



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización bioenergética y metabólica de las
mitocondrias de *Arabidopsis thaliana*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

EMILIA REFUGIO GUTIÉRREZ MIRELES



Ciudad Universitaria, CD. MX, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: José Pedraza Chaverri
VOCAL: Profesor: Euclides Avila Chávez
SECRETARIO: Profesor: Manuel Gutiérrez Aguilar
1er. SUPLENTE: Profesora: Perla Deyanira Maldonado Jiménez
2° SUPLENTE: Profesor: Javier Axosco Marín

Tutor: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
Laboratorio 115 Departamento de Bioquímica
Edificio E, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México,
Coyoacán, CDMX. C.P. 04510
México

Emilia Refugio Gutiérrez Mireles
(Sustentante)

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
(Asesor)

Definiciones de abreviaturas del presente texto

ANT: Translocador de nucleótidos de adenina

AtCyp21: Ciclofilina de *Arabidopsis thaliana* tipo 21

ATP: Adenosín trifosfato

CCCP: carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

Col-0: Columbia 0

CsA: Ciclosporina A

CYP: Ciclofilina

CypD: Ciclofilina D

DNA: Ácido desoxirribonucleico

HSP: Heat shock protein

MCU: Uniportador de calcio mitocondrial

MS: Murashige y Skoog

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFD: Perfluorodecalina

PTP: Poro de transición de la permeabilidad

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TBE: Buffer de Tris-Borato y EDTA

UV-C: Radiación ultravioleta tipo C

WT: Wild type (tipo silvestre)

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por las instalaciones y recursos brindados que permitieron mi formación profesional y personal.

Esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto DGAPA-PAPIIT IA203419 “Regulación genética de la transición de la permeabilidad mitocondrial en *Arabidopsis thaliana*”.

Se agradece el apoyo de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por proporcionar materiales vegetales y reactivos necesario para la culminación del presente estudio.

A los honorables miembros del jurado: Dr. José Pedraza Chaverri, Dr. Euclides Avila Chávez y Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar por sus sugerencias, tiempo y comentarios para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	6
1.2 El estrés abiótico y la muerte celular en plantas	9
1.2.1 Estrés térmico.....	11
1.2.2 Estrés por radiación ultravioleta tipo C (UV-C)	13
1.2.3 Evaluación de la respuesta a estrés abiótico.....	14
1.3 Las mitocondrias de plantas.....	19
1.4 El poro de transición de la permeabilidad	21
1.4.1 Ciclofilina mitocondrial: AtCyp21-3	23
1.4.2 Presencia del PTP en plantas.....	27
2. HIPOTESIS.....	29
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GENERAL	29
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA	29
4.1 Materiales y reactivos	29
4.1.1 Equipos empleados	30
4.1.2 Material vegetal (<i>Arabidopsis thaliana</i>).....	31
4.1.3 Amortiguador de extracción	31
4.1.4 Amortiguador para tinción de hojas	31
4.2 Metodología	32
4.2.1 Aislamiento de DNA.....	32
4.2.2 Oligonucleótidos	33
4.2.3 Reacción de PCR	33
4.2.4 Exposición de <i>A. thaliana</i> a estrés por radiación UV-C.....	34
4.2.4.1 Exposición de plántulas.....	34
4.2.4.2 Exposición de plantas.....	34
4.2.4.3 Tinción de hojas con JC-1	35
4.2.5 Exposición de <i>A. thaliana</i> a estrés térmico (37°C).....	35

4.2.5.1 Exposición de plántulas	35
4.2.5.2 Exposición de plantas.....	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Genotipificación de la cepa AtCyp21-3	37
5.2 Crecimiento de la cepa Col-0 y AtCyp21-3	38
5.3 Las mitocondrias de la cepa AtCyp21-3 mantienen un $\Delta\Psi$ estable.	40
5.4 Las plantas de la cepa AtCyp21-3 son resistentes a radiación UV-C.	41
5.5 Las plantas de la cepa AtCyp21-3 son sensibles a estrés térmico.	45
6. DISCUSIÓN.....	49
7. CONCLUSIONES	53
8. PERSPECTIVAS	53
9. BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura	Contenido	Página
1	Orden de respuesta de plantas ante una situación de estrés.	18
2	Tinción de mitocondrias en protoplastos con Mitotracker Green.	20
3	Los niveles de transcrito del gen At2g47320 se detectan en múltiples tejidos en <i>A. thaliana</i> usando el Arabidopsis eFP browser (Winter et al., 2007).	26
4	Genotipificación de las plantas Col-0 y mutantes isogénicas AtCyp21-3	38
5	Comparación fenotípica entre la cepa Col-0 y AtCyp21-3.	39
6	Evaluación del potencial de membrana mitocondrial.	41
7	Diferencias de crecimiento entre las plántulas de la cepa Col-0 y AtCyp21-3.	43
8	Diferencias de crecimiento entre las plantas de 3 semanas de edad de la cepa Col-0 y AtCyp21-3.	44
9	Diferencias de crecimiento entre las plántulas de la cepa Col-0 y AtCyp21-3.	46
10	Diferencias de crecimiento entre las plantas de 3 semanas de edad de cepa Col-0 y AtCyp21-3.	47

Tabla 1	Predicción de la localización de seis isoformas de ciclofilinas de interés en <i>A. thaliana</i> usando el software ARAMEMNON versión 8.1.	25
Tabla 2	Detección de un probable PTP en mitocondrias de diversas especies de plantas.	28
Tabla 3	Oligonucleótidos empleados para la genotipificación.	33
Tabla 4	Reactivos empleados para las PCRs.	33
Tabla 5	Condiciones de reacción de genotipificación.	34
Tabla 6	Plantas Col-0 y AtCyp21-3 en condiciones control y estrés por UV-C durante las primeras dos valoraciones.	42
Tabla 7	Plantas Col-0 y AtCyp21-3 en condiciones control y sometidas a estrés térmico (37 °C) durante las primeras dos valoraciones.	45

RESUMEN

Las mitocondrias de diversas especies vegetales presentan un Poro de Transición de la Permeabilidad (PTP) mitocondrial que al abrirse ocasiona la muerte celular. El PTP se activa por estímulos de estrés abiótico y es inhibido con ligandos de ciclofilinas. A pesar de ser un fenómeno relativamente estudiado, la composición molecular del PTP es motivo de constante debate. En el presente trabajo de tesis se evaluó la probable participación de la ciclofilina AtCyp21-3 (Ciclofilina de *Arabidopsis thaliana* tipo 21) como componente del PTP inducido por radiación ultravioleta tipo C (UV-C) y estrés térmico en una cepa de *Arabidopsis thaliana* silvestre (WT) y otra mutante isogénica carente de la ciclofilina AtCyp21-3.

Los resultados indican que la supresión de la AtCyp21-3 no afecta el potencial de membrana mitocondrial, pero confiere menor sensibilidad al estrés por radiación UV-C. Adicionalmente se observó que la cepa carente de AtCyp21-3 es más sensible al estrés térmico. Lo anterior nos lleva a postular que la carencia de la ciclofilina AtCyp21-3 inhibe la apertura del PTP inducido por radiación UV-C, pero no por estrés térmico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

El género *Arabidopsis* comprende nueve especies, entre las cuales podemos encontrar a *A. thaliana*. Esta es una planta pequeña de la familia *Brassicaceae*, y principalmente se puede encontrar en Europa, Asia y América del Norte, sin embargo, por su gran versatilidad *A. thaliana* tiene una distribución mundial (Al-Shehbaz & O'Kane, 2002).

El uso de *A. thaliana* como modelo de estudio en laboratorios de genética y biología molecular es muy común, ya que trabajar con esta planta supone numerosas ventajas, entre las que destacan su tamaño pequeño (aproximadamente 20 cm), rápido desarrollo (3 a 4 semanas) y la posibilidad de obtener cientos de semillas por planta (20 a 30 semillas por flor) (Grundmann, Kim, & Wong, 2013). Existen numerosos estudios con *A. thaliana* que datan del siglo pasado. Sin embargo, su utilización aumentó considerablemente desde hace dos décadas cuando su genoma compuesto por 5 cromosomas fue secuenciado (Kaul et al., 2000). Lo anterior contribuyó significativamente al desarrollo de los estudios moleculares de modelos vegetales y otras disciplinas afines (Relichova, 1998). *A. thaliana* puede crecer en diferentes entornos ambientales tales como incubadoras, invernaderos e incluso en exteriores. Para los medios de crecimiento se emplean sustratos (suelo), mezclas comerciales de invernadero, vermiculita e incluso soluciones nutritivas como medio Murashige Skoog (MS) y cajas Petri con agar (Murashige & Skoog, 1962).

Este modelo vegetal permite realizar experimentación en sus diversos estados de crecimiento: desde semillas, plántulas, raíces, hojas y también en la planta madura.

Esto ha derivado en un impresionante conjunto de descubrimientos que han permitido implementar técnicas avanzadas de transformación genética. Por ejemplo, la transformación de *A. thaliana* por la técnica de “inmersión floral” es comúnmente utilizada para generar variantes transgénicas o para interrumpir las secuencias codificantes de genes de interés (Clough & Bent, 1998). Con esto se han generado colecciones de líneas con sobreexpresión o eliminación, disponibles en sistemas de distribución en línea (www.arabidopsis.org) (Tonsor et al., 2005).

A. thaliana tiene la capacidad de autofertilizarse. Por lo anterior, existen múltiples líneas endogámicas de evolución paralela, las cuales son prácticamente homocigóticas. Esto llevó posteriormente a considerar estas plantas como “ecotipos”, refiriéndose a poblaciones de la misma especie, pero adaptadas a sus condiciones ambientes locales o específicas de crecimiento (Mondragón, 2019). Es importante destacar que actualmente el estudio y análisis molecular de la variación genética natural o dirigida no sólo funciona para la correlación entre funciones de genes conocidos, sino también para el descubrimiento de nuevos (Shindo et al., 2007).

Actualmente es posible obtener pistas sobre la función o participación de los transcritos o productos proteicos en la fisiología de *A. thaliana* a través de la mutagénesis en laboratorio (genética reversa), seguida de observaciones fenotípicas variables asociadas a la activación o desactivación de genes de interés. Esto ha llevado a dilucidar diversos genes responsables de vías metabólicas importantes o indispensables para esta planta (Tonsor et al., 2005).

A. thaliana ha proporcionado información sumamente valiosa en muchos aspectos de la biología moderna, los cuales pueden ser válidos en otros modelos o especies vegetales. Por ejemplo, el crecimiento y desarrollo de una planta no lleva un plan estrictamente definido, ya que estos organismos están comúnmente expuestos a interacciones con el ambiente, lo que genera modificaciones en la expresión de productos génicos. A este fenómeno se le conoce como “plasticidad fenotípica” y se define como la capacidad de un organismo de producir diferentes fenotipos en respuesta a cambios en el ambiente (Robinson, 1994). Para que una planta crezca con un desarrollo óptimo en términos de su reproducción, adecuación y evolución, es necesario considerar un gran número de factores ambientales como la temperatura, luz (fotoperiodos), humedad, concentración de O₂ y CO₂ en el aire, disponibilidad de agua en el suelo, salinidad y presencia de contaminantes, entre otros (Mondragón, 2019; Weigel, 2012).

Una ventaja de usar *A. thaliana* como modelo de estudio es la posibilidad de monitorear la expresión de diversos genes con el uso de protoplastos aislados del mesófilo. Esto permite llevar a cabo análisis para conocer a detalle procesos como la regulación de vías de señalización, mecanismos celulares de síntesis de pared celular, división celular, embriogénesis, actividad fotosintética o mitocondrial, así como fenómenos de transporte, entre otros. Para poder realizar experimentos con estos modelos celulares es necesario aislar a los protoplastos íntegros con la ayuda de tratamientos enzimáticos (por ejemplo, celulasa y pectinasa) que eliminan la pared celular (Mathur et al., 1995; Yoo et al., 2007).

1.2 El estrés abiótico y la muerte celular en plantas

El estrés se puede definir en forma general como cualquier factor, elemento o agente potencialmente desfavorable para el desarrollo de los seres vivos (Yepes, Adriana & Silveira Buckeridge, 2011). Este a su vez es capaz de generar un cambio o disminución en el desempeño fisiológico, metabólico y molecular. Si el estímulo es de magnitud no tolerable, este genera muerte celular y posiblemente muerte del organismo (Mondragón, 2019; Yepes, Adriana & Silveira Buckeridge, 2011). Los factores ambientales influyen de manera importante en la homeostasis de los organismos ya que existe una estrecha relación entre los flujos de energía y de materia, lo que posteriormente genera una respuesta por parte del sistema biológico (Yepes, Adriana & Silveira Buckeridge, 2011). Una vez que el modelo de estudio se expone a estímulos negativos durante minutos, horas o incluso de días, el desempeño fisiológico de este se puede afectar, generalmente alterando el metabolismo general de la planta. Posteriormente a su exposición, la planta entra en un periodo fisiológico de recuperación gradual, aclimatándose y adaptándose a procesos de compensación homeostática (Mondragón, 2019; Yepes, Adriana & Silveira Buckeridge, 2011).

Hay estudios que demuestran el efecto de la sobreexpresión de algunos genes de plantas en animales, relacionados a la muerte celular programada (Danon et al., 2000). En estos estudios se ha demostrado que la expresión heteróloga de genes de plantas en animales ocasiona el mismo fenotipo de muerte celular, sugiriendo que -a pesar de sus diferencias- las plantas y animales pueden compartir vías responsables de la muerte celular (Danon et al., 2000).

Cuando una célula se enfrenta a estrés ambiental, se pueden desencadenar reacciones de muerte celular programada (apoptosis), muerte por necrosis o muerte inducida por otras células. En este sentido existen reportes enfocados en el diseño de estrategias que contrarresten la muerte celular en un contexto de estrés abiótico (Danon et al., 2000). Un blanco de especial relevancia en la modulación de la muerte celular programada o incluso en la muerte por necrosis es la mitocondria (Danon et al., 2004; Gao et al., 2008).

Al someter una planta a estrés, se pueden observar efectos, como crecimiento alterado o la inducción de hojas cloróticas. Sin embargo, existen otros como la floración temprana, que -aunque parezca contradictorio- es una respuesta común, ya que permite la supervivencia de la especie generando descendencia. En estos procesos, las mitocondrias pueden fungir como un importante centro de señalización (Liberatore et al., 2016).

En todos los organismos multicelulares, se ha medido la muerte celular programada o apoptosis cuando las células se autodestruyen al ser dañadas o como parte de su desarrollo normal, proceso que está bien definido en células animales (D'Arcy, 2019). Aunque en plantas también existen varios tipos de programas de muerte con características similares (Van Doorn et al., 2011). Es posible diferenciar el tipo de muerte celular programada que experimenta una célula de acuerdo a criterios morfológicos tales como condensación de cromatina, núcleo y fragmentación celular (Tower, 2015). Otra característica de la apoptosis es la degradación del ácido desoxirribonucleico (DNA) en patrones "escalonados", lo cual puede ser observado como fragmentos de DNA oligosomal en múltiplos de 180 pb, debido a la expresión de una DNasa activada por caspasas al activarse la apoptosis (Danon & Gallois,

1998). En modelos vegetales también se ha encontrado el mismo proceso “escalonado” de degradación de DNA al ser sometido a diferentes tipos de estrés, sugiriendo que la muerte celular programada de la planta (apoptosis vacuolar) y la apoptosis animal podrían compartir algunos componentes (Danon & Gallois, 1998; Van Doorn et al., 2011). Actualmente se han identificado muchos genes implicados en la apoptosis, sin embargo, se siguen buscando a sus homólogos vegetales, para poder entender los puntos de convergencia o divergencia de los procesos en ambos tipos de eucariontes (Danon et al., 2004). Por esta razón se busca establecer modelos vegetales en los cuales estos procesos puedan ser estudiados a nivel molecular e inducidos para su estudio y manipulación en plantas y protoplastos.

1.2.1 Estrés térmico

Entre las principales variables que afectan a la distribución y productividad de las plantas podemos encontrar a la temperatura (Sage & Kubien, 2007). Las variaciones en la temperatura durante el año generan fluctuaciones en procesos fisiológicos en todas las escalas temporales y espaciales. Entre estos procesos figuran el crecimiento, estructura y arquitectura de las hojas, así como la profundidad y plasticidad de las raíces, etc. Por lo anterior, la temperatura puede fungir como una verdadera limitante del desarrollo y supervivencia de la planta (Sage, 1990; Yepes, Adriana & Silveira Buckeridge, 2011). Las plantas terrestres tienen temperaturas óptimas de crecimiento entre 5° y 40°C en sus respectivos ecosistemas. De igual forma, la fotosíntesis también tiene rangos de temperatura óptima bien definidos para cada especie (Sage & Kubien, 2007).

Actualmente hay una gran variedad de estudios enfocados en comprender la

respuesta de plantas a estrés térmico. En algunos de estos estudios se ha detectado la sobreexpresión de algunas proteínas del choque térmico (HSP), que son proteínas inducidas transcripcionalmente tras la exposición a calor moderado y presentan funciones como chaperonas (Vacca et al., 2006). Este tipo de proteínas pueden contrarrestar los problemas causados por el mal plegamiento y agregación de diversas proteínas. Las HSP son típicamente sobreexpresadas como mecanismo de adaptación a entornos estresantes y protegen a las plantas de las altas temperaturas. Sin embargo, las HSP son genéticamente complejas pues no siempre se expresan en condiciones de estrés y su presencia involucra muchos cambios en el organismo. Las manifestaciones de estas respuestas incluso pueden variar entre los diversos ecotipos de *A. thaliana* (Queitsch et al., 2000). Adicionalmente, cada familia de proteínas de choque térmico tiene un mecanismo de acción único (Tonsor et al., 2005). Algunos ayudan a la degradación de proteínas mal plegadas (mediada por el proteosoma); otros se unen a intermediarios plegables de diferentes tipos, evitando que se agreguen (Hsp70 y Hsp60) y otros más promueven la renaturalización de proteínas que ya se agregaron (Queitsch et al., 2000; Tonsor et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, la temperatura juega un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de una planta. Su papel se refleja en el éxito reproductivo de las especies, pues afecta directamente al rendimiento de los cultivos. Lo anterior indica que la capacidad de poder soportar el estrés térmico - aunado a estrés hídrico- puede tener gran relevancia en la productividad de la industria agrícola (Queitsch et al., 2000).

1.2.2 Estrés por radiación ultravioleta tipo C (UV-C)

La luz solar es la fuente de energía para el proceso fotosintético. Este promueve la apertura estomática y el consecuente aumento en la tasa de difusión de CO₂. Sin embargo, un elevado índice UV puede producir daño en el aparato fotosintético, el cual constantemente se asocia a condiciones de sequía y/o temperaturas extremas (Huseynova et al., 2016). Si el estrés por radiación UV es excesivo, las plantas pueden morir por procesos generalizados de apoptosis y otros tipos de muerte celular (Danon & Gallois, 1998; Danon et al., 2004; Van Doorn et al., 2011).

La radiación UV puede atacar diferentes aspectos de la planta, principalmente a nivel de DNA, proteínas y membranas. La radiación UV se divide en UV-C (longitudes de onda inferiores a 280 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-A (320-390 nm). La radiación UV-C no es fisiológicamente relevante para las plantas, ya que el O₃ en la estratosfera de la tierra la bloquea en gran medida. Sin embargo, sus fotoproductos de DNA son similares a los obtenidos al exponerse a radiación UV-B, que si alcanza la superficie de la tierra. Por lo anterior, es común encontrar estudios en donde se utiliza la radiación UV-C para el estudio de respuestas fisiológicas relevantes al daño de DNA (Danon & Gallois, 1998; Jansen et al., 1998; Martin & Cotter, 1991). Las plantas requieren luz para la fotosíntesis, por lo tanto, tuvieron que desarrollar estrategias para protegerse de los daños ocasionados por la radiación UV. Entre estos daños figuran los sistemas de reparación del DNA, los cuales son sumamente eficientes para contrarrestar los aductos formados en el material genético (Jeon et al., 2013). Cuando la radiación es mayor (elevados índices de luz UV), se presentan alteraciones a nivel mitocondrial (pérdida del potencial de membrana) que desencadenan la muerte celular (Danon & Gallois,

1998; Gao et al., 2008; Jansen et al., 1998). Específicamente, la radiación UV ionizante produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y muerte celular programada en protoplastos, además dicho estímulo induce la pérdida del potencial transmembranal mitocondrial. Posteriormente, las mitocondrias se aglomeran en diferentes lugares dentro del citoplasma en donde presentan una disminución en sus características dinámicas y energéticas (Gao et al., 2008).

1.2.3 Evaluación de la respuesta a estrés abiótico

Una forma muy común de poder evaluar la respuesta de las plantas a diferentes estímulos de estrés biótico o abiótico es estudiando su variación fenotípica. Esta se define como la distribución o rango de rasgos morfológicos, fenológicos, bioquímicos y de desarrollo dentro y entre taxones individuales (Diaz et al., 2005; Kalisz & Kramer, 2008). Dicha variación fenotípica se puede manifestar de diferentes formas, tales como la presencia de órganos repetidos (por ejemplo, tallos múltiples) en la misma planta, hasta diferencias fenotípicas entre especies o géneros. Hay estudios en los que se han encontrado altas variaciones entre especies y poblaciones de plantas. Estas variaciones pueden ser desde sutiles hasta dramáticas. Las mutaciones naturales son la fuente principal de variación fenotípica. Sus causas generalmente son muy complejas, ya que pueden ser inducidas por cambios genéticos o por factores ambientales en la epigenética de la planta, lo cual puede modificar el metabolismo y sus condiciones de desarrollo (Kalisz & Kramer, 2008).

Una forma de evaluar la muerte celular es la senescencia de las hojas, la cual es un proceso altamente organizado, bien regulado e imprescindible para el desarrollo de la vida de la planta. Durante su crecimiento, las hojas verdes acumulan nutrientes

e inducen la movilización y reciclaje de estos a las semillas. Por esta razón, el envejecimiento o estrés puede inducir la senescencia de las hojas. La etapa final de este proceso es la muerte celular, la cual se regula hasta reciclar los nutrientes de las hojas (Diaz et al., 2005; Hörtensteiner & Feller, 2002).

El crecimiento y senescencia foliar son procesos complejos caracterizados por fuertes variaciones espaciales y temporales que están controladas por numerosos factores endógenos y exógenos (Diaz et al., 2005). Entre los primeros síntomas de la senescencia se encuentra la degradación de la clorofila en hojas (por disminución en la fotosíntesis y en carbohidratos). Esta es relativamente fácil de detectar con la formación de zonas amarillentas en las hojas, las cuales llamaremos zonas “cloróticas” en el presente trabajo. Existen diversos procesos de degradación una vez que la senescencia comienza a tomar lugar, tales como la degradación de proteínas (hasta el 75% de las proteínas que se encuentran en el cloroplasto se degradan y movilizan). Adicionalmente se da la degradación de diversos transcritos, la movilización de nutrientes (azufre, fósforo, iones metálicos y minerales) y el metabolismo acelerado de los lípidos de membrana. Estos procesos catabólicos producen deficiencias en la integridad estructural y funcional de la planta. Generalmente para monitorear la senescencia respecto al tiempo se utilizan marcadores como la fluorescencia de la clorofila o cambios en los patrones de expresión génica, indicando degradación de macromoléculas y movilización de nutrientes (Diaz et al., 2005; Wiese et al., 2007).

Las plantas comúnmente logran perdurar ante condiciones de estrés mediante el desarrollo de estructuras vegetales más duraderas y estables como las semillas, bulbos y rizomas. Sin embargo, dichas adaptaciones únicamente son adecuadas

para situaciones estresantes que son hasta cierto punto predecibles (condiciones que pueden suceder a lo largo del año) o que se desarrollen lentamente para permitir que la planta pueda responder con cambios funcionales, estructurales y fisiológicos (Walter & Schurr, 2005; Wiese et al., 2007). Además, las plantas comúnmente inducen un mecanismo de respuesta cuando los cambios ambientales realmente afectan el rendimiento de la planta. El “patrón modular” es la base de la adaptación de la planta a entornos que pueden cambiar. Esto significa que su crecimiento está genéticamente fijado hasta cierto punto, pero este puede ser modificado por condiciones ambientales (Walter & Schurr, 2005).

Los múltiples factores que constituyen el estrés ambiental se pueden agrupar en dos tipos de estrés: biótico y abiótico. El primero se refiere a impactos negativos al interactuar con viroides, virus, bacterias y hongos, produciendo cambios a nivel bioquímico, molecular y metabólico (afectando su crecimiento) o con asociaciones simbióticas que pueden generar un beneficio o disfunción en la planta. Por ejemplo, los sistemas micorrízicos en los que el hongo proporciona fósforo adicional para la planta cuando se encuentra en suelos pobres de este sustrato (Medina, 2016). El segundo se refiere a un impacto negativo de los factores no vivos, que pueden ser físicos y químicos, por ejemplo, la salinidad (en su componente osmótico, iónico o tóxico), exceso o insuficiencia de radiación, anaerobiosis producida por encharcamiento o inundación, estrés mecánico por el viento o compactación del suelo, heridas o lesiones a la planta, estrés hídrico que se relaciona con el osmótico por salinidad o por sequía, entre otros (Müller & Munné-Bosch, 2015).

De manera general, las plantas pueden responder ante una situación de estrés (biótico o abiótico) en cuatro fases (Fig. 1): Fase de alarma, resistencia, agotamiento

y regeneración, donde una vez que las condiciones ambientales se vuelven desfavorables, reprimen respuestas de crecimiento y desencadenan una serie de mecanismos encargados de su protección y defensa, con el fin de asegurar la supervivencia de la planta (Müller & Munné-Bosch, 2015; Queitsch et al., 2000). De igual forma, una vez que la planta experimenta estrés abiótico, se pueden presentar alteraciones de los flujos de intercambio iónico a través de la membrana celular, principalmente de iones H^+ y Ca^{2+} con la salida de K^+ y aniones (Abdeeva et al., 2018). Casi todas las tensiones abióticas en las células vegetales generan un aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico libre. Inmediatamente después se genera una respuesta oxidativa con la liberación de ROS. Si los niveles de ROS son bajos, comienza la regulación abiótica en condiciones estresantes, sirviendo como moléculas de señalización (Abdeeva et al., 2018). Si la respuesta en la generación de ROS es desmedida, se pueden ocasionar procesos de muerte celular (Oliveira et al., 2019).



Figura 1. Orden de respuesta de plantas ante una situación de estrés.

Por lo anterior se puede decir que las plantas presentan mecanismos altamente eficientes para poder lidiar con un entorno cambiante, el cual puede generar condiciones de crecimiento y supervivencia no propicias para estos organismos. Un sitio en donde comúnmente convergen múltiples factores de estrés son las mitocondrias. En las plantas, estos organelos son el blanco de muchos tipos de estrés biótico y abiótico (Noctor et al., 2007). Por lo tanto, comprender las vías de inducción de la muerte celular en plantas y determinar el papel que desempeñan las mitocondrias es el tema de estudio de la presente tesis.

1.3 Las mitocondrias de plantas

Las mitocondrias son responsables no sólo de proveer a las células de elevadas cantidades de Adenosín trifosfato (ATP) y de una gran variedad de esqueletos de carbono producto de las reacciones biosintéticas, sino también de procesos relacionados con el catabolismo de lípidos, de esterilidad citoplasmática y de muerte celular programada (Gutiérrez-Aguilar, 2020), esto último, probablemente asociado a la pérdida del potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\Psi$). El colapso bioenergético puede ocasionar cambios morfológicos y la liberación del citocromo c, que posteriormente inicia la activación de las caspasas (Scott & Logan, 2008). Las mitocondrias miden alrededor de 1 a 4 μm de longitud, presentan una membrana externa y un complejo sistema de membranas internas (Frey & Mannella, 2000). La membrana externa envuelve por completo a la mitocondria y sirve como frontera exterior, contiene casi 50% de lípidos, proteínas como canales aniónicos dependientes de voltaje y enzimas que participan en diversas actividades como oxidación de adrenalina, descomposición de triptófano y alargamiento de ácidos grasos (Frey & Mannella, 2000; Gray, 1989; Karp, 2011). La membrana interna se sitúa justo por dentro de la membrana externa, pero gran parte de ella forma pliegues profundos o invaginaciones llamadas crestas (Frey & Mannella, 2000). Contiene complejos respiratorios, fosfolípidos y la ATP sintasa.

La membrana interna es altamente impermeable, por lo tanto, requiere de transportadores especiales para que ciertas moléculas y iones tengan acceso a la matriz (Gutiérrez-Aguilar & Baines, 2013). Por lo tanto, la composición y organización de la membrana interna es la clave para las actividades bioenergéticas

del organelo. Adicionalmente, las mitocondrias cuentan con su propio material genético.

Estos organelos se encuentran en prácticamente todos los tipos de células. No obstante, en un tipo pueden ser redondas en tanto que en otras adoptan forma fibrilar muy alargada (Fig. 2). Pueden estar dispersas por todo el citoplasma o incluso pueden concentrarse cerca de una superficie particular. Las mitocondrias en plantas comúnmente se asocian a los cloroplastos (Fig. 2) (Noctor et al., 2007). El número, aspecto y ubicación de estos organelos se puede correlacionar con las actividades del tipo de célula en particular. Son prominentes en muchas células vegetales, donde proporcionan el suministro primario de ATP a tejidos que no efectúan fotosíntesis (raíces), y otros también son fuente de ATP para células de hojas fotosintéticas durante periodos de oscuridad (Karp, 2011).

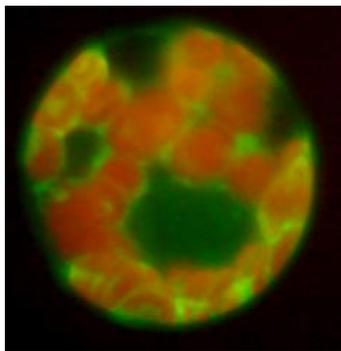


Figura 2. Tinción de mitocondrias en protoplastos con Mitotracker Green. Las mitocondrias se observan en color verde y la autofluorescencia de los cloroplastos en rojo. Micrografía a 40 x. Imagen tomada de López-Aquino, 2020.

Las mitocondrias tienen la capacidad de cambiar de forma (alargarse, acortarse, hincharse, fusionarse y dividirse). Su dislocación puede ser el resultado de interactuar con algunos elementos del citoesqueleto (microtúbulos) y de procesos de las mismas mitocondrias. Como se demuestra en la Fig. 2, hoy en día es posible

visualizar estos procesos por microscopia de fluorescencia, ya que algunos fluorocromos se unen específicamente a las mitocondrias, siendo posible evaluar su ubicación, dinámica, así como el potencial de membrana (Bereiter-Hahn & Voth, 1994).

Como se mencionó anteriormente, las mitocondrias presentan una gran importancia metabólica, ya que permiten el transporte de moléculas indispensables para el funcionamiento celular y obtención de la energía, como aminoácidos, piruvato y ATP. Por lo anterior, la disfunción mitocondrial inducida por estrés comúnmente genera alteraciones celulares que derivan en la muerte de la célula, y si la disfunción se disemina al organismo en general se puede ocasionar la muerte del mismo. Una vía por la cual se ha documentado la muerte celular en respuesta a estrés abiótico es la transición de la permeabilidad mitocondrial (Baines & Gutiérrez-Aguilar, 2018)

1.4 El poro de transición de la permeabilidad

Los primeros experimentos de aislamiento de mitocondrias concluían que existía un factor “desacoplante” que inducía la despolarización mitocondrial (Greenawalt et al., 1964). Con los años se determinó que tal factor “desacoplante” era el calcio, ya que al aislar mitocondrias en presencia de sustancias quelantes con la capacidad de secuestrar a este catión divalente se evitaba el desacoplamiento. Posteriormente Hunter y Haworth determinaron que el calcio inducía la apertura de un poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, al que llamaron PTP (Hunter & Haworth, 1979), el cual es una estructura proteica ubicada en la membrana interna de la mitocondria cuya composición es continuamente debatida (Baines & Gutiérrez-Aguilar, 2018).

Cuando se activa la transición de la permeabilidad, el PTP se abre (~2 nm) liberando metabolitos, iones e incluso proteínas debido a la posterior ruptura de la membrana externa mitocondrial. Inicialmente el PTP era conocido como un canal de liberación de calcio, inducido por calcio (Ichas & Mazat, 1998). Sin embargo, es posible cerrarlo en presencia de ciclosporina A (CsA) en concentraciones nanomolares (Griffiths & Halestrap, 1993). Dichos estudios fueron de gran relevancia para demostrar la participación del uniportador de calcio mitocondrial (MCU) y una isoforma de una ciclofilina mitocondrial o ciclofilina D (CypD) en la regulación del PTP. En experimentos donde se realiza un tratamiento previo con inhibidores de MCU, se inhibió la apertura del PTP, pero sólo al adicionar calcio, sugiriendo que la presencia de este catión en la matriz mitocondrial es necesaria para su activación (Baines & Gutiérrez-Aguilar, 2018).

La apertura del PTP dependiente de Ca^{2+} , ocasiona una pérdida en el $\Delta\Psi$, hinchamiento de los organelos y la posterior ruptura de la membrana externa (Nakagawa et al., 2005). Como se mencionó anteriormente, la composición del PTP es tema de constante controversia. Existen diversos modelos que proponen que el PTP está compuesto por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el transportador de nucleótidos de adenina (ANT), el transportador de fosfato mitocondrial, la $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATP}$ sintasa y la ciclofilina D (Baines & Gutiérrez-Aguilar, 2018; Carraro et al., 2019). Una vez que este se abre, se induce un movimiento masivo de agua y solutos a través de la membrana interna mitocondrial, hinchando a la mitocondria e inhibiendo su función respiratoria (Scott & Logan, 2008; Zancani et al., 2015).

Al presentarse una inducción del PTP en las plantas, se ha monitoreado un cambio repentino en la morfología mitocondrial de las hojas, observando un alargamiento y distorsión de los organelos (Gutiérrez-Aguilar, 2020; Scott & Logan, 2008).

1.4.1 Ciclofilina mitocondrial: AtCyp21-3

Las ciclofilinas (CYP) pertenecen a un grupo de proteínas y se les conoce como inmunofilinas. Estas proteínas se unen a fármacos inmunosupresores, como la CsA, FK506 y rapamicina, pero solamente la CsA se une a un grupo de proteínas CYP. Las CYP presentan actividad de peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (PPIasa), la cual cataliza la rotación de los enlaces peptídicos X-Prolina de una conformación *cis* a una *trans*, proceso importante para el plegamiento de proteínas (chaperonas moleculares) o ensamblaje de complejos proteicos mitocondriales (Gutiérrez-Aguilar & Baines, 2015). Este tipo de modificaciones postraduccionales coordinan diferentes vías metabólicas primarias y secundarias. Las CYP son conservadas estructural y evolutivamente y están presentes en mamíferos, plantas, insectos, hongos y bacterias (Davis et al., 2010). Todas las ciclofilinas comparten un dominio común de 109 residuos de aminoácidos y se encuentran en todos los organismos estudiados, tanto en procariontes como en eucariontes; los humanos tienen un total de 16 isoformas de ciclofilinas. Entre los diferentes tipos de CYP descritos en mamíferos se encuentra la CypD, la cual se localiza en mitocondrias y desempeña un papel importante en la transición de la permeabilidad mitocondrial, pues induce la apertura del PTP y por ende la muerte celular (Gutiérrez-Aguilar & Baines, 2015). Diversos grupos de investigación describieron que la CypD y la transición de la permeabilidad mitocondrial son necesarias para mediar la muerte celular inducida

por el calcio y daño oxidante, pero no para mediar la apoptosis convencional (Nakagawa et al., 2005; Romano et al., 2004; Wang & Heitman, 2005).

En plantas, las CYP se aislaron por primera vez en 1990 a partir de tejidos de tomate y maíz (Gasser et al., 1990). Desde entonces se busca identificar y caracterizar las CYP presentes en *A. thaliana* (AtCYP), revelando 29 isoformas ubicadas en todos los compartimentos subcelulares y órganos principales (flores, hojas, tallos y raíces). Lo anterior sugiere que las CYP desempeñan funciones de crecimiento y supervivencia de *A. thaliana*, ya que estas enzimas están presentes en la regulación transcripcional, organogénesis, señalización fotosintética y hormonal, adaptación a estrés biótico y abiótico y a respuestas de defensa (Dos Santos & Park, 2019).

La evidencia computacional sugiere que en la mitocondria se podrían localizar las isoformas AtCyp21-3 y AtCyp21-4 (Tabla 1). Específicamente, utilizando el software ARAMEMNON versión 8.1 (Schwacke et al., 2003) se pueden determinar probabilidades significativas de importación a la mitocondria y cloroplasto de las isoformas AtCyp21-3 y AtCyp21-4.

Sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que AtCYP21-4 probablemente se localiza en el aparato de Golgi (Jung et al., 2020), encargado de realizar procesos como la glucosilación de las proteínas, las cuales en plantas forman matrices de pared celular y optimizan la morfogénesis en estado de reposo y estrés. Por lo tanto, es probable que la isoforma AtCyp21-3 sea la isoforma mitocondrial en *A. thaliana*.

Tabla 1. Predicción de la localización de seis isoformas de ciclofilinas de interés en *A. thaliana* usando el software ARAMEMNON versión 8.1 (Schwacke et al., 2003). Tabla adaptada de Gutiérrez-Aguilar (2020).

Ciclofilina	Gen	Cloroplasto	Mitocondria	Vía de secreción
AtCyp19-4	At2g29960	- 1.1	0.1	25.4
AtCyp20-1	At5g58710	2.6	1.8	21.9
AtCyp21-2	At3g55920	- 0.8	0.1	27.3
AtCyp21-3	At2g47320	5.7	10.2	2.9
AtCyp21-4	At3g66654	6.7	8.5	2.7
AtCyp23	At1g26940	0.3	0.6	22.7

Por lo anterior y en vista de la existencia de reportes que demuestran los efectos benéficos de la CsA, el cual es un potente ligando de las ciclofilinas, en la función y morfología mitocondrial (Gao et al., 2008), es muy relevante documentar la existencia y función de una probable Ciclofilina mitocondrial en *A. thaliana* (Abdeeva et al., 2018; Dos Santos & Park, 2019; He et al., 2004; Kumarik et al., 2013; Romano et al., 2004).

Con ayuda de otro tipo de herramientas bioinformáticas se pueden realizar análisis del transcriptoma de *A. thaliana* para conocer más sobre sus procesos genéticos y funcionales de las respuestas de defensa contra el estrés de las plantas. (Dos Santos & Park, 2019). Por ejemplo, el Arabidopsis eFP browser permite estudiar los niveles de transcritos de interés relativos a transcritos de genes constitutivos como *gapdh* (Winter et al., 2007). Usando estas tecnologías novedosas es posible evaluar los niveles del transcrito de la proteína AtCyp21-3 (Figura 3).

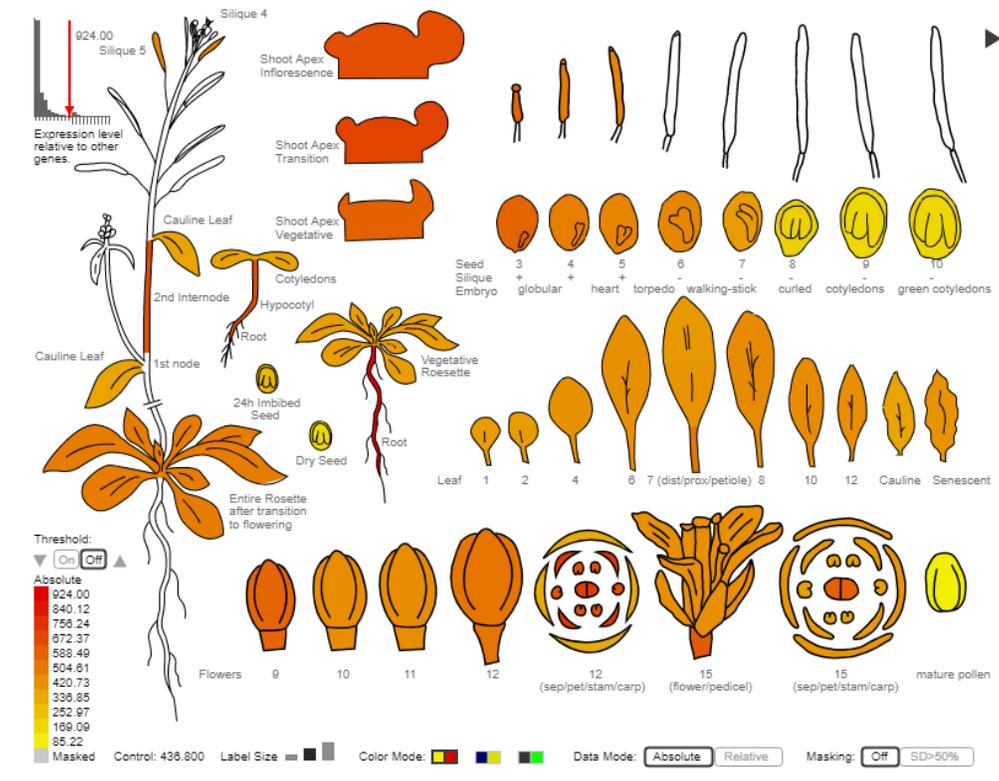


Figura 3. Niveles de transcrito del gen A At2g47320. Los niveles de transcrito del gen At2g47320 se detectan en múltiples tejidos en *A. thaliana* usando el Arabidopsis eFP browser (Winter et al., 2007).

En *A. thaliana*, la probable isoforma mitocondrial AtCyp21-3 está codificada por el gen At2g47320 y los niveles de su transcrito se encuentran predominantemente enriquecidos en hojas, flores y vainas (Fig. 3).

Como se mencionó anteriormente, las ciclofilinas tienen la capacidad de isomerizar el enlace peptidil-prolil (Davis et al., 2010). Por lo tanto, existe en dos formas isoméricas distintas: *cis* y *trans*. Los enlaces peptídicos *trans* tienen un estado energético más bajo, por lo tanto, son más estables. Sus cadenas laterales están opuestas 180° entre sí (favoreciendo estéricamente la unión). Además, se cree que el ribosoma sintetiza enlaces peptídicos de esta forma (Romano et al., 2004). Sin embargo, cuando se encuentra alguna prolina en la proteína (enlaces peptidil-prolil)

se pueden presentar enlaces *cis*, con las cadenas laterales adyacentes; ambos de *novo*. El plegamiento de proteínas requiere isomerización a la forma *cis*, el cual es un proceso lento y requiere energía (paso limitante para el plegamiento). Con ayuda de las ciclofilinas se estabiliza la isomerización, favoreciendo el plegamiento y ensamblaje de las proteínas (Davis et al., 2010).

1.4.2 Presencia del PTP en plantas

La presencia de un probable PTP en mitocondrias de *Pisum sativum* (guisante) fue propuesta por Vianello y colaboradores. En este estudio se detectó la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial inducido por Ca^{2+} e inhibido por CsA (Vianello et al., 1995). Posteriormente se describió este fenómeno en mitocondrias aisladas de papa, avena y raíces de trigo, donde se encuentran algunas similitudes o variaciones en comparación con el PTP de mamíferos (Uribe-Carvajal et al., 2011). En mitocondrias de avena y raíces de trigo, se describe un colapso de $\Delta\Psi$ inducido por Ca^{2+}/Pi e hinchamiento de la matriz, pero insensibles a CsA. En trigo ocurre espontáneamente, mientras que, en avena, requiere la adición de un ionóforo capaz de transportar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (Curtis & Wolpert, 2002).

En general, la transición de la permeabilidad ocurre con características distintas en las plantas. Lo anterior es probablemente debido a la enorme divergencia genética entre distintas especies aunado a conocidos eventos de duplicación genómica o de transposición de elementos cromosomales debidos a la interacción con patógenos, como es el caso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Gutiérrez-Aguilar, 2020). La tabla 2 sintetiza la disponibilidad de estudios en donde se ha documentado el PTP en cuatro plantas de interés científico y comercial.

Tabla 2. Detección de un probable PTP en mitocondrias de diversas especies de plantas.

Reino	Especie	Nombre común	Inhibidor	Referencia
Plantae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis</i>	Ciclosporina A	(Scott y Logan 2008) y (Tiwari y cols., 2002).
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	Ciclosporina A	(Lin y cols., 2006)
	<i>Solanum tuberosum</i>	Papa	Mg ²⁺	(Fortes y cols., 2001)
	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	Ca ²⁺	(Virolainen y cols., 2002)

Tabla modificada de Uribe-Carvajal (2011).

En los estudios enfocados a plantas, hay evidencia que demuestra que la presencia de CsA inhibe la muerte celular programada (Vianello et al., 2012). Para que la transición de la permeabilidad ocurra, es necesaria la acumulación de Ca²⁺ en la matriz mitocondrial. El flujo de este catión a la matriz mitocondrial es variable y depende de la especie y tipo de tejido. Además, su absorción en la matriz puede ser inducida por tensiones abióticas como calor, estrés oxidativo o anoxia (Zancani et al., 2015).

Por lo anterior, en el presente trabajo de tesis se caracterizaron los efectos de la eliminación de la ciclofilina AtCyp21-3 en la planta *A. thaliana* con la finalidad de comprender el probable papel que esta proteína desempeña a nivel fisiológico y en condiciones de estrés abiótico.

2. HIPOTESIS

Si la ciclofilina AtCyp21-3 regula la muerte celular a nivel del PTP, entonces la eliminación del gen que la codifica les conferirá a las plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* resistencia a condiciones de estrés abiótico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la participación de la proteína AtCyp21-3 en la respuesta a estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar diferencias fenotípicas basales entre ecotipos silvestres y mutantes carentes de AtCyp21-3 de *A. thaliana*.
- Establecer la participación de AtCyp21-3 en los cambios de crecimiento, morfología mitocondrial asociados al PTP en hojas de plantas silvestres y mutantes de *A. thaliana* en respuesta a estrés abiótico.
- Evaluar la muerte celular en *A. thaliana* en respuesta a radiación UV-C y estrés térmico.
- Evaluar el efecto de la radiación UV-C y estrés térmico (37°C) en plántulas, protoplastos y plantas de *A. thaliana*.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Materiales y reactivos

Los reactivos empleados en el presente trabajo fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, a menos que se especifique lo contrario.

- ❖ Filtro de 0.45 μm (CORNING)
- ❖ Caja Petri
- ❖ Pinzas de disección
- ❖ Tijeras
- ❖ Cuchillas de afeitar
- ❖ Frasco de vidrio
- ❖ Papel aluminio
- ❖ Tubos Eppendorf de 1 μL y 50 μL
- ❖ Jeringa Hamilton de 20 μL
- ❖ Portaobjetos
- ❖ Cubreobjetos
- ❖ Pistilo de plástico

4.1.1 Equipos empleados

- ❖ Agitador orbital
- ❖ Centrifuga para tubos Eppendorf (Vórtex)
- ❖ Termociclador Mini PCR
- ❖ Microscopio óptico
- ❖ Cámara de electroforesis
- ❖ Lámpara de UV-C (260 nm) 11.5 KJ/m²
- ❖ Incubadora a 37°C
- ❖ Microscopio de fluorescencia

4.1.2 Material vegetal (*Arabidopsis thaliana*)

Se utilizaron dos ecotipos diferentes para el presente proyecto: *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0) proporcionada amablemente por la Dra. Sobeida Sánchez Nieto de la Facultad de Química, UNAM y el ecotipo AtCyp21-3 obtenida del Arabidopsis Biological Resource Center de la Ohio State University con el código de germoplasma SALK_142397.

Las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5% y Tween-20 al 0.1% durante 20 minutos, se realizaron 3 lavados con agua estéril y se sembraron en placas Petri con medio MS, al 2% de agar y suplementado con 2% de sacarosa durante 3 a 4 semanas, transfiriendo a una cámara de crecimiento a 22 ± 0.5 °C con fotoperiodos de 8 h de luz y 16 h de oscuridad.

Las plántulas se cultivaron en una mezcla 3:1:1 de Sunshine mix #3, agrolita y vermiculita. (Pedroza-García et al., 2014; Relichova, 1998). Se realizó un seguimiento diario para evitar la presencia de contaminantes.

Para mantenimiento de plantas a partir de traspaso a maceta se adicionó solución de Hoagland a una concentración de 1.6 mg/mL.

4.1.3 Amortiguador de extracción

- ❖ Tris-HCl 200 mM, pH 7.5
- ❖ NaCl 250 mM
- ❖ EDTA 25mM, pH 8.0
- ❖ SDS 0.5%
- ❖ RNAsa A

4.1.4 Amortiguador para tinción de hojas

- ❖ Manitol 330 mM

- ❖ Tris-HCl 10 mM, pH 7.5
- ❖ EDTA 0.1 mM
- ❖ Pi 1 mM

4.2 Metodología

4.2.1 Aislamiento de DNA

Se seleccionaron dos hojas verdaderas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y AtCyp21-3 (por separado) de 3-4 semanas de edad con cuchillas de afeitar frías en un tubo Eppendorf de 1 mL, se congelaron con N₂ líquido y trituraron con un pistilo de plástico hasta obtener un polvo muy fino.

Se adicionaron 400 µL de amortiguador de extracción, homogeneizando con pistilo y vórtex durante 5 segundos, se agregó 1 µL de RNasa y se centrifugó por 5 min a 13000 rpm.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio y se centrifugó de nuevo para eliminar residuos de la centrifugación previa. En un tubo Eppendorf a -20°C, se colocaron 300 µL de sobrenadante, 300 µL de isopropanol, agitando en vórtex y centrifugando por 5 min a 13250 g, para posteriormente eliminar el sobrenadante.

Se realizaron lavados del pellet con 1 mL de etanol al 70%, centrifugando posteriormente por 5 min para eliminar el etanol residual. Se secó el precipitado a 29°C durante 15 min.

Posterior al secado del precipitado, se disolvió en 100 µL de H₂O estéril desionizada.

4.2.2 Oligonucleótidos

Para genotipificar a las plantas silvestres y mutantes se emplearon 3 oligonucleótidos (Tabla 3) proporcionados por el Instituto de Fisiología Celular con las siguientes características:

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la genotipificación.

Nombre	Tm (°C)	Secuencia 5´-3´
LBb1.3 (TDNA pROK2)	63.9	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
AtCyp21 LP FW3	59.9	AGACCAAAGAGGTTAGTCTTTGCTT
AtCyp21 RP Rev3	59	ATTACCTCAAGAACTGATCTACCATTG

Los componentes para reacción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se describen a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Reactivos empleados para las PCRs.

Orden de adición	Reactivos	µL	Concentración final
	PCR-buffer 10x	2.5	1x (2mM)
	dNTPs	2.5	0.2 mM
	Oligonucleótido 1 100 µM	1.25	0.5 µM
	Oligonucleótido 2 100 µM	1.25	0.5 µM
	Taq polimerasa	0.26	0.75-0.25 U/reacción
	H ₂ O mQ estéril		Cbp 24 µL
	DNA		1 µL
	Volumen final por tubo de reacción		25 µL

4.2.3 Reacción de PCR

Se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 3, utilizando 1 µL de DNA extraído de hojas verdaderas de *A. thaliana* ecotipo Col-

0 y AtCyp21-3 de 3 a 4 semanas de edad, en un termociclador mini8 (miniPCR mini8™) usando un programa modificado con las siguientes condiciones de reacción (Tabla 5):

Tabla 5. Condiciones de reacción de genotipificación.

	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Extensión final	Ciclos
Temp. (°C)	94	94	63.6	72	72	37
Tiempo (s)	120	30	50	71	600	

4.2.4 Exposición de *A. thaliana* a estrés por radiación UV-C

4.2.4.1 Exposición de plántulas

Posterior a la siembra de semillas de plantas en caja Petri con medio MS, se colocó una caja con especímenes de *A. thaliana* Col-0 y AtCyp21-3 de 1 semana de edad en una cámara con irradiación UV a una longitud de 260 nm durante una hora. Posteriormente se colocaron en una cámara de crecimiento a 22±0.5 °C con fotoperiodos de 8 h de luz y 16 h de oscuridad, para permanecer en observación durante 3 semanas, anotando sus características fenotípicas y utilizando como control los mismos ecotipos, pero sin previa exposición.

4.2.4.2 Exposición de plantas

Se tomaron plantas con 3 a 4 semanas de estratificación en maceta de *A. thaliana* Col-0 y AtCyp21-3, se colocaron en una lámpara UV a una longitud de 260 nm durante una hora, posteriormente se llevaron a una cámara de crecimiento a 22 ± 0.5 °C con fotoperiodos de 8 h de luz y 16 h de oscuridad, donde permanecieron 3 semanas en observación, anotando sus características fenotípicas, utilizando como control los mismo ecotipos, pero sin someterlos a ningún estrés abiótico.

4.2.4.3 Tinción de hojas con JC-1

Se cortaron hojas verdaderas con tijeras de plantas de 3-4 semanas de edad. Con ayuda de cinta adhesiva, se removió la epidermis con cuidado. La cinta adhesiva que contiene el mesófilo se introdujo en un tubo Eppendorf con 1 mL de amortiguador para tinción de hojas y así mantener a la hoja en solución.

Posteriormente se adicionó el fluorocromo potenciométrico JC-1 hasta tener una concentración final de 4 μ M. Se colocaron las muestras en una cámara de vacío durante 35-40 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron lavados con solución de mantenimiento y posteriormente se adicionó perfluorodecalina (PFD). Se adicionaron los mesófilos en un portaobjetos una o dos gotas de PFD, se sellaron con un cubreobjetos y se procedió a la visualización en un microscopio de fluorescencia con una fuente de luz de excitación a 488 nm y se registraron cambios en la emisión a 529 y 590 nm.

Para la preparación del control positivo, se agregó 1 μ L de un stock 50 mM de carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) después de añadir el PFD. Este último paso ocasiona un colapso en el $\Delta\Psi$ mitocondrial y una coloración de las mitocondrias verde índice la disipación del potencial de membrana. Todos los pasos anteriores se realizaron a temperatura ambiente.

4.2.5 Exposición de *A. thaliana* a estrés térmico (37°C)

4.2.5.1 Exposición de plántulas

Posterior a la siembra de semillas en caja Petri con medio MS, se colocó una caja con *A. thaliana* Col-0 y AtCyp21-3 de 1 semana de edad en una incubadora a 37°C durante una hora, posteriormente se colocaron en una cámara de crecimiento a 22 \pm 0.5 °C con fotoperiodos de 8 h de luz y 16 h de oscuridad, para permanecer en

observación durante 3 semanas, anotando sus características fenotípicas, utilizando como control los mismos ecotipos, pero sin previa exposición y con condiciones normales de crecimiento.

4.2.5.2 Exposición de plantas

Se tomaron plantas con 3 a 4 semanas de estratificación en maceta de *A. thaliana* Col-0 y AtCyp21-3, se colocaron en una incubadora a 37°C durante 48 horas, en ausencia de luz, posteriormente se llevaron a una cámara de crecimiento a 22±0.5 °C con fotoperiodos de 8 h de luz y 16 h de oscuridad, donde permanecieron 3 semanas en observación, anotando sus características fenotípicas, utilizando como control los mismo ecotipos, pero sin someterlos a estrés térmico.

5. RESULTADOS

5.1 Genotipificación de la cepa AtCyp21-3

De acuerdo a la T-DNA Primer Desing Tool para *A. thaliana* (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>), el tamaño del fragmento correspondiente al gen At2g47320 que codifica al AtCyp21-3 en una cepa silvestre es de 1,185 pb, mientras que en la cepa AtCyp21-3, la PCR debería amplificar una secuencia correspondiente al TDNA interrumpiendo la secuencia del gen At2g47320. Por lo anterior, la PCR debería generar un amplicón de 845 pb.

Los productos de la reacción con el DNA de las plantas silvestres y mutantes se analizaron en un gel de agarosa 0.5% usando amortiguador de Tris-Borato y EDTA (TBE) y se tiñeron con Sybr Safe (Figura 4).

Los productos obtenidos de la PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 0.5% usando el amortiguador TBE. Se puede observar que en la reacción con DNA extraído de la planta Col-0 hay un amplicón mayor a 1000 pb lo cual correlaciona con el amplicón teórico. Por otra parte, la reacción con el DNA de la planta SALK_142397c (confirmada) obtenida del TAIR a través del SALK Confirmed T-DNA Project del Dr. Joseph Ecker generó un amplicón de ~800 pb, el cual fue similar al obtenido con el DNA de la planta M5 la cual también es una planta mutante carente de AtCyp21-3 por un proceso independiente de mutagénesis.

Interesantemente, el DNA de la planta M2 (obtenida de otro stock de semillas mutantes) no produjo un amplicón robusto, por lo cual no se consideró para ser analizada en el presente estudio (Figura 4).

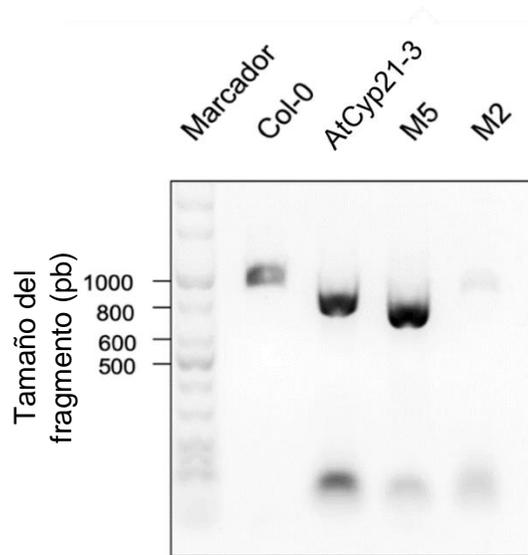


Figura 4. Genotipificación de las plantas Col-0 y mutantes isogénicas AtCyp21-3. La mutante confirmada AtCyp21-3 fue obtenida de Joseph Ecker a través de TAIR y el SALK Confirmed T-DNA Project con número de germoplasma SALK_142397c.

Es importante mencionar que en el laboratorio se está aislando RNA para verificar la ausencia del transcrito del gen At2g47320 en las plantas mutantes. De igual forma, será necesario obtener anticuerpos inmunoreactivos con la proteína AtCyp21-3 para poder confirmar la ausencia del transcrito y la proteína respectivamente.

5.2 Crecimiento de la cepa Col-0 y AtCyp21-3

Transcurridas 3 semanas de crecimiento de ambas cepas de *A. thaliana* trasplantadas en sustrato, ninguna de las dos (Col-0 y AtCyp21-3) presentó diferencias morfológicas evidentes en hojas, color o tamaño en ninguna observación en el transcurso de las 3 semanas (Figura 5).



Figura 5. Comparación fenotípica entre la cepa Col-0 y AtCyp21-3. No hay diferencia fenotípica evidente entre el tamaño de las hojas, color y forma de las hojas o roseta entre ambas cepas.

Dicha comparación fenotípica en condiciones basales es necesaria para poder evidenciar los cambios que podrían ocurrir al exponer ambas cepas a algún tipo de estrés abiótico y poder evaluar visualmente la muerte de tejidos en ambas plantas.

5.3 Las mitocondrias de la cepa AtCyp21-3 mantienen un $\Delta\Psi$ estable.

El mesófilo de las hojas de las plantas se considera como un tejido lleno de aire, por lo tanto, realizar un seguimiento u observación presenta más dificultades, ya que se pueden encontrar la interferencia de la refracción de la luz del microscopio entre los múltiples componentes celulares, espacios de aire y el mismo tejido. Estos factores pueden afectar a la señal detectable en el microscopio, ocasionando imágenes poco claras. Por lo anterior, muchos estudios han sido llevados a cabo en secciones de hojas completas de *A. thaliana* (y otras plantas) fijadas con paraformaldehído. En nuestro caso decidimos adaptar metodologías existentes para poder observar mesófilos vivos. Esto se llevó a cabo usando un agente de infiltración perfluorocarbonado llamado perfluorodecalina. (Littlejohn et al., 2010; Littlejohn & Love, 2012).

El uso de PFD se realiza con montaje infiltrativo. Está descrito como un método con el cual se logra mejorar la profundidad de las imágenes en el tejido foliar de *A. thaliana* con un impacto fisiológico mínimo y con la capacidad de aumentar la resolución de la imagen (Littlejohn et al., 2010).

Para poder determinar el grado de polarización de las mitocondrias de las plantas AtCyp21-3 y Col-0, se adicionó al medio de infiltración la sonda catiónica JC-1. Cuando el JC-1 se encuentra en su forma monomérica, emite a 527 nm (color verde) y se excita a 490 nm. Esto indica que las mitocondrias están depolarizadas. Cuando las mitocondrias están polarizadas, el JC-1 forma agregados que emiten a 590 nm (color rojo), y estos son sensibles a cambios de potencial de membrana y el color

cambia reversiblemente de verde a rojo dependiendo de la polarización de la membrana mitocondrial (Fig. 6) (Cossarizza et al., 1993; Sivandzade et al., 2019). Las mitocondrias de las plantas Col-0 se pueden observar como corpúsculos de mayor intensidad roja adyacentes a los cloroplastos (corpúsculos de mayor tamaño). Esto sugiere que las mitocondrias de las plantas Col-0 se encuentran polarizadas. Al observar los mesófilos de las plantas AtCyp21-3 al microscopio, también se pudo constatar que presentan un potencial de membrana estable tras la tinción con JC-1. Finalmente, los mesófilos de ambas plantas incubados con el agente desacoplante CCCP presentan mitocondrias de color verde (Fig. 6).

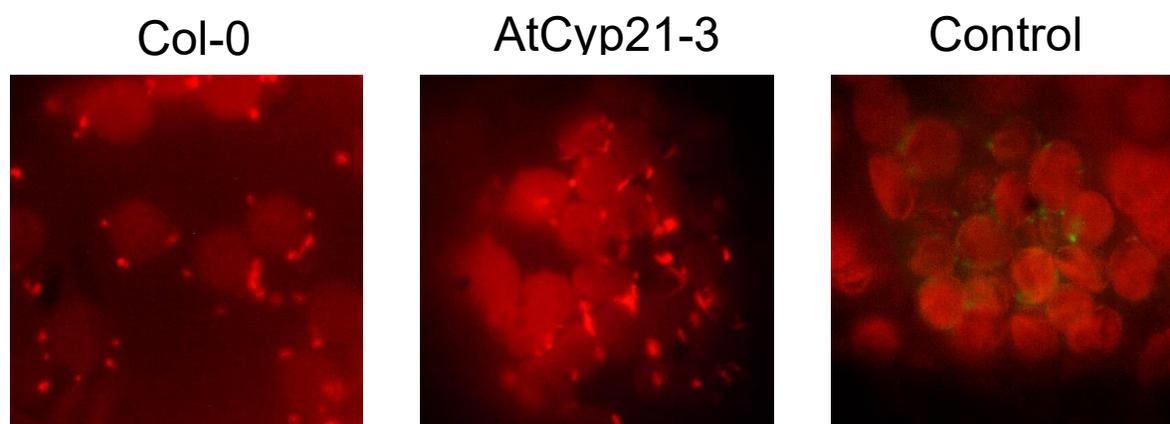


Figura 6. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial. Las hojas de las cepas Col-0 y AtCyp21-3 fueron sometidas a un procedimiento de remoción de la epidermis y fueron teñidas con el indicador mitocondrial JC-1. Las mitocondrias en ambas cepas se aprecian como corpúsculos de elevada fluorescencia roja adyacentes a los cloroplastos. En presencia del protonóforo CCCP, las mitocondrias de las plantas Col-0 cambian su fluorescencia a color verde, indicando la depolarización de los organelos (Control).

5.4 Las plantas de la cepa AtCyp21-3 son resistentes a radiación UV-C.

Las plantas de las cepas AtCyp21-3 y Col-0 se cultivaron durante 3 semanas en agar y con condiciones óptimas, posteriormente se sometieron a radiación UV-C a una dosis de 11.5 KJ/m² (equivalente a una hora de tratamiento) para ser monitoreadas durante las próximas 3 semanas, considerando cambios de

coloración, tamaño y la muerte celular en condiciones óptimas y sustrato. Es importante mencionar que los niveles de radiación utilizados en el presente trabajo de tesis son equiparables a los reportados en la literatura (Gao et al., 2008) y tienen como objetivo evaluar efectos en la muerte celular de las plantas y no daños a nivel de DNA. Para observar daños a esta macromolécula, los niveles de radiación usados son menores.

Para cuantificar el efecto de la radiación UV-C en estas plantas, se realizaron los experimentos con 10 plantas y plántulas de cada cepa, utilizando como control 10 plantas sin ser sometidas a ningún tipo de estrés (Tabla 6).

Tabla 6. Plantas Col-0 y AtCyp21-3 en condiciones control y estrés por UV-C durante las primeras dos valoraciones.

	Control	UV-C 1h.	UV-C 1h. (7 días)	% Supervivencia
Col-0	10	10	10	100%
AtCyp21-3	10	10	10	100%

Inicialmente las plántulas sometidas a estrés por UV-C en la primera semana de evaluación, no presentan muerte celular, pues el 100% de la muestra sobrevive a la aclimatación (Tabla 6), para posteriormente hacer un traslado a sustrato y condiciones óptimas de invernadero.

Las plantas Col-0 y AtCyp21-3 fueron observadas durante las siguientes 3 semanas, se compararon individualmente y se pudo detectar que ocasionalmente las hojas se ponían cloróticas, tenían un crecimiento ligeramente menor y más lento. Sin embargo, no hay evidencia de muerte celular en comparación con el control (Fig. 7).

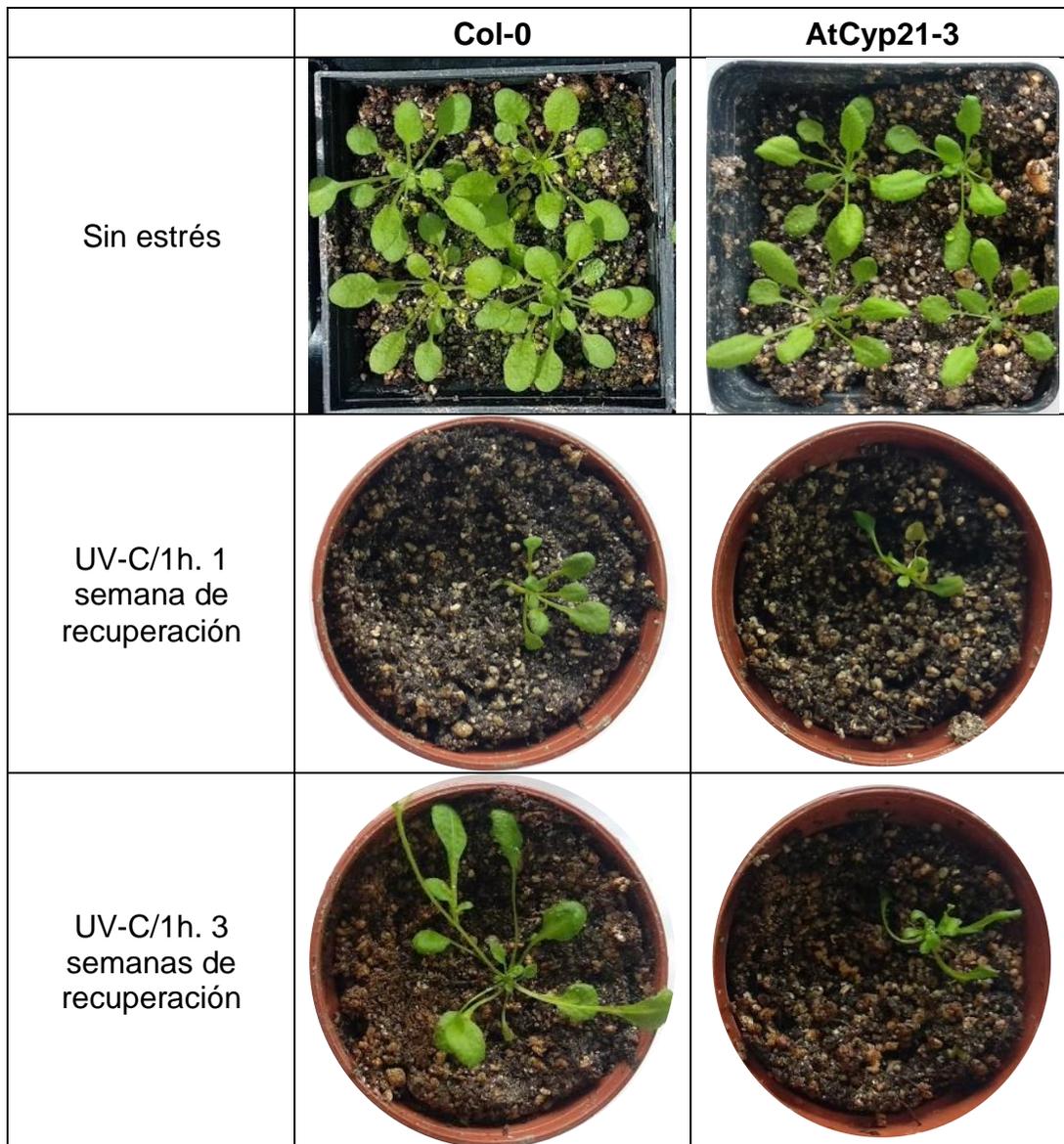


Figura 7. Diferencias de crecimiento entre las plántulas de la cepa Col-0 y AtCyp21-3. Muestreo y evaluación a una y tres semanas. Las hojas de AtCyp21-3 y Col-0 fueron sometidas a estrés por UV-C presentan menor tamaño, además de un crecimiento lento y el crecimiento temprano del tallo. Experimento con n=10

Posteriormente se cuantificó el efecto de la radiación UV-C en plantas maduras. Se realizaron las mismas pruebas en plantas de 3 semanas de edad, considerando los mismos controles que el experimento antes descrito.

Las plantas sometidas a estrés por UV-C en la primera semana en observación no mostraron muerte celular evidente, pues las hojas no cambiaron de color ni

mostraron señales de senescencia. Sin embargo, durante las 3 semanas en condiciones óptimas de invernadero y al comparar individualmente, observamos que en las Col-0 un 59% de las hojas se tornaron cloróticas y secas. Esto ocasionó en forma posterior la muerte de las hojas, mientras que en AtCyp21-3, solo un 37% presenta los mismos indicios de muerte, además de un crecimiento lento y deficiente (Fig. 8).

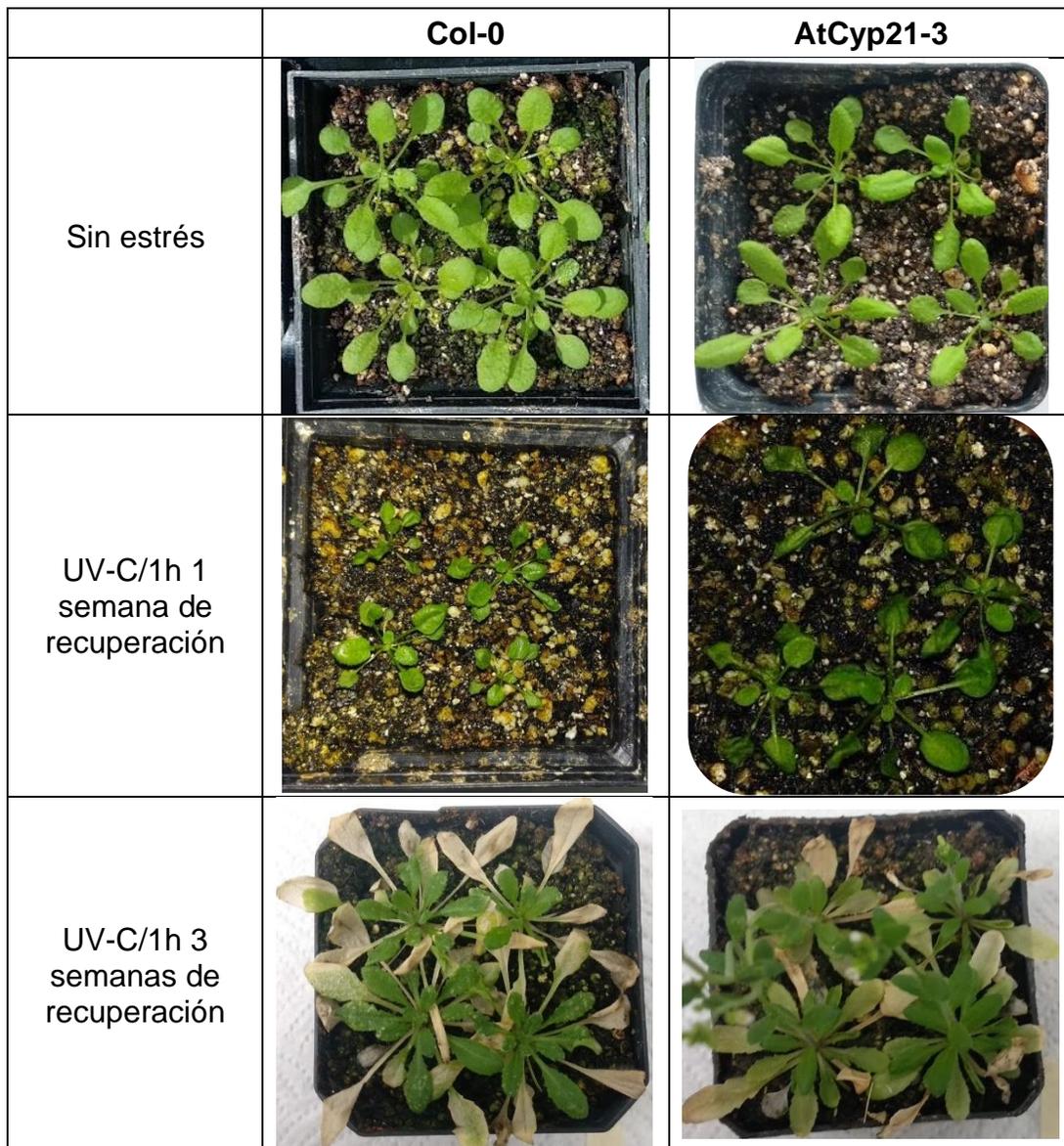


Figura 8. Diferencias de crecimiento entre las plantas de 3 semanas de edad de la cepa Col-0 y AtCyp21-3. Muestreo y evaluación a una y tres semanas. Las hojas de AtCyp21-3 y Col-0 fueron sometidas a estrés por UV-C presentan menor tamaño, además

de un crecimiento lento y el crecimiento temprano del tallo sólo en AtCyp21-3. Experimento con n=10.

5.5 Las plantas de la cepa AtCyp21-3 son sensibles a estrés térmico.

Al igual que en los experimentos descritos para los efectos de la radiación UV-C, se evaluaron los efectos del estrés térmico sobre las plantas silvestres y mutantes. Los experimentos de estrés térmico fueron llevados a cabo a 37°C durante 48 horas. La cuantificación del daño fue hecha usando 10 plantas de cada cepa y utilizando como control 10 plantas sin ser sometidas a ningún tipo de estrés (Tabla 7).

Tabla 7. Plantas Col-0 y AtCyp21-3 en condiciones control y sometidas a estrés térmico (37 °C) durante las primeras dos valoraciones.

	Control	37°C 48 h.	37°C (7 días)	% Supervivencia
Col-0	10	10	9	90%
AtCyp21-3	10	8	5	50%

Posterior al estrés térmico, dos plantas de la cepa AtCyp21-3 se tornaron secas y cloróticas, sin recuperación temporal. Transcurrida una semana para el traspaso a sustrato, se observó la muerte de 3 plantas de cepa AtCyp21-3, con los indicadores antes mencionados y debilidad de raíz. Por lo anterior, no fue posible realizar el trasplante (Tabla 7). Las plántulas restantes presentan hojas cloróticas, tamaño pequeño y crecimiento temprano de tallo y flor (Fig. 9).

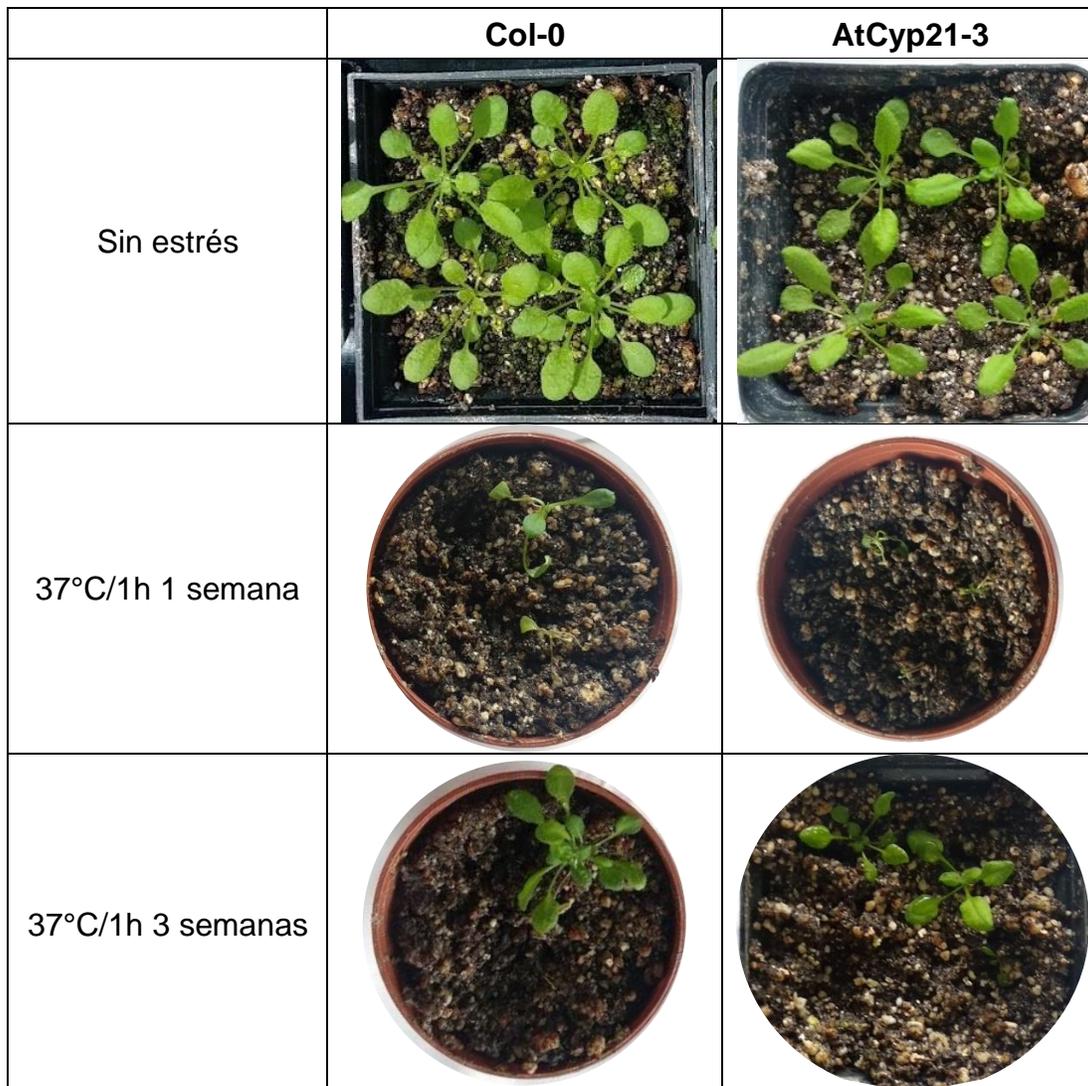


Figura 9. Diferencias de crecimiento entre las plántulas de la cepa Col-0 y AtCyp21-3. Muestreo y evaluación a diferentes tiempos durante 3 semanas. Las hojas de AtCyp21-3 y Col-0 que fueron sometidas a estrés térmico (37°C durante 1 hora) presentan mayores indicios visuales de muerte celular, además de tamaño pequeño. Experimento con n=10.

Para cuantificar el efecto del estrés térmico (37°C durante 48 h), pero ahora en plantas maduras, se realizaron las mismas pruebas en plantas de 3 semanas de edad, considerando los mismos controles que el experimento antes descrito.

Inicialmente, las plantas sometidas a estrés térmico en la primera semana en observación muestran una muerte celular evidente para la cepa AtCyp21-3, pues las hojas cambian de color y muestran señales de senescencia, además de un tamaño pequeño. Adicionalmente, durante las 3 semanas en condiciones óptimas

de invernadero y al comparar individualmente, observamos que en las Col-0 hay un proceso de recuperación, a pesar de ser una planta pequeña. En comparación con AtCyp21-3 que presenta mayores indicios de muerte, dejando hojas secas y otras cloróticas (Fig. 10).

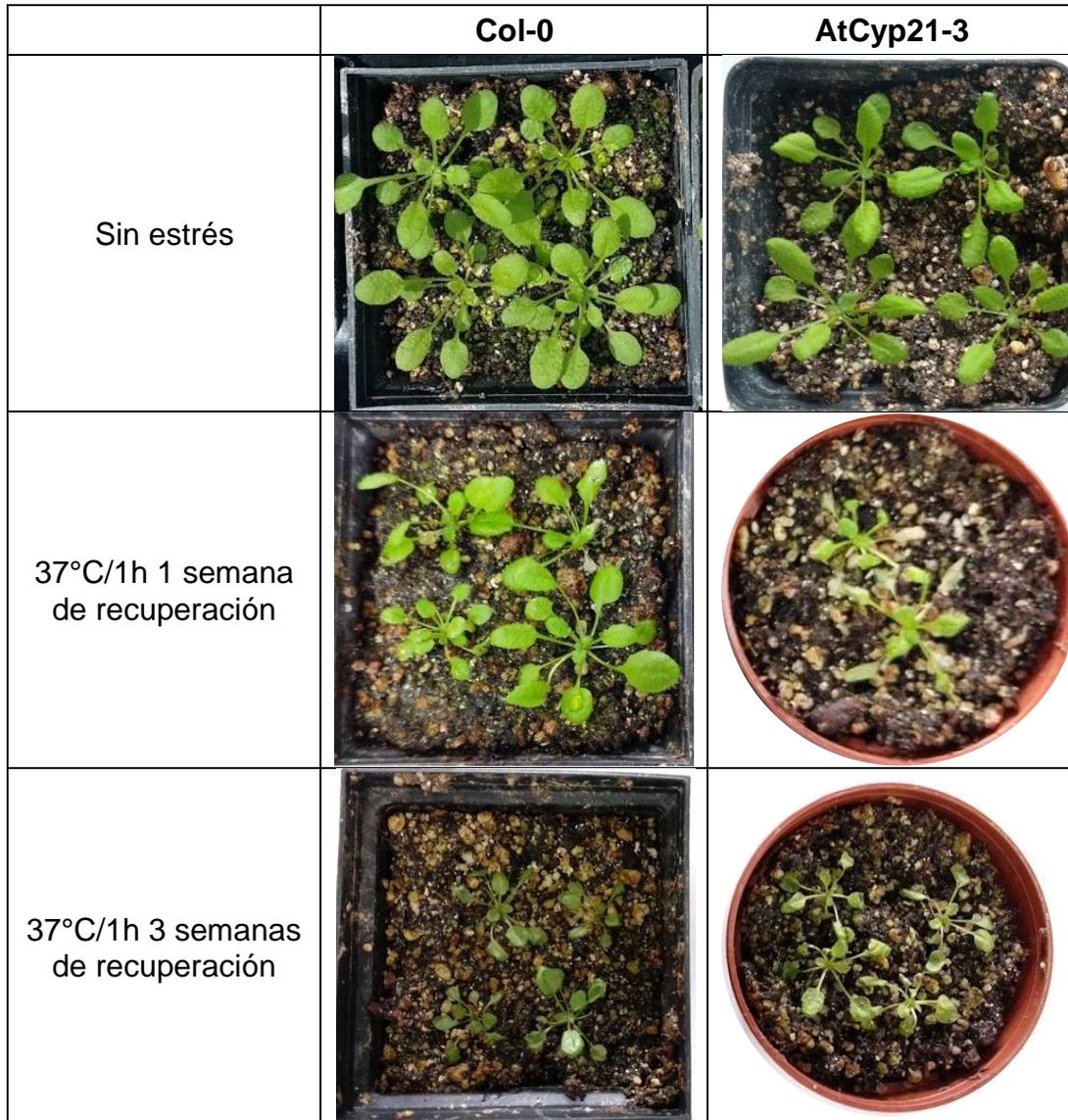


Figura 10. Diferencias de crecimiento entre las plantas de 3 semanas de edad de cepa Col-0 y AtCyp21-3. Muestreo y evaluación a diferentes tiempos durante 3 semanas. Las hojas de AtCyp21-3 y Col-0 que fueron sometidas a estrés térmico (37°C durante 48 horas) presentan mayores indicios visuales de muerte celular, además de tamaño pequeño. Experimento con n=10.

Con los datos obtenidos se pueden apreciar diferencias entre las plantas Col-0 y AtCyp21-3 en cuando a la sensibilidad a estrés abiótico. Cuando este es de tipo térmico, hay una mayor sensibilidad y falta de adaptación en caso de AtCyp21-3, pues presenta menor recuperación tanto de hojas como de plantas completas. Por otro lado, al someter ambas cepas a estrés UV-C, las plántulas pueden adaptarse y sobrevivir, aunque de un tamaño pequeño. Sin embargo, las plantas a pesar de tener indicios de muerte celular en las hojas, este es mayor en la cepa Col-0.

6. DISCUSIÓN

En ratones, la ausencia de la ciclofilina mitocondrial origina una elevada resistencia a estrés oxidativo, daño por isquemia-reperfusión y ocasiona una elevada capacidad de retención de iones de calcio en la matriz mitocondrial (Baines et al., 2005). Lo anterior ha sido relacionado con una inhibición constitutiva del PTP y puede ser recapitulada cuando se bloquea farmacológicamente a la ciclofilina con undecapéptidos cíclicos como ciclosporina A. En plantas, la inhibición farmacológica de ciclofilinas con ciclosporina A le confiere a protoplastos y células de *A. thaliana* una excepcional resistencia a radiación UV-C y a estrés oxidativo (Gao et al., 2008; Scott & Logan, 2008). Por lo anterior, es lógico asumir que la eliminación genética de AtCyp21-3 redundaría en un fenotipo similar al de plantas tratadas con ciclosporina A. En condiciones normales, las plantas silvestres y mutantes no presentaron diferencias morfológicas evidentes a nivel macroscópico. Al igual que en las plantas Col-0, las mitocondrias de las plantas carentes de AtCyp21-3 se encuentran polarizadas, lo cual también ha sido demostrado en otras especies (Baines et al., 2005). El grado de polarización pudo ser determinado empleando una sonda catiónica, que presenta una acumulación mitocondrial en función del potencial de membrana, si el potencial se pierde, la sonda no formará agregados y emite una señal fluorescente en el espectro correspondiente al color verde (527 nm). Si las mitocondrias de AtCyp21-3 no hubieran presentado un potencial de membrana estable en comparación con las plantas control (Col-0) en condiciones óptimas, no se habría podido proceder a evaluar a las plantas AtCyp21-3 con estímulos de estrés abiótico, por encontrarse ambas plantas en condiciones iniciales distintas. Sin embargo, de acuerdo a la Figura 5, las mitocondrias del

mesófilo de AtCyp21-3 presentaron un potencial de membrana estable (Sivandzade et al., 2019). Posteriormente se evaluó la sensibilidad de ambos tipos de plantas a estrés abiótico.

Para nuestra sorpresa, las plántulas mutantes no presentaron diferencias evidentes en la muerte inducida por radiación UV-C, a pesar de tener un menor crecimiento posterior. Sin embargo, las plantas silvestres de 3 semanas de edad si presentan diferencias en términos de aparición de mayor proporción de hojas cloróticas/secas y de muerte con respecto a su contraparte mutante. De lo anterior se podrían concluir dos escenarios. En uno, la ausencia de la ciclofilina no conlleva a un fenotipo divergente en plántulas debido a que esta proteína no forma parte de la vía de protección por estrés UV-C. Sin embargo, esto es poco probable ya que la inhibición farmacológica de las ciclofilinas con ciclosporina A bloquea la muerte celular en *A. thaliana* (Gao et al., 2008; Gutiérrez-Aguilar, 2020; Scott & Logan, 2008). Por otra parte, existe la posibilidad de que en ausencia de AtCyp21-3, otra isoforma de esta familia de ciclofilinas pueda tomar su lugar como mecanismo de compensación. Para poder discernir entre ambas posibilidades, será necesario llevar a cabo experimentos de PCR cuantitativo con la finalidad de evaluar los niveles de los transcritos correspondientes a las otras isoformas de las ciclofilinas. Alternativamente se podrían medir los niveles de algunas ciclofilinas de *A. thaliana* usando la técnica de Western Blot. De hecho, existen anticuerpos comerciales contra ciclofilinas de otras especies y en algunos casos, los epítomos usados para generar tales anticuerpos presentan cierta homología con su contraparte de *A. thaliana*.

Cuando las plantas descritas en el presente estudio fueron sometidas a estrés térmico, se observó una marcada sensibilidad de la cepa mutante la cual presentó una elevada muerte tanto en plantas como en plántulas. Por lo anterior se puede deducir que la ciclofilina AtCyp21-3 está implicada en procesos de protección en respuesta a estrés térmico. Es este sentido, Zhang y colaboradores han identificado al *Heat shock transcription factor A2 (HsfA2)* como un nodo de especial relevancia en la protección de las plantas ante estrés térmico. Sería interesante evaluar la probable participación tanto de AtCyp21-3 como de HsfA2 en la respuesta de las plantas ante estrés térmico (Ogawa et al., 2007; Zhang et al., 2009). Para ello se podría adoptar la estrategia reportada por Ogawa y colegas, demostrando que la sobreexpresión de HsfA2 ocasiona una elevada protección a estrés térmico. Es decir, se podría generar una cepa de *A. thaliana* que sobreexpresa AtCyp21-3 con la finalidad de evaluar si estas cepas son más resistentes al estrés térmico que sus contrapartes isogénicas silvestres. Como se mencionó en la introducción, las ciclofilinas son enzimas que catalizan la isomerización de enlaces peptidil-prolil de la conformación *cis* a *trans*. Por lo anterior, es posible que AtCyp21-3 sea importante para el procesamiento de proteínas involucradas en estrés térmico y por lo tanto que su ausencia redunde en el fenotipo de sensibilidad a estrés térmico reportado en el presente trabajo. Sin embargo, para demostrar lo anterior será necesario llevar a cabo una caracterización más a fondo del papel de la proteína AtCyp21-3.

Las plantas cuentan normalmente con mecanismos reguladores al daño por UV-C, sin embargo, fueron sometidas a dosis más altas de radiación para inducir la muerte celular e identificar si las plantas carentes de AtCyp21-3 presentan cambios en la

resistencia a este tipo de estrés abiótico comparando con las Col-0 según las condiciones descritas por Gao y colegas (2008).

Cuando las mitocondrias pierden el potencial de membrana, es común detectar fugas inespecíficas de iones por la membrana interna a favor de su gradiente de concentración. Si el daño es constante, comienza la generación de ROS, que a su vez continúa alterando dicho potencial. Mantener un potencial de membrana desestabilizado de manera sostenida es perjudicial para las mitocondrias y comienza el proceso de muerte celular. Durante la apoptosis, el potencial de membrana disminuye y genera la apertura del PTP y el daño será irreversible (Carraretto et al., 2016). La evaluación del potencial de membrana es un indicador funcional, pues está estrechamente relacionado a la capacidad de las células de sintetizar ATP y otros metabolitos de importancia fisiológica.

Se cree que la CypD ubicada en mitocondria desempeña un papel importante en la transición de la permeabilidad mitocondrial, al inducir la apertura del PTP. En la cepa carente de la Ciclofilina AtCyp21-3 durante las 3 semanas de observación esta presenta mayor recuperación en comparación con la Col-0, lo cual sugiere que existen mecanismos dependientes de la mitocondria en respuesta a radiación UV.

Con las observaciones y los datos obtenidos previamente descritos, la planta carente de AtCYp21-3 podría funcionar como un modelo que permita generar cultivos más resistentes al estrés por radiación UV-C, condición que en la actualidad comienza a ser de gran importancia, pues cada vez la industria agrícola se ve afectada por condiciones climáticas inusuales.

7. CONCLUSIONES

- ❖ Las plantas carentes de AtCyp21-3 presentan morfología similar a la Col-0.
- ❖ La ausencia de AtCyp21-3 no ocasiona cambios en el $\Delta\Psi$ en condiciones basales.
- ❖ Las plantas AtCyp21-3 son más resistentes al estrés por radiación UV-C.
- ❖ Las plántulas Col-0 y AtCyp21-3 presentan poca senescencia a estrés por radiación UV-C, aunque es más evidente en AtCyp21-3 por un crecimiento lento.
- ❖ Las plantas y plántulas AtCyp21-3 son más sensibles al estrés térmico que las silvestres.

8. PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar los niveles de los transcritos correspondientes a todas las isoformas de las ciclofilinas en plantas silvestres y mutantes AtCyp21-3.
- ❖ Hacer pruebas con anticuerpos comerciales contra ciclofilinas de otras fuentes para evaluar inmunodetección de estas proteínas en plantas silvestres y mutantes de AtCyp21-3.
- ❖ Evaluar niveles de muerte celular en plantas Col-0 y AtCyp21-3 en respuesta a estrés UV-C y térmico usando un ensayo de liberación de solutos citoplasmáticos por conductimetría.
- ❖ Determinar muerte celular en ambos tipos de plantas usando un ensayo fluorométrico con la sonda Sytox-green.
- ❖ Generar una planta que sobreexpresa AtCyp21-3.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abdeeva, I. A., Pogorelko, G. V., Maloshenok, L. G., Mokrykova, M. V., Fursova, O. V., &

Bruskin, S. A. (2018). Search for partner proteins of *A. thaliana* immunophilins involved in the control of plant immunity. *Molecules*, 23(4).

<https://doi.org/10.3390/molecules23040953>

Al-Shehbaz, I. A., & O’Kane, S. L. (2002). Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis*

(Brassicaceae). *The Arabidopsis Book*, 1(1821), e0001.

<https://doi.org/10.1199/tab.0001>

Baines, C. P., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2018). The still uncertain identity of the channel-

forming unit(s) of the mitochondrial permeability transition pore. *Cell Calcium*,

73(April), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.05.003>

Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska¹, H., Hambleton², M. A.,

... Molkenstin, J. R. & J. D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434(7033), 658–662.

<https://doi.org/10.1038/nature03434>.

Bereiter-Hahn & Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells. *Microscopy*

Res. and Technique., 219, 198–219.

Carraretto, L., Checchetto, V., De Bortoli, S., Formentin, E., Costa, A., Szabó, I., & Teardo,

E. (2016). Calcium flux across plant mitochondrial membranes: Possible molecular players. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016), 1–8.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00354>

Carraro, M., Checchetto, V., Szabó, I., & Bernardi, P. (2019). F-ATP synthase and the

permeability transition pore: fewer doubts, more certainties. *FEBS Letters*, 593(13),

1542–1553. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13485>

- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *16*(6), 735–743.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>
- Cossarizza, A., Baccaranicontri, M., Kalashnikova, G., & Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *197*, 40–45.
- Curtis, M. J., & Wolpert, T. J. (2002). The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. *Plant Journal*, *29*(3), 295–312.
<https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01213.x>
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, *43*(6), 582–592.
<https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N., & Gallois, P. (2000). Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry*, *38*(9), 647–655.
[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01178-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01178-5)
- Danon, A., & Gallois, P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, *437*(1–2), 131–136.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01208-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01208-3)
- Danon, A., Rotari, V. I., Gordon, A., Mailhac, N., & Gallois, P. (2004). Ultraviolet-C Overexposure Induces Programmed Cell Death in *Arabidopsis*, Which Is Mediated by Caspase-like Activities and Which Can Be Suppressed by Caspase Inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(1), 779–

787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304468200>

- Davis, T. L., Walker, J. R., Campagna-Slater, V., Finerty, P. J., Finerty, P. J., Paramanathan, R., ... Dhe-Paganon, S. (2010). Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biology*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000439>
- Diaz, C., Purdy, S., Christ, A., Morot-Gaudry, J. F., Wingler, A., & Masclaux-Daubresse, C. (2005). Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in Arabidopsis. A metabolic profiling approach. *Plant Physiology*, 138(2), 898–908. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060764>
- Dos Santos, I. B., & Park, S. W. (2019). Versatility of cyclophilins in plant growth and survival: A case study in arabidopsis. *Biomolecules*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/biom9010020>
- Frey, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, 0004(July), 319–324. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1)
- Gao, C., Xing, D., Li, L., & Zhang, L. (2008). Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. *Planta*, 227(4), 755–767. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0654-4>
- Gasser, C. S., Gunning, D. A., Budelier, K. A., & Brown, S. M. (1990). Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24), 9519–9523. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9519>

- Gray, M. W. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends in Genetics*, 5(C), 294–299. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90111-X](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90111-X)
- Greenawalt, J. W., Rossi, C. S., & Lehninger, A. L. (1964). Effect of Active Accumulation of Calcium and Phosphate Ions on the Structure of Rat Liver Mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 23, 21–38. <https://doi.org/10.1083/jcb.23.1.21>
- Griffiths, E. J., & Halestrap, A. P. (1993). Protection by Cyclosporin A of Ischemia/Reperfusion-Induced Damage in Isolated Rat Hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 25, pp. 1461–1469. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1993.1162>
- Grundmann, M. L., Kim, S., & Wong, C. J. (2013). The impact of mutation at the At3g55360 locus (cer10) results in a reduction in the cell length of Arabidopsis. *The Expedition*, 2, 1–12.
- Gutiérrez-Aguilar, M. (2020). Mitochondrial calcium transport and permeability transition as rational targets for plant protection. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1861(12), 148288. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148288>
- Gutiérrez-Aguilar, M., & Baines, C. P. (2013). Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers. *Biochemical Journal*, 454(3), 371–386. <https://doi.org/10.1042/BJ20121753>
- Gutiérrez-Aguilar, M., & Baines, C. P. (2015). Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(10), 2041–2047. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.009>
- He, Z., Li, L., & Luan, S. (2004). Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl

prolyl isomerases in arabidopsis. *Plant Physiology*, 134(4), 1248–1267.

<https://doi.org/10.1104/pp.103.031005>

Hörtensteiner, S., & Feller, U. (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 927–937.

<https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.927>

Hunter, D. R., & Haworth, R. A. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 195(2), 468–477. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90373-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90373-4)

Huseynova, I. M., Rustamova, S. M., Suleymanov, S. Y., Aliyeva, D. R., Mammadov, A. C., & Aliyev, J. A. (2016). Drought-induced changes in photosynthetic apparatus and antioxidant components of wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties. *Photosynthesis Research*, 130(1–3), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0244-z>

Ichas, F., & Mazat, J. P. (1998). From calcium signaling to cell death: Two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366(1–2), 33–50. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00119-4)

Jansen, M. A. K., Gaba, V., & Greenberg, B. M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science*, 3(4), 131–135. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01215-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01215-1)

Jeon, H., Jin, Y. M., Choi, M. H., Lee, H., & Kim, M. (2013). Chloroplast-targeted bacterial RecA proteins confer tolerance to chloroplast DNA damage by methyl viologen or UV-C radiation in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Physiologia Plantarum*, 147(2), 218–233. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01658.x>

- Jung, H., Jo, S. H., Park, H. J., Lee, A., Kim, H. S., Lee, H. J., & Cho, H. S. (2020). Golgi-localized cyclophilin 21 proteins negatively regulate ABA signalling via the peptidyl prolyl isomerase activity during early seedling development. *Plant Molecular Biology*, *102*(1–2), 19–38. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00928-5>
- Kalisz, S., & Kramer, E. M. (2008). Variation and constraint in plant evolution and development. *Heredity*, *100*(2), 171–177. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800939>
- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw Hill México, 6a Edición.
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., ... & Somerville, C. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, *408*(6814), 796–815. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35048692>
- Kumari, S., Roy, S., Singh, P., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2013). Cyclophilins: Proteins in search of function. *Plant Signaling and Behavior*, *8*(1), 25–32. <https://doi.org/10.4161/psb.22734>
- Liberatore, K. L., Dukowic-Schulze, S., Miller, M. E., Chen, C., & Kianian, S. F. (2016). The role of mitochondria in plant development and stress tolerance. *Free Radical Biology and Medicine*, *100*, 238–256. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.033>
- Littlejohn, G. R., Gouveia, J. D., Edner, C., Smirnoff, N., & Love, J. (2010). Perfluorodecalin enhances in vivo confocal microscopy resolution of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *New Phytologist*, *186*(4), 1018–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03244.x>
- Littlejohn, G. R., & Love, J. (2012). A simple method for imaging *arabidopsis* leaves using perfluorodecalin as an infiltrative imaging medium. *Journal of Visualized Experiments*,

2(59), 1–4. <https://doi.org/10.3791/3394>

Martin, S. J., & Cotter, T. G. (1991). Ultraviolet b irradiation of human leukaemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis. *International Journal of Radiation Biology*, 59(4), 1001–1016. <https://doi.org/10.1080/09553009114550891>

Mathur, J., Koncz, C. & Szabados, L. (1995). A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Cell Reports*, 14, 221–226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00233637>

Medina, L. (2016). Agriculture , Salinity and Arbuscular Mycorrhizal Fungi: a Need , a Problem and an Alternative. *Cultivos Tropicales*, 37(3), 42–49. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1117.9765>

Mondragón, O. (2019). *Variación natural en respuesta a estrés osmótico usando la raíz de Arabidopsis thaliana como organismo modelo*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, 169(1), 32–41. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00677>

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., ... Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434(7033), 652–658. <https://doi.org/10.1038/nature03317>

- Noctor, G., De Paepe, R., & Foyer, C. H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, 12(3), 125–134.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.005>
- Ogawa, D., Yamaguchi, K., & Nishiuchi, T. (2007). High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3373–3383. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm184>
- Oliveira, R. A. de C., de Andrade, A. S., Imparato, D. O., de Lima, J. G. S., de Almeida, R. V. M., Lima, J. P. M. S., ... Dalmolin, R. J. S. (2019). Analysis of Arabidopsis thaliana Redox Gene Network Indicates Evolutionary Expansion of Class III Peroxidase in Plants. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52299-y>
- Pedroza-García, J. A., Nájera-Martínez, M., de la Paz Sanchez, M., & Plasencia, J. (2014). Arabidopsis thaliana thymidine kinase 1a is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant Molecular Biology*, 87(3), 303–315. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0277-7>
- Queitsch, C., Hong, S. W., Vierling, E., & Lindquist, S. (2000). Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12(4), 479–492.
<https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.479>
- Relichova, J. (1998). Arabidopsis Protocols. In J. M. M.-Z. & J. Salinas (Ed.), *Arabidopsis Protocols*. Methods in Molecular Biology.
- Robinson, D. (1994). The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist*, 127(4), 635–674. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02969.x>
- Romano, P. G. N., Horton, P., & Gray, J. E. (2004). The arabidopsis cyclophilin gene

family. *Plant Physiology*, 134(4), 1268–1282. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022160>

Sage, R. F. (1990). A model describing the regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, electron transport, and triose phosphate use in response to light intensity and CO₂ in C₃ plants. *Plant Physiology*, 94(4), 1728–1734. <https://doi.org/10.1104/pp.94.4.1728>

Sage, R. F., & Kubien, D. S. (2007). The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 30(9), 1086–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01682.x>

Schwacke, R., Schneider, A., Van Der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., ... Kunze, R. (2003). ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiology*, 131(1), 16–26. <https://doi.org/10.1104/pp.011577>

Scott, I., & Logan, D. C. (2008). Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in Arabidopsis. *New Phytologist*, 177(1), 90–101. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02255.x>

Shindo, C., Bernasconi, G., & Hardtke, C. S. (2007). Natural genetic variation in arabidopsis: Tools, traits and prospects for evolutionary ecology. *Annals of Botany*, 99(6), 1043–1054. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl281>

Sivandzade, F., Bhalerao, A., & Cucullo, L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-Protocol*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3128>

Tonsor, S. J., Alonso-Blanco, C., & Koornneef, M. (2005). Gene function beyond the single trait: Natural variation, gene effects, and evolutionary ecology in Arabidopsis thaliana.

Plant, Cell and Environment, 28(1), 2–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01264.x>

Tower, J. (2015). Programmed cell death in aging. *Ageing Research Reviews*, 23(PA), 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.04.002>

Uribe-Carvajal, S., Luévano-Martínez, L. A., Guerrero-Castillo, S., Cabrera-Orefice, A., Corona-de-la-Peña, N. A., & Gutiérrez-Aguilar, M. (2011). Mitochondrial Unselective Channels throughout the eukaryotic domain. *Mitochondrion*, 11(3), 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.02.004>

Vacca, R. A., Valenti, D., Bobba, A., Merafina, R. S., Passarella, S., & Marra, E. (2006). Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco bright-yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiology*, 141(1), 208–219. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078683>

Van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., ... Bozhkov, P. V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1241–1246. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.36>

Vianello, A., Macri, F., Braidot, E., & Mokhova, E. N. (1995). Effect of cyclosporin A on energy coupling in pea stem mitochondria. *FEBS Letters*, 371(3), 258–260. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00897-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00897-I)

Vianello, Angelo, Casolo, V., Petrusa, E., Peresson, C., Patui, S., Bertolini, A., ... Zancani, M. (2012). The mitochondrial permeability transition pore (PTP) - An example of multiple molecular exaptation? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(11), 2072–2086. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.06.620>

- Walter, A., & Schurr, U. (2005). Dynamics of leaf and root growth: Endogenous control versus environmental impact. *Annals of Botany*, 95(6), 891–900.
<https://doi.org/10.1093/aob/mci103>
- Wang, P., & Heitman, J. (2005). The cyclophilins. *Genome Biology*, 6(7).
<https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-7-226>
- Weigel, D. (2012). Natural variation in arabidopsis: From molecular genetics to ecological genomics. *Plant Physiology*, 158(1), 2–22. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189845>
- Wiese, A., Christ, M. M., Virnich, O., Schurr, U., & Walter, A. (2007). Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytologist*, 174(4), 752–761. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02053.x>
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “electronic fluorescent pictograph” Browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, 2(8), 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000718>
- Yepes, Adriana & Silveira Buckeridge, M. (2011). Plant responses to meteorological events related to climate change - review. *Colombia Forestal*, 14(0120–0739), 213–232. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=423939616005>
- Yoo, S. D., Cho, Y. H., & Sheen, J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2(7), 1565–1572. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>
- Zancani, M., Casolo, V., Petrusa, E., Peresson, C., Patui, S., Bertolini, A., ... Vianello, A. (2015). The permeability transition in plant mitochondria: The missing link. *Frontiers in*

Plant Science, 6(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01120>

Zhang, L., Li, Y., Xing, D., & Gao, C. (2009). Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that HsfA2 alleviates oxidative damage caused by heat stress in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 60(7), 2073–2091. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp078>