales involucran cambios en la regulación epigenética, pues se sabe que estos mecanismos controlan una gran cantidad de genes y afectan en gran medida la respuesta plástica de las plantas ante el estrés (Luo *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015).

El término epigenética se definió por primera vez en 1940 por Conrad Waddington, como el estudio de los genes, sus productos, y las interacciones causales de estos que conducen a la formación de un fenotipo (Waddington, 1942), esclareciendo lo complicado que era hacer una relación lineal entre el genotipo y el fenotipo. Actualmente esta definición se ha transformado para explicar los cambios mitóticos y/o meióticos en la función génica que no pueden ser explicados por cambios en el DNA (Feil y Fraga, 2012) y que además son procesos que subyacen la plasticidad y canalización durante el desarrollo de un organismo originando efectos rápidos y reversibles (Holliday, 2006) o persistentes a través de las generaciones (Jablonka y Raz, 2009). Conforme pasa el tiempo los estudios epigenéticos son cada vez más numerosos y profundos, haciendo de esta disciplina un área de investigación de frontera que está modificando los paradigmas de la herencia y la variación natural.

Los mecanismos epigenéticos están a cargo de proteínas que se unen directa o indirectamente a regiones del DNA o las histonas, las cuales son capaces de regular la expresión de los genes, controlando su transcripción a través del movimiento dinámico de la cromatina. La cromatina está compuesta por los nucleosomas, unidades que están formadas por un octámero de histonas donde se enrolla el DNA, y que son capaces de regular y estructurar regiones específicas del genoma (Luger *et al.*, 1997). Dicha regulación se puede dar a través de modificaciones covalentes en el DNA, como es la metilación de las citosinas; o a través de

modificaciones en las histonas, que incluyen metilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones, ADP ribosilaciones y/o fosforilaciones (Li *et al.*, 2007). De manera general, las modificaciones asociadas con transcripción activa son las acetilaciones o la di- o trimetilación (me) de la lisina (K) 4 de la histona H3 (H3K4me2 y H3K4me3, respectivamente); mientras que algunas de las modificaciones asociadas a represión transcripcional son la H3K9me3 y la H3K27me3. Estas marcas son reconocidas por otras proteínas que tienen influencia sobre la dinámica de cromatina, como los remodeladores de cromatina, que utilizan la hidrólisis del ATP para alterar los contactos entre las histonas y el DNA, modificando el acceso de los factores transcripcionales hacia los genes (Li *et al.*, 2007).

Según van Dijk *et al.* (2010), el porcentaje global de las modificaciones por monometilación (H3K4me), dimetilación (H3K4me2) y trimetilación (H3K4me3) cambian bajo condiciones de estrés hídrico. La abundancia de la marca H3K4me3 que está asociada directamente con activación transcripcional se vio relacionada con una mayor expresión de genes de respuesta a estrés, y su disminución también coincidió con genes que se desregulan negativamente bajo estrés. Por otra parte, Kim *et al.* (2008) demostraron que las marcas epigenéticas de acetilación H3K9ac, H3K14ac, H3K23ac, H3K27ac y de metilación H3K4me3, todas asociadas con activación transcripcional, cambiaron después del tratamiento de estrés en cuatro genes de respuesta, y las marcas H3K4me3 and H3K9ac correlacionaron con la activación génica de los mismos. Además, hay cambios globales en H3K4me2 y H3K9ac durante la diferenciación prematura del RAM en respuesta al estrés hídrico (Ji *et al.*, 2014).

Lo anterior sugiere que el complejo Trithorax (TrxG) podría estar involucrado en gran medida en la regulación de genes de respuesta al estrés, pues se encarga de colocar la marca H3K4me3, que en general está asociada a la activación transcripcional, promoviendo un estado de cromatina más laxo. El complejo TrxG está formado por histonas-metiltransferasas como Arabidopsis Homolog of Trithorax (ATX1), que contienen un dominio SET (acrónimo de las proteínas de Drosophila: Su(var)3-9 and Enhancer of zeste) el cual le confiere su actividad catalítica, a su vez por proteínas reguladoras que conforman el complejo COMPASS y por factores remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (Pien y Grossniklaus, 2007; Sanchez *et al.*, 2015). En muchos casos, se sabe que el complejo TrxG es antagónico a Polycomb (PcG), éste último funciona en complejos denominados Polycomb Repressive Complex 1 y 2 (PRC1 y PRC2), siendo

PRC2 el que posee la actividad catalítica a través de diversas enzimas como CURLY LEAF (CLF), que cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) asociada a la compactación de la cromatina y a la represión génica; mientras que el complejo PRC1 se une a ella y estabiliza dicha represión (Pien y Grossniklaus, 2007; Sanchez *et al.*, 2015)

Ambos complejos, TrxG y PcG, son un conjunto de proteínas conservadas evolutivamente que regulan la expresión genética tanto en animales como en plantas. Su función provoca cambios en la estructura de la cromatina para regular varios procesos celulares y de desarrollo, incluyendo la tolerancia al estrés hídrico. Por ejemplo, se sabe que ATX1 está implicado en el estrés por deshidratación en las vías de señalización ABA-dependiente y ABA-independiente; además de que las plantas mutantes *atx1-1* mostraron una transpiración más rápida y una disminución de la tolerancia al estrés hídrico (Ding *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha estudiado que en el mutante *clf* se da una mayor sensibilidad a la sequía y se redujeron un 40-60% los niveles de ABA respecto a las plantas silvestres (Liu *et al.*, 2014). Aunque la marca de represión ha sido menos evaluada que la marca de activación colocada por ATX1, ya existen reportes donde demuestran que la expresión de algunos genes que se inducen bajo estrés se ve aumentada en la mutante de *clf*, sugiriendo la importancia de esta enzima en la regulación de la expresión de genes (Liu *et al.*, 2014).

Por otra parte, la actividad de estas enzimas involucradas en la regulación epigenética durante el estrés se ha visto asociada a la respuesta que puede surgir de la exposición consecutiva de las plantas al estrés, un fenómeno conocido como “memoria epigenética”, el cual se describirá a continuación.

2.4.1 Generación de memoria epigenética en respuesta al estrés hídrico.

Las plantas están sujetas a cambios ambientales continuamente y deben ser capaces de responder y sobrevivir a modificaciones cíclicas de temperatura, precipitación, salinidad, etc. Una manera de lograrlo es a través de la generación de “memoria”, en la que la exposición previa a un tipo de estrés ocasiona una respuesta más veloz o de mayor magnitud ante los estímulos subsecuentes, beneficiando su resistencia (Bruce *et al.*, 2007; Han y Wagner, 2014; Kinoshita y Seki, 2014).

Un mecanismo que se ha propuesto para la “memoria” son las modificaciones epigenéticas asociadas a metilación de histonas; que pueden suceder en las células somáticas o germinales,

afectando a nivel transgeneracional (Molinier *et al.*, 2006). A pesar de que es un tema reciente, el complejo TrxG ha merecido especial atención por su capacidad activadora de la transcripción de genes de respuesta a estrés hídrico a través de la deposición de la marca H3K4me3 (Ding *et al.*, 2012; Avramova, 2015). Durante el primer estímulo de estrés, en los genes de respuesta se observó un incremento de la marca de activación H3K4me3 asociada a un aumento de expresión; cuando las plantas fueron rehidratadas después del primer estrés, la marca epigenética se mantuvo a pesar de que ya no había transcrito en la recuperación. Esto permitió que, ante un segundo evento de deshidratación, se diera un mayor enriquecimiento de la marca epigenética, acompañada de un incremento aún mayor en la expresión (Ding *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015). La memoria epigenética ante el estrés por desecación se observó en los genes *RD29B* y *RAB18*, que fueron llamados “genes entrenables” pues sus niveles de expresión aumentaban conforme fueron sometidos a eventos de estrés subsecuentes y la marca de activación H3K4me3 permanecía en los genes aun cuando en los procesos de rehidratación los niveles de mensajero disminuían (Ding *et al.*, 2012) (Figura 4).

Aunque el papel de la enzima CLF es más controversial, Liu *et al.* (2014) sugieren que la marca de represión H3K27me3 en vez de prevenir los niveles de transcripción de algunos genes de respuesta, limita su expresión, pero permanece invariable en la generación de memoria; sugiriendo que no está involucrada en este proceso.

Fenómenos como éste son de especial importancia pues las poblaciones capaces de responder más rápidamente y con mayor fuerza a estímulos subsecuentes podrían tener un mayor éxito que aquellas que no tienen este tipo de memoria, creando así, un gradiente de plasticidad en función de su capacidad de respuesta (Sanchez *et al.*, 2015).

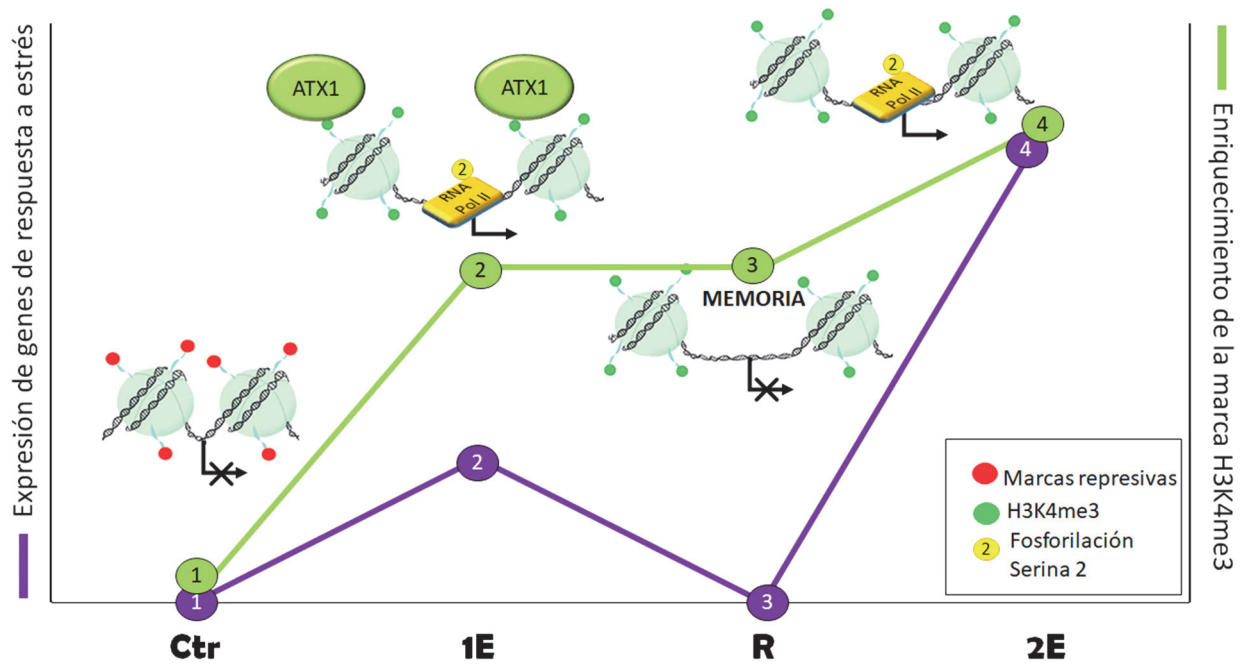


Figura 4. Mecanismo de memoria epigenética bajo estrés hídrico en plantas. Bajo condiciones control (Ctr) las plantas se encuentran hidratadas y los genes de respuesta a estrés están reprimidos, aunque los mecanismos epigenéticos involucrados han sido escasamente descritos. Bajo un primer estrés hídrico (1E), algunos genes como *NCED3*, *RAB18* y *RD29B* presentan la marca de activación H3K4me3 colocada por ATX1, lo que eleva sus niveles transcripcionales. Durante la recuperación al estrés (R), la expresión de los genes disminuye; sin embargo, la H3K4me3 se mantiene por un periodo más prolongado, influyendo posiblemente en la memoria epigenética para que la respuesta transcripcional sea de mayor magnitud ante un segundo evento de estrés (2E). ATX1= HOMOLOGUE OF TRITHORAX 1; RNA Pol II= RNA Polimerasa II; H3K4me3= Trimetilación de la lisina cuatro en la histona H3. Recopilado de Ding *et al.* (2012).

Debido a que la mayoría de los mecanismos de respuesta al estrés hídrico y/u osmótico han sido descritos principalmente en el ecotipo Col-0, las investigaciones acerca de las respuestas diferenciales que generan otras variantes naturales de *Arabidopsis* es un área que necesita ser explorada con mayor profundidad. Asimismo, no se conoce en qué medida los cambios de expresión de genes de respuesta a estrés y la presencia de los factores epigenéticos en la raíz podrían jugar un papel en las respuestas plásticas de este órgano ante el estrés osmótico.

Tales cambios que se dan a nivel molecular y que tienen un efecto sobre la morfología provocan respuestas diferenciales entre las poblaciones que pueden tener una importancia adaptativa (Richards *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, el ecotipo Cvi-0 habita en zonas áridas y su posible adaptación a estas condiciones más hostiles le habría conferido mecanismos de respuesta diferenciales a los de Col-0; por lo tanto, en este estudio se evaluará la capacidad de respuesta morfológica y transcripcional de estos ecotipos, así como el papel de los factores epigenéticos ATX1 y CLF en su regulación.

3. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Para entender algunos de los mecanismos que intervienen en la diversidad fenotípica de la raíz de *A. thaliana*, en mi proyecto de licenciatura se describieron, bajo condiciones control, las diferencias en la morfología radicular de doce ecotipos que se distribuyen principalmente en el hemisferio norte y habitan en condiciones ambientales diferentes. El ecotipo más contrastante fue Cvi-0 de Cabo Verde, África, que reside en el sitio con la mayor temperatura y menor precipitación respecto a Col-0. Los resultados demostraron una gran variabilidad en la longitud total de la raíz, siendo el ecotipo Cvi-0 el de menor tamaño. Además, se encontraron diferencias en la morfometría total de la raíz, así como la longitud y organización del meristemo entre ecotipos (Aceves-García *et al.*, 2016), el cual podría ser un reflejo del comportamiento de la raíz ante un genotipo-ambiente en particular. Adicionalmente, cuando se realizó una correlación entre el tamaño radicular vs. factores ambientales como la temperatura y la precipitación, se encontró que no hay una correlación entre el tamaño y la temperatura, pero sí la hay respecto a la precipitación ($r_s = 60$; $p \text{ value} < 2.2 \times 10^{-16}$). De todos los ecotipos, Col-0 y Cvi-0 fueron muy contrastantes, pues el tamaño radicular resultó inversamente proporcional a la precipitación de su lugar de origen; es decir, Cvi-0 que habita originalmente en un lugar seco presentó la raíz más corta, y sucedió lo contrario con Col-0 (Aceves-García *et al.*, 2016). Este resultado sugirió que la disponibilidad de agua influye en la determinación del tamaño radicular y es un estímulo al que los ecotipos podrían estar respondiendo diferencialmente; por lo tanto, en este trabajo se estudiaron las respuestas morfológicas y de expresión génica que se inducen entre Col-0 y Cvi-0 ante el estrés osmótico, que como se mencionó anteriormente, genera un déficit hídrico.

Por otra parte, resultados de nuestro laboratorio indican que ATX1 participa en el desarrollo de la raíz, pues la mutante presenta una raíz corta y un meristemo reducido, y este efecto es inverso al que se muestra en la mutante de CLF (Petroni, 2015; Vega-Leon, 2016). Considerando que ya se ha evaluado la influencia de estos factores epigenéticos en la expresión y la memoria de genes inducidos por estrés hídrico en parte aérea (Ding *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014), se decidió evaluar su participación en las respuestas plásticas que genera Col-0 en la raíz, y su papel en la generación de memoria ante un segundo evento de estrés osmótico.

4. HIPÓTESIS

Debido a que Cvi-0 es un ecotipo que habita naturalmente en un clima semiárido, sus mecanismos moleculares y morfológicos particulares le permiten generar mayor tolerancia al estrés osmótico respecto a Col-0 que proviene de zonas con mayor precipitación. Asimismo, los factores epigenéticos ATX1 y CLF son necesarios para la adecuada respuesta radicular al estrés osmótico y la generación de memoria ante un segundo estímulo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la variación de las respuestas al estrés osmótico que presentan las raíces de los ecotipos Col-0 y Cvi-0 de *Arabidopsis thaliana* y determinar las implicaciones de la regulación epigenética en el estrés osmótico a través del estudio de los factores ATX1 y CLF.

5.2 Objetivos particulares

- 1.- Definir el fenotipo y los cambios de expresión génica en la raíz asociados a la respuesta por estrés osmótico entre los ecotipos Col-0 y Cvi-0.
- 2.-Estudiar las implicaciones de la regulación epigenética utilizando mutantes de *atx1-3* y *clf-29* en el ecotipo Col-0 bajo condiciones de estrés osmótico.
- 3.- Evaluar la generación de memoria en respuesta a un segundo estímulo de estrés osmótico en los diferentes genotipos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Condiciones de crecimiento de *Arabidopsis thaliana* e inducción de estrés osmótico.

En este proyecto, se utilizaron dos ecotipos que provienen de situaciones geográficas y ambientales diferentes: Col-0 (Landsberg am Lech, Alemania), que se usa comúnmente en nuestro laboratorio, y Cvi-0 (Islas de Cabo Verde, África) del Stock Centre NASC (N1096). Además, se usaron dos líneas mutantes para los factores epigenéticos generados por inserción de T-DNA en el ecotipo Col-0: *atx1-3* (SALK_105214) y *clf-29* (SALK_021003); y una doble mutante de pérdida de función *atx1-3/clf-29* (denotada como *atx1/clf*), generada por Vega-Leon (2016).

Las semillas fueron desinfectadas con una solución al 20% de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) y 0.01% de Tween-20 (Sigma-Aldrich), manteniéndolas en agitación durante 15 min a temperatura ambiente y realizando cuatro series de lavados con agua estéril. Con el fin de sincronizar la germinación, las semillas fueron estratificadas durante 5 días a 4°C en oscuridad. Después de ese tiempo, las semillas fueron sembradas en cajas Petri verticales con medio MS (-0.22 MPa) que contiene: MS al 0.2X (Murashige y Skoog 1962, MP Biomédicals), MES monohidratado al 0.05% (Sigma-Aldrich), sacarosa al 1% (Sigma-Aldrich) y agar al 1% (Becton, Dickinson and Company) a un pH de 5.6 ajustado con 1M de KOH. Posteriormente se transfirieron a unas cámaras de crecimiento (Percival) para permitir el desarrollo vertical de las plantas a 22 °C, con una intensidad de luz 110 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ en condiciones de día largo (16 h luz + 8 h oscuridad).

Para los análisis de estrés osmótico (excepto los de germinación), las plantas se dejaron crecer por 5 días post-siembra (dps) bajo las condiciones control anteriormente descritas y posteriormente fueron transferidas a cajas Petri con medio MS adicionado con 300 mM de manitol (-0.85 MPa), el tiempo indicado para cada ensayo particular según se requería. Se ha reportado que esta concentración de manitol induce la deshidratación celular, ocasionando una serie de respuestas morfo-fisiológicas, sin provocar muerte generalizada (Claeys *et al.*, 2014). Para los ensayos de tolerancia además se usó 400 mM de manitol (-1.08 MPa) para aumentar la magnitud del estrés. En los ensayos donde las plantas se mantuvieron por tiempos muy prolongados en manitol, éstas fueron transferidas a medios frescos (recién preparados) cada siete días.

6.2 Tasa de germinación.

Las semillas de los ecotipos Col-0 y Cvi-0 fueron germinadas en medio MS con 300 mM de manitol y se evaluó la tasa de germinación basándose en la ruptura de testa y un tamaño radicular de 2 mm, cada 24 h durante 12 días. Posteriormente las plantas fueron transferidas a tierra y regadas de forma normal para evaluar su capacidad de recuperación.

6.3 Cinética de crecimiento.

Para realizar la cinética de crecimiento se hizo un marcaje en la caja de Petri vertical de la longitud que alcanzaba la raíz cada 24 h desde el primer día después de la germinación hasta el final de la cinética (10 dps). Después de cinco días de crecimiento en medio MS, las plantas fueron transferidas a 300 mM de manitol por otros cinco días. Posteriormente las plantas se escanearon para realizar las mediciones del tamaño final obtenido por día con el software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

6.4 Análisis de las raíces mediante microscopía de luz.

Después de crecer las plantas por cinco días en MS, fueron transferidas a 300 mM de manitol por tiempos diferentes, según lo requería el ensayo. Para observar las raíces se usó el Protocolo de la Tinción de Pseudo Shift, modificado de Truernit *et al.* (2008), que consta de la fijación de las plantas con 50 % metanol y 10 % ácido acético a 4°C por 24 h, su posterior incubación con 1 % de ácido periódico a 37 °C por 45 min. y la tinción de las raíces mediante el reactivo de Pseudo Shiff (100 mM de metabisulfito de sodio y 0.15 N de HCl) usando 0.075 mg/mL de yoduro de propidio durante 1 h. Finalmente, las plantas se rehidrataron con 2% DMSO y 30 % glicerol por 48 h y se montaron en una solución de yoduro de sodio (5.6 mM de NaI, 8 mM Na₂S₂O₃, 65% glicerol y 2% DMSO). Sólo en el caso de las raíces de ocho días en 300 mM de manitol y la visualización de “cicatriz” en 400 y 500 mM de manitol se usó un aclaramiento con 80% cloralhidrato y 10% glicerol. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio óptico Olympus BX60 a un aumento de 20X y fueron fotografiadas con una cámara Evolution MP COLOR of Media Cybernetics camera.

Los fenotipos de la “cicatriz” se determinaron cuantitativamente midiendo el tamaño desde el primer pelo más cercano a la punta de la raíz y hasta el último pelo, para determinar si era de

morfología “restringida” (<1400 μm) o “amplia” (>1400 μm). Para definir el tamaño de los pelos radiculares se midió el pelo más largo dentro de la zona y se definió como “pelo corto” todo aquel menor a 260 μm y “pelo largo” como aquel mayor a ese valor. Para que los pelos se localizaran en cada categoría debía haber al menos tres con esa característica.

6.5 Tratamiento para el estudio de las respuestas de memoria ante el estrés osmótico.

Para evaluar la respuesta en la morfología aérea y radicular ante un segundo estrés, se crecieron las plantas durante 5 días en medio MS y posteriormente fueron transferidas a otras cajas con medio MS o con 300 mM de manitol añadido, según los siguientes tratamientos (Fig. 16A):

- A) Control (Ctr): Plantas que crecieron durante 6, 8 y 9 días en medio MS.
- B) Primer estrés (1E 6d): Plantas que crecieron durante cinco días en MS y después fueron transferidas a un medio con 300 mM de manitol durante 24 h.
- C) Recuperación (R): Las plantas que fueron sometidas a un primer estrés se transfirieron a un medio MS por 48 h.
- D) Primer estrés (1E 9d): Las plantas que crecieron en medio MS por ocho días y posteriormente se transfirieron a un medio con 300 mM de manitol por 24 h para su primer evento de estrés.
- E) Segundo estrés (2E): Las plantas que fueron recuperadas se transfirieron a un medio con 300 mM de manitol por 24 h.

6.6 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

Las extracciones de RNA se realizaron con las raíces de plantas control y plantas crecidas durante 5 días en MS y un posterior tratamiento de 8 h o 24 h (según fuera el caso) en 300 mM de manitol, usando el kit Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research). El tejido de raíz de las plantas fue tratado según indica el instructivo, utilizando un tratamiento con DNAsa I para eliminar el DNA. Las muestras se cuantificaron en el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se analizaron mediante gel de electroforesis (TBE 0.5X) en condiciones semidesnaturalizantes, utilizando el amortiguador de carga semidesnaturalizante (95% formamida y 0.025% SDS) y calentando las muestras a 70°C por

10 min. La visualización de los RNAs 18S y 28S permitió corroborar su integridad y concentración (Fig. S3). Las muestras calibradas se utilizaron para realizar la síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante la técnica de RT-PCR, utilizando el kit “FirstStrand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT” (Invitrogen). La reacción se realizó en un volumen final de 20 µL y para ello se agregó 0.5 µM de oligonucleótido dT y 0.5 mM de dNTPs Mix con 1000 ng de RNA. Esta reacción se incubó a 65°C por 5 min. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 1X de amortiguador First Strand, 10 mM de DTT, 40 unidades de RNAsout y 200 unidades de la enzima SuperScript II RT. La síntesis de cDNA se realizó a 42°C por 50 min y la enzima se inactivó a 70°C por 15 min.

6.7 PCR semicuantitativa. Comprobación de la metodología usada para inducir estrés osmótico en los ecotipos.

Para elegir el tiempo de exposición a estrés osmótico con 300 mM de manitol que incrementara la transcripción de genes de respuesta, se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes *RD26*, *KIN2* y *ABI1* a través de los transcriptomas disponibles en el portal “The *Arabidopsis* Information Resource” (TAIR) (<http://bbc.botany.utoronto.ca>). En estos genes se corroboró que el mayor nivel de expresión en la raíz de plantas Col-0 a los 18 días de crecimiento fue desde las 6 h hasta las 24 h. Considerando la ventana de tiempo anterior, se eligió las 8 h de estrés como el tiempo indicado para inducir los genes de respuesta. El tejido radicular recolectado fue de plantas Col-0 y Cvi-0 crecidas por 5 días en MS y posteriormente transferidas por 8 h a estrés osmótico. Después de realizar la extracción de RNA utilizando el kit Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) y calibrar los RNA ribosomales (Fig. S3A), se procedió a realizar la síntesis de cDNA, como se indicó anteriormente. El cDNA obtenido se utilizó para realizar ensayos de PCR semicuantitativos con el kit “FirstStrand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT: Basic PCR Protocol” (Invitrogen) en un volumen final de 15 µL. Para esto se le adicionó a 1 µL de cDNA 1X de amortiguador para PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.8 mM de dNTPs, 0.4 µM del par de oligonucleótidos diseñados (Tabla 1) y 0.06 unidades de *Taq* DNA Polimerasa. Los resultados de este experimento se muestran en el Anexo de datos (Figs. S14 y S15).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR semicuantitativa

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón	Distancia del extremo 3' cDNA	Temperatura de fusión (Kellermeier <i>et al.</i>)
RD26	RD26_PA_qF	GAAGCTCCAAGTTGGATGATTG	114 nt	341 nt	64 °C
	RD26_PA_qR	CATTCGTGCTATGCTCTTCAC			62 °C
KIN2	KIN2_PA_qF	GCAACAGGCGGGAAAGAGTA	96 nt	4 nt	62 °C
	KIN2_PA_qR	GTTGACTCGGATCGCTACTTG			64 °C
ABI1	ABI1_PA_qF	CGGATAGAGAAGATGAAGCTG	117 nt	386 nt	62 °C
	ABI1_PA_qR	AGTATCTATCGCCAATGGATC			60 °C

6.8 Análisis de microarreglos.

Se realizó la extracción de RNA de las raíces de Col-0 y Cvi-0 controles y bajo estrés inducido con 300 mM de manitol durante 8 h, utilizando el kit Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research). Se realizaron dos réplicas biológicas que fueron mezcladas para obtener una concentración final de 30 ug de RNA por muestra (Fig. S3D). Las muestras se enviaron al Instituto de Fisiología Celular, UNAM, para realizar los microarreglos del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* V.3.0.3 (TAIR/TIGR/Unigene/GenBank) que contiene 29,950 genes. Los microarreglos pareados fueron los siguientes: 1) Col-0 control vs. Cvi-0 control y 2) Col-0 manitol vs. Cvi-0 manitol.

Los resultados de los microarreglos fueron corregidos y normalizados con el Software Array Pro Analyzer del Instituto de Fisiología. Los genes de Cvi-0 bajo condiciones control y manitol significativamente diferentes a Col-0 fueron elegidos a partir de valores mayores a 1.5 del Z-score. Valores positivos significan que están mayoritariamente expresados en Cvi-0 respecto a Col-0, mientras que valores negativos indican lo contrario. Estos posteriormente fueron analizados usando el software en línea Panther de Gene Ontology (<http://pantherdb.org/>).

6.9 PCR cuantitativa (qPCR).

Se realizó la extracción de RNA utilizando el kit Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research), como se indicó anteriormente, calibrando las muestras de RNA para comprobar concentración e integridad (Fig. S3B, C y E). Posteriormente se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante la técnica de RT-PCR, utilizando el kit "FirstStrand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT"

(Invitrogen). Para la PCR cuantitativa, en cada reacción se utilizó una concentración de cDNA de 5 ng/ μ L, 5 μ L de SYBR Green Master Mix (Thermoscientific) y 300 nM de cada oligonucleotido, en un volumen final de 10 μ L. Todas las corridas se realizaron en un equipo StepOnePlus (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 1) 50°C por 2 min, 2) 95°C por 10 min, 3) 95°C por 15 s, 4) 60°C por 1 min (pasos 3 y 4 x 50 ciclos). Para la curva de melting: 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min y 95°C por 15s +0.3°C.

Para aquellos genes de interés que presentaron valores significativos con Z-score > 1.5 en el análisis del microarreglo se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes. Las especificaciones de cada par de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 2 y su eficiencia se verificó mediante el algoritmo Real-time PCR Miner de Sheng y Russell (2005) (www.miner.ewindup.info) (Tabla 4). Para el ensayo de Col-0 vs. Cvi-0 se utilizaron los genes *UPL7*, *PDF2* y *AT5G15710* como normalizadores y para el ensayo de Col-0 vs *atx1-3* se utilizaron *UPL7*, *PDF2* y *RNAseH* (Tabla 3), que ya se habían probado con anterioridad en esta mutante (Vega-Leon, 2016). Para identificar el número de genes normalizadores adecuados para el análisis y validar la estabilidad de cada uno de ellos, se utilizó el algoritmo geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002).

Otro parámetro a evaluar fue que la tasa de amplificación fuera dependiente de la concentración del templado, y para esto se probaron concentraciones de 10 ng y 1ng, resultando en una diferencia de 3.3 a 4.4 ciclos, lo cual es correspondiente con las curvas de calibración estándar (Thermo Scientific, 2012). Finalmente, las diferencias de expresión se estimaron por el método de cuantificación relativa ($\Delta\Delta CT$) utilizando el software qbase+ version 3 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium - www.qbaseplus.com), para ello se sustituyeron previamente los valores de CT originales por aquellos corregidos por el algoritmo Real-time PCR Miner de Sheng y Russell (2005) (www.miner.ewindup.info). Para confirmar que la amplificación correspondía a un solo producto por cada par de oligonucleótidos, se realizó una curva de *melting* que fue específica para cada gen de interés (Fig. Supl. 5A y B).

El número de réplicas biológicas y técnicas para cada ensayo está señalado en los pies de figura de acuerdo a cada experimento. Cada réplica técnica se probó a través de tres pruebas de pipeteo en las placas de 48 pozos para qPCR. Los datos de Col-0 bajo estrés y Cvi-0 control están normalizados respecto a Col-0 control, y los datos de Cvi-0 y *atx1-3* bajo estrés fueron normalizados con base en Cvi-0 control y *atx1-3* control, respectivamente.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de interés por qPCR.

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón	Distancia del extremo 3' cDNA	Temperatura de fusión (Kellermeier <i>et al.</i>)
RD29A	RD29A_PA_qF	CTGATGAGGTGAAGCCAGAA	139 nt	31 nt	60 °C
	RD29A_PA_qR	GAGCCAAGTGATTGTGGAGA			60 °C
RD29B	RD29B_PA_qF	AAAGGAGCGGTCACTTCTTGG	102 nt	69 nt	64 °C
	RD29B_PA_qR	AAACCCCATAGTCCCAACGGT			64 °C
ANAC019	ANAC019_PA_qF	GAAGCACTAAGTTGGATGATTG	124 nt	391 nt	62 °C
	ANAC019_PA_qR	GACGAAGTACCGTTGTTGCT			60 °C
NCED3	NCED3_PA_qF	ACATGGAAATCGGAGTTACAG	105 nt	33 nt	60 °C
	NCED3_PA_qR	GATGAATGTACCGTCAAATCC			60 °C
COR15A	COR15A_PA_qF	AACGAGGCCACAAAGAAAGC	122 nt	115 nt	60 °C
	COR15A_PA_qR	CCCAATGTATCTGCGGTTTC			60 °C
KIN2	KIN2_PA_qF	GCAACAGGCGGGAAAGAGTA	96 nt	4 nt	62 °C
	KIN2_PA_qR	GTTGACTCGGATCGCTACTTG			64 °C
RAB18	RAB18_PA_qF	CTCGGAGGATGATGGACAAG	99 nt	115 nt	62°
	RAB18_PA_qR	TGAGCTTGACCAGACTGATC			60°
ATX1	ATX1-3'_RV_qF	ATTCATGTGTGCCAATTGCT	111 nt	257 nt	60°C
	ATX1-3'_RV_qF	AGTCATAGTCTAGCTCTTCC			60°C
CLF	CLF-JCFS-qF2	ATTATTCGCATGACCCTTGAG	103 nt	2097 nt	60°C
	CLF-JCFS-qR2	CATGTCTTGCTTGATTCAC			60°C

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes normalizadores por qPCR.

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Temperatura de fusión (Kellermeier <i>et al.</i>)
AT5G15710	Norm_PA_qF	CTCTTTCGCCTCTTGTTTTG	60 °C
	Norm_PA_qR	CCAGCAACTAAGTAACCATCC	62 °C
PDF2	PDF2-F1_TR_RC	TAACGTGGCCAAAATGATGC	58 °C
	PDF2-R1_TR_RC	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	62 °C
UPL7	UPL7-F1_TR_RC	TTCAAATACTTGCAGCCAACCTT	64 °C
	UPL7-R1_TR_RC	CCCAAAGAGAGGTATCACAAGAGACT	76 °C
RNAseH	RNAH_Y_qF	CCATTCTACTTTTTGGCGGCT	62 °C
	RNAH_Y_qR	TCAATGGTAACTGATCCACTCTGATG	74 °C

Tabla 4. Eficiencias de los oligonucleótidos diseñados para qPCR.

Nombre del gen	Eficiencia de los oligonucleótidos	Nombre del gen	Eficiencia de los oligonucleótidos
RD29A	86%	AT5G15710	86%
RD29B	87.5%	PDF2	87.5%
ANAC019	87%	UPL7	88%
NCED3	86%	RNAsaH	87.5%
COR15A	87%		
KIN2	85%		
RAB18	87.5%		
ATX1	87%		
CLF	87%		

6.10 Análisis estadísticos.

Se comprobó la distribución normal de los datos a través del software R versión 3.3.1 (R Development Core Team, 2008), y los datos no ajustados a la normalidad fueron transformados a logaritmo antes de aplicar las pruebas estadísticas. La prueba de ANOVA seguida de la prueba *post hoc* de Tukey, que permite comparaciones entre todas las muestras, fueron realizadas con el Software GraphPad Prism versión 7 para Windows, La Jolla California USA (www.graphpad.com). Los niveles de confianza (p) específicos están señaladas en cada pie de figura.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de tolerancia al estrés osmótico de los diferentes genotipos de *Arabidopsis thaliana*.

Previamente a la descripción de la variabilidad radicular entre Col-0 y Cvi-0 en respuesta al estrés osmótico, se decidió analizar la tasa de germinación y las respuestas del tejido aéreo para determinar la tolerancia de alguno de estos genotipos ante este tipo de estrés. Asimismo, se evaluó la participación de los factores epigenéticos en la tolerancia al estrés a través del uso de mutantes de pérdida de función de ATX1 y CLF en el ecotipo Col-0.

7.1.1 Tolerancia diferencial durante la germinación en los ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

La medición de la tasa de germinación aporta una visión rápida de las respuestas ante el estrés que genera cada ecotipo. Para este ensayo, las semillas de Col-0 y Cvi-0 fueron sembradas en un medio enriquecido con 300 mM de manitol y se evaluó la capacidad de la ruptura de la testa y la elongación de la radícula hasta los 2 mm, al igual que se realizó en Schopfer y Plachy (1984), como comprobación de viabilidad de la semilla. Los resultados indican que tanto en condiciones control como en manitol, la mayoría de las semillas rompen la testa (100% en condiciones control, 92.5% Col-0 manitol y 97.5% Cvi-0 manitol); sin embargo, el desarrollo radicular después de la germinación se vio afectado en gran medida bajo condiciones de estrés osmótico en ambos ecotipos. Cvi-0 presentó un retraso más evidente en el crecimiento radicular respecto a Col-0, pues la mayoría de las plantas pertenecientes a la población de Cvi-0 alcanzaron los 2 mm hasta el día ocho, mientras que las de Col-0 lo hicieron en el tercer día (Fig. 5A). Es importante notar que en ningún ecotipo el crecimiento radicular se detuvo por completo, como se muestra en la Fig. 5B, y comenzó un aumento en la generación de raíces laterales probablemente para incrementar el área de captura de agua. Por otra parte, en etapas más avanzadas del desarrollo, a pesar de que la floración se retrasó en las plantas que fueron sometidas a estrés por doce días, éstas fueron capaces de recuperarse y completar su ciclo de vida cuando fueron sembradas en tierra bajo condiciones óptimas de agua (Fig. S1). Estos resultados indican que ambos ecotipos son capaces

de sobrevivir al estrés osmótico inducido con 300 mM de manitol durante la germinación, y que Cvi-0 se desarrolló más lentamente, pero sin perder viabilidad. Además, se comprobó que la exposición a estrés inducido con 300 mM de manitol permite observar diferencias en el desarrollo entre los ecotipos, por lo que los experimentos posteriores fueron realizados usando esta condición.

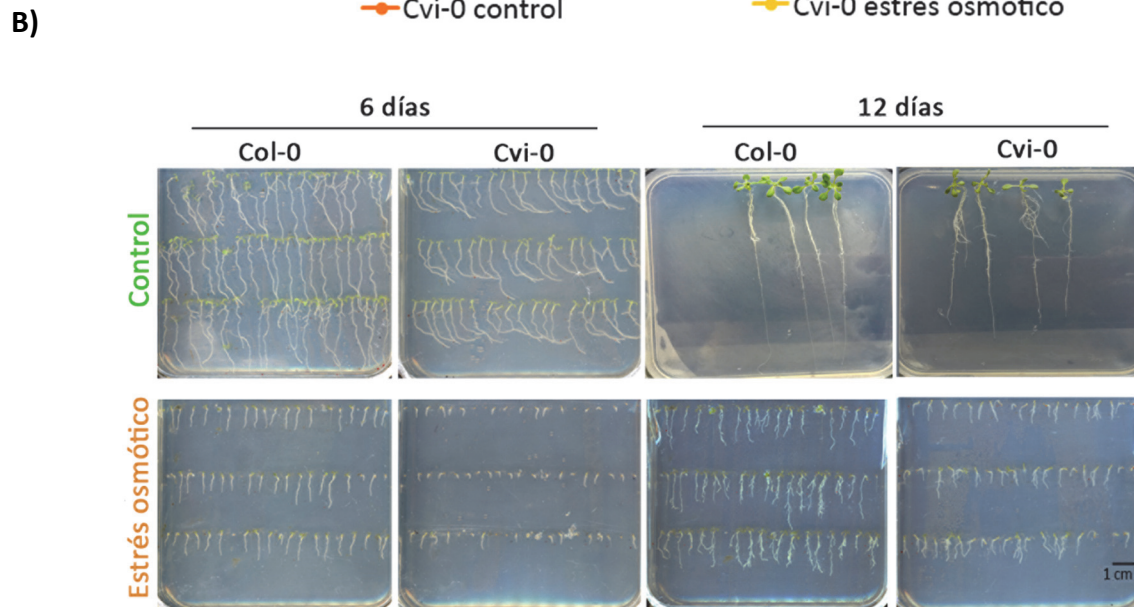
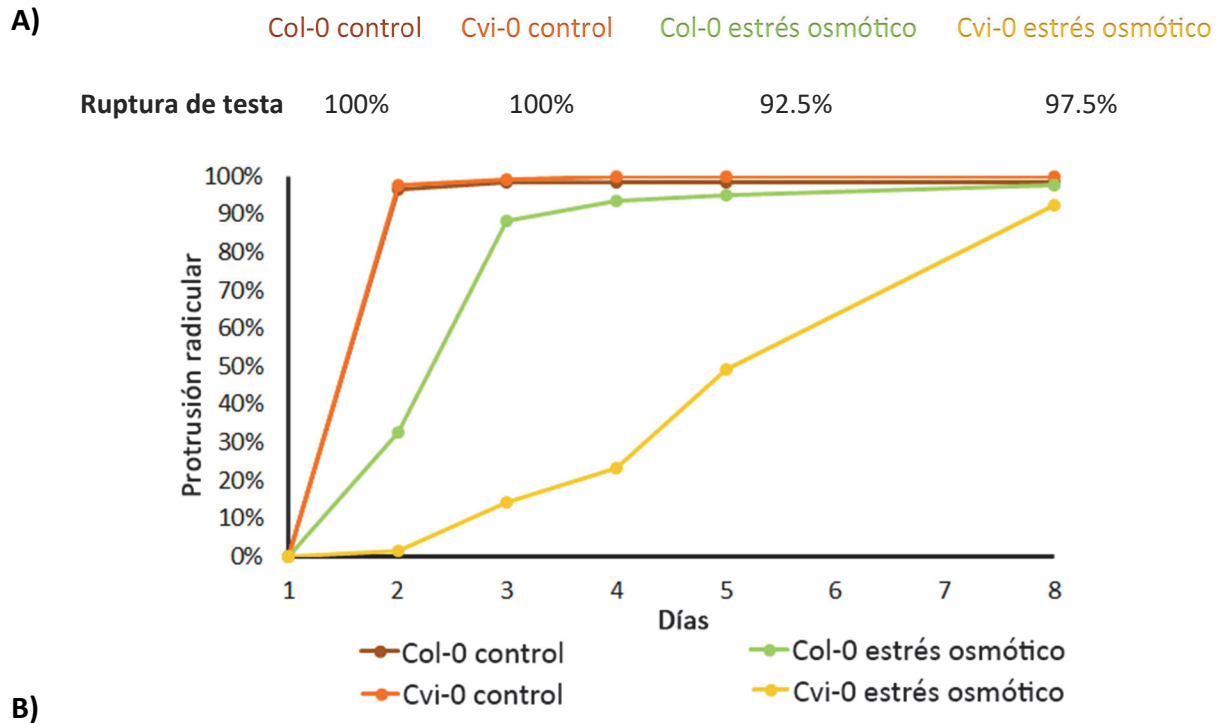


Figura 5. Germinación de las semillas Col-0 y Cvi-0 bajo estrés osmótico. A) Tasa de germinación de Col-0 y Cvi-0 en manitol 300 mM. En la parte superior se indica el porcentaje de plantas que rompieron la testa a los dos días post-siembra y en la gráfica inferior se muestra el porcentaje de plantas que alcanzaron los 2 mm de longitud en la raíz (protrusión radicular) en el tiempo. B) Fenotipo radicular a los 6 y 12 días post-siembra en condiciones control y manitol 300 mM. Resultado de un ensayo biológico con n=100 semillas por ecotipo en cada tratamiento.

7.1.2 Tolerancia diferencial en etapas posteriores del desarrollo entre los ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

El resultado anterior mostró que la falta de disponibilidad de agua afectó más el desarrollo de la raíz principal de Cvi-0 respecto a Col-0 cuando germinó directo en estrés osmótico; sin embargo, hay que tener precaución en la interpretación de los resultados porque no necesariamente una alta tasa de germinación indica tolerancia en etapas posteriores del desarrollo (Verslues *et al.*, 2006). Por lo tanto, se realizó una evaluación completa del estado total de la planta bajo estrés en etapas posteriores del desarrollo para evidenciar si Cvi-0 presentaba mayor tolerancia respecto a Col-0.

Para evitar el retraso de la germinación y evaluar el efecto del estrés osmótico en el desarrollo de etapas más avanzadas, las plantas fueron sembradas en medio MS durante cinco días (lo que permitió una germinación homogénea); y posteriormente se transfirieron a un medio MS adicionado con 300 mM de manitol por tiempos muy prolongados. A los 19 días en manitol se lograron observar diferencias claras entre ambos ecotipos, evidenciando que mientras Col-0 presentó un grado de marchitez muy severo en sus hojas, las de Cvi-0 permanecieron verdes y turgentes. A pesar de que estudios previos han demostrado que la raíz de Cvi-0 es mucho más corta en condiciones control respecto a la de Col-0 (Aceves-García *et al.*, 2016), bajo este tipo de estrés prolongado su tamaño fue muy similar al de Col-0, lo que sugiere que la raíz de Cvi-0 sigue elongándose mientras que la de Col-0 retrasa o detiene su desarrollo (Fig. 6A).

Con el fin de someter a Cvi-0 a un estrés hídrico mucho más severo para evaluar su capacidad de resistencia, las plantas fueron nuevamente crecidas en medio MS durante cinco días y posteriormente se transfirieron a un medio MS adicionado con 400 mM de manitol. Ambos ecotipos fueron gravemente afectados en los primeros días de crecimiento, y hasta el día 32 se observaron las mayores diferencias entre ellos, evidenciando que Cvi-0 permaneció con sus hojas más grandes (Fig. 6B), y a pesar de que mostraron una pigmentación morada debido al estrés, sólo esta población tuvo una capacidad de recuperación sorprendente, aumentando mucho más su tamaño, número de hojas y longitud de la raíz (Fig. 6C). Cuando las plantas fueron transferidas a tierra por 27 días más, ambos ecotipos lograron completar su ciclo de vida; pero, en comparación con Col-0, Cvi-0 mostró una cantidad mayor de hojas y escapos, posiblemente para aumentar su

capacidad de éxito reproductivo (Fig. S2). Aunque no se realizaron más análisis al respecto, sería muy interesante evaluar el número de silicuas, el tamaño y la cantidad de semillas viables para corroborar esta hipótesis.

Estos resultados sugieren que cuando las semillas de ambos ecotipos germinan en condiciones hidratadas, pero posteriormente las plántulas se ven expuestas a un estrés hídrico severo, el ecotipo Cvi-0 es capaz de tolerar más eficientemente el estrés que las plantas de Col-0.

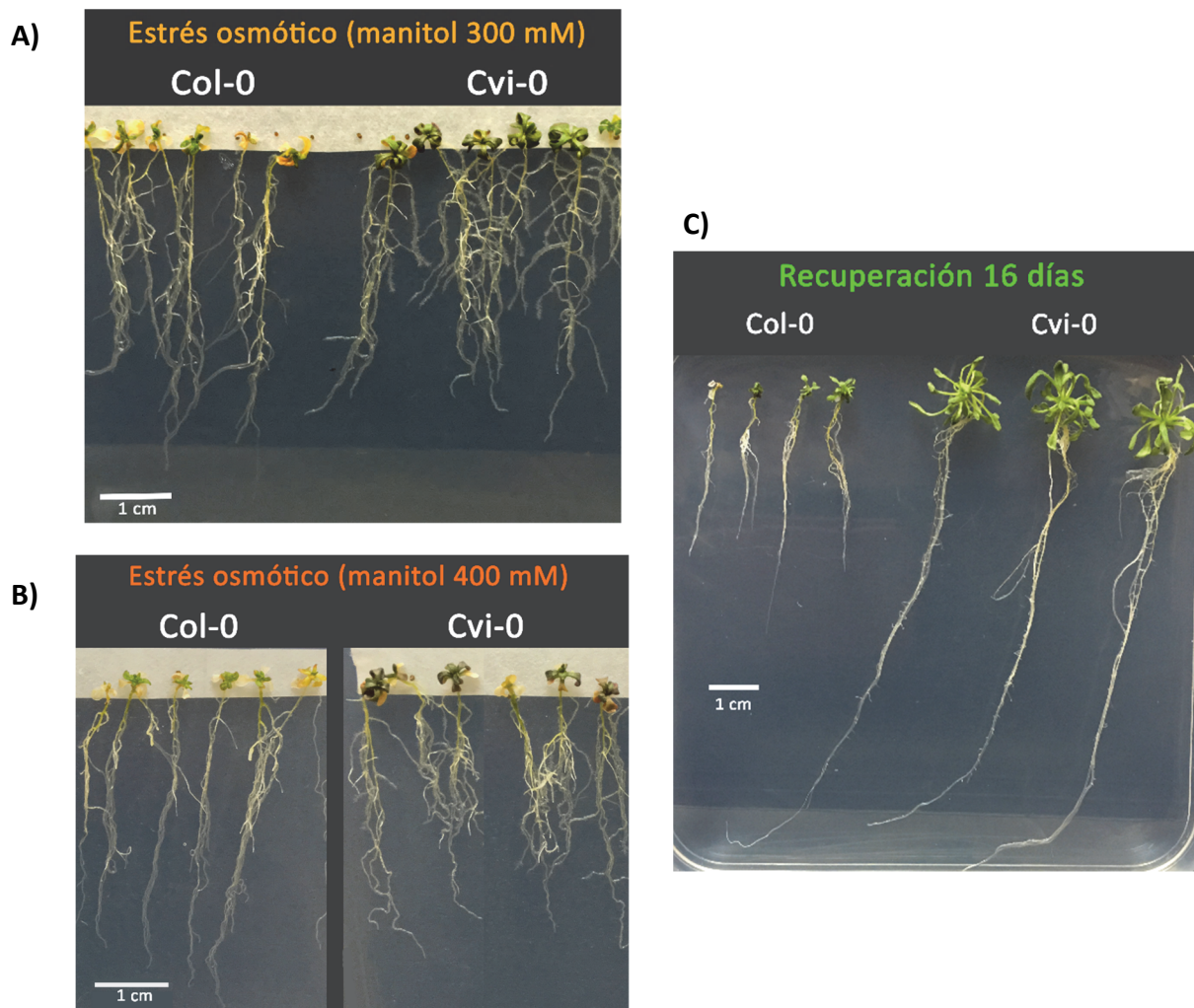


Figura 6. Análisis de tolerancia al estrés osmótico en los ecotipos Col-0 y Cvi-0. Plántulas de Col-0 y Cvi-0 de cinco días de crecimiento fueron transferidas a: A) 300 mM de manitol por 19 días, y B) 400 mM de manitol por 32 días. C) Las plantas de 32 días en 400 mM fueron recuperadas en MS por 16 días. Resultado promedio de 3 réplicas biológicas con n=25 en cada tratamiento para cada ecotipo.

Debido a que la tolerancia al estrés hídrico se ha visto relacionada con la inducción de diversos genes de respuesta (Iuchi *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2004; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Estrada-Melo *et al.*, 2015); y a su vez, su activación transcripcional se ve influenciada por la actividad de los factores epigenéticos ATX1 y CLF (Ding *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015); el efecto de la pérdida de función de estas enzimas sería un primer acercamiento a los mecanismos moleculares que controlan las respuestas al estrés osmótico.

7.1.3 Influencia de la pérdida de función de los factores epigenéticos ATX1 y CLF en la tolerancia al estrés osmótico.

La participación de estos factores epigenéticos en la respuesta al estrés osmótico se realizó a través del análisis fenotípico de plantas mutantes de pérdida de función para ATX1, que regula la activación transcripcional; y para CLF, encargado de mantener la represión transcripcional.

Las plantas mutantes *atx1-3* y *clf-29* (fondo Col-0) fueron crecidas por cinco días en MS y posteriormente fueron expuestas a 300 mM por 27 días, momento en que se evidenciaron claramente las diferencias entre ellas. En la Fig. 7A se observa que la mutante de *atx1-3* presentó hojas más verdes y turgentes que las plantas silvestres (Col-0), además de presentar una arquitectura radicular con mayor número de raíces laterales. En cambio, las plantas mutantes *clf-29* fueron las más afectadas pues se mostraron completamente marchitas. Un comportamiento similar se observó en las dobles mutantes (*atx1/clf*), posiblemente debido a un efecto epistático de CLF sobre ATX1, tal y como ha sido sugerido por Vega-Leon (2016).

Siguiendo con la misma orientación de los resultados anteriores, para evaluar la respuesta de estas mutantes a un estrés más severo, las plantas fueron expuestas a 400 mM de manitol por 32 días. Bajo este tratamiento, no se observaron diferencias tan evidentes entre las plantas silvestres y las mutantes; sin embargo, a pesar de que no se realizó un método cuantitativo, se puede observar que *clf-29* y *atx/clf* presentaron un menor número de hojas verdes (Fig. 7B). Cuando estas plantas fueron crecidas en MS por 16 días, se manifestó que la recuperación en general fue más favorable para la mutante *atx1-3* respecto al resto de las plantas, aunque también presentó una gran variabilidad entre individuos (Fig. 7C). Estos resultados sugieren que, bajo estrés

osmótico, la pérdida de ATX1 favorece la tolerancia de las plantas, mientras que la de CLF tiene el efecto contrario.

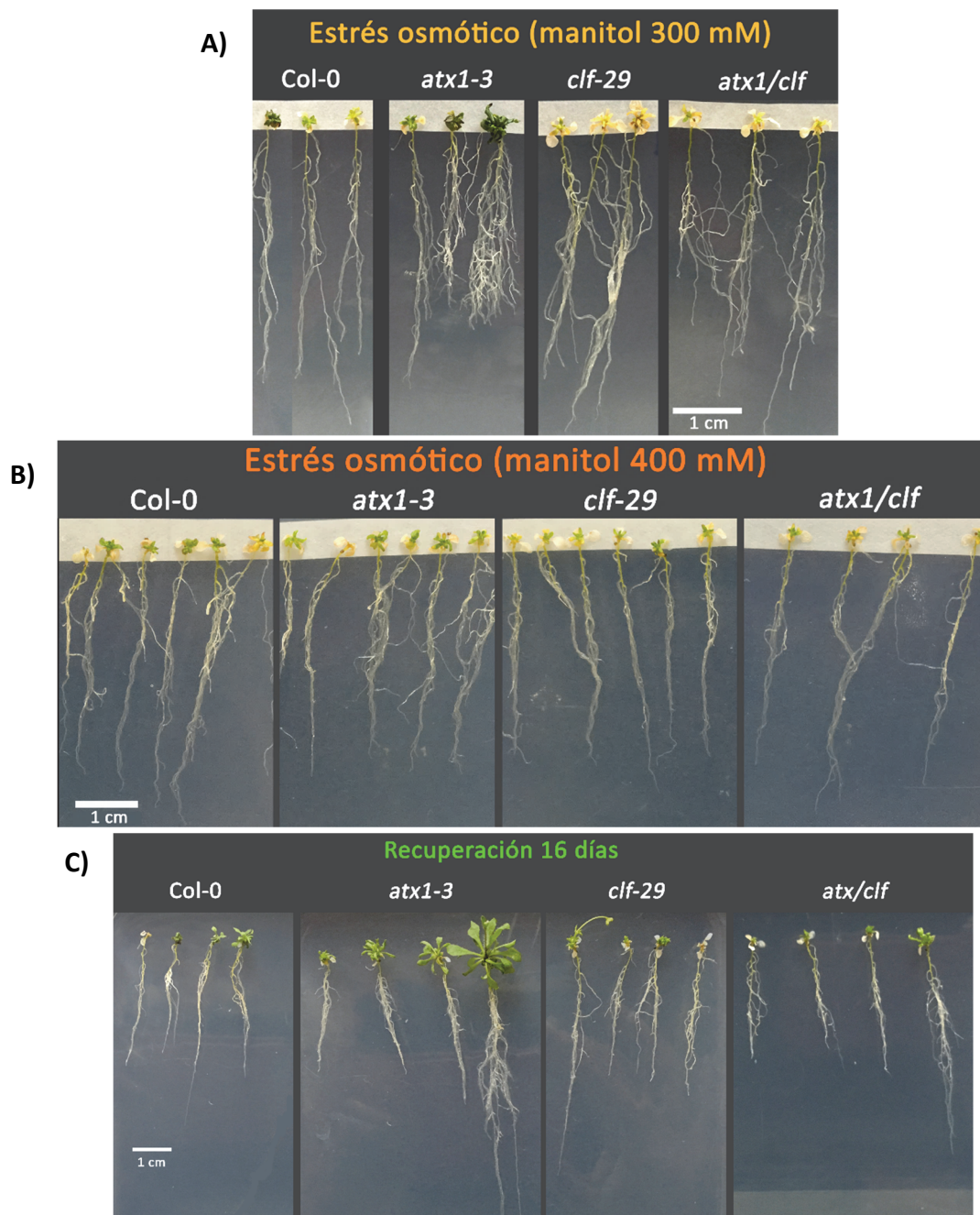


Figura 7. Análisis de tolerancia al estrés osmótico en las mutantes *atx1-3*, *clf-29* y *atx/clf*. Plántulas silvestres (Col-0) y mutantes de cinco días de crecimiento fueron transferidas a: A) 300 mM de manitol por 27 días, y B) 400 mM de manitol por 32 días. C) Las plantas de 32 días en 400 mM fueron recuperadas en MS por 16 días. Resultado promedio de 3 réplicas biológicas con n=25 en cada tratamiento para cada genotipo.

Una vez visualizada la variabilidad de respuestas de los ecotipos y las mutantes *atx1-3* y *clf-29* en la planta completa, a continuación, se evaluaron las respuestas radiculares ante el estrés osmótico en todos los genotipos. Primero se describirán los resultados de la variabilidad natural de Col-0 y Cvi-0; y posteriormente, el efecto de la pérdida de función de los factores epigenéticos.

7.2 Variación fenotípica en la raíz en respuesta al estrés osmótico.

Debido a que la raíz es el primer órgano en ser expuesto al déficit hídrico, las modificaciones morfo-fisiológicas que suceden como respuesta tienen un papel fundamental en la tolerancia al estrés, pues gracias a éstas la planta es capaz de continuar la elongación de la raíz en suelos deficientes de agua y así, aumentar la capacidad de captura de este compuesto indispensable para la vida (Feng *et al.*, 2016). Considerando que la respuesta de la raíz respecto al de la hoja es muy distinta bajo estrés hídrico (Hsiao y Xu, 2000), y de que existe muy poca información sobre la plasticidad del sistema radicular en diferentes genotipos, es de vital interés realizar estudios de su morfología. Algunos de los componentes que son importantes en el sistema radicular para adquirir tolerancia al estrés son el tamaño radicular, la presencia de raíces jóvenes y promover el desarrollo de pelos radiculares que aumenten la superficie de contacto entre el suelo y la planta (Wasson *et al.*, 2012; Comas *et al.*, 2013). Por lo tanto, se evaluó la variabilidad de diversos caracteres radiculares que poseen las poblaciones naturales y que podrían estar asociados a respuestas adaptativas de ambientes específicos.

7.2.1 Efecto del estrés osmótico en el desarrollo de la raíz principal entre los ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

Los resultados anteriores demostraron que el ecotipo Cvi-0 fue más tolerante al estrés osmótico respecto a Col-0; por lo tanto, se procedió a evaluar los efectos de este tipo de estrés en el desarrollo de su raíz a lo largo del tiempo. Para esto, se realizó una cinética de crecimiento en 300 mM de manitol con plántulas que fueron previamente crecidas por cinco días en medio MS para evitar posibles efectos en el desarrollo causados por el retraso de la germinación.

En condiciones control, se corroboró que Cvi-0 presentó significativamente un tamaño radicular menor al de Col-0, y su tasa de crecimiento fue más baja: mientras que la tasa de

crecimiento promedio a partir de los 5 dps en condiciones hidratadas en Col-0 fue de 0.77 cm por día, la de Cvi-0 fue de 0.57 cm. Sin embargo, durante el tratamiento bajo estrés osmótico, ambos ecotipos se observaron afectados significativamente con una tasa de crecimiento muy similar durante los cinco días de estrés (tasa de crecimiento promedio de 0.28 cm por día en Col-0 y 0.27 cm por día en Cvi-0; Fig. 8A). Es decir, a pesar de que naturalmente el desarrollo de Cvi-0 es más lento, bajo estrés osmótico éste es comparable al de Col-0; por lo que, al normalizarlo respecto a su respectivo control, se concluyó que Cvi-0 disminuyó un 48.3% su longitud de raíz en comparación con Col-0 que lo hizo un 57.6% a los 10 dps (Fig. 8B y C). Esto confirma el resultado de la Fig. 6A, donde se observa que el ecotipo Cvi-0 alcanza una longitud radicular muy similar a la de Col-0 al estar expuesta por 19 días en manitol.

Estos datos sugieren que cuando las plántulas son sometidas a estrés osmótico, en Cvi-0 se afecta menos el desarrollo radicular, resultado que, aunado a lo encontrado en parte aérea, fortalece la hipótesis de que Cvi-0 tiene una mayor tolerancia que Col-0.

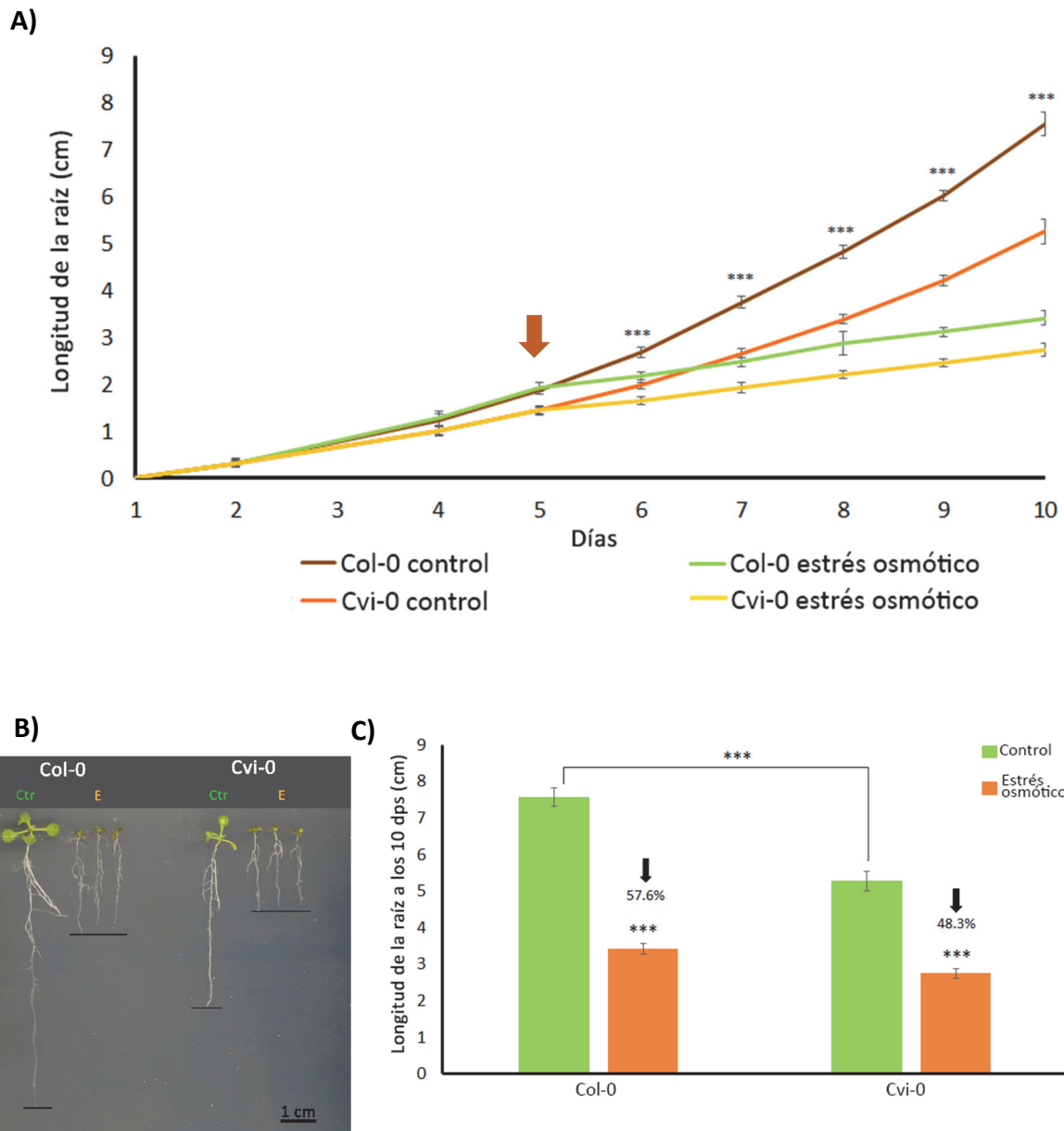


Figura 8. Crecimiento de la raíz bajo estrés osmótico en Col-0 y Cvi-0. A) Cinética de crecimiento de la raíz cada 24 h en manitol 300 mM y condiciones control. La flecha café indica el día en que las plantas fueron transferidas al estrés osmótico; B) Respuesta fenotípica ante el estrés osmótico. Ctr= control y E= estrés osmótico a los 10 dps; C) Longitud de la raíz a los 10 dps en cada tratamiento por ecotipo. La flecha negra indica el porcentaje de disminución en la longitud radicular bajo estrés osmótico. Los asteriscos sobre las barras naranjas simbolizan significancia estadística para una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p < 0.001$ (***) entre los tratamientos control y estrés osmótico. Resultado promedio de 2 réplicas biológicas compuestas por al menos 30 plantas en cada tratamiento para cada ecotipo.

Para indagar más sobre de la variabilidad de respuestas en la raíz bajo estrés osmótico, se realizaron observaciones en el microscopio de los tejidos radiculares de Col-0 y Cvi-0.

7.2.2 Variación morfológica de la “cicatriz” en respuesta al estrés osmótico entre los ecotipos.

En las plantas bajo condiciones control, la formación de pelos radiculares se origina distalmente del meristemo, en la zona de diferenciación, como resultado de la adquisición del estado final diferenciado (Ivanov y Dubrovsky, 2013; Fig. 2). Sin embargo, en condiciones de estrés osmótico, Garay-Arroyo *et al.*, (datos sin publicar) han demostrado que el ecotipo Col-0 bajo condiciones de manitol 300 mM genera una abundancia de pelos radiculares ectópica, en la zona de transición y/o elongación, caracterizada por presentar células más cortas y con paredes engrosadas, la cual ha sido llamada “cicatriz”. La formación de esta morfología particular actualmente está siendo estudiada en nuestro laboratorio; sin embargo, aún se desconoce su función y asociación con la tolerancia al estrés osmótico. En este trabajo, se discutirá más adelante la hipótesis de su formación como resultado del ajuste osmótico que las células próximas a elongar realizan para continuar el desarrollo radicular. Con la finalidad de evaluar la formación de la “cicatriz” en Cvi-0 que podría relacionarse con una capacidad de ajuste osmótico más veloz y mayor tolerancia, se observó la morfología de esta zona a los 8 h y 24 h de exposición con manitol 300 mM.

En la Fig. 9C se muestra que, a las 8 h de estrés osmótico, la mayor frecuencia de las plantas Col-0 (81%) mostraron un engrosamiento en las paredes celulares, pero aún no formaron pelos radiculares; mientras que en el ecotipo Cvi-0, el 100% de las plantas presentaron pelos radiculares que sobresalen de la raíz principal. Por otra parte, a las 24 h de estrés, se forman cuatro fenotipos: “cicatriz” amplia con A) pelos radiculares cortos y B) pelos radiculares largos; y “cicatriz” restringida con C) pelos radiculares cortos y D) pelos radiculares largos (ver materiales y métodos y Fig. 9A). Aunque todos estos fenotipos están presentes en ambos ecotipos, Col-0 y Cvi-0 mostraron morfologías definidas y diferenciales en la mayor proporción de plantas (Fig. 9B). Por ejemplo, la mayor frecuencia de plantas pertenecientes al ecotipo Col-0 (61.11%) presentaron el fenotipo A; pero en Cvi-0, un 65.22% de las plantas exhibieron más frecuentemente el fenotipo D (Fig. 9C), caracterizado por un incremento en la longitud de pelos radiculares, posiblemente asociado a un

mayor tiempo de desarrollo, como consecuencia de una capacidad de ajuste osmótico más veloz que en Col-0. La hipótesis sobre la formación de “cicatriz” y la capacidad de ajuste osmótico será abordada con mayor detalle en la discusión.

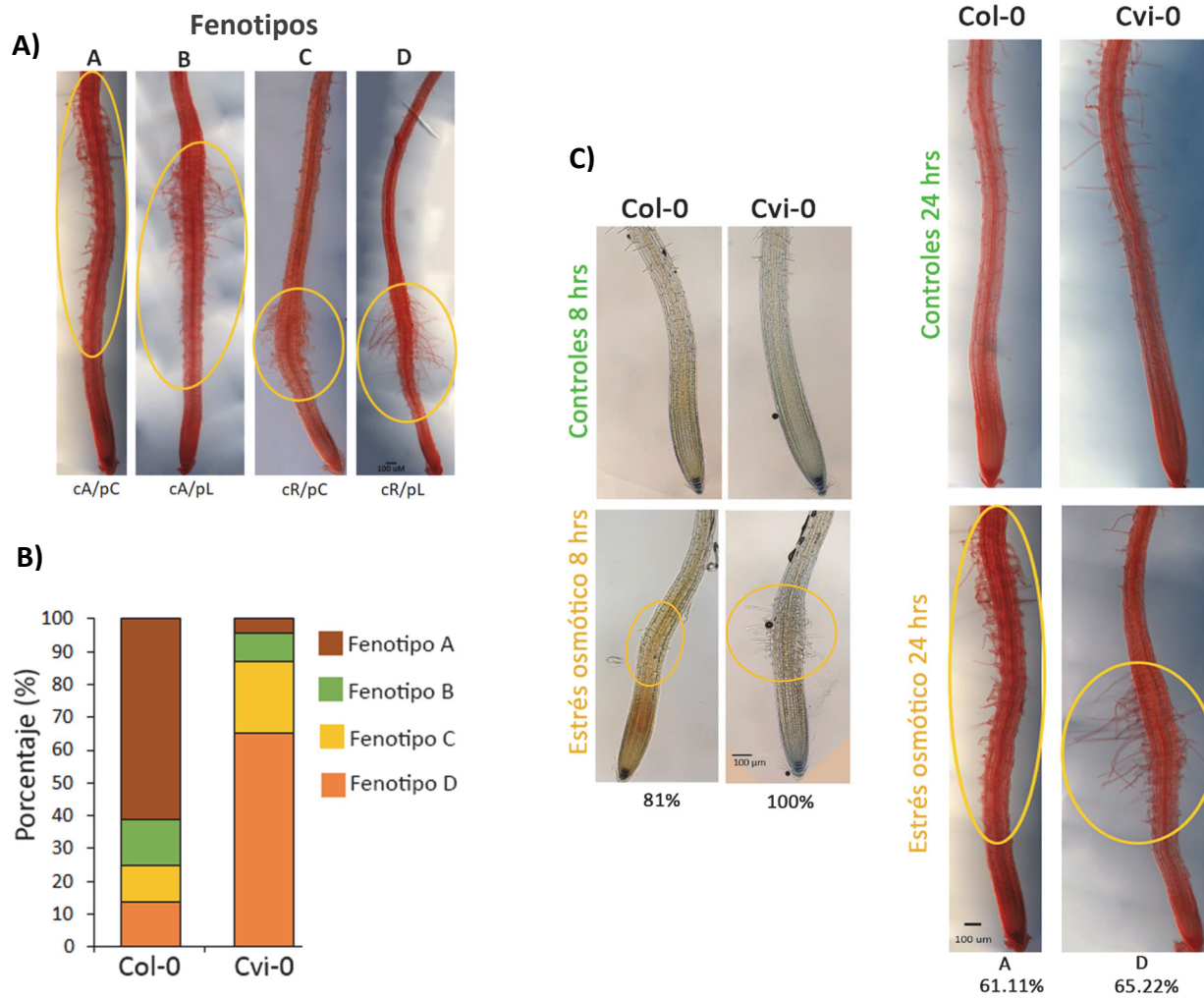


Figura 9. Diferencias morfológicas de la "cicatriz" entre los ecotipos crecidos bajo estrés osmótico. A) Los cuatro fenotipos (A-D) observados a las 24 h de estrés osmótico con 300 mM de manitol: cA= cicatriz amplia, cR= cicatriz restringida, pC= pelos cortos, pL= pelos largos (ver materiales y métodos); B) Frecuencias de los diferentes fenotipos de "cicatriz" en las poblaciones de Col-0 y Cvi-0 bajo estrés osmótico por 24 h; C) Plantas de cinco días post-siembra a las que se les indujo un estrés osmótico por 8 h (panel izquierdo) y 24 h (panel derecho). Las escalas de ambos tratamientos son diferentes. Los fenotipos mostrados son los de mayor frecuencia en la población (porcentaje y fenotipo indicado debajo de la figura). La "cicatriz" se encuentra señalada por un círculo amarillo. Resultado de dos réplicas biológicas para Cvi-0 (n = 20) y tres réplicas biológicas para Col-0 (n = 30) en cada tratamiento.

7.2.3 Efecto de la pérdida de función los factores epigenéticos ATX1 y CLF en el desarrollo de la raíz principal bajo estrés osmótico.

El análisis de los factores epigenéticos ATX1 y CLF resulta relevante ya que estudios previos han demostrado que la metiltransferasa ATX1 tiene un papel importante en el desarrollo de la raíz, dado que la mutante presenta una longitud mucho menor a las plantas silvestres, también con un meristemo reducido debido a una menor tasa de división celular y un menor número de raíces laterales (Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014; Petrone, 2015; Vega-Leon, 2016). En cambio, la mutante de CLF no muestra una diferencia significativa en la longitud de la raíz ni en el tamaño del meristemo comparado con las plantas silvestres (Vega-Leon, 2016). En el mismo sentido, las plantas dobles mutantes (*atx1/clf*) tampoco presentan cambios en la longitud de la raíz respecto a las plantas silvestres ni a *clf-29*, lo que podría indicar que la pérdida de CLF genera un fenotipo epistático sobre el que se muestra por la ausencia de ATX1 (Vega-Leon, 2016). Por lo anterior, en este trabajo es de gran interés evaluar la respuesta de estas mutantes al estrés osmótico pues podría ser útil para profundizar en el estudio de su función.

Los resultados de la Fig. 10A muestran que los fenotipos bajo condiciones control reproducen lo anteriormente reportado, pues *atx1-3* fue el genotipo de raíz más corta; pero a partir de las 24 h en estrés osmótico y hasta los 10 dps (5 días en manitol 300 mM) todos los genotipos se vieron gravemente afectados en el desarrollo de la raíz, con una reducción de más del 50% en todos los casos. De todos los genotipos, *clf-29* y la doble mutante *atx1/clf* fueron los más sensibles, y cabe destacar que su comportamiento es casi idéntico, lo que refuerza el fenotipo epistático de CLF sobre ATX1 en la raíz (Fig. 10C). Al analizar el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz respecto al control en cada genotipo, se concluye que la mutante de *atx1-3* fue la menos afectada pues su tamaño radicular se reduce un 58.6% respecto a la planta silvestre que se reduce un 61.2% (Fig. 10B y C). Esta respuesta radicular de *atx1-3* que se ve más favorecida bajo estrés osmótico va en el mismo sentido que lo observado en hoja, y también en el ecotipo Cvi-0, lo que sugiere que los genotipos que son más tolerantes también presentan una sensibilidad reducida en la raíz bajo estrés osmótico.

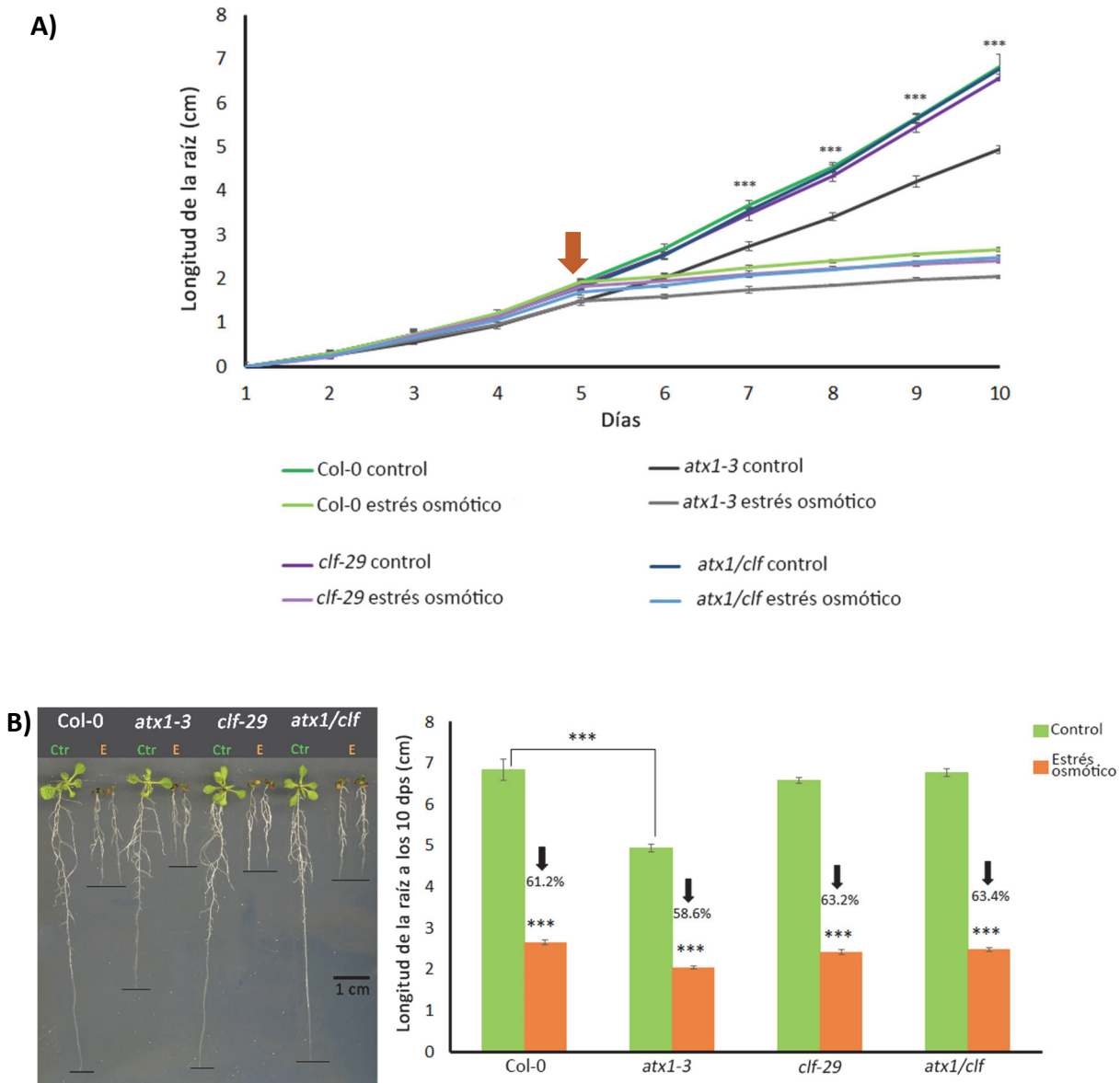


Figura 10. Crecimiento de la raíz bajo estrés osmótico en plantas silvestres (Col-0) y las mutantes de los factores epigenéticos *atx1-3*, *clf-29* y *atx1/clf*. A) Cinética de crecimiento de la raíz cada 24 h en manitol 300 mM y condiciones control. La flecha café indica el día en que las plantas fueron transferidas al estrés osmótico; B) Respuesta fenotípica ante el estrés osmótico. Ctr= control y E= estrés osmótico a los 10 dps; C) Longitud de la raíz a los 10 dps en cada tratamiento por fondo genético. La flecha negra indica el porcentaje de disminución en la longitud radicular bajo estrés osmótico. Los asteriscos sobre las barras naranjas simbolizan significancia estadística para una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p < 0.001$ (***) entre los tratamientos control y estrés osmótico. Resultado promedio de 1 réplica biológica compuesta por al menos 15 plantas en cada tratamiento para cada genotipo.

7.2.4 Morfología de la “cicatriz” que genera el estrés osmótico en ausencia de los factores epigenéticos ATX1 y CLF.

Una vez demostrado que las plantas mutantes *atx-1* y *clf* presentan respuestas antagónicas en la supervivencia y longitud radicular ante el estrés osmótico, se procedió a estudiar la morfología de la “cicatriz” en la raíz de las plantas mutantes.

Al igual que lo observado con los ecotipos, ante el primer estrés a las 24 h se formaron los cuatro fenotipos anteriormente descritos (Fig 11A). Sin embargo, también fue posible determinar la morfología más frecuente en los genotipos de las mutantes. Como se mencionó previamente, la mayoría de las plantas silvestres (61.11%) generaron el fenotipo A. En cambio, la mutante *atx1-3* generó dos fenotipos en proporciones muy similares: 1) Fenotipo A, al igual que las silvestres (32.34%), y 2) Fenotipo B (29.73%), que es de “cicatriz” amplia, como el silvestre, pero con pelos radiculares largos acotados más distalmente al meristemo (Fig. 11B). Es interesante mencionar que en esta mutante ningún fenotipo sobresalió por sobre los demás, sino que todos se mantuvieron en una proporción muy similar. Además, fue el único genotipo que presentó raíces sin pelos radiculares en un 10.81% de la población (Fig. 11A). Esto sugiere que la mutante de *atx1-3* es muy plástica, lo cual abre nuevas preguntas sobre la función que cumple en la capacidad del ajuste osmótico y el desarrollo de pelos radiculares. Por otra parte, en la mayor proporción de plantas *clf-29* (64%) se observa el fenotipo B (Fig. 11B).

Estos resultados indican que la pérdida de los factores epigenéticos ATX1 y CLF no tienen un efecto tan contrastante como el que se observa en la variabilidad natural dentro de los ecotipos, pero sí podrían estar involucrados en la capacidad de ajuste osmótico de Col-0, pues en su ausencia, las plantas podrían ser capaces de realizar su ajuste más rápido y así, desarrollar pelos radiculares más largos.

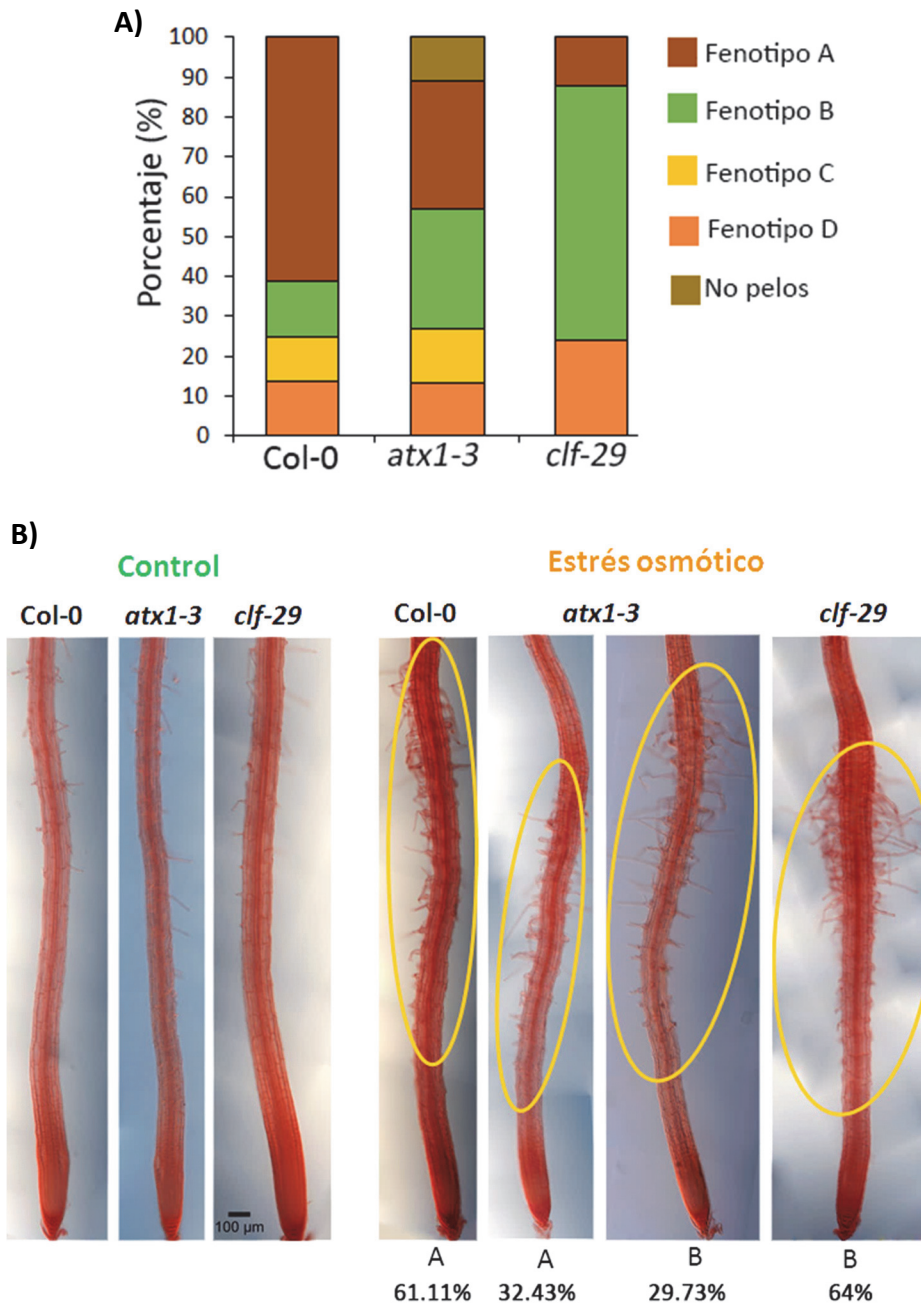


Figura 11. Diferencias morfológicas de la “cicatriz” entre las mutantes de *atx1-3* y *clf-29* respecto a las plantas silvestres (*Col-0*) crecidas bajo estrés osmótico. A) Frecuencias de los diferentes fenotipos de “cicatriz” en las poblaciones de *Col-0*, *atx1-3* y *clf-29* bajo estrés osmótico por 24 h; B) Plantas de cinco días post-siembra fueron transferidas a manitol 300 mM por 24 h. La “cicatriz” se encuentra señalada con un círculo amarillo. Los fenotipos mostrados son los de mayor frecuencia en la población (porcentaje y fenotipo indicados debajo de la figura). Resultado de tres réplicas biológicas para *Col-0* y *atx1-3* (n=30) y dos réplicas biológicas para *clf-29* (n=20) en cada tratamiento.

En conjunto, los resultados morfológicos anteriores demuestran que los genotipos evaluados presentan diferencias en el desarrollo de la raíz bajo estrés osmótico. Dado que el adecuado desarrollo del sistema radicular está controlado por mecanismos moleculares que incluyen cambios en la expresión de genes de respuesta a estrés, se realizaron análisis de expresión para evaluar la variabilidad de respuesta transcripcional entre los genotipos. Primero se describirán los cambios debido a la variabilidad natural, y posteriormente, el efecto de la ausencia del factor epigenético ATX1.

7.3 Análisis de la expresión génica global en los ecotipos Col-0 y Cvi-0 bajo condiciones control y estrés osmótico.

Los resultados anteriores demuestran que la respuesta morfológica entre los ecotipos sucede desde tiempos muy tempranos de inducción al estrés osmótico; por ejemplo, la formación de la “cicatriz” se observa a las 8 h de estrés en Cvi-0. Para comprobar el tiempo suficiente para inducir cambios transcripcionales en respuesta al estrés en la raíz, se realizó una búsqueda de los genes de respuesta *RD26*, *ABI1* y *KIN2* en la base de datos TAIR de los transcriptomas de *Arabidopsis* (<http://bbc.botany.utoronto.ca>). Los resultados *in silico* indicaron que los tres genes se expresan en mayor medida desde las 6 h y hasta las 24 h de exposición a manitol 300 mM (Fig. S14); por lo tanto, 8 h de estrés osmótico fue el tiempo elegido para poder observar cambios transcripcionales en el sistema radicular bajo estrés osmótico, lo cual se confirmó a través de PCRs semicuantitativas (Fig. S15).

Para los ensayos globales mediante microarreglos, se aisló el RNA de las raíces de plantas de cinco días a las cuales se les indujo un estrés osmótico con 300 mM de manitol por 8 h. Esta herramienta fue usada para observar los perfiles de expresión de los genes que naturalmente son diferentes entre las raíces de Col-0 y Cvi-0 bajo condiciones de crecimiento control (microarreglo Col-0 control vs. Cvi-0 control) y para los genes que se regulan en respuesta al estrés osmótico durante 8 h de tratamiento (microarreglo Col-0 manitol vs. Cvi-0 manitol). El valor del Z-score obtenido del análisis, permitió discriminar los genes que se expresan diferencialmente y son estadísticamente significativos entre las muestras (ver materiales y métodos).

En los resultados del microarreglo se encontró que los perfiles de expresión de la raíz bajo estrés osmótico son muy variables entre los ecotipos. De acuerdo con su dependencia a las condiciones control, los genes se agruparon en cuatro comportamientos posibles (A-D, Tabla 5). Por ejemplo, el perfil de expresión más común, representado con 1914 genes, es aquel que mostró los mismos niveles transcripcionales entre los ecotipos en condiciones control, pero bajo estrés osmótico su expresión fue variable entre Col-0 y Cvi-0 (Grupo B); es decir, la expresión diferencial fue independiente de las condiciones control. Asimismo, se encontraron 1469 genes expresados diferencialmente entre los ecotipos en condiciones control que no presentaron diferencias significativas bajo estrés osmótico (Grupo A); esto puede ser debido a que no están involucrados en la respuesta al estrés, o porque en condiciones de estrés osmótico alcanzaron los mismos niveles transcripcionales. En todos los grupos anteriormente descritos, una proporción ligeramente mayor de genes se expresó más en Cvi-0 respecto a Col-0 (Tabla 5).

Por otra parte, 1318 genes fueron expresados diferencialmente tanto en las condiciones control como también bajo estrés osmótico entre Col-0 y Cvi-0 (Grupos C y D), por lo que su respuesta al estrés podría estar influenciada por la expresión genotipo-específica que las plantas presentan incluso desde las condiciones hidratadas. Una cuestión importante por resaltar es que, en la mayoría de los genes, si en condiciones control Cvi-0 presentó una menor expresión respecto a Col-0, sus niveles también se mantuvieron más bajos en estrés osmótico; o viceversa, si hubo mayores niveles transcripcionales en Cvi-0 que Col-0 en control, en estrés osmótico también se elevaron más (Grupo C). Tan solo 14 genes mostraron comportamientos invertidos entre los ecotipos en cada tratamiento; es decir, 11 de ellos estuvieron sub-expresados en Cvi-0 control y luego se elevaron más que Col-0 bajo estrés, y únicamente cuatro genes de Cvi-0 estuvieron sobre-expresados en condiciones control y luego se redujeron más que Col-0 bajo estrés osmótico (Grupo D).

En conclusión, estos resultados sugieren que la mayoría de los genes que responden diferencialmente entre Col-0 y Cvi-0 al estrés osmótico no están influenciados por las condiciones control, o tienden a continuar con la misma tendencia que la que presentan en condiciones hidratadas.

Tabla 5. Número de genes con expresión diferencial entre Col-0 y Cvi-0 bajo condiciones control y estrés osmótico. Las celdas verdes representan genes que están sobre-expresados en Cvi-0 respecto a Col-0, las celdas rojas son los genes sub-expresados en Cvi-0, y las celdas grises representan genes que no muestran cambios significativos con un Z-score > 1.5 entre los ecotipos. Cada comportamiento diferencial se agrupó en categorías A-D.

Grupo	Control	Estrés osmótico	Número de genes
A			775
			694
B			1040
			874
C			761
			543
D			11
			3
		Total	4701

Cvi-0 > Col-0
 Cvi-0 < Col-0
 Cvi-0 = Col-0

Los procesos biológicos involucrados en la expresión diferencial fueron visualizados con el software en línea Panthera de *Gene Ontology*. En la Fig. 12A se observa que los genes diferencialmente expresados entre Col-0 y Cvi-0 tanto en condiciones control como de estrés osmótico, están relacionados principalmente con procesos metabólicos y procesos celulares. Bajo estrés, el número de genes con diferentes niveles transcripcionales entre los ecotipos es de 723 y 805, respectivamente para cada proceso. Dentro de estos, la mayoría de los genes presentaron el perfil de expresión del grupo B, pues los niveles transcripcionales que alcanzaron bajo estrés son independientes de los niveles en condiciones control (Fig 12A).

Para fines de este proyecto los genes de la categoría “respuesta a estímulos” son de especial interés. En ese rubro, se observa que la mayoría de los genes expresados diferencialmente entre los ecotipos se agruparon en la función de “respuesta a estrés”. Sorprendentemente, alrededor de 82 genes relacionados con la respuesta al estrés se encontraron diferencialmente expresados entre los ecotipos desde las condiciones control (grupo A, C y D), lo que reflejó la

influencia de la variabilidad natural incluso desde las condiciones hidratadas, que puede repercutir en las respuestas que se originan bajo estrés osmótico. Sin embargo, también hay una gran proporción de genes (56 genes) agrupados en la categoría de “respuesta a estrés” que presentan niveles diferenciales entre los ecotipos bajo estrés osmótico, independientemente de sus niveles en condiciones control (Grupo B) (Fig 12B). Es decir, la dinámica de respuestas y la dependencia de las condiciones control que existe en estos genes entre los ecotipos es muy variable.

Una observación que podría ser evaluada en un futuro con mayor profundidad es que de los genes que se expresan diferencialmente entre los ecotipos bajo condiciones control, existe un porcentaje pequeño que se agrupó en la categoría de respuesta inmune y estímulos bióticos, y que podría ser de interés para evaluar la capacidad de respuesta de Cvi-0 ante la defensa a patógenos (Fig. 12B).

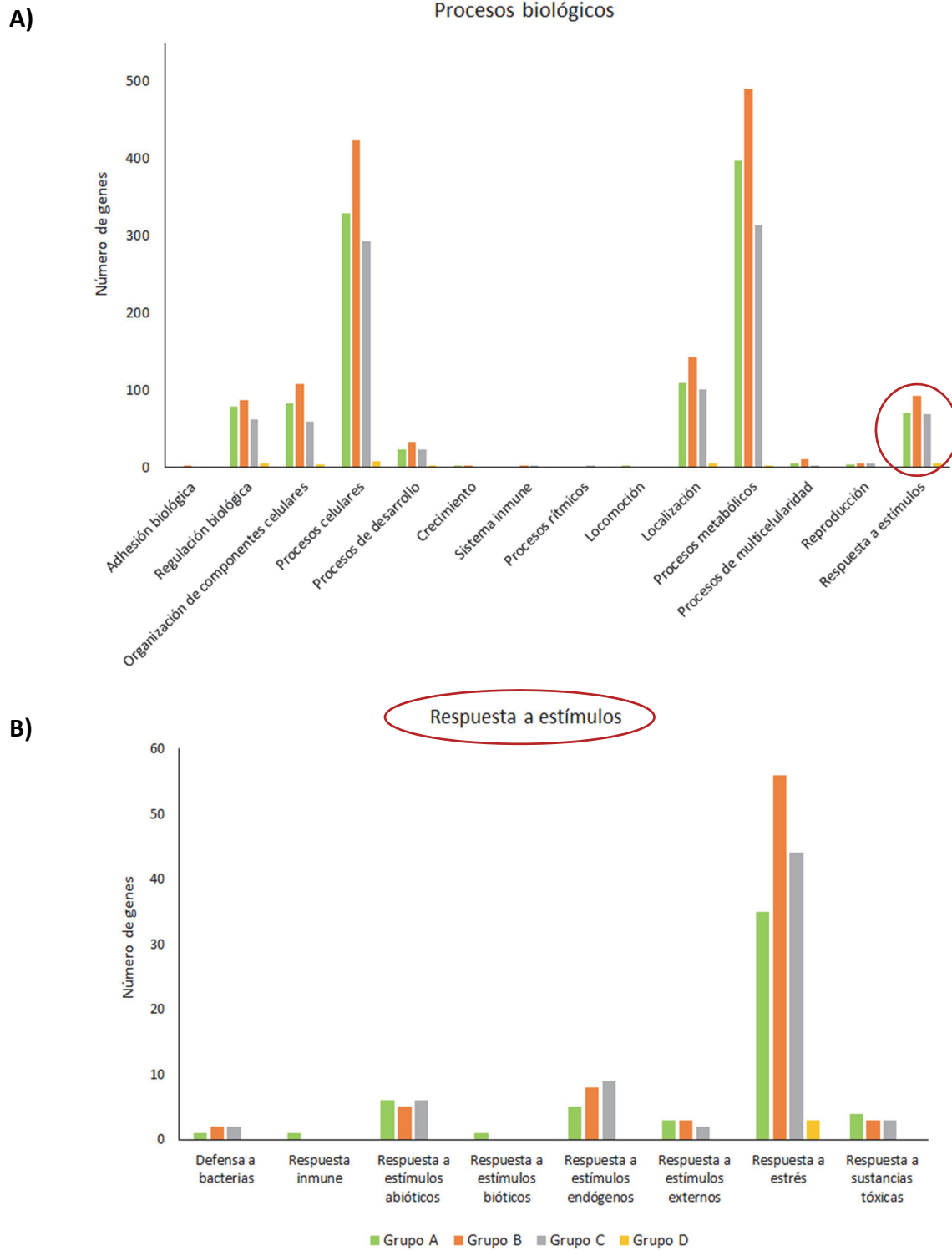


Figura 12. Categorías funcionales de los genes expresados diferencialmente entre los ecotipos bajo estrés osmótico. Número de genes con expresión diferencial entre Col-0 y Cvi-0 involucrados en A) Procesos biológicos y B) Respuesta a estímulos. Los grupos A-D son los perfiles transcripcionales descritos en la Tabla 5.

A través de los análisis de microarreglos también se observó expresión diferencial de diversos factores epigenéticos o remodeladores de cromatina entre los ecotipos. Estos son de especial interés pues se encargan de sensar el ambiente para poder desencadenar respuestas de activación o represión en el DNA o en las histonas, para regular la transcripción génica. Por ejemplo, del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non Fermentable), algunas subunidades se expresan diferencialmente en cada condición: las subunidades SWI3C y SWI3D se encuentran mayormente expresadas en Cvi-0 únicamente en condiciones control (Grupo A), pero la subunidad SWI3B sólo está sobre-expresada en Cvi-0 bajo condiciones de estrés osmótico (Grupo B). Esto podría ser importante para la comprensión del recambio de subunidades en cada condición ecotipo-específica.

Asimismo, únicamente bajo condiciones de estrés osmótico se encontraron sobre-expresados en Cvi-0 factores de acetilación de histonas relacionados con la activación transcripcional como HAC1, metiltransferasas de la H3K4 como SET7/9 y SDG2. También es interesante encontrar niveles más altos en Cvi-0 respecto a Col-0 únicamente bajo estrés de la variante de histona H2AX, que cuando es fosforilada se acumula en las zonas donde sucedió daño al DNA para relajar la cromatina (Sharma *et al.*, 2012). Sin embargo, también hay genes que se encuentran diferencialmente expresados desde las condiciones control y bajo estrés osmótico (Grupo C), por ejemplo, de activación transcripcional se encuentra ASHH4/SDG24 y de represión ATRING1A, que pertenece al grupo PRC1 de Polycomb (Sanchez-Pulido *et al.*, 2008), también LDL1 que es una desmetilasa de la marca H3K4me3, o la metiltransferasa de DNA, DNMT2A. Dentro de los genes que se expresan menos en Cvi-0 respecto a Col-0 en ambos tratamientos es la DNA metiltransferasa CMT3 involucrada en represión transcripcional (Tabla 6).

Tabla 6. Expresión diferencial entre Col-0 y Cvi-0 de factores epigenéticos involucrados en la activación o represión transcripcional en condiciones control y bajo estrés osmótico. Las celdas verdes representan genes que están sobre-expresados en Cvi-0 respecto a Col-0, las celdas rojas son los genes sub-expresados en Cvi-0, y las celdas grises representan genes que no muestran cambios significativos con un Z-score > 1.5 entre los ecotipos. Los grupos A-D son los perfiles transcripcionales descritos en la Tabla 5.

Código	Genes	Descripción	Z-score control	Z-score estrés osmótico	Grupo
AT1G21700	SWI3C	Componente del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF	1.65	0.24	A
AT4G34430	SWI3D	Componente del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF	1.53	1.13	A
AT1G26760	ATXR1	Histona metiltransferasa, activación transcripcional	2.25	1.05	A
AT2G33610	SWI3B	Componente del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF	0.94	1.58	B
AT1G79000	HAC1	Histona acetiltransferasa de la familia CBP	0.52	1.94	B
AT1G77660	SET7/9	Histona H3K4me metiltransferasa	No encontrado	2.18	B
AT4G15180	SDG2	Histona H3K4me metiltransferasa	0.81	1.65	B
AT1G08880	H2AX	Variante de histona involucrada en el daño al DNA	1.2	1.7	B
AT5G44280	ATRING1A	Componente del complejo PRC1 de Polycomb	1.91	1.94	C
AT5G25480	DNMT2	DNA metiltransferasa	1.85	1.78	C
AT1G62830	LDL1	Desmetilasa de H3K4me3	1.99	1.7	C
AT3G59960	ASHH4/SDG24	Histona metiltransferasa, activación transcripcional	3.37	2.2	C
AT1G69770	CMT3	DNA metiltransferasa	-2.62	-1.66	C

7.4 Análisis de la expresión diferencial inducida por estrés osmótico mediante PCR cuantitativa.

El análisis de microarreglo permitió seleccionar a los genes de respuesta que se inducen diferencialmente bajo estrés osmótico entre Col-0 y Cvi-0. Debido a que en este proyecto la influencia de los mecanismos epigenéticos durante el estrés es de especial importancia, otro criterio para la selección de genes fue que previamente se conociera que su regulación es por medio de factores y/o marcas epigenéticas. Los genes elegidos para realizar el análisis de la expresión relativa mediante qPCR fueron: *ANAC019*, *COR15A*, *KIN2*, *NCED3*, *RD29A*, *RD29B* y *RAB18* (Tabla 7).

7.4.1 La influencia de la variabilidad natural en los patrones de expresión en respuesta al estrés osmótico.

En parte aérea, ya se ha demostrado que diversos ecotipos muestran expresiones diferenciales ante el estrés hídrico, y que algunos cambios transcripcionales correlacionan con modificaciones morfológicas en respuesta al estrés (Rymaszewski *et al.*, 2017). Sin embargo, en la raíz aún no hay estudios donde demuestren la variabilidad de respuestas transcripcionales entre ecotipos. Debido a esto, usando la raíz como material biológico, se realizó el análisis de la expresión de los genes mencionados anteriormente, los cuales tienen diversas funciones (Tabla 7).

Tabla 7. Expresión diferencial entre Col-0 y Cvi-0 de los genes evaluados por qPCR bajo condiciones control y de estrés osmótico. En la tabla se muestran los genes de respuesta a estrés y los factores epigenéticos ATX1 y CLF. Las celdas de colores muestran la expresión diferencial entre los ecotipos obtenida por qPCR: las celdas verdes representan genes que están sobre-expresados en Cvi-0 respecto a Col-0, las celdas rojas son los genes sub-expresados en Cvi-0, y las celdas grises representan genes que no muestran cambios significativos entre los ecotipos. Los grupos B-D son los perfiles transcripcionales descritos en la Tabla 5.

Código	Genes	Descripción	Control	Estrés osmótico	Grupo
AT2G23380	CLF	Histona H3K27 trimetiltransferasa, represión transcripcional	Grisea	Verde	B
AT5G66400	RAB18	Proteína dehidrina hidrofílica que responde a ABA	Grisea	Verde	B
AT2G42540	COR15A	Proteína de respuesta a estrés por frío y deshidratación que es capaz de proteger la membrana celular	Grisea	Roja	B
AT5G52310	RD29A	Proteína hidrofílica mayoritariamente ABA independiente	Grisea	Roja	B
AT3G14440	NCED3	Enzima que cataliza la reacción de 9-cis xantofila a xantoxina para la biosíntesis de ABA	Verde	Roja	D
AT5G52300	RD29B	Proteína hidrofílica mayoritariamente ABA dependiente	Verde	Roja	D
AT5G15970	KIN2	Gen de respuesta a estrés por ABA y deshidratación	Roja	Verde	D
AT1G52890	ANACO19	Factor transcripcional tipo NAC	Grisea	Grisea	
AT2G31650	ATX1	Histona H3K4 trimetiltransferasa, activación transcripcional	Grisea	Grisea	

Para la realización de las qPCRs, los genes *UPL7*, *PDF2*, *RNAseH* y *AT5G15710* fueron seleccionados por el programa del qbase+ version 3 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium - www.qbaseplus.com), como buenos normalizadores según el algoritmo de geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), aunque *AT5G15710* y *RNAseH* fueron los de menor preferencia (Fig S4A).

Mediante los análisis de expresión por qPCR se demostró que todos los genes de respuesta se sobre-expresaron bajo estrés osmótico en ambos ecotipos respecto a las condiciones control; por ejemplo, la expresión varió de 10-15 veces en *RD29A* y *KIN2*, y hasta 200 o 500 veces más elevadas que el control en *RD29B*, *RAB18* y *COR15A*, en ambos ecotipos (Fig. 13). Asimismo, se determinó que Col-0 y Cvi-0 exhibieron perfiles de expresión diferenciales en todos estos genes, representados en la Tabla 7. Por ejemplo, los genes *COR15A*, *RD29A* y *RAB18* pertenecieron al grupo B, pues sus niveles de expresión fueron independientes de las condiciones control: mientras que en *COR15A* y *RD29A* los niveles de transcrito fueron menores en Cvi-0 respecto a Col-0 bajo estrés, *RAB18* alcanzó niveles de expresión mayores en Cvi-0. Por otra parte, a pesar de que en Cvi-0 los genes *NCED3* y *RD29B* estuvieron ligeramente aumentados respecto a Col-0 en condiciones control, bajo estrés osmótico estos se elevaron en menor medida, por lo que tuvieron menor expresión en Cvi-0 respecto a Col-0 en estrés (Grupo D). En cambio, el gen *KIN2* fue muy interesante, pues a pesar de que en Cvi-0 control éste se mantuvo en menor nivel transcripcional, bajo estrés su expresión fue superior que la de Col-0 (Grupo D). En contraste a todos los genes anteriores, el gen *ANAC019* no mostró diferencias significativas entre los ecotipos bajo estrés osmótico.

En cuanto a los factores epigenéticos, interesantemente el factor *CLF*, asociado a represión transcripcional, presentó mayor expresión en Cvi-0 que en Col-0, sólo bajo condiciones de estrés osmótico. En cambio, *ATX1*, asociado a la activación transcripcional, no presentó diferencias significativas entre los ecotipos bajo ningún tratamiento (Fig. 13).

Los diferentes perfiles de expresión sugieren que cada gen presenta mecanismos de respuesta particulares; sin embargo, la mayoría de los genes evaluados mostraron una menor expresión en Cvi-0 durante el estrés osmótico. Considerando que anteriormente se demostró la mayor tolerancia de Cvi-0 respecto a Col-0, y un ajuste osmótico más rápido a las ocho horas, entonces es probable que los niveles transcripcionales que alcanza, aunque sean menores, son suficientes para que Cvi-0 tenga una mejor respuesta ante el estrés.

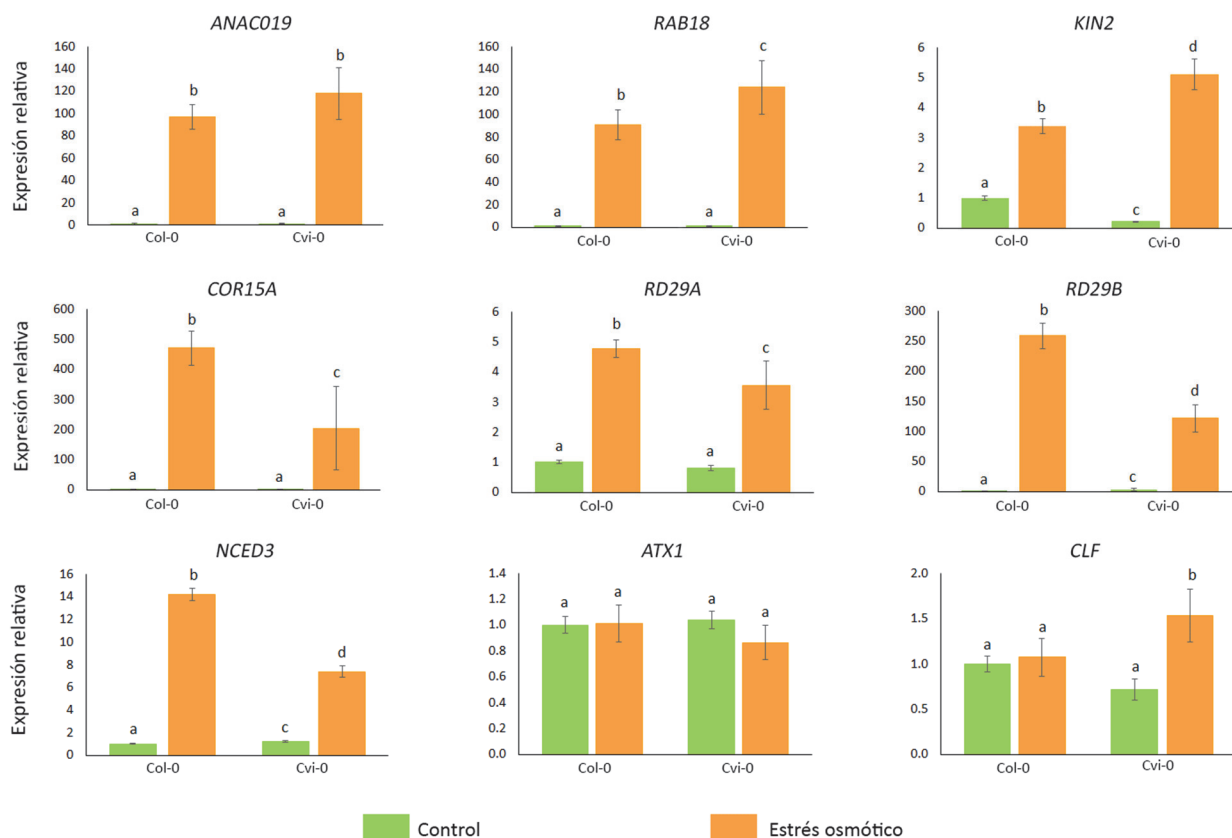


Figura 13. Expresión relativa de genes de respuesta a estrés osmótico en los ecotipos Col-0 y Cvi-0. Plantas de Col-0 y Cvi-0 de cinco días post-siembra fueron transferidas a 300 mM por ocho h para inducir estrés osmótico, las plantas control permanecieron ese tiempo en medio MS. La técnica de qPCR se realizó en los genes inducibles *ANAC019*, *RAB18*, *KIN2*, *COR15A*, *RD29A*, *RD29B*, *NCED3* y en los factores epigenéticos *ATX1* y *CLF*. Los resultados de las condiciones control están normalizados con Col-0 control, y los de estrés osmótico fueron normalizados respecto a su propio control ecotipo-específico. Las barras indican la desviación estándar de dos réplicas biológicas independientes y de la muestra que fue enviada para realizar el microarreglo (mezcla de las dos réplicas biológicas), cada una con dos réplicas técnicas. Las diferentes letras representan diferencias significativas para una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey ($p < 0.05$), que permite hacer comparaciones entre todas las muestras. Los genes normalizadores utilizados en este experimento se encuentran en la Fig. S4A.

Los resultados *in silico* de la Fig. S14, demostraron que algunos genes de inducción presentan su mayor expresión desde las seis y hasta las 24 h bajo estrés osmótico en plántulas completas. En el resultado anterior, mediante qPCR, se determinó que los ecotipos presentan una expresión diferencial de los genes de respuesta a las 8 h de estrés; tiempo en el que se observa el inicio de la formación de la “cicatriz”, la cual es diferencial entre los ecotipos. Sin embargo, a las 24 h de estrés, el ajuste osmótico ya se logró en ambos ecotipos y estos muestran morfologías más desarrolladas en la “cicatriz”; por lo que se consideró importante evaluar el comportamiento de dichos genes entre los ecotipos a las 24 h de inducción de estrés osmótico para observar las transformaciones de la expresión génica en el tiempo (Fig. 14). Aunque estos resultados son preliminares pues sólo fueron realizados en un muestreo biológico, los perfiles de expresión se mantienen idénticos a los observados a las 8 h de estrés. Por ejemplo, los genes *KIN2* y *RAB18* se mostraron mayormente expresados en Cvi-0, respecto a Col-0, y el resto de los genes tuvieron niveles transcripcionales menores (Fig. 14). Sin embargo, estos niveles son más bajos en todos los genes a las 24 h respecto a las 8 h, excepto en *RAB18* y *RD29B*, que presentaron mayores niveles de transcritos en ambos ecotipos a las 24 h, y las diferencias entre ellos se acentuaron (Figs. 13 y 14). Este resultado coincide con los datos de microarreglos de plántula completa de Col-0 en 300 mM de manitol, disponibles en <http://bbc.botany.utoronto.ca>, donde se observa que el punto máximo de estos dos genes es entre las 12 y las 24 h. Estos resultados invitan a pensar que la mayoría de los genes tienen una acción más inmediata, pues disminuyen su expresión con el tiempo, pero *RAB18* y *RD29B* podrían estar involucrados en el mantenimiento de la respuesta más prolongada. Además, cabe mencionar que aún bajo un estrés más severo, los perfiles de expresión entre ecotipos no cambiaron, lo que apoya la hipótesis de que los niveles transcripcionales más reducidos en Cvi-0, serían suficientes para conferirle una resistencia superior a Col-0.

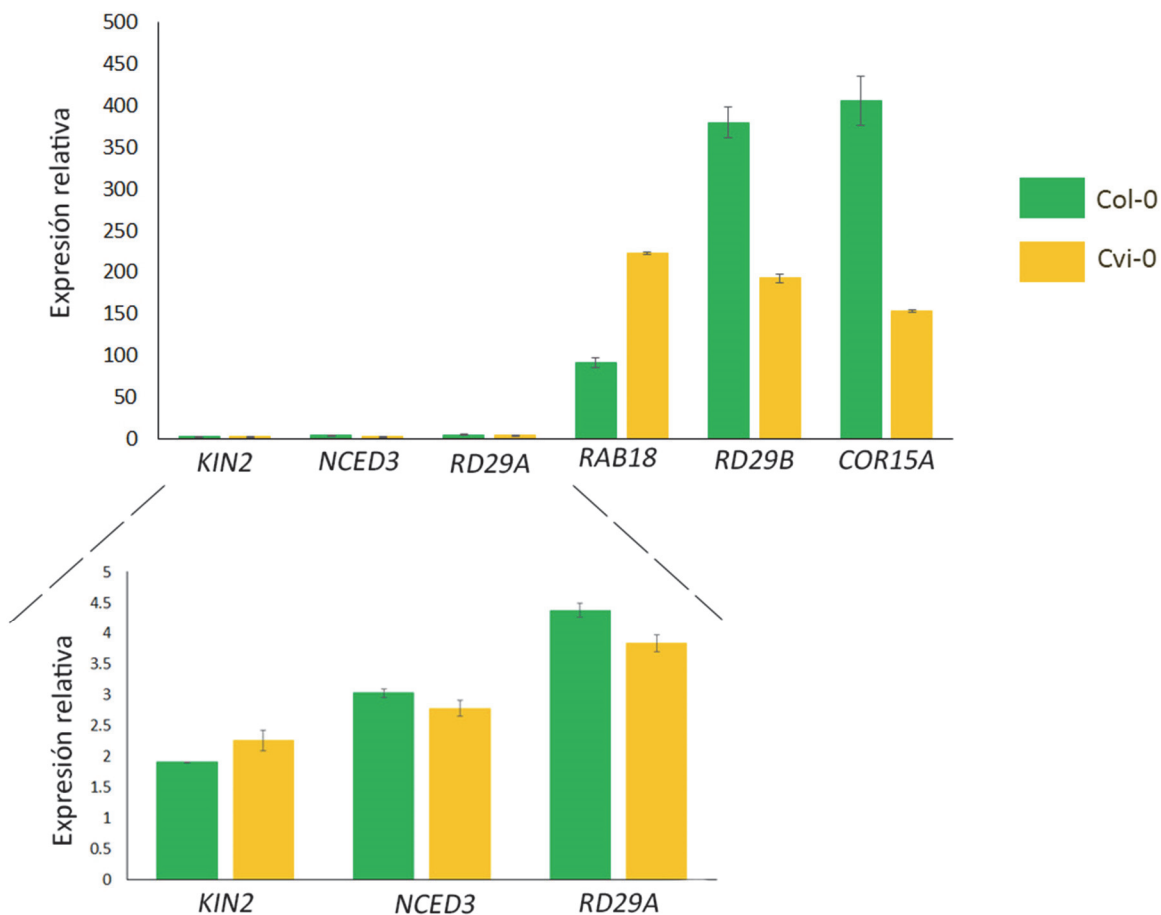


Figura 14. Expresión relativa de genes de respuesta a las 24 h de estrés osmótico. Plantas de Col-0 y Cvi-0 de cinco días post-siembra fueron transferidas a 300 mM por 24 h para inducir estrés osmótico, las plantas control permanecieron ese tiempo en medio MS. La técnica de qPCR se realizó en los genes inducibles *KIN2*, *NCED3*, *RD29A*, *RAB18*, *RD29B* y *COR15A*. Sólo se muestran los resultados bajo estrés osmótico, que fueron normalizados respecto a su propio control ecotipo-específico. Las barras indican la desviación estándar de dos réplicas técnicas realizadas en un solo muestreo biológico, por lo que no se muestran análisis estadísticos. En la parte inferior se muestra la ampliación de la imagen que contiene a los genes de menor expresión: *KIN2*, *NCED3* y *RD29A*. Los genes normalizadores utilizados en este experimento se encuentran en la Fig. S4B.

Siguiendo el mismo sentido de los resultados anteriores, después de corroborar diferencias en la expresión debido a la variabilidad natural de las plantas, se decidió evaluar también las implicaciones de la pérdida de función de ATX1 en los genes de respuesta a estrés en la raíz.

7.4.2 El papel de ATX1 en la expresión de genes de respuesta al estrés osmótico en el ecotipo Col-0.

Estudios anteriores realizados en las hojas bajo estrés hídrico han demostrado que diversos genes de respuesta a estrés están regulados por la metiltransferasa ATX1, pues en ausencia de la enzima, sus niveles de transcripción se reducen (Ding *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2012). Sin embargo, la implicación de esta proteína en las raíces bajo estrés osmótico no ha sido estudiada; y resulta de gran interés debido a las diferentes respuestas que genera cada órgano ante la limitación hídrica. Por lo tanto, se realizaron análisis de qPCR en las raíces de plantas silvestres del ecotipo Col-0 y la mutante *atx1-3* (fondo Col-0) por 24 h en estrés osmótico. Los resultados de la Fig. 15 indican que el gen *RAB18* muestra una evidente disminución de la expresión en la mutante, lo que sugiere que ATX1 está involucrado en su activación bajo estrés. Aunque los genes *COR15A*, *RD29A* y *RD29B* disminuyen en la mutante, los resultados no fueron estadísticamente significativos (posiblemente debido a un reducido tamaño de muestra en Col-0) para confirmar que estos genes están regulados por ATX1 en la raíz. Sin embargo, sí existe una tendencia a ser regulados por la enzima; pues aquellos genes que claramente no lo estuvieron (*KIN2* y *NCED3*) no mostraron cambios en *atx1-3* respecto a las plantas silvestres. Asimismo, cabe destacar que, en todos los genes de respuesta que posiblemente están regulados por ATX1, su expresión se observa claramente limitada en la mutante, pero no inhibida por completo, por lo que se concluye que ATX1 está involucrada en la magnitud del incremento de los niveles de expresión, pero no en la activación desde las condiciones control. Para confirmar estos resultados se requiere aumentar el número de réplicas biológicas de Col-0 en un futuro.

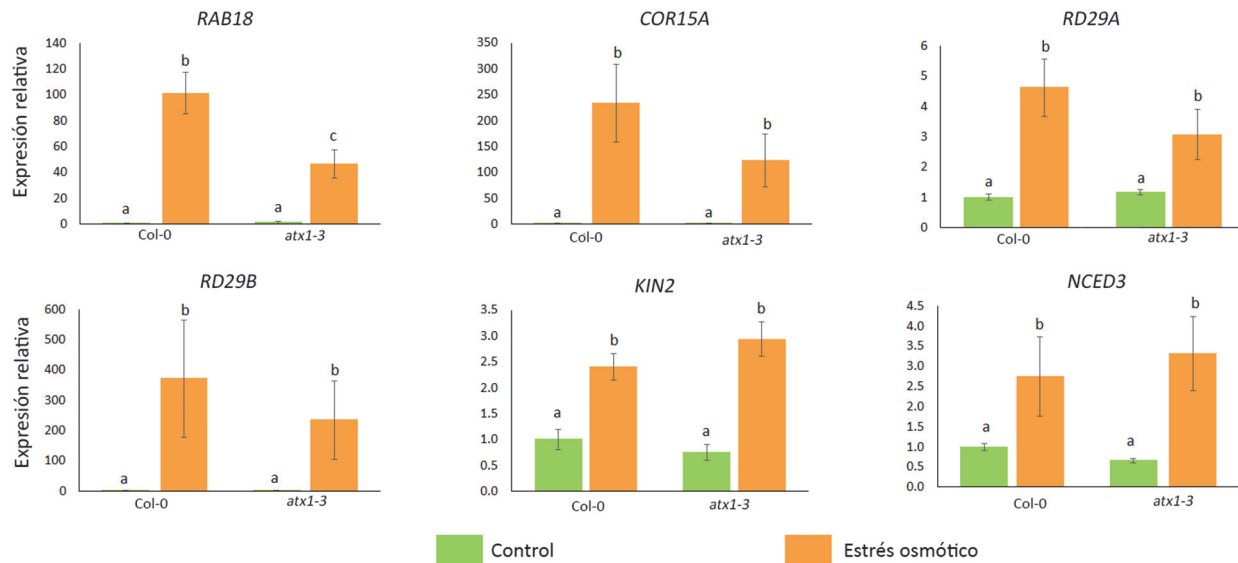


Figura 15. Expresión relativa de genes de respuesta a estrés en la mutante *atx-1*. Plantas silvestres (Col-0) y *atx1-3* de cinco días post-siembra fueron transferidas a 300 mM por 24 h para inducir estrés osmótico, las plantas control permanecieron ese tiempo en medio MS. La técnica de qPCR se realizó en los genes inducibles *RAB18*, *COR15A*, *RD29A*, *RD29B*, *KIN2* y *NCED3*. Los resultados de las condiciones control están normalizados con Col-0 control, y los de estrés osmótico fueron normalizados respecto a su propio control genotipo-específico. Las barras indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas para *atx1-3* y dos réplicas biológicas para Col-0, cada una con una réplica técnica. Las diferentes letras representan diferencias significativas para una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey ($p < 0.05$), que permite hacer comparaciones entre todas las muestras. Los genes normalizadores utilizados en este experimento se encuentran en la Fig. S4C.

7.5 Evaluación de la generación de memoria ante un segundo evento de estrés osmótico entre los diferentes genotipos.

Una posible respuesta después de la exposición al estrés es que las plantas se vuelvan más resistentes a una exposición futura, un fenómeno conocido como “priming”, “acondicionamiento” o “memoria” (Bruce *et al.*, 2007). Las respuestas diferenciales al estrés osmótico observadas entre los ecotipos, llevó a pensar si podrían generar respuestas distintas ante un segundo estímulo de estrés, lo que evaluaría la capacidad de memoria que presenta cada uno.

7.5.1 Respuesta fenotípica ante dos eventos de estrés entre los ecotipos.

Para evaluar los fenotipos de la raíz generados después de dos estímulos de estrés en los ecotipos de *Arabidopsis*, a plántulas de cinco días de crecimiento se les indujo un primer estrés por 24 h (1E 6d), seguido de un periodo de recuperación por dos días (R), para dar un subsecuente estímulo de estrés por otras 24 h (2E). Debido a que pasan por dos eventos de estrés de 24 h en diferentes etapas del desarrollo (cinco y ocho días post-siembra), fue importante tener presentes los controles que indicaran los efectos debido a la edad de las plantas (1E 6d y 1E 9d) (Fig. 16A).

Como se observa en la Fig. 16B, cuando ambos ecotipos son sometidos a dos eventos de estrés, su desarrollo radicular y aéreo se ven gravemente afectados respecto al control de nueve dps. Esto es debido a que la recuperación después de un primer evento estresante es muy lenta, y el segundo estímulo vuelve a retrasar el desarrollo de las plantas. Por tal razón, aunque las plantas 2E tienen la misma edad que las 1E 9d, su desarrollo aéreo y radicular es más semejante al de las plantas 1E 6d (Fig. 16B). Debido a esto, la comparación de las plantas 2E se hará respecto a las 1E 6d en los resultados siguientes; aunque no hay que dejar de lado que las plantas que pasan por un primer estrés de 24 h a los cinco (1E 6d) y ocho días (1E 9d), responden diferente al estrés (Fig. S6 y S9).

Para demostrar más claramente el efecto de la inducción a un segundo estrés, las plantas se dejaron recuperar por tres y seis días en MS después de cada uno de sus tratamientos. A pesar de que otro tipo de ensayos son necesarios para confirmar que fisiológicamente las plantas del segundo estrés son más tolerantes, en la Fig. 17 se observa que éstas tuvieron un área foliar mayor respecto a las plantas que sólo estuvieron expuestas a un primer estrés, y además la arquitectura

radicular fue altamente modificada, mostrando raíces laterales muy largas y una densidad mayor de pelos radiculares hacia la base. Estos resultados muestran que las plantas que fueron expuestas a un estrés previo adquieren caracteres morfológicos asociados a un incremento en el área de contacto entre la planta y el sustrato para aumentar la captura de agua, posiblemente relacionado con la capacidad de generar memoria.

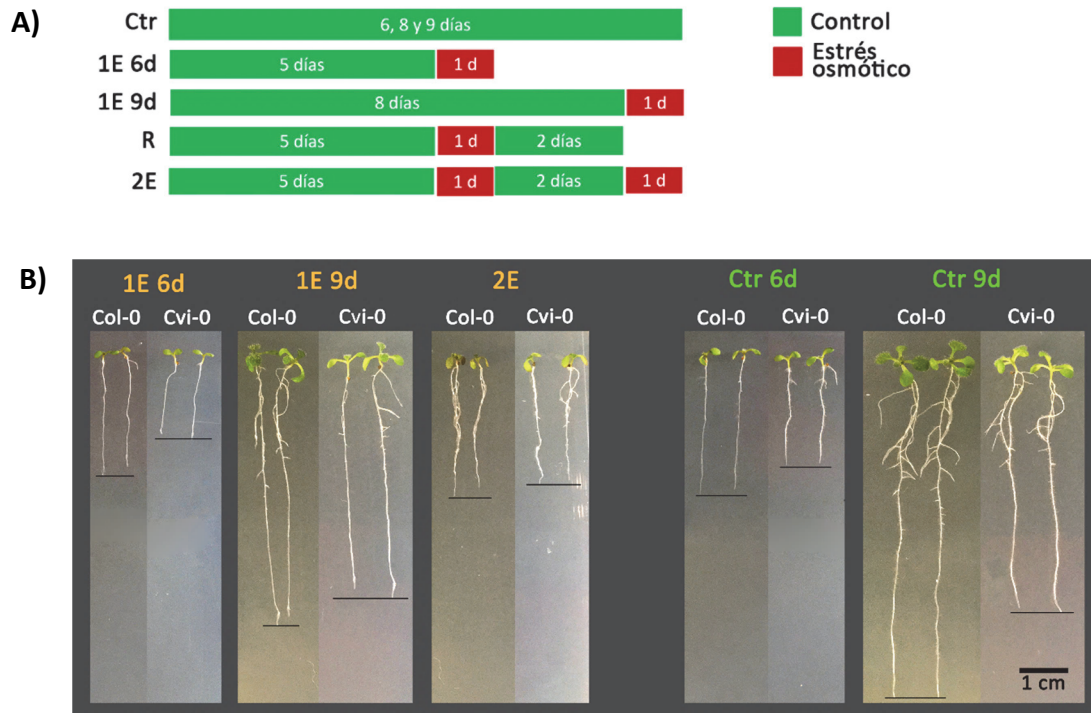


Figura 16. Fenotipo de Col-0 y Cvi-0 después de dos estímulos de estrés osmótico (2E) y sus respectivos controles. A) Diseño experimental de los tratamientos. Las plantas expuestas a un segundo estrés (2E) de 300 mM de manitol por 24 h fueron germinadas y crecidas por 5 días en MS para ser sometidas previamente a un primer estrés de igual magnitud con un periodo intermedio de recuperación por dos días (R). Las plantas control son aquellas que crecieron durante cinco días en MS y después fueron transferidas a un medio con 300 mM de manitol 300 durante 24 h (1E 6d) y las que crecieron en medio MS por ocho días y posteriormente se transfirieron a un medio con 300 mM de manitol por 24 h para su primer evento de estrés (1E 9d); así como los respectivos controles que nunca fueron expuestos al estrés y crecieron por seis, ocho y nueve días en MS (Ctr). d= día. (ver materiales y métodos) B) Desarrollo de las plantas Col-0 y Cvi-0 bajo los tratamientos anteriormente descritos. Resultado promedio de 3 réplicas biológicas con al menos 30 plantas en cada tratamiento para cada ecotipo.

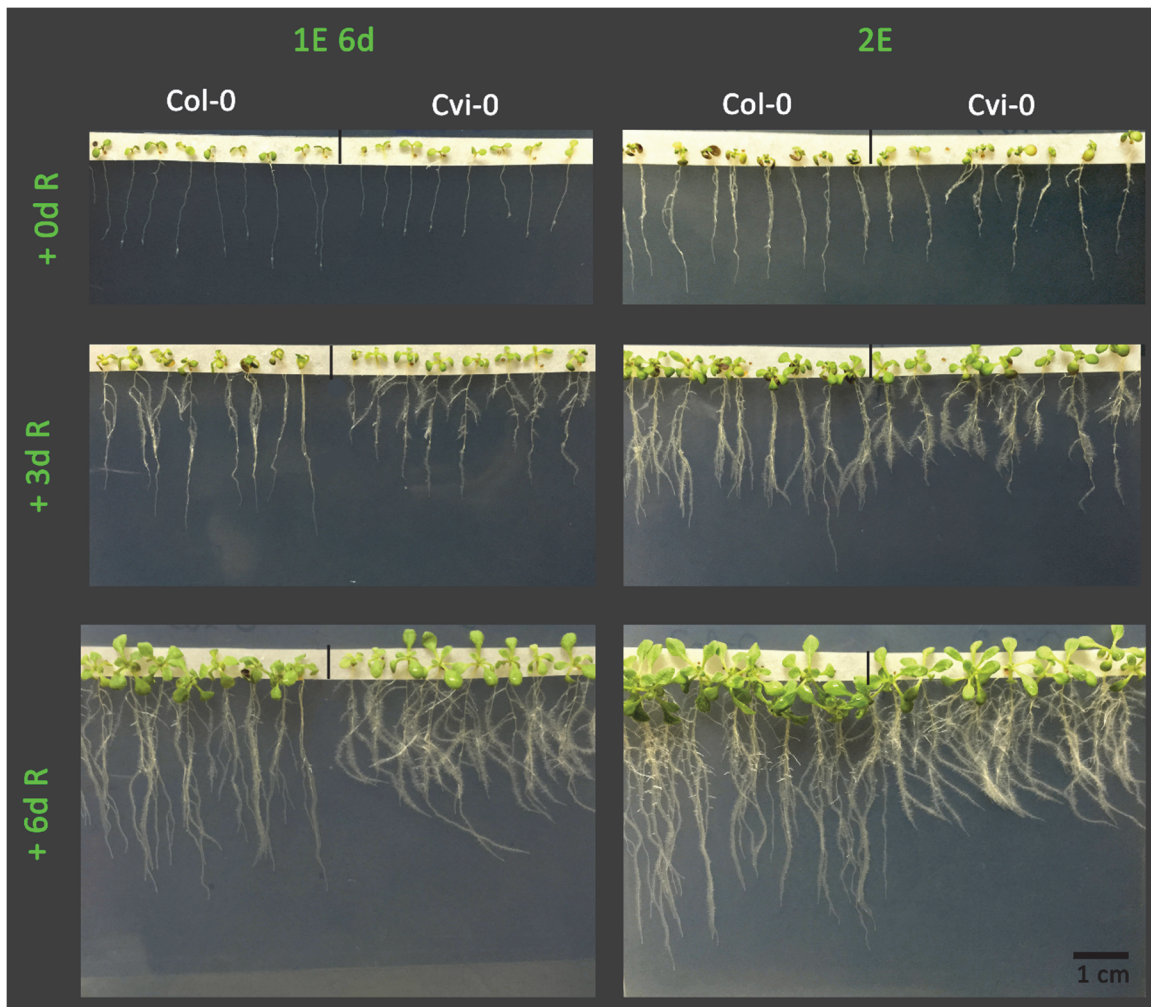


Figura 17. Recuperación de las plantas Col-0 y Cvi-0 que fueron expuestas a un segundo estímulo de estrés osmótico. Las plantas que fueron expuestas a un solo evento de estrés en 300 mM de manitol por 24 h (1E 6d) y las del segundo estrés (2E) fueron recuperadas posteriormente en MS por tres días (+3d R) y seis días (+6d R). Resultado promedio de 1 muestreo biológico con n=10 en cada tratamiento para cada ecotipo.

7.5.2 Morfología de la “cicatriz” en respuesta a un segundo estímulo de estrés osmótico.

Como se demostró en el resultado anterior, al someter las plantas al segundo evento de estrés, éstas generaron cambios en la arquitectura radicular que estarían posiblemente asociados a una mayor tolerancia. Para indagar más acerca de las respuestas que genera la raíz, se evaluó la morfología de la “cicatriz”, comparando las plantas que recibieron dos estímulos (2E) respecto a las que sólo fueron expuestas a un primer estrés (1E 6d).

Como se describió en la Figura 9B, las plantas Col-0 sometidas a un primer estrés (1E 6d) presentaron en mayor frecuencia el fenotipo A. Sin embargo, cuando éstas fueron transferidas a un segundo estrés por 24 h (2E), la respuesta que originaron fue diferente, pues aumentaron las frecuencias de los fenotipos B y C, que son muy contrastantes; pues uno presenta pelos radiculares largos y el otro, pelos radiculares cortos, respectivamente. Estos resultados sugieren que las plantas de Col-0 responden diferencialmente a dos eventos de estrés consecutivos, y que la diversidad de respuestas aumenta cuando fueron expuestas a un estrés previo.

Por el contrario, en el caso del ecotipo Cvi-0, la mayor proporción de plantas que fueron sometidas a un primer estrés (1E 6d) y a un segundo estímulo (2E), presentaron en mayor frecuencia el fenotipo D (Fig. 18D). Este fenotipo de pelos radiculares más largos podría reflejar la capacidad de ajuste osmótico más veloz, y debido a que Cvi-0 es un ecotipo más resistente, presentó este mecanismo desde el primer estrés y lo conservó en el segundo estímulo.

Asimismo, no se puede descartar que el desarrollo afecta la formación de la “cicatriz”, pues las plantas Col-0 que fueron sometidas a un primer estrés a una edad más tardía (1E 9d), no presentaron una morfología que sobresaliera por sobre los demás, sino que los fenotipos B, C y D estuvieron en frecuencias muy similares. Asimismo, en Cvi-0 la respuesta es dependiente de la etapa de desarrollo, pues las 1E 9d presentaron en mayor proporción el fenotipo C, caracterizado por tener pelos cortos (Fig. S9).

Una variable adicional que sería muy interesante evaluar en estudios futuros es la densidad de pelos radiculares durante estos tratamientos, pues podría ser un parámetro que varía como respuesta a un segundo evento de estrés.

Adicionalmente, se observó que en ambos ecotipos las plantas expuestas a un segundo estrés presentaron tres “cicatrices”: la primera corresponde al primer estrés, la segunda se genera cuando las plantas se someten a la recuperación en MS y la tercera se forma como respuesta al segundo estrés (Fig. 18C). Estos resultados sugieren que la generación de la “cicatriz” se da en respuesta a un cambio osmótico que puede ir en ambos sentidos: hacia un medio con mayor o menor potencial osmótico, no únicamente cuando se induce una falta de disponibilidad de agua. Este resultado refuerza la hipótesis de la formación de pelos radiculares ectópicos como consecuencia del ajuste osmótico, pues es un fenómeno que sucede ante cambios osmóticos, que podría ser resultado de la entrada de agua a las células radiculares. Acerca de esto, se profundizará más en la discusión.

Debido a que Duan *et al.* (2010) observaron que bajo estrés osmótico las raíces laterales en recuperación después de un primer estrés presentan una mayor tolerancia que aquellas que nunca estuvieron expuestas, se decidió evaluar la morfología de las raíces laterales durante los tratamientos. Interesantemente, en todos los genotipos, durante el primer estrés no se observó ninguna planta que presentara pelos radiculares en sus primordios emergentes o raíces laterales jóvenes (Fig.19); sin embargo, cuando las plantas fueron transferidas nuevamente a MS por dos días (plantas en recuperación) algunas de las raíces laterales que apenas están formándose en medio MS presentaron un desarrollo prematuro de pelos radiculares, que estaba totalmente ausente en las plantas control (Fig. 19). Esto podría indicar que a pesar de que las plantas ya no se encuentren en un medio estresante y las raíces laterales nunca estuvieron expuestas al estrés, puesto que éstas están recién formadas, generan un tipo de memoria que posiblemente les ofrezca la ventaja de estar preparadas a través del aumento de pelos radiculares que les permitiría absorber una mayor cantidad de agua a estímulos subsecuentes.

Se sabe que el tiempo en que las células del periciclo dejan de formar parte de la zona meristemática y comienzan el desarrollo para formar los primordios de raíces laterales (etapa II y III) es de 13.6 a 16 h en Col-0 (Dubrovsky *et al.*, 2000); y, también se ha estudiado que la ventana de tiempo para que se lleve a cabo la iniciación de las raíces laterales es de 10.4 h aproximadamente en Col-0 (Dubrovsky *et al.*, 2006). Por lo tanto, para confirmar que los primordios y las raíces laterales jóvenes que presentan pelos radiculares prematuros nunca estuvieron expuestas al estrés, se mantuvieron plantas durante 4 días en recuperación en medio

MS. Aunque a esta edad (10 días post-siembra) la presencia de raíces laterales jóvenes fue muy escasa, se logró observar en Cvi-0 el fenómeno de una posible memoria en las raíces laterales, pues las más jóvenes presentaron pelos radiculares prematuros (Fig. S11). Asimismo, en comparación con el primer estrés, en el segundo estrés todos los genotipos también presentaron pelos radiculares prematuros en las raíces laterales jóvenes, lo cual ratifica una posible memoria generada en aquellas plantas que fueron expuestas previamente al estrés osmótico (Fig.19).

7.5.3 Implicaciones epigenéticas en el desarrollo de la “cicatriz” en respuesta a un segundo estímulo osmótico.

En los ensayos de estímulos subsecuentes de estrés osmótico, también se analizó a la mutante *atx1-3* (fondo Col-0), pues ATX-1 es la enzima que coloca la marca de activación transcripcional H3K4me3 en las histonas y que se ha visto involucrada en la generación de memoria epigenética para lograr responder más rápido o más eficientemente a un segundo estrés (Ding *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012), así como la mutante *clf-29* (fondo Col-0), pues CLF es la enzima antagónica de ATX-1 que se encarga de colocar la marca de represión transcripcional H3K27me3 en las histonas y aunque en menor medida, se ha reportado involucrada en la memoria bajo estrés hipersalino (Sani *et al.*, 2013). Además, previamente se observó que las plantas que carecen de la enzima ATX1 son más resistentes al estrés osmótico; al contrario de las plantas mutantes *clf-29*, que son más sensibles (Fig. 7); por lo que estudiar su respuesta bajo un segundo estrés podría arrojar más información sobre su relevancia en la regulación de memoria.

Cuando la mutante *atx1-3* es sometida al primer estrés osmótico se observaron tres fenotipos en proporciones muy similares a las plantas silvestres (Col-0), excepto que se presentó una menor frecuencia del fenotipo A, que es la más abundante en Col-0. Cuando las plantas fueron sometidas a un segundo evento de estrés, en *atx1-3*, al igual que en las plantas silvestres, el fenotipo más frecuente fue el B y el D (Fig. 18D), caracterizados por poseer pelos radiculares más largos.

El caso de la mutante *clf* es muy interesante, pues mientras en un primer estrés el fenotipo más abundante fue el B, ante un segundo estrés generó el patrón contrario en mayor proporción, que fue una “cicatriz” restringida con pelos cortos (fenotipo C). Por lo tanto, esto podría sugerir

que la pérdida de CLF, impide el ajuste osmótico más rápido ante un segundo estrés, y como consecuencia, los pelos se desarrollan más lentamente y se observan cortos a las 24 h. Asimismo, al igual que en las plantas silvestres, la morfología de las mutantes depende del tiempo de desarrollo, pues los fenotipos cambiaron en las plantas 1E 6d y 1E 9d (Fig. S9). Otro aspecto que vale la pena mencionar, es que sólo en las mutantes se encontraron fenotipos que carecen de pelos radiculares (Fig. 18D y Fig. S9), lo que sugiere que estas enzimas al estar involucradas en tantos mecanismos de respuesta a estrés, generan una diversidad sumamente amplia de fenotipos entre los individuos.

En cuanto a la formación de pelos prematuros en las raíces laterales, los resultados fueron idénticos al de las plantas silvestres; por lo que se concluye que estas enzimas no están involucradas en la memoria de generación de pelos radiculares en las raíces laterales.

Aún se desconoce si la formación del nuevo meristemo que dará origen a las raíces laterales se debe a una desdiferenciación y posterior rediferenciación de las células del periciclo, o se forma a partir de células que siempre se mantuvieron indiferenciadas (Van Norman *et al.*, 2013). Si la primera teoría de desdiferenciación es cierta, el hecho de que las raíces laterales sean capaces de guardar la memoria sobrepasando esta etapa de borrado es fascinante, y merecería una mayor cantidad de estudios al respecto.

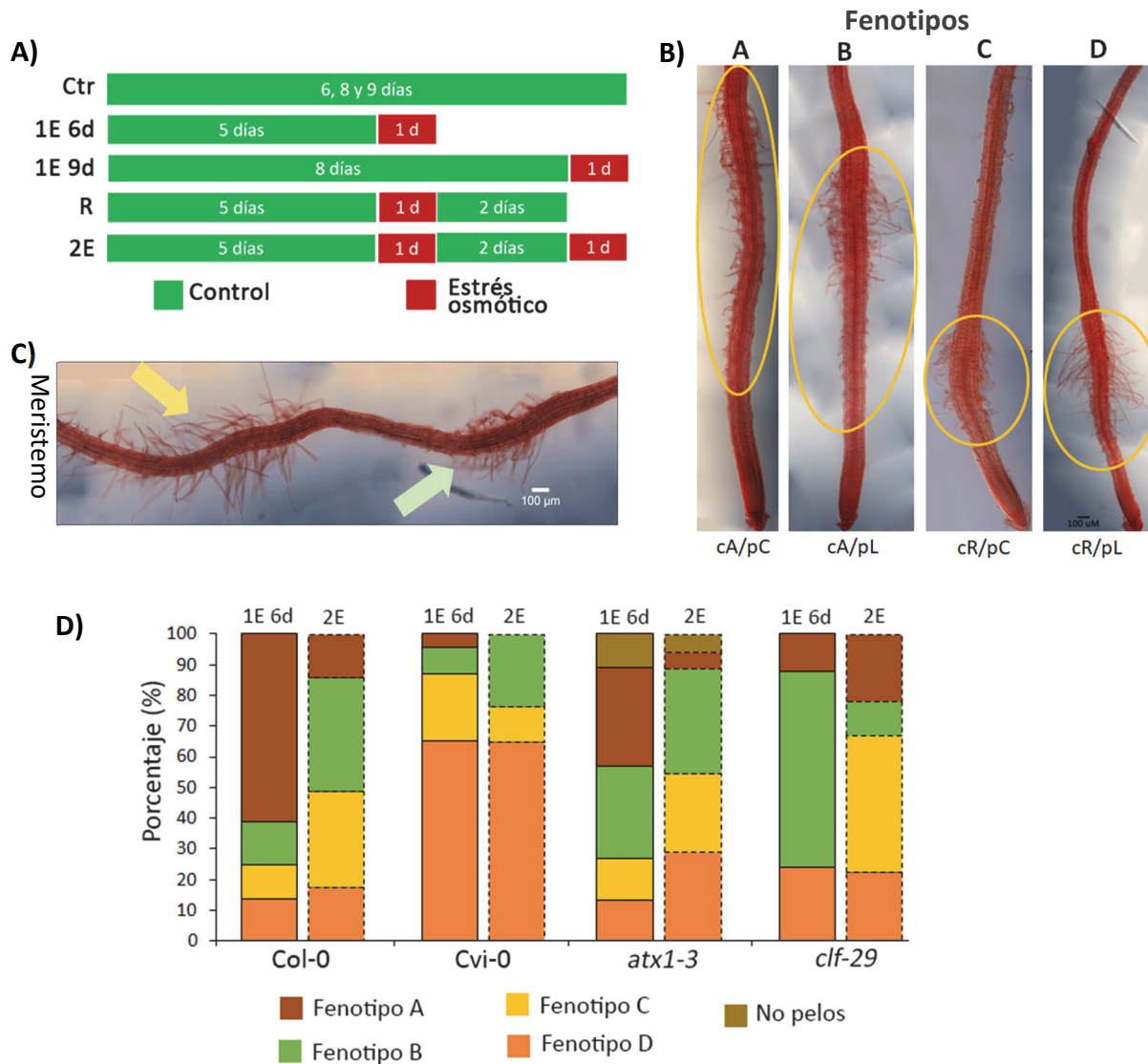


Figura 18. Diversidad morfológica de la “cicatriz” entre los ecotipos Col-0 y Cvi-0, y las mutantes *atx1-3* y *clf-29* ante dos eventos de estrés osmótico. A) Diseño experimental de los tratamientos (revisar materiales y métodos); B) Los cuatro fenotipos observados durante los eventos de estrés (A-D). cA= cicatriz amplia, cR= cicatriz restringida, pC= pelos cortos, pL= pelos largos; C) En las plantas expuestas a dos eventos de estrés, se puede observar señalada con una flecha verde la cicatriz generada en el primer evento de estrés y, con una flecha amarilla, la cicatriz generada cuando son transferidas a recuperación en MS. En la figura está señalada la dirección donde se encuentra el meristemo; D) Frecuencia de los diferentes fenotipos que se generan durante el primer estrés (1E 6d) y el segundo estrés (2E). Las morfologías particulares de cada genotipo están representadas en la Fig. S8. Resultado de tres réplicas biológicas para Col-0 y *atx1-3* (n=30) y dos réplicas biológicas para Cvi-0 y *clf-29* (n=20).

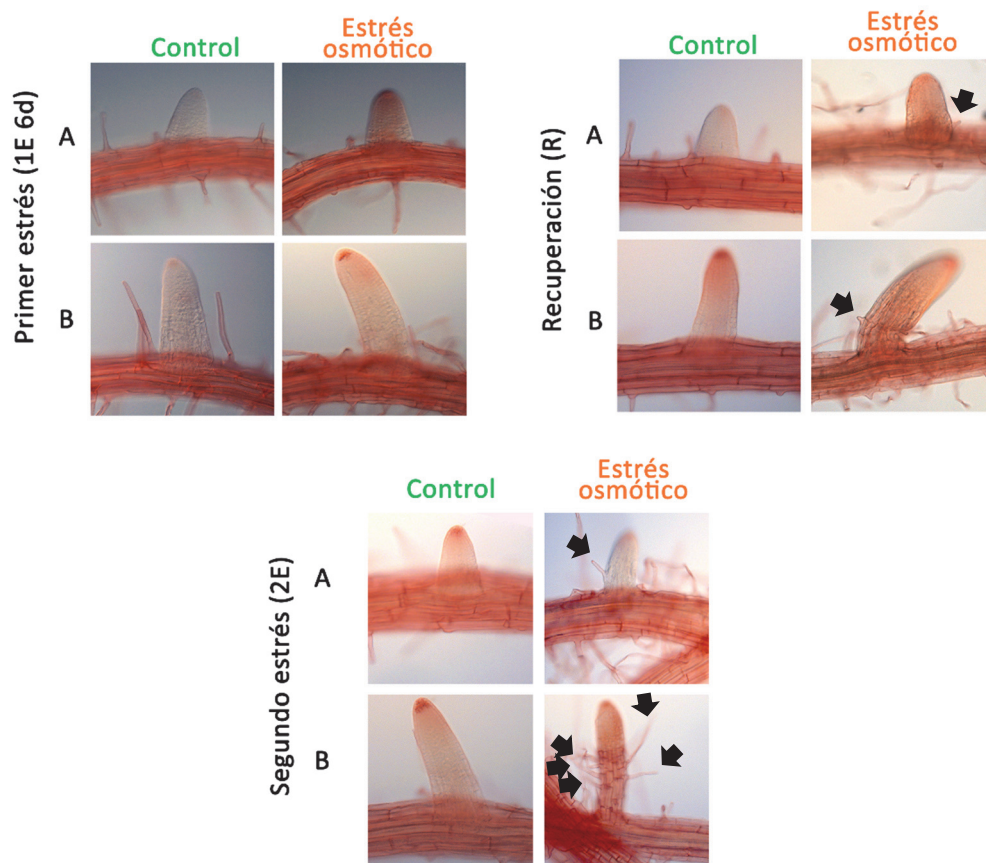


Figura 19. Formación de pelos radiculares prematuros en las raíces laterales jóvenes en respuesta a la generación de memoria al estrés osmótico. Plántulas de Col-0 de cinco días post-siembra fueron expuestas a estrés osmótico con 300 mM de manitol por 24 h (1E 6d), recuperación de 48 h en MS (R) y segundo estrés de la misma magnitud (2E). El panel A muestra raíces laterales más jóvenes que el panel B. Las flechas señalan la presencia de pelos prematuros en las raíces. Esquema representativo de lo que sucede en Col-0, Cvi-0, *atx1-3* y *clf-29*. Los fenotipos particulares de cada genotipo se encuentran en la Fig. S10.

Los estudios anteriores demostraron que existe variación morfológica en respuesta a un segundo estímulo de estrés osmótico entre los genotipos; por lo tanto, conocer los mecanismos moleculares que están interviniendo es esencial para el estudio integral de las respuestas diferenciales entre estos.

7.5.4 La regulación de ATX1 en los genes de respuesta ante un segundo estímulo de estrés osmótico.

Se ha demostrado previamente que, durante un segundo estrés por deshidratación, los genes llamados “no entrenables” presentan los mismos niveles de expresión respecto al primer estímulo; en contraste, los genes considerados “entrenables” elevan súbitamente su expresión en el segundo estrés, como respuesta a una posible “memoria” (Ding *et al.*, 2012). Sin embargo, estos estudios sólo han sido realizados en planta completa, donde las respuestas de la parte aérea encubren lo que sucede en la raíz. Considerando los diferentes fenotipos observados entre un primer y segundo estímulo de 24 h, se decidió evaluar los niveles transcripcionales de genes de respuesta a estrés en las plantas silvestres (Col-0) y la mutante *atx1-3* durante un primer y segundo evento de estrés.

Para poder comparar estos resultados con los datos morfológicos y, debido a que los resultados de la Figs. 13 y 14 muestran que los genes *RAB18* y *RD29B* (demostrados como genes “entrenables” para estrés por deshidratación por Ding *et al.*, 2012) tienen mayor expresión a las 24 h, se realizaron qPCRs de tejido radicular a las 24 h de estrés, seguidas de dos días de recuperación, pues en el mismo estudio expuesto anteriormente, se demostró que la memoria se mantiene hasta los cinco días de recuperación (Ding *et al.*, 2012).

Cuando las plantas 2E son expuestas a un primer estímulo, el nivel de expresión de sus genes de respuesta debe ser idéntico al de las plantas 1E 6d; pero la expresión puede variar en un segundo estrés, dependiendo de su capacidad de generar memoria transcripcional. Los resultados indicaron que, bajo un segundo evento de estrés, la respuesta no fue significativamente diferente a la de las plantas expuestas a un solo estímulo. Es decir, al contrario de lo que sucede en hoja bajo estrés por deshidratación, en la raíz no se presentó una mayor expresión bajo en segundo estrés. De hecho, aunque los resultados no fueron significativos, en los genes *RAB18* y *RD29B*

(“entrenables”) incluso hubo una tendencia a que su expresión disminuyera bajo un segundo estrés osmótico en Col-0 (Fig. 20). Para corroborar si otros genes muestran este mismo comportamiento, se evaluaron los genes de respuesta *ABI1*, *AREB1*, *DREB2A* y *LEA4.5* (Fig. S7); ninguno de ellos presentó la memoria característica observado por Ding *et al.* (2013). Asimismo, hay que mencionar que, aunque las plantas expuestas en diferentes etapas del desarrollo a un primer estrés (1E 6d y 1E 9d) presentaron cambios morfológicos, el único gen con niveles transcripcionales diferenciales fue *COR15A* (Fig. S6), por lo que se concluye que la edad no es un factor influyente en la mayoría de los genes de respuesta evaluados.

En cuanto a la regulación por ATX1, los resultados de la Fig. 20 muestran que los genes *COR15A* y *RAB18* fueron regulados por ATX1 tanto en el primer como en el segundo evento de estrés osmótico. Esta misma tendencia, aunque no es significativa, se observó en los genes *RD29A* y *RD29B*, donde la expresión de la mutante se vio comprometida en ambos estímulos. En contraste, los genes *NCED3* y *KIN2* mostraron los mismos niveles de expresión en plantas Col-0 que en la mutante *atx1-3*, lo que permite concluir que bajo estrés osmótico no están regulados por la acción de esta enzima sobre la cromatina.

En conjunto, estos resultados indican que la función de ATX1 es necesaria para la correcta expresión de estos genes bajo un primer y segundo estímulo de estrés osmótico.

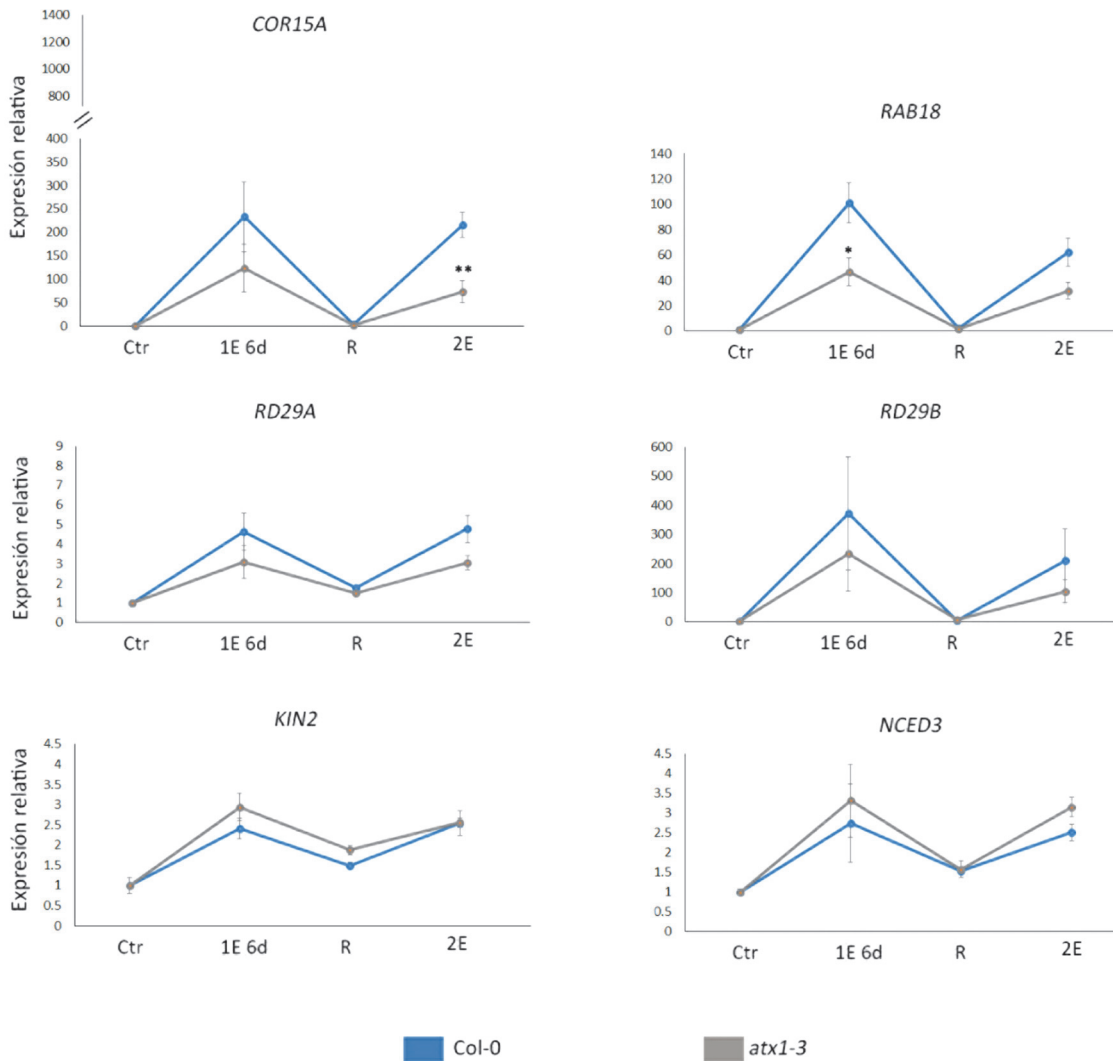


Figura 20. Patrones de expresión de genes de respuesta en raíces expuestas a un segundo estímulo de estrés osmótico, y el papel de ATX1 en su regulación. La técnica de qPCR se realizó en los genes inducibles *COR15A*, *RAB18*, *RD29A*, *RD29B*, *KIN2* y *NCED3*. Todos los resultados de las plantas silvestres (Col-0) están normalizados respecto a Col-0 control (Ctr) y todos los de *atx1-3* están normalizados respecto a *atx1-3* control (Ctr). Las barras indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas para *atx-1* y dos réplicas biológicas para Col-0, cada una con una réplica técnica. Los asteriscos simbolizan diferencias significativas entre Col-0 y *atx-1* en ese tratamiento. Prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*). Los genes normalizadores de este experimento se encuentran en la Fig. S4D.

8. DISCUSIÓN

Las plantas están expuestas continuamente a factores que amenazan su homeostasis, por lo que su capacidad de percibir el ambiente y responder adecuadamente ante las adversidades es lo que define la diferencia entre la vida y la muerte. La deshidratación, el factor abiótico más importante para la producción agrícola, es un tipo de estrés muy complejo que tiene consecuencias a nivel morfológico, fisiológico, genético y epigenético (Farooq *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2015; Janiak *et al.*, 2016). Estas consecuencias son variables dependiendo de la especie y la estrategia de vida, pero también se pueden encontrar diferencias dentro de una misma especie, *i.e.*, en las variedades naturales o ecotipos, debido a que las poblaciones que se originan en diversos lugares geográficos han estado sujetos a selecciones de presión diferenciales que les ha permitido evolucionar para adaptarse a su ambiente en particular (Verslues y Juenger, 2011). Por lo tanto, el estudio de la variación natural bajo estrés puede ser una herramienta útil y poderosa para comprender toda la gama de respuestas que poseen las plantas de forma silvestre.

En este trabajo, a través del uso de dos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y Cvi-0, se evaluaron las respuestas diferenciales ante el estrés osmótico mediano-severo en etapas tempranas del desarrollo; así como la influencia de los factores epigenéticos ATX1 y CLF en las respuestas que generan las plantas ante el estrés.

8.1 La tolerancia de Cvi-0 al estrés osmótico.

La habilidad de producir semillas es una adaptación de algunas plantas terrestres que les permitió controlar exitosamente su dispersión y posterior germinación para establecerse sólo cuando las condiciones son favorables para la supervivencia de la especie. Es decir, la semilla es capaz de percibir el ambiente y comenzar el proceso de germinación y desarrollo cuando se presentan concentraciones de agua favorables; sin embargo, el proceso de germinación de algunas semillas puede presentar cierto grado de tolerancia a la deshidratación, aunque los mecanismos involucrados aún no se comprenden por completo (Vallejo *et al.*, 2010).

En este trabajo, se observó que casi el 100% de las semillas de ambos ecotipos rompieron la testa en las condiciones de estrés osmótico probadas. Este fenómeno fue descrito también por

Claeys *et al.* (2014) y Kazachkova *et al.* (2016), donde reportan que la tasa de germinación no fue afectada en *Arabidopsis* usando una concentración de 300 mM de manitol. Esto puede ser debido a que se ha demostrado que la hormona ABA (involucrada en la señalización de estrés hídrico y osmótico) no inhibe la ruptura de la testa, sino más bien la ruptura del endospermo que da lugar a la liberación de la radícula. Es decir, el estrés osmótico afecta directamente la fase de transición entre la germinación y el crecimiento post-germinación (Muller *et al.*, 2006). Esto puede ser la causa de lo observado en el ecotipo Cvi-0, porque a pesar de que casi todas las semillas rompieron la testa desde el primer día, su desarrollo radicular fue muy lento en comparación con Col-0, ya que hasta los ocho días apenas alcanzó los dos mm de longitud. En este mismo sentido, Vallejo *et al.* (2010) reportaron que la germinación en Cvi mostró la mayor sensibilidad de respuesta a polietilenglicol (PEG), que también induce estrés osmótico.

Estos resultados aparentan ser contradictorios a la tolerancia observada de Cvi-0 en este trabajo; no obstante, estudios anteriores realizados con variedades de la especie *Brassica napus* (evolutivamente cercana a *Arabidopsis*, ambas de la familia Brassicaceae) han demostrado que las variantes Toccata y Saturnin, sensibles al estrés osmótico durante la germinación, resultaron ser más tolerantes en etapas posteriores del desarrollo, que las otras variedades categorizadas como resistentes durante la germinación (Pace y Benincasa, 2010). Este estudio rememora los resultados observados en Cvi-0 y alerta sobre la importancia de evaluar otros aspectos fisiológicos, pues una alta tasa de germinación no necesariamente implica tolerancia en las siguientes etapas de desarrollo (Verslues *et al.*, 2006); por lo tanto, otras respuestas morfológicas como la apariencia de las hojas, la longitud y morfología radicular fueron evaluadas en ambos ecotipos.

En las hojas, cuando hay un estrés hídrico, los ajustes osmóticos ocurren más lentamente que en las raíces (Hsiao y Xu, 2000), y éstas se ven afectadas mostrando una evidente reducción en su tasa de crecimiento y, por ende, en el área foliar (Claeys *et al.*, 2014). Los genotipos que son capaces de sobrevivir a condiciones de baja disponibilidad de agua muestran mayor biomasa en las hojas, por lo que observar este órgano es un buen indicador del estado en el que se encuentra la planta (Verslues *et al.*, 2006). Cuando los ecotipos fueron sometidos a 300 mM de manitol por un tiempo prolongado (19 días), se observa claramente que la deshidratación del tejido foliar en Col-0 causó la muerte de la mayoría de sus hojas; en cambio, las hojas de Cvi-0 permanecieron verdes y turgentes. Cuando fueron sometidas a 400 mM de manitol por 32 días, la respuesta de

Col-0 es muy similar, pero en Cvi-0 aunque las hojas son más grandes y turgentes, su coloración se modifica de verde a morado. La pérdida de clorofila durante el estrés hídrico es la causa de este cambio, pues ayuda a reducir el daño foto-oxidativo, que ocurre cuando la fotosíntesis es inhibida (Chen *et al.*, 2015); y la coloración morada se debe a la producción de antocianinas, pigmentos inducidos en respuesta al estrés abiótico que se correlacionan con un aumento en la tolerancia, pues funcionan como foto-protectores, antioxidantes y señalizadores del estrés (Kovinich *et al.*, 2015).

Dado que éste es el primer trabajo en el que se reporta que Cvi-0 es más tolerante al estrés osmótico que Col-0, los mecanismos involucrados en su mayor capacidad de tolerancia se desconocen; sin embargo, las respuestas bajo otros tipos de estrés se han evaluado en este ecotipo. Por ejemplo, en estrés por saturación de CO₂, Cvi-0 mantiene una mayor tasa fotosintética y no presenta perturbaciones en el metabolismo del nitrógeno en comparación con Col-0 (Li *et al.*, 2008). Además, Bouchabke *et al.* (2008) demostraron que Cvi-0 tiene la capacidad de mantener su contenido de agua inalterable bajo estrés hídrico respecto al control, a pesar de que es el ecotipo que presenta la mayor pérdida de agua, incluso en condiciones hidratadas. Esto puede ser debido a que en Cvi-0 los estomas permanecen más abiertos respecto a Col-0, lo que aumenta la transpiración, pero también el intercambio gaseoso para mantener los niveles fotosintéticos elevados y evitar el sobrecalentamiento del tejido (Monda *et al.*, 2011). Respecto a esto, Chen *et al.* (2015) demostraron en maíz que, entre varios parámetros, la capacidad de mantener un alto potencial hídrico y no presentar alteraciones en la proporción de carbono/nitrógeno durante el estrés contribuye a la resistencia que tiene implicaciones en la adaptación de las plantas. De acuerdo con lo descrito anteriormente, es posible que también estos sean los mecanismos que utiliza el ecotipo Cvi-0 durante el estrés osmótico para presentar una mayor tolerancia respecto a Col-0.

Otra evidencia que sustenta su mayor resistencia, fue la alta capacidad de recuperación del ecotipo Cvi-0, lo cual puede influir en la adaptación a climas variables. De hecho, Chen *et al.* (2015) demostraron que la adaptación al estrés hídrico está más relacionada con la recuperación que con la resistencia, y que el parámetro más importante para favorecer la recuperación fue mantener un contenido alto de clorofila y la estabilidad del sistema fotosintético; los cuales podrían ser mecanismos que están favorecidos en el ecotipo Cvi-0.

Aunque lo ideal sería realizar estudios que involucren el análisis de parámetros fisiológicos bajo estrés osmótico; estos datos en conjunto, comprueban la tolerancia del ecotipo Cvi-0 sobre Col-0, que podría tener implicaciones adaptativas al ambiente árido en el que habita originalmente.

8.2 Modificaciones en la arquitectura de la raíz y su asociación con la tolerancia al estrés osmótico.

Cuando las plantas se encuentran bajo estrés hídrico, el crecimiento de las hojas y la raíz debe coordinarse dinámicamente para lograr la supervivencia de todo el sistema. A pesar de que la raíz es el primer órgano que está expuesto al déficit hídrico y que origina una serie de respuestas para disminuir los efectos adversos en toda la planta (Turner y Jones, 1980; Hsiao y Xu, 2000; Wasson *et al.*, 2012), su estudio ha sido escaso en comparación con los análisis realizados en las hojas durante el estrés. Por lo tanto, los análisis específicos de la arquitectura radicular son fundamentales para integrar todas las respuestas órgano-específicas que las plantas utilizan para sobrellevar el estrés.

Como se demostró en los análisis de cinética, la longitud radicular de las plantas crecidas en estrés osmótico disminuye más de un 45% en ambos ecotipos. Esto puede ser debido a que las células pierden turgencia por la salida del agua, y las células de la zona de elongación entran en un estado de quiescencia; aunque posteriormente la producción de osmolitos promueve el ajuste osmótico, el crecimiento de la raíz se recupera a una menor tasa (Feng *et al.*, 2016); tal y como ha sido reportado para el caso de estrés salino (Geng *et al.*, 2013). Al comparar ambos ecotipos en condiciones control, es claro que la tasa de crecimiento radicular de Cvi-0 es más lenta de forma natural respecto a Col-0. No obstante, durante el estrés osmótico, la tasa de crecimiento de Cvi-0 es comparable a la de Col-0; es decir, mientras que la de Col-0 cambia drásticamente, la de Cvi-0 se observa menos alterada respecto a sus respectivos controles, lo que puede ser un reflejo de la capacidad de tolerancia de su sistema radicular. Este resultado se confirma en el ensayo de estrés prolongado, donde se observa que incluso a los 19 o 32 días bajo estrés, la longitud de la raíz principal es muy similar a la de Col-0.

Para poder comprender la base de la plasticidad a las condiciones adversas, es necesario el estudio de los mecanismos celulares que determinan la arquitectura radicular. En las plantas

control, una característica que sucede como resultado de la diferenciación es el desarrollo de los pelos radiculares distalmente del meristemo (Ivanov y Dubrovsky, 2013). En algunos procesos de estrés, como el déficit de fosfatos, el agotamiento del meristemo genera la pérdida de su potencial proliferativo, produciendo una diferenciación prematura de pelos radiculares que se observan muy próximos a la punta de la raíz y continúan a lo largo de todo el eje de la raíz principal (Sanchez-Calderon *et al.*, 2005). No obstante, bajo estrés osmótico, la formación de los pelos radiculares (“cicatriz”) no parece ser resultado de una diferenciación prematura, pues sucede en un sitio acotado de la zona de transición y/o elongación, rodeado por la ausencia de pelos radiculares; hasta que más distalmente se encuentra la zona de diferenciación, aparentemente normal. Además, bajo estrés osmótico (300 mM de manitol), donde se observa claramente la formación de la “cicatriz”, no se agota el meristemo y la raíz continúa su desarrollo.

Una de las preguntas más interesantes por contestar es la causa de la formación de la “cicatriz”, y los resultados de este trabajo son de utilidad para indagar más acerca de su función. Por ejemplo, en los análisis de germinación, se visualizó que cuando las plantas son germinadas bajo estrés osmótico y permanecen en esa condición por varios días, las raíces no presentan “cicatriz” (Fig. S12). Asimismo, en los análisis de generación de memoria por medio de un segundo estímulo osmótico, se observó que cuando las plantas son recuperadas en medio MS (mayor potencial osmótico), éstas vuelven a generar pelos abundantes en la zona de elongación, y los forman de nuevo cuando son transferidas a un segundo evento de estrés (menor potencial osmótico). Estos resultados concluyen que la formación de “cicatriz” se produce sólo cuando hay cambios osmóticos después de la germinación, independientemente de la magnitud de potencial al que se sometan.

Una hipótesis generada a partir de este proyecto, es que en las plantas sometidas a estrés osmótico, la generación de pelos radiculares podría ser una respuesta al ajuste osmótico, más que a la falta de disponibilidad de agua. La posible explicación es la siguiente: cuando las plantas son transferidas a estrés osmótico, el agua celular sale y la célula pierde turgencia, lo que impide la total expansión de las células que están próximas a elongar; razón por la cual exhiben un tamaño muy reducido en la “cicatriz”. Al cabo de unas horas, cuando se lleva a cabo el ajuste osmótico gracias a la síntesis de moléculas orgánicas y el ingreso de moléculas inorgánicas (osmolitos), el agua comienza a entrar y se crea una presión hidrostática interna (turgencia) que es necesaria para

la expansión de las células de la epidermis. Como resultado de esa expansión, se generan pelos radiculares en esa zona mientras la planta continúe creciendo. Esta hipótesis va en sentido con lo mencionado por Lew (1996), acerca de que el desarrollo de pelos radiculares implica que la actividad de transporte de osmolitos está manteniendo la turgencia para generar expansión celular.

Otra evidencia que apoya esta hipótesis se muestra en la ausencia de pelos radiculares en las plantas sometidas a 400 y 500 mM de manitol por 24 h; dado que, bajo esta condición tan severa, el ajuste osmótico no es óptimo y la raíz detiene su desarrollo. El resultado es una “cicatriz” con células muy cortas, incapaces de elongar en ausencia de agua y carente de pelos radiculares (Fig. S13), ya que no logran el ajuste osmótico para continuar expandiéndose. Esto provoca que en 500 mM de manitol el desarrollo radicular se detenga por completo; pero en la concentración de 400 mM de manitol es probable que el ajuste osmótico ocurra después de las 24 h, pues ya se ha visto que las raíces retoman su crecimiento muy lentamente. Sería interesante evaluar si después de ese tiempo, se genera la formación de “cicatriz” en las plantas como resultado del ajuste osmótico tardío. Por lo tanto, en este trabajo se propone que la generación de pelos radiculares se observa sólo en las plantas que lograron el ajuste osmótico y la zona de elongación es capaz de recuperar el crecimiento gradualmente para que las raíces puedan absorber agua y continuar con su desarrollo.

En el ecotipo Cvi-0, se observó que la generación de pelos radiculares se da desde las ocho horas bajo estrés osmótico, mientras que la de Col-0 es una respuesta más tardía. El hecho de que los pelos radiculares comiencen a formarse con anterioridad en Cvi-0 explicaría que este ecotipo es capaz de lograr el ajuste osmótico antes que Col-0, lo que posiblemente se asocia con una mayor tolerancia radicular. Estos resultados van en sentido con lo reportado por Geng *et al.* (2013), donde visualizan que las raíces sometidas a estrés salino, salen de un estado quiescente a las ocho horas para comenzar a recuperar su desarrollo, hasta entrar en un nuevo estado homeostático donde la tasa de crecimiento se vuelve estable. Otro resultado que se reportó en este artículo es que la fase de recuperación se da en tiempos diferentes entre Col-0 y Ler (Geng *et al.*, 2013); lo que sugiere que es una etapa dependiente del ecotipo; y es lo que podría ocasionar las diferencias en el tiempo de formación de la “cicatriz” entre Col-0 y Cvi-0. Aunque la formación de “cicatriz” no se ha reportado en otros artículos, en los resultados de Geng *et al.* (2013) se logran observar células

engrosadas con presencia de pelos radiculares ectópicos que se forman en exposición a 140 mM de NaCl. Esta observación sugiere que la formación de la “cicatriz” responde a otros tratamientos que inducen cambios osmóticos, como la alta salinidad.

Es aceptado que los pelos radiculares juegan un papel importante en la toma de agua, ya que incrementan el área superficial con el sustrato (Segal *et al.*, 2008). Sin embargo, en la formación de la “cicatriz”, posiblemente como una respuesta al ajuste osmótico, aún es incierto si los pelos radiculares en esta zona beneficiarían a las plantas en el aumento de captura de agua, probablemente como una ventaja secundaria de su formación.

Además de la variabilidad en el tamaño de los pelos radiculares, los genotipos presentaron variación en la longitud de la “cicatriz”, que se categorizó como “amplia” o “restringida”. Es probable que la longitud más corta (restringida) resulte de un menor crecimiento de la raíz, pues el meristemo genera una menor cantidad de células que se van incorporando a la zona de elongación, en contraste con las longitudes mayores. La variabilidad encontrada podría deberse a la tasa de crecimiento genotipo-específica, que depende del equilibrio entre la división celular y la diferenciación; por ejemplo, ya se ha visto que bajo condiciones control, el meristemo de Cvi-0 es ligeramente más corto que el de Col-0 (Aceves *et al.*, 2016). Asimismo, resultados preliminares (no mostrados) muestran que Cvi-0 tiene una zona de elongación más corta, lo que podría resultar en una menor cantidad de células que generan pelos radiculares ectópicos. Aunque los detalles sobre la longitud de la “cicatriz” requieren de investigaciones posteriores; en conjunto, estos resultados abren nuevas preguntas sobre las implicaciones del potencial osmótico externo en el desarrollo de pelos radiculares en la zona de elongación, y la capacidad de crecimiento radicular bajo estrés, que sería muy interesante indagar en un futuro.

8.3 Expresión diferencial de los genes de respuesta a estrés osmótico entre los ecotipos Col-0 y Cvi-0.

En los resultados del microarreglo, se comprobó que Cvi-0 presenta diferencias en la expresión génica a nivel global respecto a Col-0, tanto en condiciones control como de estrés osmótico. Según los datos del *Gene Ontology*, existe una gran cantidad de genes relacionados con el estrés que se regulan diferencialmente en Cvi-0 desde las condiciones control; lo que sugiere que, la diversidad

de respuestas que presenta un gen bajo estrés osmótico puede variar de acuerdo a los niveles de transcrito que se encuentran desde las condiciones control. Rymaszewski *et al.* (2017) comprobaron que las diferentes respuestas morfo-fisiológicas de la parte aérea de diversos ecotipos, correlacionaban con la abundancia de transcritos antes del estrés, y que posteriormente tenían respuestas diferenciales durante la deshidratación.

A nivel global, los resultados del microarreglo señalan que, de todos los genes que se expresan diferencialmente bajo estrés, el 56% se expresan más en Cvi-0 respecto a Col-0; y de los genes relacionados con “respuesta a estímulos” un 49.3% se sobre-expresan en Cvi-0 respecto a Col-0. Estos resultados sugieren que este ecotipo no requiere una mayor expresión en una gran cantidad de genes en relación a Col-0 para verse favorecido bajo estrés osmótico.

La técnica de microarreglo permite observar diferencias significativas entre los ecotipos, pero no es un método que logre determinar los niveles de transcrito relativos para cada uno. Para esto, se realizaron análisis de qPCR en los genes *ANAC019*, *COR15A*, *KIN2*, *NCED3*, *RD29A*, *RD29B* y *RAB18*. De los siete genes elegidos que se inducen bajo estrés, seis presentaron diferencias significativas entre Col-0 y Cvi-0 bajo estrés osmótico; y esta misma tendencia se mantuvo hasta las 24 h. De estos, *RAB18* es un gen que se encontró sobre-expresado en Cvi-0 respecto a Col-0 en ambos tiempos de exposición. De acuerdo a los resultados de Geng *et al.* (2013), *RAB18* presenta desde las ocho horas, elevados niveles de transcrito localizados en la zona asociada a la “cicatriz” en estrés salino. Interesantemente, la mayor expresión de este gen se mantiene en esta zona a través del tiempo, hasta las 24 horas. Esto advierte una posible función de *RAB18* en la “cicatriz”, que merece ser evaluada debido a que se expresa más en Cvi-0 y podría relacionarse con el tiempo prematuro de su formación en este ecotipo. Otro gen que resulta muy interesante es *NCED3*, una enzima involucrada en la biosíntesis de ABA. En estudios de alta salinidad, demostraron que la biosíntesis de ABA es más crítica durante la fase de recuperación, aunque su acumulación en esta etapa es menor que en las primeras horas de estrés. Debido a que se ha demostrado que bajas concentraciones de ABA promueven el desarrollo radicular al inhibir la producción de etileno (Spollen *et al.*, 2000), los resultados de Geng *et al.* (2013) sugieren que la disminución en expresión de *NCED3* y la menor acumulación de ABA en la fase de recuperación promueve el desarrollo de la raíz. Este dato es de gran interés en los ecotipos, pues en Cvi-0 la expresión del gen *NCED3* es un 52% menor a la que exhibe el ecotipo Col-0 a las ocho horas; posiblemente generando una

recuperación más temprana en este ecotipo, asociado a un ajuste osmótico más rápido. En este mismo sentido, los niveles de ABA disminuyeron aún más en ambos ecotipos a las 24 horas, con un decremento mayor en Cvi-0; lo que podría resultar en una mayor inducción del crecimiento una vez que las plantas se encuentran en un nuevo estado homeostático durante el estrés.

Respecto al resto de los genes evaluados, la mayoría de ellos se sub-expresan en Cvi-0 respecto a Col-0 bajo estrés osmótico; lo cual no necesariamente está asociado a la disminución de *NCED3* (y como consecuencia, de ABA), pues *RAB18* y *RD29B* son regulados por esta hormona y presentan expresiones opuestas; además, genes como *RD29A* y *COR15A*, que principalmente son independientes de la ruta de ABA, también se expresan en menor cantidad a las ocho y 24 h. Este resultado, aunado a lo encontrado en la categoría de “respuestas a estímulos” del microarreglo, sugiere que Cvi-0 no requiere de una expresión mayor en la mayoría de sus genes de respuesta en relación a Col-0 para tener una mayor tolerancia; y que sus respuestas al estrés pueden ser bastante más complejas. Por ejemplo, Abarca *et al.* (2001) demostraron que Cvi es más tolerante a la intoxicación por superóxido que el ecotipo *Ler*; no obstante, presenta menor expresión del gen *Csd2*, que codifica para una superóxido dismutasa involucrada en el catabolismo de esta especie reactiva de oxígeno. A pesar de la menor cantidad de RNA mensajero, la actividad de la enzima aumentó un 40% en condiciones de frío, en comparación con un 35% en el ecotipo *Ler*. Es decir, *Ler* requirió incrementar sus niveles de transcrito para aumentar la actividad enzimática, pero no fue así para Cvi.

Este es un ejemplo de la relación no lineal entre los genes y sus productos en los diferentes ecotipos, y de la complejidad de mecanismos que pueden estar presentando. De hecho, tampoco las relaciones entre los productos y la adaptación al estrés hídrico tienen una relación directa, y son más complejos de explicar. Por ejemplo, a través del uso de mutantes, se ha correlacionado el incremento en la cantidad de prolina con un aumento en la tolerancia (Hong *et al.*, 2000; Szekely *et al.*, 2008); no obstante, en el estudio realizado por McKay *et al.* (2008) observaron que el ecotipo Kas-1 (Kashmir, India) que proviene de un ambiente muy seco, acumula una cantidad mucho menor de prolina en exposición a estrés osmótico, en relación con Tsu-1 (Tsushima, Japón), que es originario de zonas con abundante precipitación. Estos resultados previenen las interpretaciones lineales, pues las variedades naturales son más complejas que las mutantes y los resultados no siempre son extrapolables.

En conjunto, estos resultados demuestran que la regulación de los genes de respuesta a estrés en Cvi-0 es distinta a la que presenta Col-0, y que esta regulación específica, podría contribuir con su mayor tolerancia en la raíz.

8.4 Respuestas morfológicas y de expresión génica ante un segundo estímulo de estrés osmótico.

Una vez comprobadas las diferencias morfológicas y de expresión génica en un primer evento de estrés, se evaluaron las respuestas ante un segundo estímulo de estrés osmótico. Se ha reportado que la ventaja de someter a las plantas a un estrés previo, es facilitar una respuesta más rápida y/o de mayor magnitud hacia un estrés recurrente, lo que se conoce como “memoria” o “acondicionamiento” (Bruce *et al.*, 2007).

En este ensayo, se observó que las plantas sometidas a un segundo estímulo de estrés osmótico mostraron un efecto severo en su desarrollo. Sin embargo, durante la recuperación exhibieron características involucradas con una mayor captura de agua, como un sistema radicular con una longitud mayor de raíces laterales y una mayor densidad de pelos radiculares. A pesar de que estudios fisiológicos serían de utilidad para corroborar lo anterior, este resultado sugiere que tanto las plantas de Col-0 como de Cvi-0 sometidas a un segundo estímulo, presentan una mayor tolerancia al estrés.

Los resultados descritos anteriormente demostraron que la generación de pelos radiculares en la “cicatriz” podría estar asociada a la capacidad de ajuste osmótico y posterior elongación de las raíces; por lo que se decidió evaluar su respuesta ante un segundo evento de estrés. En el ecotipo Col-0 se observa que, ante un segundo estrés, la proporción de plantas con el fenotipo B y C aumenta en relación al primer estrés. Aunque este resultado es complicado de explicar, pues estos dos fenotipos son opuestos en la longitud de sus pelos radiculares y el tamaño de su “cicatriz”, es evidente que Col-0 está respondiendo diferencialmente cuando es expuesto a un estrés osmótico previo. Sin embargo, el caso de Cvi-0 es distinto, pues las plantas en el segundo estrés responden muy parecido a su primer evento de limitación hídrica, generando un fenotipo “restringido” con pelos radiculares largos (fenotipo D); incluso, la proporción del fenotipo B, que también es de pelos radiculares largos, aumenta considerablemente en el segundo estrés. Esto

puede ser debido a que la capacidad de Cvi-0 de realizar su ajuste osmótico antes que Col-0, se mantiene e incluso incrementa, ante un segundo estímulo.

Un mecanismo adicional que se observó durante el ensayo de memoria, fue la formación prematura de pelos radiculares en las raíces laterales jóvenes, fenotipo que en ningún caso sucede bajo condiciones control. Las raíces laterales sometidas sólo a un primer estrés, no presentaron pelos radiculares; sin embargo, inesperadamente, durante la recuperación, las raíces laterales sí generaron pelos radiculares prematuros. Estas raíces jóvenes no estuvieron expuestas a estrés osmótico, ya que se formaron durante los dos días de recuperación en MS. Para demostrar que su formación fue durante el crecimiento en condiciones control (y no durante el estrés), se mantuvieron raíces por cuatro días en recuperación, y se observó que las raíces laterales jóvenes también generaron pelos radiculares. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la respuesta que sucede durante la recuperación es un posible mecanismo de “memoria”, para lograr responder más eficientemente en un segundo estrés e incrementar la captura de agua, pues las plantas expuestas al segundo estímulo también presentaron la formación de pelos radiculares prematuros en sus raíces laterales jóvenes. En los estudios de Duan *et al.* (2010) visualizaron que la muerte celular de la raíz principal, como consecuencia de un estrés hídrico severo, induce cambios en la arquitectura radicular que incluye la formación de raíces laterales. Cuando las plantas son recuperadas, estas raíces son capaces de elongar y muestran mayor tolerancia al estrés hídrico. Por lo tanto, el desarrollo de las raíces jóvenes, con mayor capacidad de absorción de agua, podría ser una estrategia adaptativa para la supervivencia de las plantas y su posterior recuperación.

La memoria está involucrada en múltiples modificaciones a nivel fisiológico, proteómico, transcripcional y epigenético (Kinoshita y Seki, 2014). Existen reportes sobre mecanismos de “memoria”, donde los genes de respuesta a estrés elevan más sus niveles transcripcionales en un segundo evento de deshidratación en comparación con el primero (Ding *et al.*, 2012). Al evaluar estas respuestas de memoria en las plantas Col-0 bajo estrés osmótico, se encontró que al igual que lo reportado en la parte aérea por Ding *et al.* (2012) los genes *COR15A*, *KIN2* y *RD29A*, categorizados como “no entrenables” (no poseen “memoria”) no mostraron diferencias respecto al primer estrés en la raíz. Sin embargo, los genes *RAB18* y *RD29B*, que incrementan significativamente sus niveles de expresión en un segundo evento de estrés en hoja, clasificados como “entrenables” por Ding *et al.* (2012), no presentaron ese comportamiento en la raíz. De

hecho, ambos genes mostraron tendencias (no significativas) a disminuir en el segundo evento de estrés respecto al primero. Aunque es necesario aumentar el número de réplicas biológicas para confirmar lo anterior, la reducción de los genes de respuesta bajo un segundo estrés ha sido categorizada también como una respuesta de “memoria”, pues la respuesta es diferencial al primer evento. Respecto a esto, Ding *et al.* (2013) a través de análisis de RNA-Seq de hojas expuesta a un segundo estímulo de estrés por desecación, demostraron que existen diversos comportamientos de genes que responden diferencialmente entre un primer y segundo estrés: 1) la memoria “típica”, donde se observa que los genes inducidos bajo estrés incrementan su expresión bajo un segundo evento de limitación hídrica; 2) genes que disminuyen sus niveles de transcrito bajo estrés y en un segundo evento disminuyen aún más; 3) genes que reducen su expresión bajo un primer estrés, pero en un segundo estímulo se incrementan aún más que en condiciones control; y 4) genes que se inducen bajo el primer estrés y en un segundo evento disminuyen, pero nunca a los mismos niveles que en condiciones control. En el estudio presente, en raíz y bajo estrés osmótico, los genes *RAB18* y *RD29B* presentaron el cuarto comportamiento. Incluso en lo reportado por Ding *et al.* (2013), observaron que este comportamiento es el más frecuente de todos los genes que poseen memoria. Por ejemplo, de todos aquellos que se inducen por estrés salino y por ABA, 84 y 80 genes reducen su expresión en el segundo estrés, respectivamente; y tan solo 25 y 24 genes lo aumentan, respectivamente, en cada tratamiento. Asimismo, la mayoría de los factores transcripcionales pertenecientes a las familias AP2/ERF, bHLH, NAC y WRKY tienden a aumentar sus niveles transcripcionales en el primer estrés y disminuirlos bajo el segundo (Ding *et al.*, 2013). Por lo tanto, para que las plantas expuestas a un segundo estímulo sean más tolerantes, no necesariamente requieren un incremento en su expresión durante el segundo estrés en la mayoría de sus genes. Esto se comprueba en el análisis de la mutante *atx1*, la cual restringe el incremento de los genes en el segundo estrés, pero las plantas continúan siendo más tolerantes si fueron expuestas previamente (Ding *et al.*, 2013).

Los resultados de este ensayo alertan sobre los diferentes mecanismos de respuesta que pueden generar las hojas y las raíces ante la limitación hídrica, lo cual tiene una gran relevancia para el estudio de su función. Aunque la inducción al estrés por métodos distintos tiene como finalidad la deshidratación del tejido, es posible que los mecanismos de respuesta sean diferenciales. Debido a que Ding *et al.*, (2012) inducen la deshidratación del tejido aéreo por medio

de aireación, y en este trabajo se utilizó manitol como factor de limitación hídrica, para comprobar que los resultados aquí expuestos sean dependientes del tejido, actualmente se están realizando en el tejido aéreo los análisis de memoria bajo condiciones de estrés osmótico en 300 mM de manitol por 24 h.

8.5 El papel de los factores epigenéticos en la respuesta al estrés osmótico.

Los cambios en la estructura de la cromatina proporcionan otra forma de regulación génica, que puede ser reversible y dinámica. El papel de las modificaciones de histonas en la iniciación y elongación de los genes ha sido estudiado ampliamente (Shilatifard, 2006; Karlic *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). En particular, la participación de la enzima activadora ATX1 y su antagonista represor, CLF, se han reportado como elementos importantes en la regulación de los genes de respuesta a estrés hídrico (Alvarez-Venegas *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2009).

En los análisis de tolerancia, inesperadamente se observó que la mutante *atx1-3* muestra mayor resistencia bajo estrés osmótico y una mejor capacidad de recuperación. Estos datos discrepan con los reportados por Ding *et al.* (2011), donde observan que las hojas de las mutantes *atx1-1* después de doce días de exposición con manitol o PEG tienen más clorosis y menor contenido de agua relativo. Ya que en el estudio presente se observa que, incluso a los 10 días, la mutante *atx1-3* es ligeramente más resistente, las discrepancias en ambas investigaciones pueden deberse a los diferentes alelos utilizados o ser una respuesta inherente al ecotipo. Particularmente, Ding *et al.*, (2011) utilizaron al alelo *atx1-1*, de pérdida de función total que está en fondo genético Wassilewskija (Ws); mientras que en el estudio presente se usó al alelo *atx1-3*, que es de pérdida de función parcial, en el fondo Col-0. Cabe mencionar que ambos alelos generan un desarrollo muy distinto; pues el alelo *atx1-1* genera una planta más pequeña con un sistema radicular muy corto, lo que podría implicar que debido a su retrasado desarrollo mostraran una amplia sensibilidad al estrés y fueran menos resistentes que las *atx1-3*.

Por otro lado, el comportamiento de la mutante *clf-29*, de pérdida de función total, fue contrario a la reportada en *atx1-3*, pues las plantas que carecen de esta enzima son menos tolerantes que las plantas silvestres. Los resultados encontrados por Liu *et al.* (2014) demuestran que bajo estrés hídrico, los genes de respuesta *HIP22*, *LTP3* y *LTP4* elevan hasta 30, 150 y 400 veces,

respectivamente, su expresión en la mutante *clf*, demostrando que CLF limita los niveles de transcrito. Por lo tanto, en ausencia de esta enzima represora, algunos genes de respuesta a estrés podrían generar niveles de expresión muy elevados, lo cual sería contraproducente para la resistencia de las plantas en periodos prolongados y perjudicaría su desempeño al estrés. Por ejemplo, se ha demostrado que los niveles de ABA y la expresión de genes que responden a esta hormona disminuyen a los diez días bajo estrés; lo que trae como consecuencia nuevos ajustes fisiológicos, como estabilizar el intercambio gaseoso y reducir el consumo de energía para lograr normalizar el metabolismo (Harb *et al.*, 2010). También esto ha sido demostrado por Geng *et al.* (2013), donde la disminución de la acumulación de ABA se vio relacionada con la inducción del crecimiento en la etapa de recuperación. Por lo tanto, es necesario que las plantas adquieran un nuevo estado de homeostasis, para lograr la supervivencia, disminuyendo la expresión de diversos genes de respuesta a estrés, lo cual se vería afectado en ausencia de CLF.

Integrando todos los resultados anteriores, es probable que para adquirir una mayor tolerancia al estrés se requiera de la activación de genes de respuesta en cantidades controladas y limitadas, efecto que se demostró también en Cvi-0. A propósito de este resultado, vale la pena mencionar que el ecotipo Cvi-0 presenta una mayor expresión de *CLF*, sólo bajo condiciones de estrés osmótico, lo cual podría estar relacionado con la expresión limitada de sus genes de respuesta.

Después de evaluar la tolerancia de todo el sistema ante el estrés, se analizó la morfología radicular en las mutantes. Comparando los resultados con los encontrados en las plantas silvestres, es evidente que la pérdida de ambas enzimas afecta el ajuste osmótico de las plantas; siendo *clf-29* el que cambia en mayor medida la proporción de los fenotipos, generando en mayor frecuencia el fenotipo B, caracterizado por tener pelos radiculares largos y posiblemente un ajuste osmótico más rápido. Aunque este resultado no va en sentido con su mayor sensibilidad al estrés por tiempos prolongados, es probable que en algunas ocasiones la velocidad de ajuste osmótico a las 24 h no esté directamente relacionada con la capacidad de tolerancia en etapas posteriores; ya que muchos otros factores podrían estar influyendo a través del tiempo en exposiciones prolongadas, cuando se observó la sensibilidad de la mutante.

Bajo un segundo estrés osmótico, la mutante *atx1-3* tiene un comportamiento muy similar al de las plantas silvestres; sin embargo, el caso de *clf-29* es muy interesante, debido a que la

carencia de esta enzima durante el segundo estrés provoca la generación de “cicatriz” con pelos radiculares cortos, lo que podría implicar un ajuste osmótico más retrasado. Además, la mayoría de las plantas también son “restringidas”, lo cual podría implicar que el desarrollo de la raíz fue más lento bajo el segundo estrés. Este resultado advierte que es necesario profundizar en estudios futuros acerca de la participación de *CLF* durante la tolerancia al estrés y la generación de memoria.

En cuanto a la regulación epigenética de *ATX1* sobre los genes de respuesta a estrés evaluados en este trabajo, se demostró que *RD29A*, *RD29B*, *COR15A* y *RAB18*, en la raíz, disminuyen su expresión en la mutante *atx1-3*. Estos resultados son comparables a lo observado en hoja bajo estrés hídrico demostrado por Ding *et al.* (2011; 2012), excepto para el gen *NCED3*, que no es regulado por esta enzima en la raíz bajo condiciones de estrés osmótico. *NCED3* es un gen clave en la señalización de respuesta al estrés, gracias a que regula la producción de ABA, y su activación es necesaria para lograr una respuesta adecuada. En el tejido aéreo bajo estrés hídrico, ya se ha comprobado la presencia de la marca epigenética H3K4me3 en *NCED3*, por lo que es posible que, si también posee esta marca de activación en la raíz, la enzima SDG2 (que también se encarga de colocar la marca H3K4me3) sea la involucrada en la inducción de su transcripción (Guo *et al.*, 2010), y/o por la presencia de histonas acetiltransferasas que regulen su activación.

En conclusión, en este proyecto se demostró que los ecotipos Col-0 y Cvi-0 poseen mecanismos diferenciales para la tolerancia al estrés osmótico, y que los factores epigenéticos *ATX1* y *CLF* están involucrados en la morfología de la “cicatriz” en la raíz principal, y posiblemente el factor *CLF* esté interviniendo en las respuestas de memoria. Por otra parte, los resultados de expresión mediante análisis de RT-qPCR cuestionan la relación lineal entre la cantidad de transcrito y la capacidad de tolerancia, pues los resultados obtenidos en Cvi-0 y *atx1-3* aluden a que mantener niveles de expresión limitados podría relacionarse con una mayor tolerancia. Si bien el fenotipo resulta de una gran cantidad de interacciones génicas y modificaciones fisiológicas que vuelven compleja la relación directa entre los resultados encontrados y la capacidad de tolerancia, los resultados de este proyecto abren la interrogante del papel que juegan las modificaciones epigenéticas en la arquitectura de la raíz y la expresión genética diferencial en la plasticidad de respuestas que generan los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* ante el estrés osmótico.

9. CONCLUSIONES

- Cvi-0 es un ecotipo más tolerante al estrés osmótico que Col-0.
- Los factores epigenéticos ATX1 y CLF están involucrados en la capacidad de tolerancia al estrés osmótico.
- La longitud de la raíz en los genotipos más tolerantes, Cvi-0 y *atx1-3*, presenta menor afectación al estrés osmótico que en los genotipos más sensibles.
- La variabilidad de respuestas en la generación de “cicatriz” podría estar asociada a la capacidad diferencial de ajuste osmótico entre los genotipos.
- Las plantas expuestas a un segundo estrés generan pelos radiculares prematuros en las raíces laterales jóvenes, posiblemente asociados a mecanismos de memoria.
- En la raíz, la expresión de los genes *COR15A*, *RD29B*, *RD29A*, *RAB18* y *NCED3* inducidos a las 8 y 24 h de estrés osmótico es diferencial entre Col-0 y Cvi-0, presentando perfiles de expresión dinámicos desde las condiciones control.
- En la raíz de plantas silvestres sometidas a un segundo estímulo osmótico, la expresión de los genes de respuesta a estrés catalogados como de “memoria” es similar al de las plantas expuestas a un solo evento de estrés.
- ATX1 participa de manera importante en la regulación de los genes *COR15A*, *RD29B*, *RD29A* y *RAB18* durante un primer y segundo estrés osmótico, pero no está involucrado en la regulación de la expresión de *NCED3* en la raíz.

10. REFERENCIAS

- Abarca, D., Roldán, M., Martín, M. y Sabater, B. 2001. *Arabidopsis thaliana* Ecotype Cvi Shows an Increased Tolerance to Photo-Oxidative Stress and Contains a New Chloroplastic Copper/Zinc Superoxide Dismutase Isoenzyme. *J Exp Bot* 52: 1417-1425
- Aceves-García, P., Álvarez-Buylla, E. R., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Muñoz, R. y Sanchez, M. de la Paz. 2016. Root Architecture Diversity and Meristem Dynamics in Different Populations of *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 7: 858
- Alonso-Blanco, C., Mendez-Vigo, B. y Koornneef, M. 2005. From Phenotypic to Molecular Polymorphisms Involved in Naturally Occurring Variation of Plant Development. *Int J Dev Biol* 49: 717-732
- Alvarez-Venegas, R., Sadler, M., Hlavacka, A., Baluska, F., Xia, Y. et al. 2007. The *Arabidopsis* Homolog of Trithorax, ATX1, Binds Phosphatidylinositol 5-Phosphate, and the Two Regulate a Common Set of Target Genes. *PNAS* 103: 6049-6054
- Avramova, Z. 2015. Transcriptional 'Memory' of a Stress: Transient Chromatin and Memory (Epigenetic) Marks at Stress-Response Genes. *Plant J* 83: 149-159
- Bac-Molenaar, J. A., Granier, C., Keurentjes, J. J. y Vreugdenhil, D. 2016. Genome-Wide Association Mapping of Time-Dependent Growth Responses to Moderate Drought Stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 39: 88-102
- Borsani, O., Valpuesta, V. y Botella, M. A. 2001. Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Physiol* 126: 1024-1030
- Bouchabke, O., Chang, F., Simon, M., Voisin, R., Pelletier, G. y Durand-Tardif, M. 2008. Natural Variation in *Arabidopsis thaliana* as a Tool for Highlighting Differential Drought Responses. *PLoS One* 3: e1705
- Bray, E.A. 2001. Plant Response to Water-deficit Stress. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley y Sons, Ltd., Chichester. <http://www.els.net/> [DOI: 10.1038/npng.els.0001298]
- Bray, E. A. 2004. Genes Commonly Regulated by Water-Deficit Stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55: 2331-2341
- Bruce, T. J. A., Matthes, M. C., Napier, J. A. y Pickett, J. A. 2007. Stressful "Memories" of Plants: Evidence and Possible Mechanisms. *Plant Sci* 173: 603-608
- Chaves, M. M., Maroco, J. P. y Pereira, J. S. 2003. Understanding Plant Responses to Drought — from Genes to the Whole Plant. *Funct Plant Biol.* 30: 239-264
- Chen, D., Wang, S., Cao, B., Cao, D., Leng, G. et al. 2015. Genotypic Variation in Growth and Physiological Response to Drought Stress and Re-Watering Reveals the Critical Role of Recovery in Drought Adaptation in Maize Seedlings. *Front Plant Sci* 6: 1241
- Claeys, H., Van Landeghem, S., Dubois, M., Maleux, K. y Inze, D. 2014. What Is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used in Vitro Stress Assays. *Plant Physiol* 165: 519-527
- Comas, L. H., Becker, S. R., Cruz, V. M., Byrne, P. F. y Dierig, D. A. 2013. Root Traits Contributing to Plant Productivity under Drought. *Front Plant Sci* 4: 442
- Ding, Y., Avramova, Z. y Fromm, M. 2011. The *Arabidopsis* Trithorax-Like Factor ATX1 Functions in Dehydration Stress Responses Via Aba-Dependent and Aba-Independent Pathways. *Plant J* 66: 735-744
- Ding, Y., Fromm, M. y Avramova, Z. 2012. Multiple Exposures to Drought 'Train' Transcriptional Responses in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 3: 740
- Ding, Y., Lapko, H., Ndamukong, I., Xia, Y., Al-Abdallat, A. et al. 2009. The *Arabidopsis* Chromatin Modifier ATX1, the Myotubularin-Like AtMTM and the Response to Drought. *Plant Signal Behav* 4: 1049-1058
- Ding, Y., Liu, N., Virilouvet, L., Riethoven, J.-J., Fromm, M. y Avramova, Z. 2013. Four Distinct Types of Dehydration Stress Memory Genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 13: 229-229

- Duan, Y., Zhang, W., Li, B., Wang, Y., Li, K. *et al.* 2010. An Endoplasmic Reticulum Response Pathway Mediates Programmed Cell Death of Root Tip Induced by Water Stress in *Arabidopsis*. *New Phytol* 186: 681-695
- Dubrovsky, J. G., Doerner, P. W., Colon-Carmona, A. y Rost, T. L. 2000. Pericycle Cell Proliferation and Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124: 1648-1657
- Dubrovsky, J. G., Gambetta, G. A., Hernandez-Barrera, A., Shishkova, S. y Gonzalez, I. 2006. Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*: Developmental Window, Spatial Patterning, Density and Predictability. *Ann Bot* 97: 903-915
- Estrada-Melo, A. C., Chao, Reid, M. S. y Jiang, C. Z. 2015. Overexpression of an Aba Biosynthesis Gene Using a Stress-Inducible Promoter Enhances Drought Resistance in Petunia. *Hortic Res* 2: 15013
- Fang, Y. y Xiong, L. 2015. General Mechanisms of Drought Response and Their Application in Drought Resistance Improvement in Plants. *Cell Mol Life Sci* 72: 673-689
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. y Basra, S. M. A. 2009. Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. *Agron Sustain Dev* 29: 185-212
- Feil, R. y Fraga, M. F. 2012. Epigenetics and the Environment: Emerging Patterns and Implications. *Nat Rev Genet* 13: 97-109
- Feng, W., Lindner, H., Robbins, N. E., 2nd y Dinneny, J. R. 2016. Growing out of Stress: The Role of Cell- and Organ-Scale Growth Control in Plant Water-Stress Responses. *Plant Cell* 28: 1769-1782
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L. y Rock, C. D. 2002. Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *Plant Cell* 14: s15-s45
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2011. Aba-Mediated Transcriptional Regulation in Response to Osmotic Stress in Plants. *J Plant Res* 124: 509-525
- Futuyma, D. 1942. Evolution. Sunderland, EUA. 173 pp.
- Geng, Y., Wu, R., Wee, C. W., Xie, F., Wei, X. *et al.* 2013. A Spatio-Temporal Understanding of Growth Regulation During the Salt Stress Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 2132-2154
- Grenier, S., Barre, P. y Litrico, I. 2016. Phenotypic Plasticity and Selection: Nonexclusive Mechanisms of Adaptation. *Scientifica (Cairo)* 2016: 7021701
- Guo, L., Yu, Y., Law, J. A. y Zhang, X. 2010. Set Domain Group2 Is the Major Histone H3 Lysine [Corrected] 4 Trimethyltransferase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18557-18562
- Han, S. K. y Wagner, D. 2014. Role of Chromatin in Water Stress Responses in Plants. *J Exp Bot* 65: 2785-2799
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M. M. y Pereira, A. 2010. Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in *Arabidopsis* Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiol* 154: 1254-1271
- Hetherington, A. M. y Woodward, F. I. 2003. The Role of Stomata in Sensing and Driving Environmental Change. *Nature* 424: 901-908
- Holliday, R. 2006. Epigenetics: A Historical Overview. *Epigenetics* 1: 76-80
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. y Verma, D. P. 2000. Removal of Feedback Inhibition of Delta(1)-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Results in Increased Proline Accumulation and Protection of Plants from Osmotic Stress. *Plant Physiol* 122: 1129-1136
- Hsiao, T. C. y Xu, L. K. 2000. Sensitivity of Growth of Roots Versus Leaves to Water Stress: Biophysical Analysis and Relation to Water Transport. *J Exp Bot* 51: 1595-1616
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Tajiri, T., Naramoto, M., Seki, M. *et al.* 2001. Regulation of Drought Tolerance by Gene Manipulation of 9-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase, a Key Enzyme in Abscisic Acid Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 27: 325-333
- Ivanov, V. B. y Dubrovsky, J. G. 2013. Longitudinal Zonation Pattern in Plant Roots: Conflicts and Solutions. *Trends Plant Sci* 18: 237-243
- Jablonka, E. y Lamb, M. 2005. Evolution in Four Dimensions. Londres, Inglaterra. 92-101 pp.

- Jablonka, E. y Raz, G. 2009. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution. *Q Rev Biol* 84: 131-176
- Janiak, A., Kwasniewski, M. y Szarejko, I. 2016. Gene Expression Regulation in Roots under Drought. *J Exp Bot* 67: 1003-1014
- Ji, H., Liu, L., Li, K., Xie, Q., Wang, Z. *et al.* 2014. Peg-Mediated Osmotic Stress Induces Premature Differentiation of the Root Apical Meristem and Outgrowth of Lateral Roots in Wheat. *J Exp Bot* 65: 4863-4872
- Jones, H. G. 2007. Monitoring Plant and Soil Water Status: Established and Novel Methods Revisited and Their Relevance to Studies of Drought Tolerance. *J Exp Bot* 58: 119-130
- Kalisz, S. y Kramer, E. M. 2008. Variation and Constraint in Plant Evolution and Development. *Heredity (Edinb)* 100: 171-177
- Karlic, R., Chung, H. R., Lasserre, J., Vlahovicek, K. y Vingron, M. 2010. Histone Modification Levels Are Predictive for Gene Expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2926-2931
- Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E. A. y Bailey-Serres, J. 2004. Differential Mrna Translation Contributes to Gene Regulation under Non-Stress and Dehydration Stress Conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 38: 823-839
- Kazachkova, Y., Khan, A., Acuna, T., Lopez-Diaz, I., Carrera, E. *et al.* 2016. Salt Induces Features of a Dormancy-Like State in Seeds of *Eutrema (Thellungiella) Salsugineum*, a Halophytic Relative of *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 7: 1071
- Kellermeier, F., Chardon, F. y Amtmann, A. 2013. Natural Variation of *Arabidopsis* Root Architecture Reveals Complementing Adaptive Strategies to Potassium Starvation. *Plant Physiol* 161: 1421-1432
- Kim, J. M., Sasaki, T., Ueda, M., Sako, K. y Seki, M. 2015. Chromatin Changes in Response to Drought, Salinity, Heat, and Cold Stresses in Plants. *Front Plant Sci* 6: 114
- Kim, J. M., To, T. K., Ishida, J., Matsui, A., Kimura, H. y Seki, M. 2012. Transition of Chromatin Status During the Process of Recovery from Drought Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 53: 847-856
- Kim, J. M., To, T. K., Ishida, J., Morosawa, T., Kawashima, M. *et al.* 2008. Alterations of Lysine Modifications on the Histone H3 N-Tail under Drought Stress Conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49: 1580-1588
- Kinoshita, T. y Seki, M. 2014. Epigenetic Memory for Stress Response and Adaptation in Plants. *Plant Cell Physiol* 55: 1859-1863
- Koncz, C., Chua, N. y Schell, J. 1992. *Methods in Arabidopsis Research*. World Scientific. Singapore. 3 pp.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C. y Vreugdenhil, D. 2004. Naturally Occurring Genetic Variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* 55: 141-172
- Kovinich, N., Kayanja, G., Chanoca, A., Otegui, M. S. y Grotewold, E. 2015. Abiotic Stresses Induce Different Localizations of Anthocyanins in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 10: e1027850
- Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X. y Harper, J. F. 2002. Transcriptome Changes for *Arabidopsis* in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant Physiol* 130: 2129-2141
- Lang, V., Mantyla, E., Welin, B., Sundberg, B. y Palva, E. T. 1994. Alterations in Water Status, Endogenous Abscisic Acid Content, and Expression of Rab18 Gene During the Development of Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 104: 1341-1349
- Lefebvre, V., Kiani, S. P. y Durand-Tardif, M. 2009. A Focus on Natural Variation for Abiotic Constraints Response in the Model Species *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci* 10: 3547-3582
- Lew, R. R. 1996. Pressure Regulation of the Electrical Properties of Growing *Arabidopsis thaliana* L. Root Hairs. *Plant Physiology* 112: 1089-1100
- Li, B., Carey, M. y Workman, J. L. 2007. The Role of Chromatin During Transcription. *Cell* 128: 707-719
- Li, P., Ainsworth, E. A., Leakey, A. D., Ulanov, A., Lozovaya, V. *et al.* 2008. *Arabidopsis* Transcript and Metabolite Profiles: Ecotype-Specific Responses to Open-Air Elevated [Co₂]. *Plant Cell Environ* 31: 1673-1687

- Liu, N., Fromm, M. y Avramova, Z. 2014. H3k27me3 and H3k4me3 Chromatin Environment at Super-Induced Dehydration Stress Memory Genes of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 7: 502-513
- Ludlow, M. M. 1989. *Strategies of Response to Water-Stress*. The Hague: S P B Academic Publ. 269-281 pp.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. y Richmond, T. J. 1997. Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. *Nature* 389: 251-260
- Luo, M., Liu, X., Singh, P., Cui, Y., Zimmerli, L. y Wu, K. 2012. Chromatin Modifications and Remodeling in Plant Abiotic Stress Responses. *Biochim Biophys Acta* 1819: 129-136
- McCormack, M. L. y Guo, D. 2014. Impacts of Environmental Factors on Fine Root Lifespan. *Front Plant Sci* 5: 205
- McKay, J. K., Richards, J. H., Nemali, K. S., Sen, S., Mitchell-Olds, T. et al. 2008. Genetics of Drought Adaptation in *Arabidopsis thaliana* li. Qtl Analysis of a New Mapping Population, Kas-1 X Tsu-1. *Evolution* 62: 3014-3026
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C. y Hohn, B. 2006. Transgeneration Memory of Stress in Plants. *Nature* 442: 1046-1049
- Monda, K., Negi, J., Iio, A., Kusumi, K., Kojima, M. et al. 2011. Environmental Regulation of Stomatal Response in the *Arabidopsis* Cvi-0 Ecotype. *Planta* 234: 555-563
- Msanne, J., Lin, J., Stone, J. M. y Awada, T. 2011. Characterization of Abiotic Stress-Responsive *Arabidopsis thaliana* Rd29a and Rd29b Genes and Evaluation of Transgenes. *Planta* 234: 97-107
- Muller, K., Tintelnot, S. y Leubner-Metzger, G. 2006. Endosperm-Limited Brassicaceae Seed Germination: Abscisic Acid Inhibits Embryo-Induced Endosperm Weakening of *Lepidium sativum* (Cress) and Endosperm Rupture of Cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47: 864-877
- Napsucially-Mendivil, S., Alvarez-Venegas, R., Shishkova, S. y Dubrovsky, J. G. 2014. *Arabidopsis* Homolog of Trithorax1 (ATX1) is Required for Cell Production, Patterning, and Morphogenesis in Root Development. *J Exp Bot* 65: 6373-6384
- Pace, R. y Benincasa, P. 2010. Effect of Salinity and Low Osmotic Potential on the Germination and Seedling Growth of Rapeseed Cultivars with Different Stress Tolerance. *Italian Journal of Agronomy* 5: 69-78
- Petrone, E. 2015. Función del Gen ATX1 en el Desarrollo de la Raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pien, S. y Grossniklaus, U. 2007. Polycomb Group and Trithorax Group Proteins in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta* 1769: 375-382
- Pigliucci, M., Murren, C. J. y Schlichting, C. D. 2006. Phenotypic Plasticity and Evolution by Genetic Assimilation. *J Exp Biol* 209: 2362-2367
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V. y Vivekanandan, M. 2004. Drought-Induced Responses of Photosynthesis and Antioxidant Metabolism in Higher Plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202
- Reyes-Hernandez, B. J., Srivastava, A. C., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Ramos-Parra, P. A. et al. 2014. The Root Indeterminacy-to-Determinacy Developmental Switch Is Operated through a Folate-Dependent Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 202: 1223-1236
- Richards, C. L., Bossdorf, O. y Verhoeven, K. J. 2010. Understanding Natural Epigenetic Variation. *New Phytol* 187: 562-564
- Ristova, D. y Busch, W. 2014. Natural Variation of Root Traits: From Development to Nutrient Uptake. *Plant Physiol* 166: 518-527
- Roychoudhury, A., Paul, S. y Basu, S. 2013. Cross-Talk between Abscisic Acid-Dependent and Abscisic Acid-Independent Pathways During Abiotic Stress. *Plant Cell Rep* 32: 985-1006
- Rutter, M. T. y Fenster, C. B. 2007. Testing for Adaptation to Climate in *Arabidopsis thaliana*: A Calibrated Common Garden Approach. *Ann Bot* 99: 529-536

- Rymaszewski, W., Vile, D., Bediee, A., Dauzat, M., Luchaire, N. *et al.* 2017. Stress-Related Gene Expression Reflects Morphophysiological Responses to Water Deficit. *Plant Physiol* 174: 1913-1930
- Sanchez, M. de la Paz., Aceves-García, P., Petrone, E., Steckenborn, S., Vega-Leon, R. *et al.* 2015. The Impact of Polycomb Group (PcG) and Trithorax Group (TrxG) Epigenetic Factors in Plant Plasticity. *New Phytol* 208: 684-694
- Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Cruz-Ramirez, A., Nieto-Jacobo, F. *et al.* 2005. Phosphate Starvation Induces a Determinate Developmental Program in the Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46: 174-184
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Sung, Z. R. y Calonje, M. 2008. Rawul: A New Ubiquitin-Like Domain in Prc1 Ring Finger Proteins That Unveils Putative Plant and Worm Prc1 Orthologs. *BMC Genomics* 9: 308
- Sani, E., Herzyk, P., Perrella, G., Colot, V. y Amtmann, A. 2013. Hyperosmotic Priming of *Arabidopsis* Seedlings Establishes a Long-Term Somatic Memory Accompanied by Specific Changes of the Epigenome. *Genome Biol* 14: R59
- Satbhai, S. B., Ristova, D. y Busch, W. 2015. Underground Tuning: Quantitative Regulation of Root Growth. *J Exp Bot* 66: 1099-1112
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, L. y Frise, E. 2012. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nature methods* 9: 676-682
- Schopfer, P. y Plachy, C. 1984. Control of Seed Germination by Abscisic Acid : li. Effect on Embryo Water Uptake in Brassica Napus L. *Plant Physiol* 76: 155-160
- Segal, E., Kushnir, T., Mualem, Y. y Shani, U. 2008. Water Uptake and Hydraulics of the Root Hair Rhizosphere. *Vadose Zone Journal* 7
- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T. *et al.* 2002. Monitoring the Expression Pattern of around 7,000 *Arabidopsis* Genes under Aba Treatments Using a Full-Length Cdna Microarray. *Funct Integr Genomics* 2: 282-291
- Sharma, A., Singh, K. y Almasan, A. 2012. Histone H2ax Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. *Methods Mol Biol* 920: 613-626
- Sharma, S., Lin, W., Villamor, J. G. y Verslues, P. E. 2013. Divergent Low Water Potential Response in *Arabidopsis thaliana* Accessions Landsberg Erecta and Shahdara. *Plant Cell Environ* 36: 994-1008
- Sheng, Z. y Russell, D. 2005. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Comput. Biol* 12: 105-162
- Shilatifard, A. 2006. Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annu Rev Biochem* 75: 243-269
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene Networks Involved in Drought Stress Response and Tolerance. *J Exp Bot* 58: 221-227
- Shishkova, S., Rost, T. L. y Dubrovsky, J. G. 2008. Determinate Root Growth and Meristem Maintenance in Angiosperms. *Ann Bot* 101: 319-340
- Spollen, W. G., LeNoble, M. E., Samuels, T. D., Bernstein, N. y Sharp, R. E. 2000. Abscisic Acid Accumulation Maintains Maize Primary Root Elongation at Low Water Potentials by Restricting Ethylene Production. *Plant Physiol* 122: 967-976
- Szekely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L. *et al.* 2008. Duplicated P5cs Genes of *Arabidopsis* Play Distinct Roles in Stress Regulation and Developmental Control of Proline Biosynthesis. *Plant J* 53: 11-28
- Takhtajan, A. 1986. *Floristic Regions of the World*. Berkeley, California. 522 pp.
- Thalhammer, A. y Hinch, D. K. 2014. A Mechanistic Model of Cor15 Protein Function in Plant Freezing Tolerance: Integration of Structural and Functional Characteristics. *Plant Signal Behav* 9: e977722
- Tran, L. S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y. *et al.* 2004. Isolation and Functional Analysis of *Arabidopsis* Stress-Inducible Nac Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive Cis-Element in the Early Responsive to Dehydration Stress 1 Promoter. *Plant Cell* 16: 2481-2498

- Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J. *et al.* 2008. High-Resolution Whole-Mount Imaging of Three-Dimensional Tissue Organization and Gene Expression Enables the Study of Phloem Development and Structure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 1494-1503
- Turesson, G. 1922. The Species and the Variety as Ecological Units. *Hereditas* 3: 100-113
- Turner, N. C. y Jones, M. M. 1980. Turgor Maintenance by Osmotic Adjustment: A Review and Evaluation. pp. 87-103. New York: John Wiley y Sons, Inc.
- Ubeda-Tomas, S., Beemster, G. T. y Bennett, M. J. 2012. Hormonal Regulation of Root Growth: Integrating Local Activities into Global Behaviour. *Trends Plant Sci* 17: 326-331
- Vallejo, A. J., Yanovsky, M. J. y Botto, J. F. 2010. Germination Variation in *Arabidopsis thaliana* Accessions under Moderate Osmotic and Salt Stresses. *Ann Bot* 106: 833-842
- van Dijk, K., Ding, Y., Malkaram, S., Riethoven, J. J., Liu, R. *et al.* 2010. Dynamic Changes in Genome-Wide Histone H3 Lysine 4 Methylation Patterns in Response to Dehydration Stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 10: 238
- Van Norman, J. M., Xuan, W., Beeckman, T. y Benfey, P. N. 2013. To Branch or Not to Branch: The Role of Pre-Patterning in Lateral Root Formation. *Development* 140: 4301-4310
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N. *et al.* 2002. Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biol* 3
- Vega-Leon, R. 2016. Estudio de la Función Antagónica de los Factores Epigenéticos CLF y ATX1 en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. y Zhu, J. K. 2006. Methods and Concepts in Quantifying Resistance to Drought, Salt and Freezing, Abiotic Stresses That Affect Plant Water Status. *Plant J* 45: 523-539
- Verslues, P. E. y Juenger, T. E. 2011. Drought, Metabolites, and *Arabidopsis* Natural Variation: A Promising Combination for Understanding Adaptation to Water-Limited Environments. *Curr Opin Plant Biol* 14: 240-245
- Verslues, P. E., Lasky, J. R., Juenger, T. E., Liu, T. W. y Kumar, M. N. 2014. Genome-Wide Association Mapping Combined with Reverse Genetics Identifies New Effectors of Low Water Potential-Induced Proline Accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 164: 144-159
- Waddington, C. H. 1942. The Epigenotype. *Endeavour* 1: 18-20
- Wang, H. y Cutler, A. J. 1995. Promoters from Kin1 and Cor6.6, Two *Arabidopsis thaliana* Low-Temperature- and Aba-Inducible Genes, Direct Strong Beta-Glucuronidase Expression in Guard Cells, Pollen and Young Developing Seeds. *Plant Mol Biol* 28: 619-634
- Wasson, A. P., Richards, R. A., Chatrath, R., Misra, S. C., Prasad, S. V. *et al.* 2012. Traits and Selection Strategies to Improve Root Systems and Water Uptake in Water-Limited Wheat Crops. *J Exp Bot* 63: 3485-3498
- Weigel, D. 2012. Natural Variation in *Arabidopsis*: From Molecular Genetics to Ecological Genomics. *Plant Physiol* 158: 2-22
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H. y Zhu, J. K. 2001. The *Arabidopsis* Los5/Aba3 Locus Encodes a Molybdenum Cofactor Sulfurase and Modulates Cold Stress- and Osmotic Stress-Responsive Gene Expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083
- Yang, Y. Z. y Tan, B. C. 2014. A Distal Aba Responsive Element in Atnced3 Promoter Is Required for Positive Feedback Regulation of Aba Biosynthesis in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9: e87283
- Zhang, H., Rong, H. y Pilbeam, D. 2007. Signalling Mechanisms Underlying the Morphological Responses of the Root System to Nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 58: 2329-2338
- Zhang, T., Cooper, S. y Brockdorff, N. 2015. The Interplay of Histone Modifications - Writers That Read. *EMBO Rep* 16: 1467-148

11. ANEXO I. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.

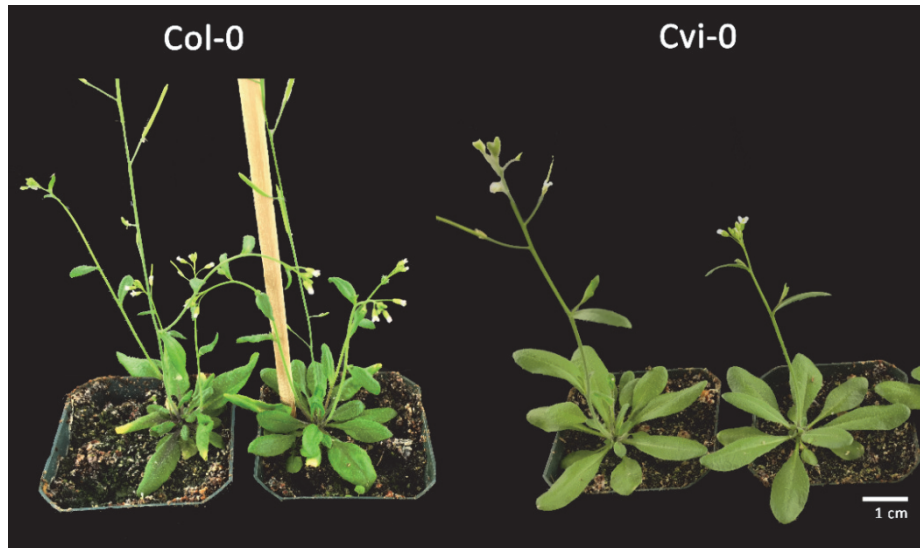


Figura suplementaria 1. Recuperación de las plantas germinadas en estrés osmótico. Después de crecerlas por 12 días en 300 mM de manitol, fueron recuperadas por 36 días en tierra.

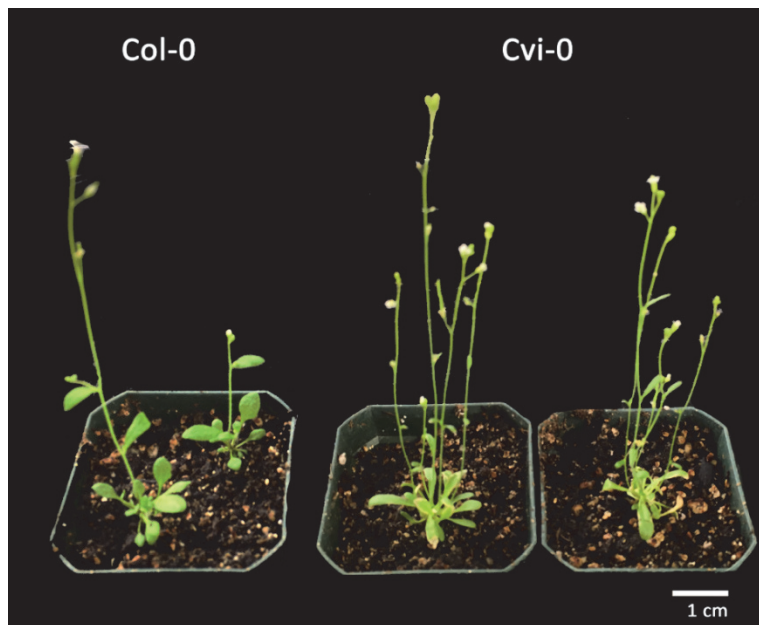


Figura suplementaria 2. Recuperación de las plantas expuestas a estrés severo por tiempos prolongados. Las plantas crecidas por cinco días en condiciones control fueron transferidas a 400 mM de manitol por 32 días y posteriormente fueron recuperadas por 27 días en tierra.

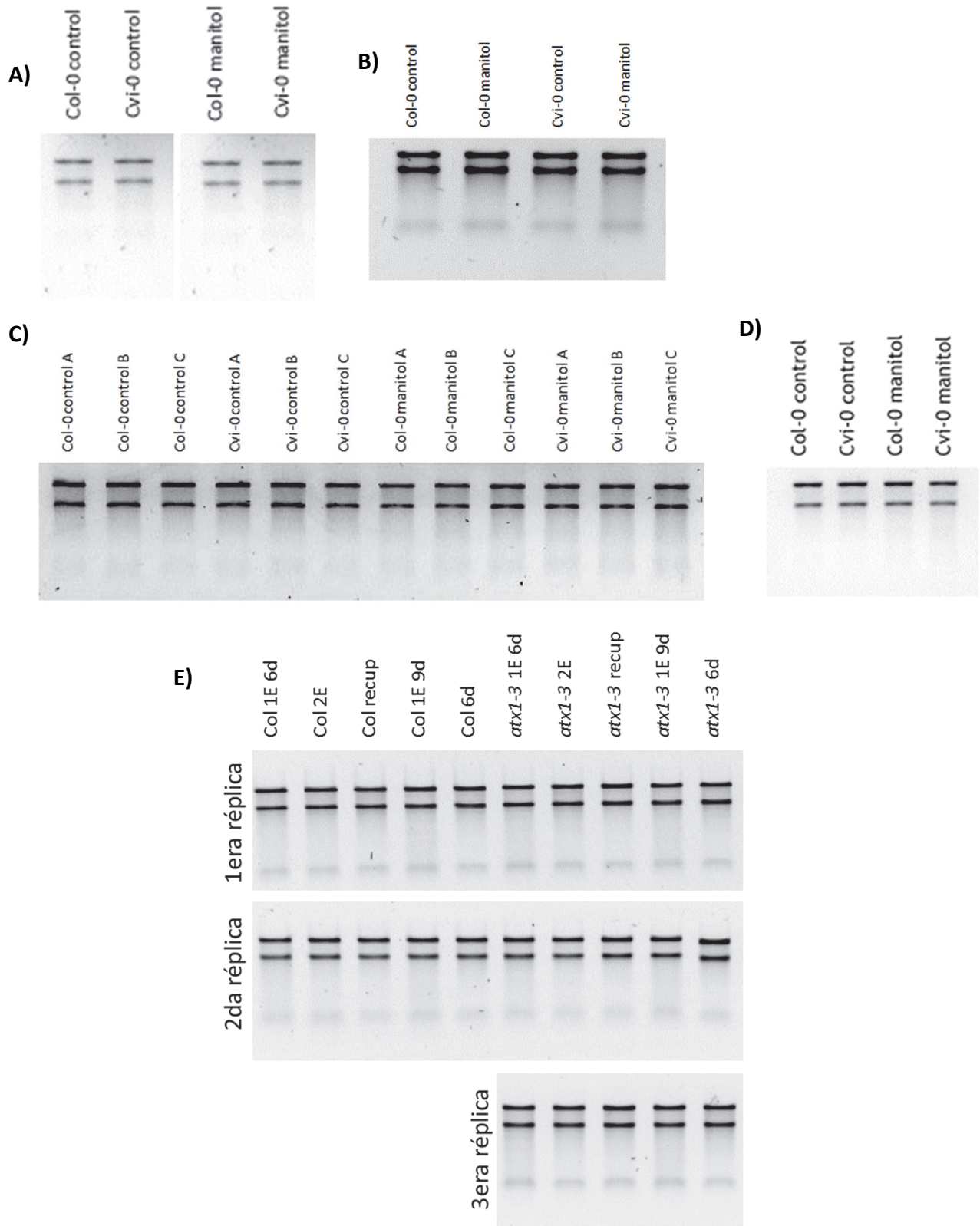


Figura suplementaria 3. Geles de RNA. Las bandas gruesas indican los RNA ribosomales 28 y 18S. A) Ensayo semicuantitativo para comprobar la metodología usada; B) Ensayo de Col-0 y Cvi-0 durante 24 h de estrés osmótico; C) Réplicas biológicas A, B y mezcla de las anteriores (A y B) de Col-0 y Cvi-0 durante ocho h en estrés osmótico; D) Mezcla que se mandó a Fisiología Celular para la realización del microarreglo. Col-0 y Cvi-0 durante ocho h en estrés osmótico; E) Las tres réplicas biológicas del ensayo de memoria en Col-0 y *atx1-3* durante 24 h en estrés osmótico.

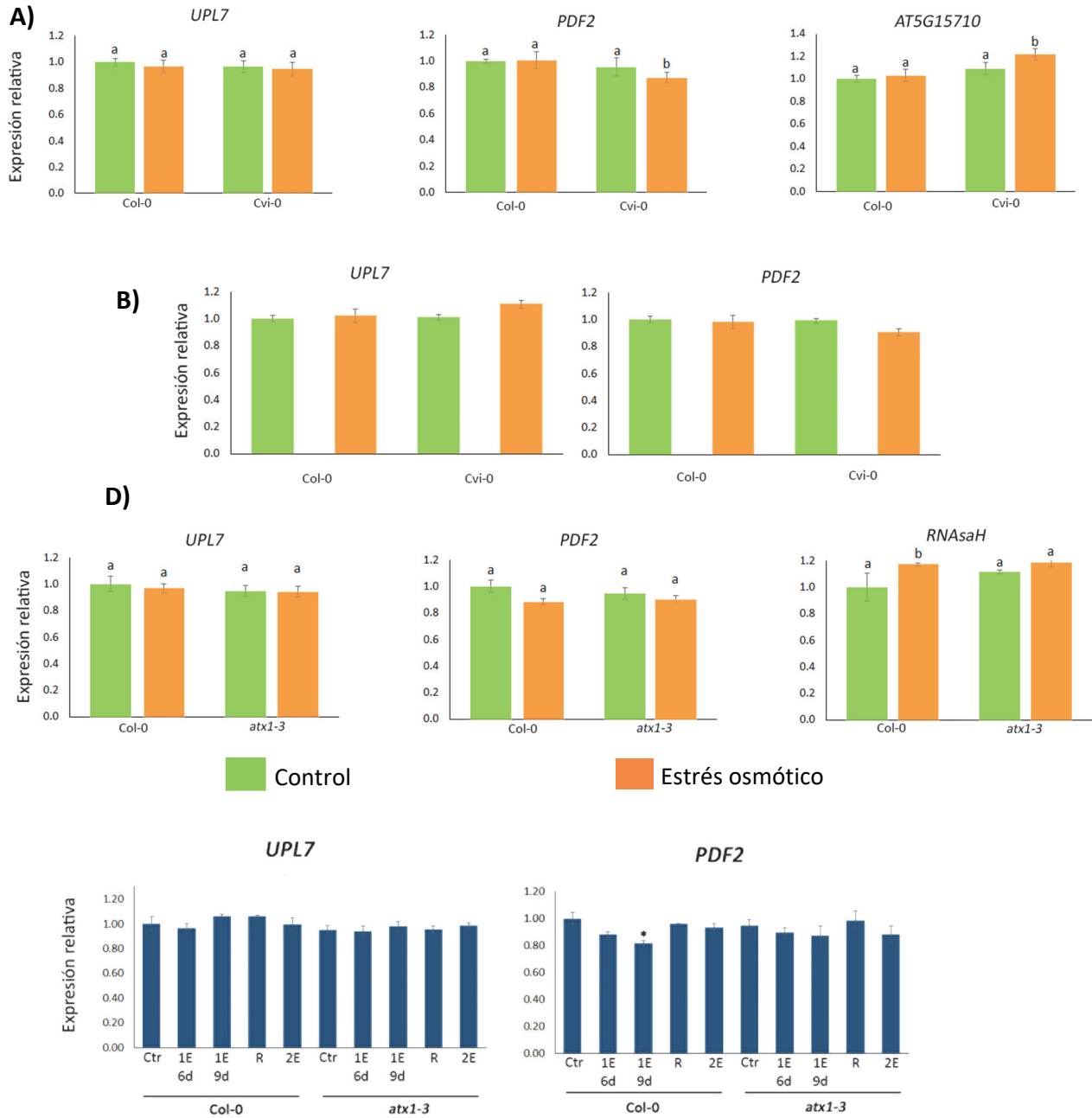
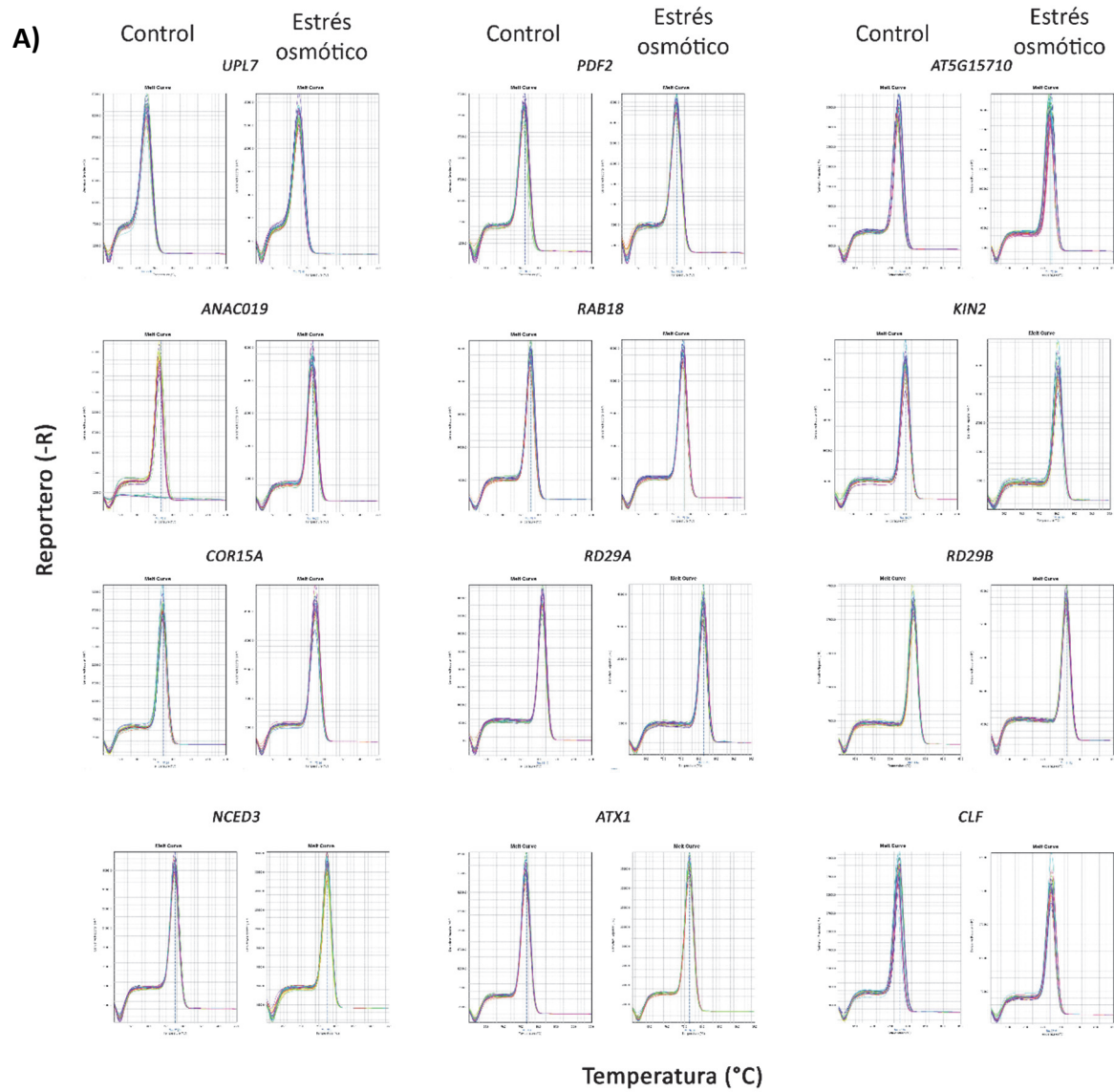


Figura suplementaria 4. Genes normalizadores *UPL7*, *PDF2*, *RNAsaH* y *AT5G15710*. A) Ensayo Col y Cvi-0 durante ocho h en estrés osmótico; B) Ensayo Col-0 y Cvi-0 durante 24 h en estrés osmótico; C) Ensayo de Col-0 y *atx1-3* durante 24 h en estrés osmótico; D) Ensayo de memoria en Col-0 y *atx1-3*. Las barras indican la desviación estándar de las réplicas según sea el caso. Las diferentes letras representan diferencias significativas para una prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey ($p < 0.05$), que permite hacer comparaciones entre todas las muestras.



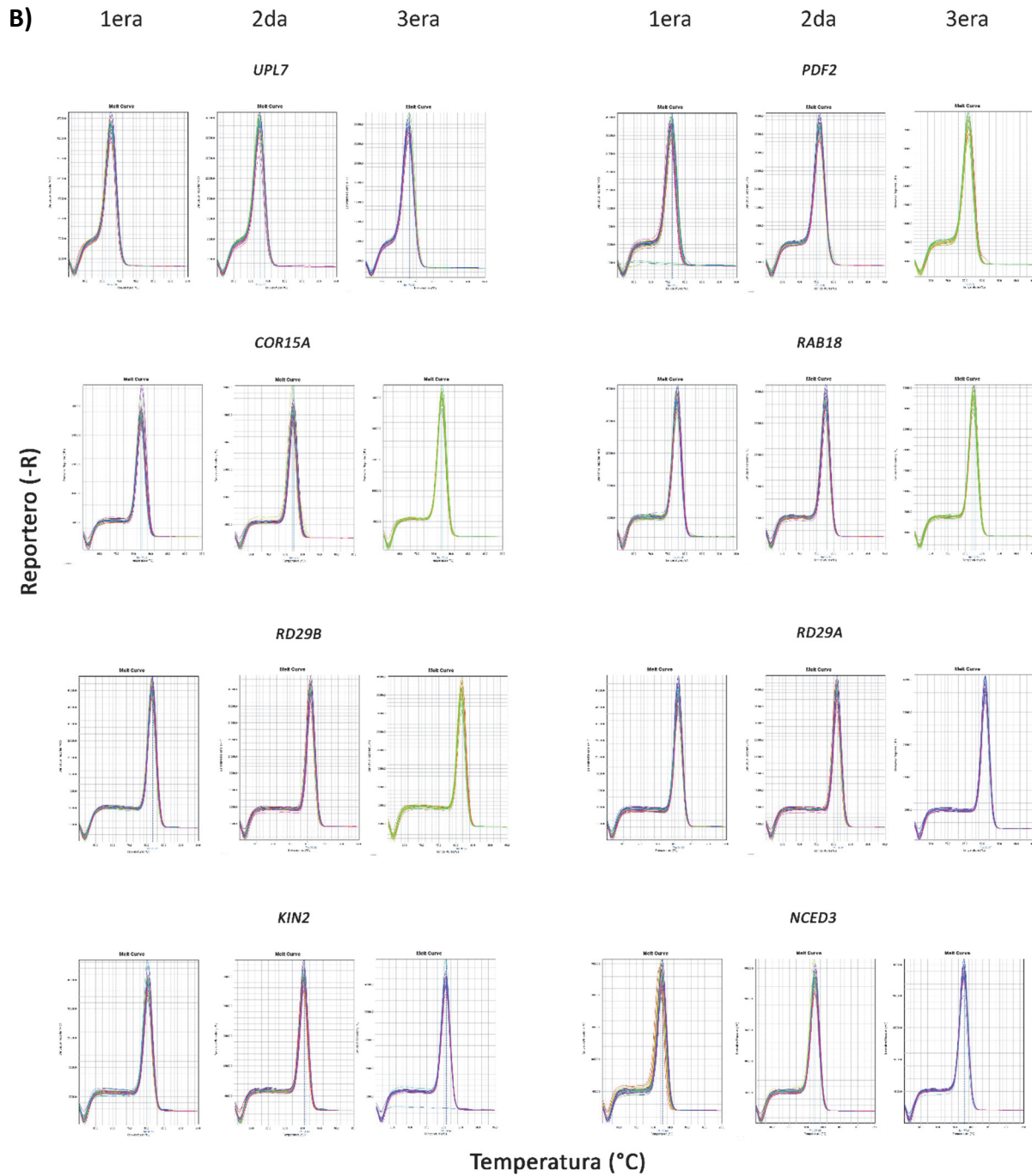


Figura suplementaria 5. Curvas de *melting* de las amplificaciones por PCR cuantitativa (qPCR). A) Ensayo de Col-0 y Cvi-0 bajo estrés osmótico por ocho h. Los tratamientos control y manitol se realizaron en placas diferentes para cada gen; B) Ensayo de memoria de Col-0 y *atx1-3*. Cada réplica biológica (1era, 2da y 3era) se realizaron en placas de qPCR diferentes para completar un gen. No se muestran los controles negativos en la gráfica.

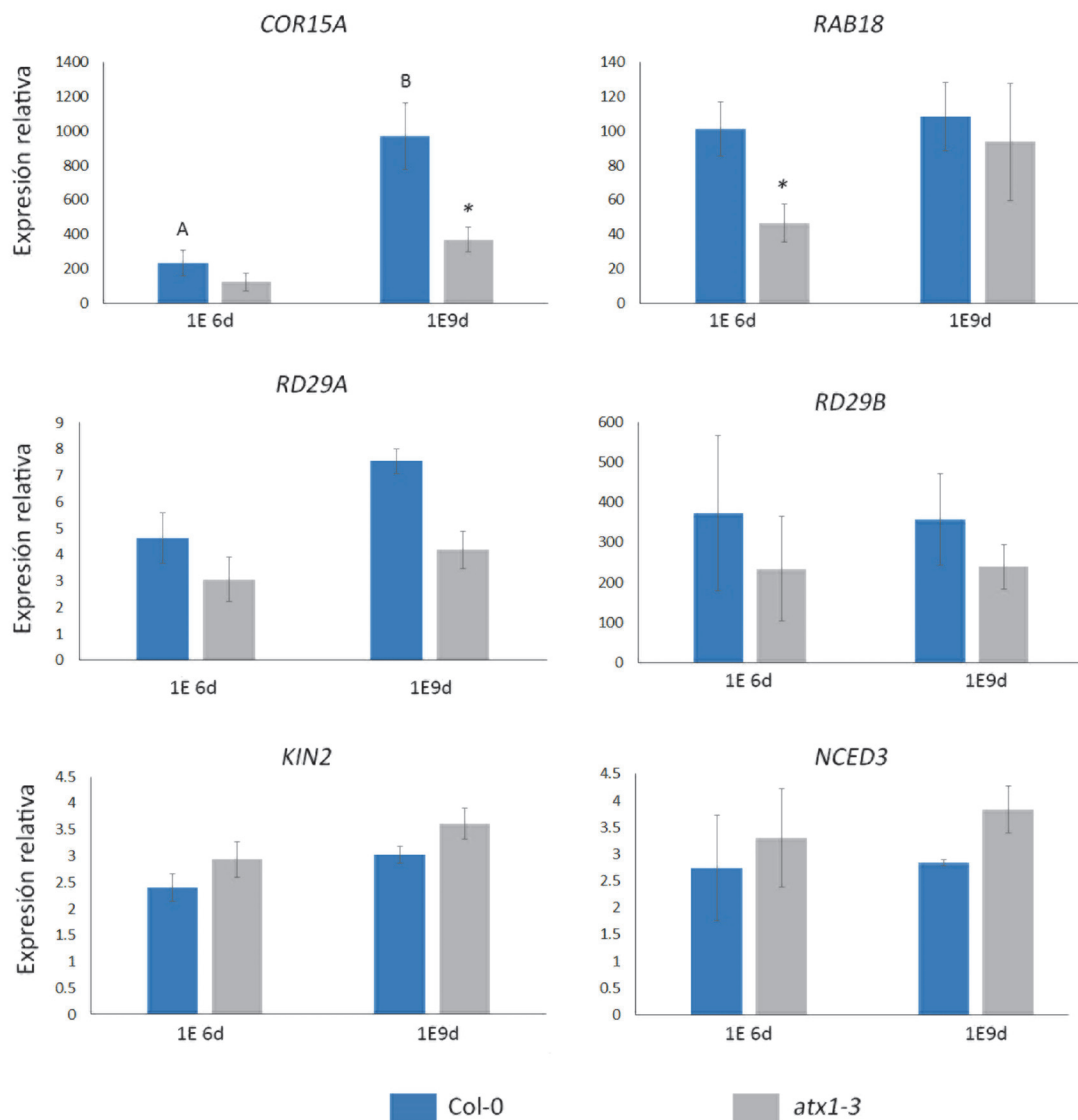


Figura suplementaria 6. Comparación en la expresión de los genes de respuesta en diferentes etapas del desarrollo. Comparación de los genes de respuesta *COR15A*, *RAB18*, *RD29A*, *RD29B*, *KIN2* y *NCED3* en plantas que fueron sometidas a un primer estrés a los 5 dps por 24 h (1E 6d) y a los 8 dps (1E 9d). Todos los resultados de Col-0 están normalizados respecto a Col-0 control (Ctr) y todos los de *atx1-3* están normalizados respecto a *atx1-3* control (Ctr). Las barras indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas para *atx-1* y dos réplicas biológicas para Col-0, cada una con una réplica técnica. Los asteriscos simbolizan diferencias significativas entre Col-0 y *atx-1* en ese tratamiento, y las diferentes letras representan diferencias significativas entre los tratamientos para Col-0. Prueba de ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Tukey $p < 0.05$ (* y letras).

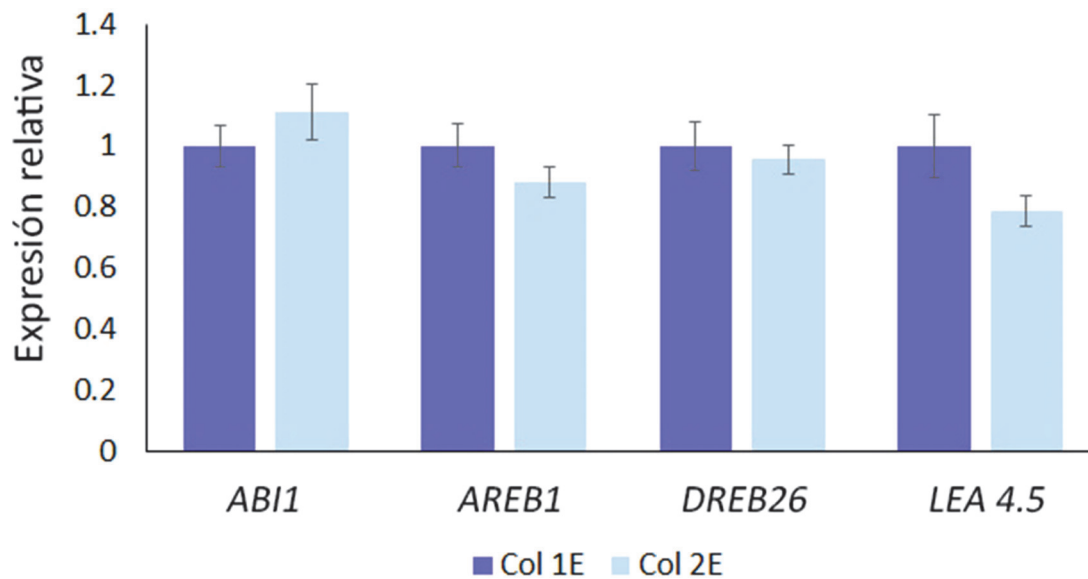


Figura suplementaria 7. Expresión de otros genes de respuesta ante dos estímulos de estrés osmótico.

Los genes *ABI1*, *AREB1*, *DREB26* y *LEA4.5* fueron evaluados en las plantas que sólo pasaron por un primer estrés (1E) y las expuestas a dos estímulos de estrés (2E). Datos normalizados respecto a Col-0 1E. Las barras indican la desviación estándar de tres réplicas de pipeteo. Resultado de un muestreo biológico y una réplica técnica.

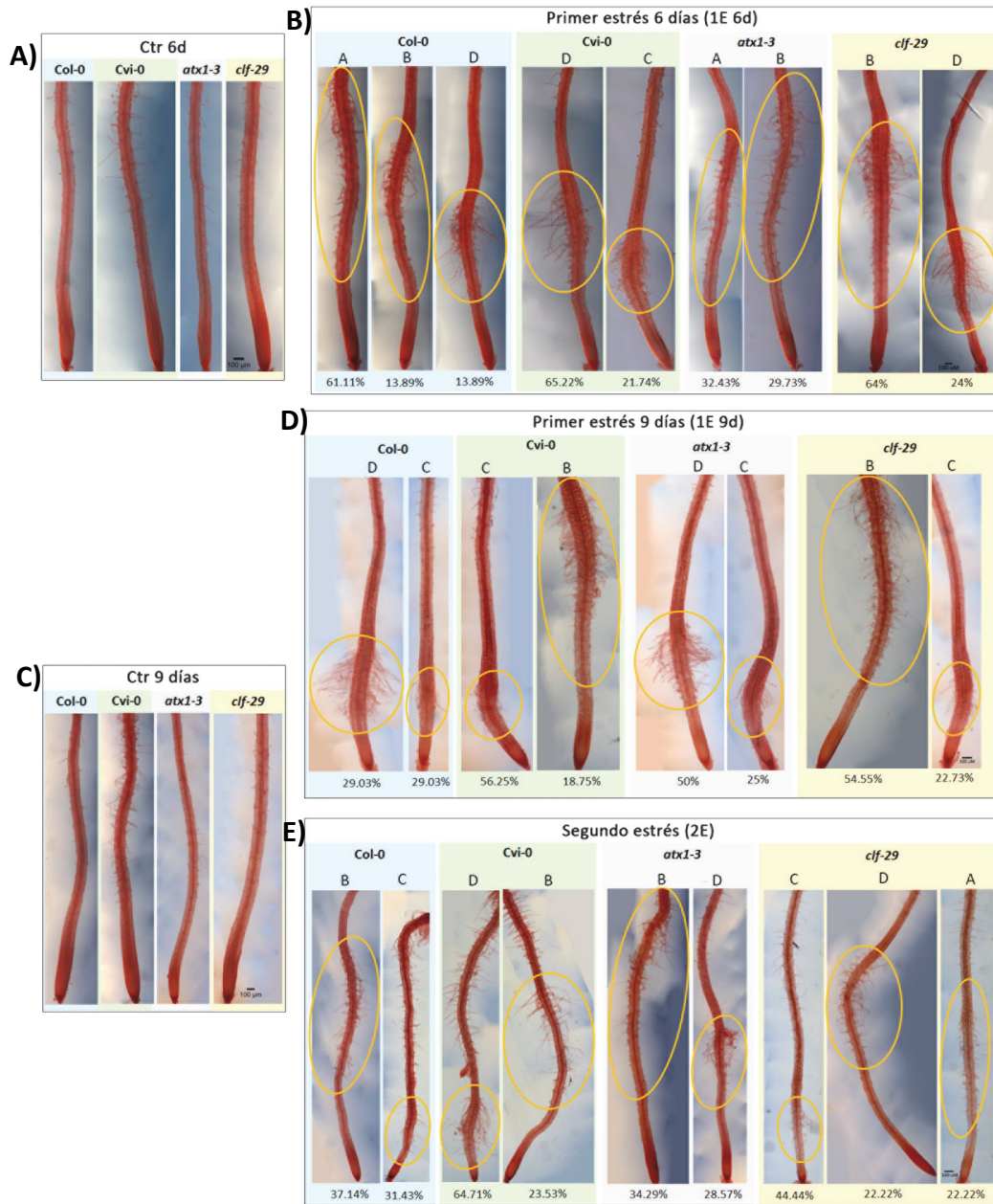


Figura suplementaria 8. Diversidad en la morfología de la “cicatriz” en los ecotipos Col-0 y Cvi-0, y las mutantes *atx1-3* y *clf-29* ante dos eventos de estrés osmótico. A) Plantas no expuestas de seis dps, ctr= control; B) Plantas de cinco dps fueron expuestas por primera vez a 300 mM por 24 hrs (1E 6d); C) Plantas no expuestas de nueve dps, ctr= control; D) Plantas de 8dps fueron expuestas por primera vez a 300 mM por 24 hrs (1E 9d); E) Segunda exposición a manitol 300 mM por 24 hrs (2E). Para cada uno de los genotipos se muestran los dos fenotipos más frecuentes en cada tratamiento, debajo de las figuras se indica el porcentaje. Resultado de tres réplicas biológicas para Col-0 y *atx1-3* (n~30) y dos réplicas biológicas para Cvi-0 y *clf-29* (n~20).

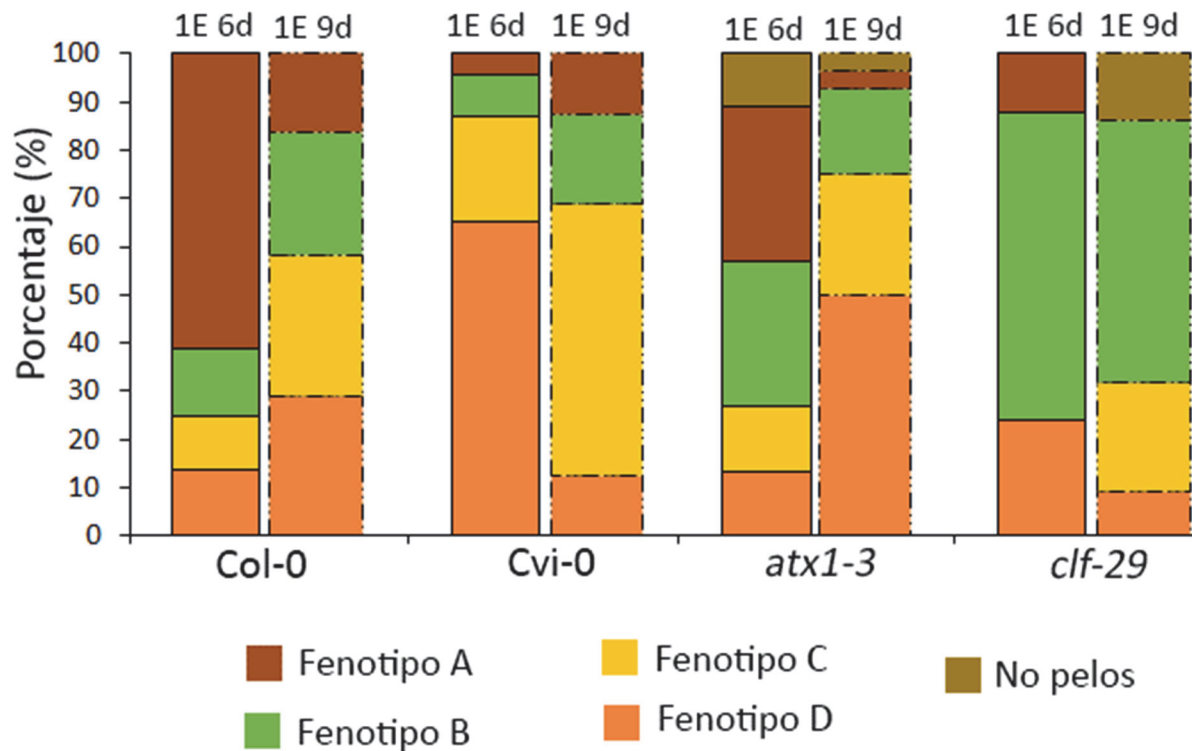


Figura suplementaria 9. Frecuencia de los diferentes fenotipos que se generan en diferentes etapas del desarrollo ante un primer estrés. Plantas que crecieron por cinco días en condiciones control y posteriormente fueron transferidas a un primer estrés con 300 mM de manitol por 24 h (1E 6d) y plantas que crecieron en condiciones control por ocho días y posteriormente fueron sometidas a un primer estrés de la misma magnitud por 24 h (1E 9d). Resultado de tres réplicas biológicas para Col-0 y *atx1-3* (n~30) y dos réplicas biológicas para *Cvi-0* y *clf-29* (n~20).

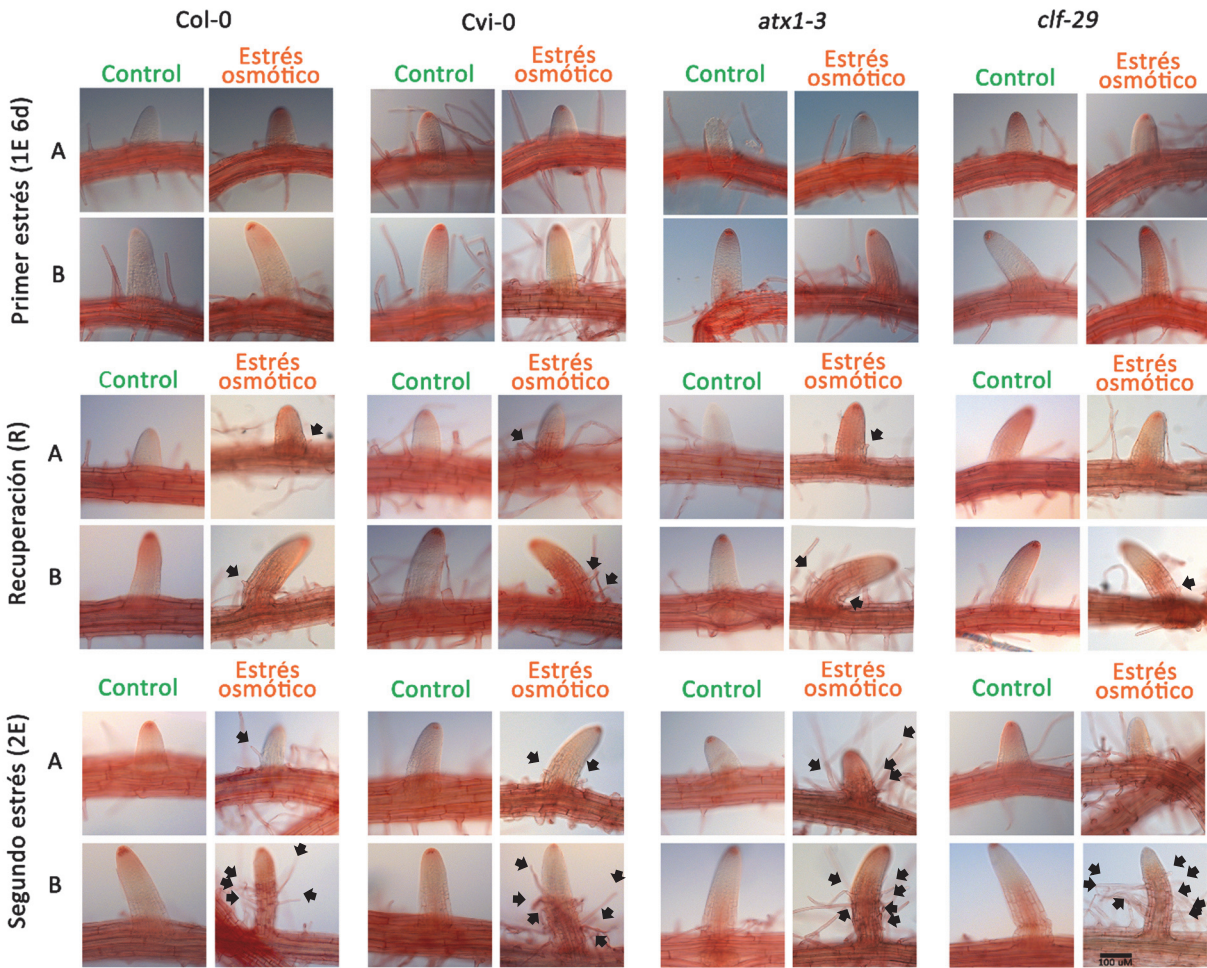


Figura suplementaria 10. Formación de pelos radiculares en las raíces laterales jóvenes de Col-0, Cvi-0, *atx1-3* y *clf-29* como respuesta de memoria al estrés osmótico. Los fenotipos se evaluaron 24 h después del primer evento de estrés inducido con 300 mM de manitol, a las 48 h de recuperación en MS y a las 24 h después de un segundo evento de estrés. El panel A muestra raíces laterales más jóvenes que el panel B. Las flechas señalan la presencia de pelos prematuros en las raíces.

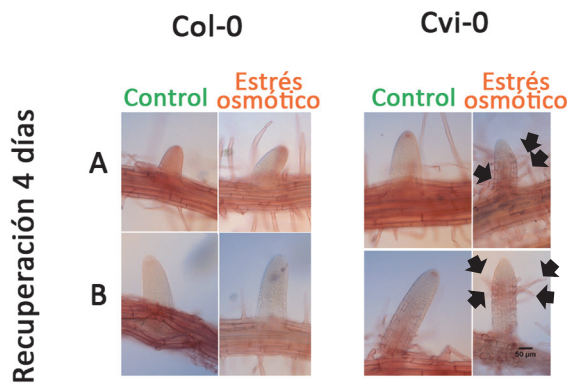


Figura suplementaria 11. Desarrollo prematuro de pelos radiculares en las raíces laterales. Después de un primer estrés inducido con 300 mM de manitol por 24 h, las plantas fueron recuperadas por cuatro días en medio MS. Las flechas señalan la presencia de pelos prematuros en las raíces.

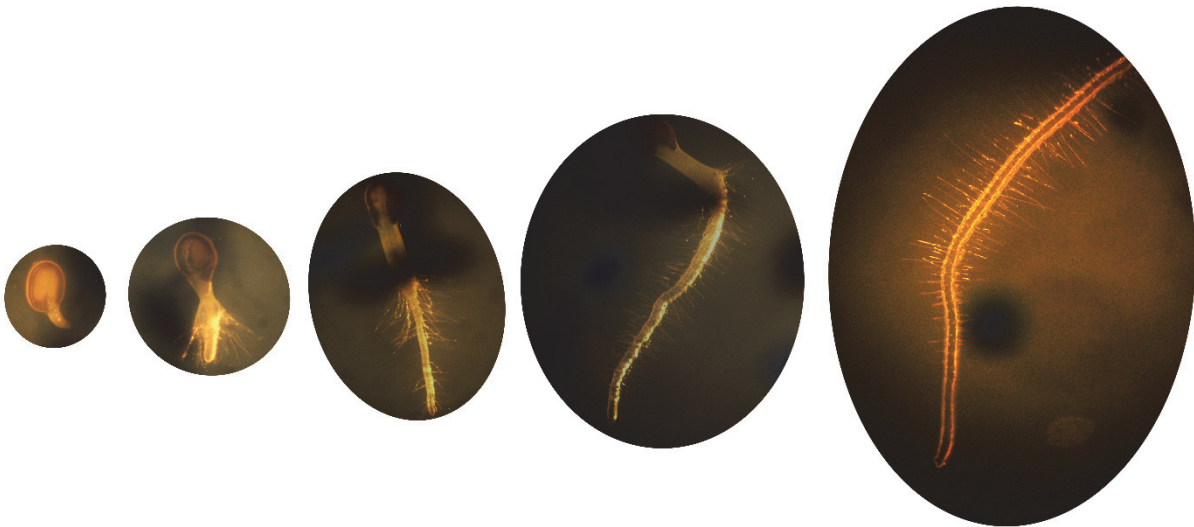


Figura suplementaria 12. Desarrollo de la raíz después de la germinación en estrés osmótico. Plantas de Cvi-0 fueron sembradas directamente en 300 mM de manitol. En cada etapa del desarrollo después de la germinación se observa la ausencia de la zona prematura de pelos radiculares.



Figura suplementaria 13. Cicatriz carente de pelos radiculares en estrés severo. Plantas de Col-0 fueron crecidas por cinco días en condiciones control y posteriormente transferidas a 400 y 500 mM de manitol por 24 h. 1 réplica biológica n~15.

12. ANEXO II. DATOS SUPLEMENTARIOS.

12.1 Comprobación de la metodología usada para inducir estrés.

Para planificar el momento de inducción de la transcripción de los genes de respuesta se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes RD26 (RESPONSIVE TO DESICCATION 26), un factor transcripcional de la familia NAC que actúa como activador en respuesta a ácido abscísico; KIN2/COR6.6 (COLD-RESPONSIVE 6.6), un gen que responde a estrés osmótico, por frío y salinidad; y ABI1 (ABA INSENSITIVE 1), que se activa por ácido abscísico y está involucrado en la respuesta fisiológica del cierre de estomas para evitar la pérdida de agua.

Usando los datos recopilados en la base de datos TAIR de los transcriptomas de *Arabidopsis* bajo diversos estímulos bióticos y abióticos (<http://bbc.botany.utoronto.ca>), se observó que los tres genes se expresan en mayor cantidad desde las 6 y hasta las 24 h de exposición a 300 mM de manitol manitol 300 (Fig. S14).

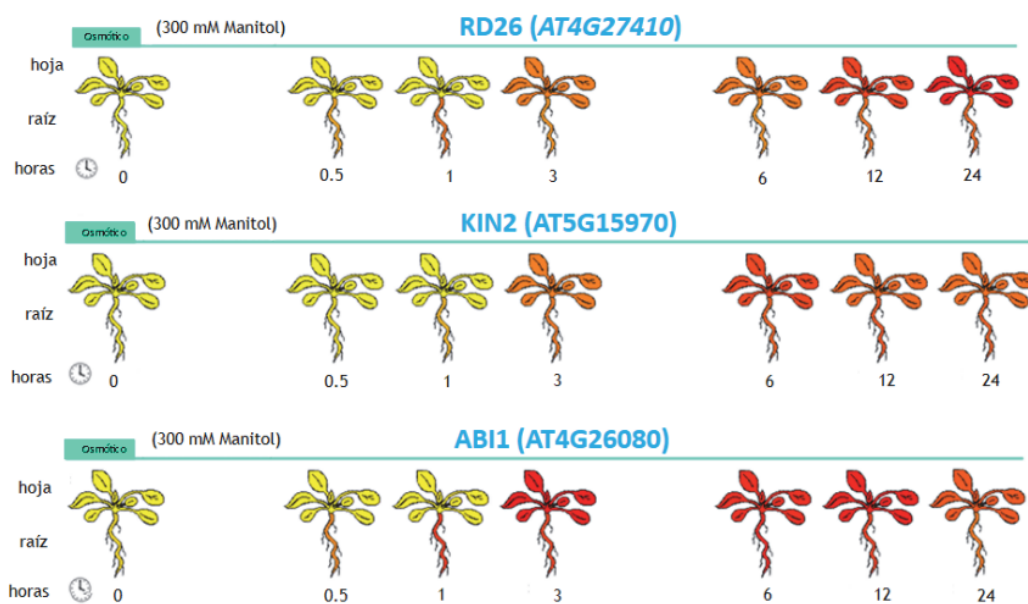


Figura Suplementaria 14. Patrones de expresión en hoja y raíz de tres genes implicados en la respuesta a estrés osmótico en diferentes h de exposición con 300 mM de manitol. Se muestra un gradiente en la expresión según la intensidad de los colores, el amarillo indica una baja expresión y el color rojo un aumento en ésta. Información obtenida de <http://bbc.botany.utoronto.ca>.

Se consideró que, dentro de la ventana de expresión, se realizaría la evaluación del estrés a las 8 h de tratamiento. Mediante los ensayos de PCR semicuantitativos se confirmó que la metodología empleada de 300 mM (-0.85 MPa) durante 8 h es suficiente para inducir una respuesta a estrés osmótico en los ecotipos, pues hay un aumento en la transcripción de los genes de respuesta a estrés respecto a los controles (Fig. S15). Éste fue el tratamiento que se realizó para el análisis de microarreglo y las qPCRs.

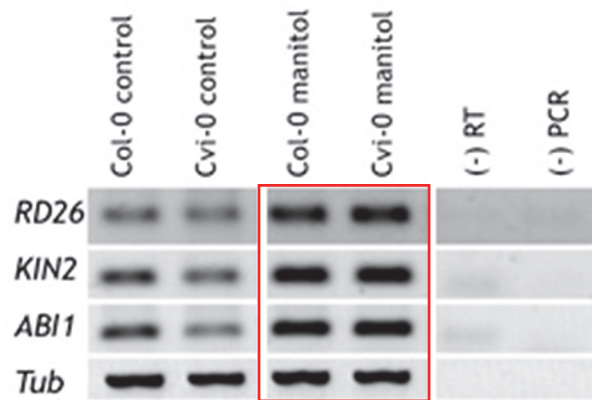


Figura Suplementaria 15. Expresión de los genes de respuesta a las 8 h de estrés osmótico en los ecotipos Col-0 y Cvi-0. Las plantas tratadas fueron crecidas durante 8 h en medio MS adicionado con 300 mM de manitol. Las tubulinas (*Tub*) fueron empleadas como genes de referencia (constitutivos). (-) RT y (-) PCR son los controles negativos. Gel representativo de dos réplicas técnicas.