



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



MCIAM
Maestría en Ciencias
en Ingeniería Ambiental
UMSNH

Facultad de Ingeniería Química

Facultad de Ingeniería Civil

Facultad de Biología

Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Tesis:

**“VALORACIÓN DEL EFECTO DE ESTRÉS POR BAJAS
TEMPERATURAS EN LA GERMINACIÓN DE 3 GÉNEROS DE LA
FAMILIA *Brassicaceae*: EN BUSCA DE UN MODELO DE
ESTUDIO SOBRE MEMORIA TRANSGENERACIONAL”**

Que presenta:

Biol. Julio Adrián Gómez villa

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Director de Tesis:

**Dra. Nabanita Dasgupta
Schubert**

Co-Director de Tesis:

**Dr. Marco Aurelio Pardo
Galván**

Morelia, Michoacán, Agosto de 2019



CONTENIDO

CONTENIDO	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Adaptación	6
1.2. Estrés ambiental	7
II. Antecedentes.....	10
2.1. Las bajas temperaturas en el desarrollo de plantas	10
2.3. Dormancia y germinación	13
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. HIPÓTESIS	17
V. OBJETIVOS	18
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. Modelos experimentales	19
6.2. Germinación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tipo silvestre (Col 0), <i>Brassica juncea</i> (Mostaza de la India) y <i>Nasturtium officinale</i> (Berro).....	20
6.3. Preparación de medio MS al 0.2X	21
6.4. Diseño de cámara de cultivo	21
6.5. Trasplante de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> a tierra.....	24
6.6. Cosecha de semillas.....	24
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
7.1. Diseño de la cámara de cultivo	29
7.2. Condición de shock térmico (congelación y ultracongelación).....	30
VIII. DISCUSIÓN AMPLIADA	48
IX. CONCLUSIÓN	51
X. BIBLIOGRAFÍA	52



RESUMEN

El cambio climático planetario representa uno de los mayores desafíos del ser humano, tanto por las repercusiones socio-económicas, como por ser, en gran medida, responsable del mismo. El exceso de lluvias, sequías prolongadas y heladas extremas son algunas de las consecuencias del cambio climático. Las desviaciones extremas de temperatura se han agudizado en los últimos años, que han provocado enormes pérdidas económicas en la agricultura, así como alteraciones graves en los ecosistemas de todo el mundo. Las plantas son las que sufren en mayor medida estos cambios por ser sésiles. Variaciones drásticas en la temperatura, en particular las bajas temperaturas extremas, afectan su viabilidad y comprometen su supervivencia ya que a temperaturas de congelación el agua contenida en las células forma cristales que dañan las membranas celulares. Para sobrevivir deben adaptar su fisiología. Para plantas de interés agronómico, las temperaturas de congelación repercuten en la productividad y calidad del producto. La expectativa de utilizar cultivos resistentes a bajas temperaturas se basa en las posibilidades de manipular las respuestas naturales de las plantas a esas temperaturas. Un proceso clave en esta respuesta es la capacidad germinativa de la planta. Cada planta posee una temperatura óptima de germinación. En el presente trabajo, se compara la respuesta de germinación ante temperaturas de congelación y ultracongelación de semillas de plantas pertenecientes a la familia *Brassicaceae*: berro, mostaza y el modelo vegetal más estudiado, *Arabidopsis thaliana*. Descubrimos una correlación de resistencia a este estrés abiótico con el origen geográfico de las plantas estudiadas.

Palabras clave: Cambio climático, temperatura, germinación, *Brassicaceae*.



ABSTRACT

Planetary climate change represents one of the greatest challenges for humanity, because of its social and economic repercussions, and for being, to a large extent, responsible for it. Excessive rains, prolonged droughts and extreme frosts are some of the consequences of climate change. Extreme temperature deviations have worsened in recent years, which have caused huge economic losses in agriculture, as well as serious changes in ecosystems around the world. Plants are the ones that suffer most from these changes because they are sessile. Drastic variations in temperature, in particular the low extreme temperatures, affect its viability and compromise its survival since at freezing temperatures the water contained in the cells forms crystals that damage cell membranes. To survive they must adapt their physiology. For plants of agronomic interest, freezing temperatures have an impact on productivity and product quality. The expectation of using crops resistant to low temperatures is based on the possibilities of manipulating the natural responses of plants to those temperatures. A key process in this response is the germination capacity of the plant. Each plant has an optimal germination temperature. In this paper, the germination response is compared to freezing and deep-freezing temperatures of seeds from plants belonging to the Brassicaceae family: watercress, mustard and the most studied plant model, *Arabidopsis thaliana*. We discovered a correlation of resistance to freezing temperatures with the geographical origin of the studied plants.

Keywords: Climate change, temperature, germination, Brassicaceae.



I. INTRODUCCIÓN

La evolución biológica es el conjunto de cambios en caracteres fenotípicos y genéticos de poblaciones biológicas a través de generaciones. Dicho proceso ha originado la diversidad de formas de vida que existen sobre la tierra a partir de un antepasado común. Los procesos evolutivos han producido la biodiversidad en cada nivel de la organización biológica, incluyendo los de población, especie, organismos individuales y molecular; así toda la vida de la tierra procede de un antepasado común.

Una teoría que dio origen al término de la evolución tal y como la conocemos hoy es la teoría de Lamarck, naturalista francés nacido en el año de 1744. En su época se sostenía que Dios creaba directamente las especies, mientras que Lamarck defendía que Dios creaba la naturaleza y ésta daba lugar a las especies debido a su tendencia natural hacia la complejidad y a las adaptaciones causadas por las variaciones ambientales.

Esta es la primera teoría que presenta una estructura clara y coherente sobre la transformación, admite la existencia de la evolución de las especies a través del tiempo que va de formas menos complejas a más complejas y trata de darle una explicación racional, aunque resultara equivocada.

En su teoría, los seres vivos conocidos se organizan de lo simple a lo complejo y cada escalón representaba un nivel superior de organización de manera lineal. Así, las especies más antiguas eran simples, mientras que las más recientes eran más complejas y parecidas a las actuales.

En síntesis, la teoría de Lamarck trataba los siguientes puntos:

- El sentido de la transformación evolutiva va de las especies más sencillas, formadas por generación espontánea, a las más complejas.



- Tendencia natural hacia la complejidad.
- Las variaciones de las condiciones del medio ambiente provocan cambios en las funciones vitales de los seres vivos, lo cual conlleva que unos órganos se desarrollen y otros se atrofien. Es decir, las variaciones medioambientales causan las adaptaciones de los organismos.
- Desarrollo de adaptación al medio, con la idea de que “la función crea al órgano”.
- Las modificaciones adquiridas por los organismos durante su vida, en su adaptación al medio, se transmiten a los descendientes.

Cuando Lamarck dio a conocer su teoría no fue aceptada por todos los naturalistas de su época, insistiendo que las especies habían sido creadas de manera independiente y que eran inmutables.

Charles Darwin, naturalista británico que no estaba de acuerdo con la teoría lamarckiana de la evolución por carecer de pruebas suficientemente concluyentes, hizo que en 1831 se embarcara en un viaje de exploración y descubrimientos alrededor del mundo que duró 5 años. Durante este tiempo recolectó enormes cantidades de materiales, haciendo observaciones de la vida natural, lo cual lo llevaron a escribir el libro “El origen de las especies” en la década de 1850. En él propuso que las especies tienen descendencia con modificaciones (evolución) y que todos los seres vivos pueden rastrear su ascendencia a un antepasado común.

Darwin propuso que las especies cambian con el tiempo, que las nuevas especies provienen de especies preexistentes y que todas las especies comparten un ancestro común. En este modelo cada especie tiene su propio conjunto de diferencias heredables en relación con su ancestro común, las cuales se han acumulado gradualmente durante periodos de tiempo muy largos, refiriéndose a este proceso, en el que los grupos de organismos cambian en sus características heredables a lo largo de generaciones, como “descendencia con modificaciones”.



Darwin no solo propuso que los organismos evolucionaban si no también un mecanismo para la evolución: la selección natural. Este mecanismo podía explicar cómo podían evolucionar las poblaciones, tener descendencia modificada, de tal manera que se hacían más adecuadas para vivir en sus entornos con el paso del tiempo. Este concepto lo sustentó en varias observaciones, tales como:

- Los rasgos a menudo son heredados pasando de los padres a los hijos.
- Se produce más descendencia de la que puede sobrevivir por lo que existe una competencia por los recursos limitados en cada generación.
- La descendencia varía en sus rasgos heredables, teniendo ligeros cambios entre sí los cuales serán heredados.

Basado en estas observaciones, Darwin concluyó que: en una población algunos individuos tendrían rasgos heredables que les ayudarían a sobrevivir y reproducirse, habiendo individuos con rasgos más ventajosos los cuales dejarán una mayor descendencia, dado que sus rasgos los hace más efectivos para la supervivencia y la reproducción; de esta manera, los rasgos más ventajosos tenderán a volverse más comunes en la población de la siguiente generación y en el transcurso de varias generaciones, la población se adaptará mejor a su entorno, manteniéndose estos rasgos por procesos de selección natural dependientes del ambiente, favoreciendo de esta manera los rasgos más benéficos para la supervivencia de los organismos en un ambiente específico, teniendo una mejor “adaptación” a dicho ambiente.

1.1. Adaptación

La teoría de Darwin sobre la evolución por selección natural estaba destinada a resolver, a la vez, el problema del origen de la variabilidad y el problema del origen de la adaptación.

El punto de vista actual sobre la adaptación es que el ambiente plantea ciertos “problemas” que los organismos necesitan “resolver”, y que la evolución a través de la



selección natural constituye el mecanismo para crear dichas soluciones. La adaptación es el proceso del cambio evolutivo mediante el cual el organismo procura una “solución” al “problema” cada vez mejor, siendo el resultado final la adaptación.

Hay una constante interacción entre el organismo y el medio; por lo cual, aunque la selección natural pueda estar adaptando al organismo a una serie concreta de circunstancias ambientales, la evolución del propio organismo cambia dichas circunstancias. Finalmente, los mismos organismos determinan qué factores externos formarán parte de su nicho mediante sus propias actividades. El nicho ecológico es una descripción pluridimensional del ambiente en su conjunto y del medio de vida de un organismo. En esa descripción entran factores físicos, como temperatura y humedad; factores biológicos, como naturaleza y cantidad de recursos alimenticios y número de depredadores.

La teoría de Van Valen expone que el ambiente está constantemente degradándose con respecto a los organismos existentes, por lo que la selección natural actúa esencialmente capacitando a los organismos para mantener su estado de adaptación., en otras palabras, la selección natural, cuando actúa durante largo tiempo, no parece mejorar la probabilidad de supervivencia de la especie sino simplemente la capacita para “seguir la pista” de él, o hacer frente al constante cambio ambiental.

Los biólogos expertos en evolución suponen que cada uno de los aspectos morfológicos, fisiológicos y etológicos de un organismo ha sido moldeado por selección natural como solución a un problema de estrés planteado por el ambiente.

1.2. Estrés ambiental

Podemos definir el estrés como cualquier tipo de situación ambiental adversa que afecte al organismo.

A todo ser vivo, las condiciones adversas les exigen una serie de cambios fisiológicos con el único fin de mantenerse con vida. En el campo agrícola este estrés conlleva a una disminución en la cantidad y calidad de la producción.



El estrés se identifica como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida. Dichas condiciones ocasionan cambios en todos los niveles funcionales de los organismos. El estrés se refiere a los cambios ambientales que alteran al estado fisiológico de las plantas (Larcher, 1995).

El estrés es el conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas.

El estrés se puede dividir en dos clases:

Bióticos: que pueden ser producidos por competencia de otras plantas por el agua y los nutrientes, daños provocados por los herbívoros, patógenos, etc.

Abióticos: en estos se distinguen dos tipos. 1) físicos, tales como altas y bajas temperaturas, sequía, inundaciones, etc. 2) Químicos, tales como pesticidas, salinidad, pH, etc.

Se define la resistencia al estrés como la capacidad de un organismo para resistir, evitar y escapar a los estímulos ambientales negativos o poder permanecer bajo un estado particular de estrés sin que su fenotipo se vea modificado de manera significativa.

Una característica del desarrollo de las plantas es su plasticidad fenotípica. Esta plasticidad le confiere adaptabilidad a un medio ambiente espacial y temporalmente heterogéneo. Las plantas por ser sésiles, están sujetas a estímulos bióticos y abióticos siempre cambiantes. Un estímulo abiótico esencial para su supervivencia es la temperatura. En el mundo actual, las temperaturas se extreman año con año y esto conlleva efectos graves en la supervivencia y productividad de plantas importantes para la ecología y para el consumo humano. Por estas razones es imperativo entender los mecanismos de las plantas que nos permitan hacer frente a estos efectos adversos.

En plantas, un objetivo fundamental relacionado a su evolución, ecología y biotecnología es saber en qué grado la variación en caracteres podrían ser heredables, porque la herencia determina el potencial y capacidad adaptativos a medio ambientes cambiantes. Una habilidad particularmente importante de las plantas es la plasticidad fenotípica, esto es la habilidad genotípica de expresar diferentes fenotipos en distintos



ambientes. Esta característica es esencial para organismos sésiles como las plantas, que deben adaptarse a un medio ambiente espacial y temporalmente heterogéneo. Muchos caracteres complejos de importancia ecológica y biotecnológica como tiempo de floración, producción y resistencia a sequía y heladas, se ha considerado que son el producto de la interacción de múltiples genes. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que la variación de algunos caracteres heredables podría ser causada por variación epigenética. Por más de cinco décadas, se ha considerado como única fuente de evolución a los cambios de secuencia nucleotídica en el ADN de un organismo. Sin embargo, recientemente se han descubierto mecanismos moleculares que implican modificaciones químicas en la cromatina que no alteran la secuencia de bases del ADN, pero que sí influyen un carácter o fenotipo en un ser vivo suprimiendo o estimulando la expresión o actividad de un gene; a esto se le conoce como epigenesis (Wu 2001). En plantas se han reportado numerosos procesos relacionados al desarrollo en los que se ha podido demostrar que son modulados por modificaciones epigenéticas. Entre estos procesos se encuentran la floración, tamaño radicular, simetría foliar, generación de semillas y, de particular interés al presente proyecto, la germinación.

El desarrollo en plantas es plástico y fuertemente influenciado por factores bióticos y abióticos. Las plantas requieren de una interacción específica entre programas de desarrollo y rutas de señalización provenientes de estímulos externos que han de ser coordinadas a nivel de la organización cromatínica.

Las plantas emplean las estrategias de regulación epigenética para mantener su plasticidad. Estos mecanismos les permiten una rápida adaptación a nuevas condiciones sin necesidad de cambiar su secuencia de ADN.



II. Antecedentes

2.1. Las bajas temperaturas en el desarrollo de plantas

Un factor abiótico clave en el desarrollo de una planta es la temperatura. Toda planta posee una temperatura óptima de crecimiento, floración, generación de semillas y germinación. Variaciones drásticas en la temperatura afecta su viabilidad y compromete su supervivencia. Para productores de plantas de interés agronómico, las variaciones en las condiciones climáticas extremas que se radicalizan año con año, repercuten fuertemente en la productividad y en la calidad del producto. Las bajas temperaturas son un factor importante que determina la distribución geográfica de las especies y de los cultivos. Los daños a los cultivos son cuantiosos; por ejemplo, se estima que un descenso de 1°C en la temperatura promedio anual, provocaría una disminución del 40% en la cosecha mundial de arroz. La expectativa de utilizar cultivos resistentes a bajas temperaturas en regiones de clima frío se basa en las posibilidades de manipular las respuestas naturales de las plantas a esas temperaturas. En los últimos años se han realizado esfuerzos para conocer la forma en que las plantas “censan” el ambiente y responden a los cambios ambientales por la aplicación potencial de este conocimiento. Esto unido al uso de técnicas de ingeniería genética permitiría proporcionar resistencia al frío a plantas sensibles. No cabe duda que, con la aplicación de estas nuevas y poderosas herramientas, en México sería posible extender notablemente el área de cultivo de especies tropicales hacia zonas más frías y por otra parte se podría evitar o reducir el daño a los cultivos causado por heladas.

Los principales aspectos que influyen en la sensibilidad de los vegetales al frío son la especie, la edad, la historia previa y las condiciones ambientales (Olivares 1990). En general, las plántulas muy jóvenes y las semillas en germinación son las más afectadas por las bajas temperaturas, mientras que las semillas dormantes son las más resistentes.

En el transcurso de la evolución, las plantas adquirieron numerosos mecanismos de supervivencia relacionados con el frío. Para sobrevivir a este estrés, las plantas usan



mecanismos de tolerancia que es la capacidad de resistir las alteraciones que ocasiona el frío a través de mecanismos internos extremadamente complejos que están controlados por genes inducidos por las bajas temperaturas (Thomashow 1999).

Una de las estrategias de tolerancia es la aclimatación al frío, proceso por el cual las plantas aumentan su tolerancia al congelamiento después de ser expuestas a bajas temperaturas por un período de tiempo. De hecho, se ha encontrado que plantas expuestas a pequeños periodos de estrés térmico (altas o bajas temperaturas) pueden posteriormente tolerar temperaturas que normalmente son letales (Sung 2003). Esta tolerancia adquirida involucra cambios en la expresión genética que se traducen en cambios cualitativos en el patrón de proteínas sintetizadas.

En general, las plantas aclimatadas sobreviven con mayor cantidad de agua congelada en sus tejidos; la resistencia a la congelación depende, tanto de la capacidad de los espacios extracelulares para controlar el volumen del cristal como de la capacidad del protoplasto de resistir a la deshidratación. Se ha observado que la aclimatación al frío está correlacionada con una disminución del potencial osmótico y la estabilización de las membranas contra el daño por congelamiento (Palta 1993). El daño a las membranas se reduce al aumentar los ácidos grasos insaturados que las constituyen. La adquisición de la tolerancia al congelamiento ocurre en un plazo de pocos días, e implica una rápida inducción y síntesis de proteínas protectoras, así como de enzimas responsables de la síntesis de azúcares tales como sacarosa, rafinosa y fructosa, que evitan la formación de hielo intracelular al disminuir la temperatura de congelamiento del agua.

Se han descrito varios mecanismos moleculares involucrados en la respuesta de aclimatación al frío (Thomashow 1999). En *Arabidopsis thaliana* las bajas temperaturas inducen la síntesis de factores de transcripción, como a DREB1, involucrado en la inducción de los genes COR (cold-regulated genes). Aunque aún se desconoce la función precisa de las proteínas codificadas por los genes COR, se les considera parte del grupo de las deshidrinas (Puhakainen 2004), y se ha podido demostrar que juegan un rol relevante en la tolerancia a frío, especialmente COR47 en *Arabidopsis thaliana* (Sung et al. 2003, Thomashow 2001, Lee 1999).



2.2. Germinación

La semilla corresponde al óvulo maduro de las plantas con flores y consiste fundamentalmente en una cubierta seminal, material de reserva y el embrión. La cubierta seminal o testa, normalmente está formada por uno o dos integumentos, su estructura es altamente variable pudiendo endurecerse con depósitos de lignina o cutina y fenoles, lo que puede hacerla extremadamente resistente y/o impermeable.

El tejido de reserva es el endospermo originado de los núcleos polares después de la fertilización y queda formado por células triploides. El embrión crece después de fertilizado y termina constituyendo, con diversos grados de desarrollo según la especie, los ápices caulinar y radical y uno o dos cotiledones.

La formación de una semilla se inicia con el establecimiento de la polaridad conducente a la aparición de las zonas caulinar y radical, y pueden distinguirse cuatro etapas: 1) la histodiferenciación, con formación de las primeras estructuras embrionarias 2) la expansión celular y depósito de reservas que implica una fuerte vacuolización; 3) la maduración con disminución del metabolismo y síntesis del ARNm de proteínas LEA (“last embryogenesis abundant”) altamente hidrofílicas y 4) la adquisición de la dormancia (Vertucci & Farrant 1995). A partir de una semilla dormante se da la germinación.

El concepto de germinación comprende a todos aquellos cambios que van desde el inicio de la rehidratación (imbibición) de la semilla hasta el inicio del crecimiento de la radícula que culmina con la ruptura de las envolturas seminales; esto se ajusta al criterio botánico que considera germinada a las semillas cuando alguna parte del embrión emerge de las envolturas. Los acontecimientos siguientes, que incluyen la movilización de las reservas mayores, se asocian con el crecimiento de la plántula en el proceso conocido como “emergencia” y que culmina en la fotoautotrofia.



Se han descrito tres grandes etapas en la germinación:

- 1) Rehidratación o imbibición: implica una rápida entrada inicial de agua debida al elevado potencial mátrico de las semillas y que genera un gran aumento de volumen (entre 40 y 60%), lo que a su vez induce el lixiviado de solutos y metabolitos de bajo peso molecular hacia el medio.
- 2) Germinación en sentido estricto o fase estacionaria: A consecuencia de la imbibición, la semilla reasume su actividad metabólica y lo primero que se observa es el aumento de la actividad respiratoria, con un importante consumo inicial de oxígeno, gracias a las hidrolasas que están presentes en la semilla seca. También se activan la vía glicolítica y la de la pentosa-fosfato, se reparan y activan organelos (particularmente mitocondrias) y se reasume la síntesis de proteínas que, inicialmente, depende de los ribosomas existentes; a las pocas horas hay síntesis de nuevos ribosomas a partir de los ARNm preformados almacenados y de las proteínas LEA presentes en el embrión (Bewley 1997).
- 3) Crecimiento o ruptura de testa: es la salida de la radícula a través de las cubiertas motivada por elongación celular (Holdsworth 2008). Este evento marca el fin de la germinación.

2.3. Dormancia y germinación

Durante la imbibición, además de la reactivación metabólica se da una reactivación transcripcional. Recientemente se ha reportado en *Arabidopsis thaliana* que los niveles transcripcionales de numerosos genes se alteran durante la imbibición (Footitt 2011). Estos cambios en la expresión génica se asocian a modificaciones en la cromatina, por lo que se asume que la reactivación transcripcional está bajo control de mecanismos epigenéticos.

La fitohormona ácido abscísico (ABA) juega un papel central en la regulación positiva de la maduración de la semilla y en la dormancia, y regula negativamente a la germinación. La acción de ABA durante la maduración de la semilla y la dormancia está relacionada con la expresión de cuatro reguladores transcripcionales maestros:



LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1), LEC2, FUSCA 3 (FUS3) and ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) (Holdsworth 2008; To 2006). Estos reguladores centrales se reprimen durante la imbibición y se mantienen reprimidos a lo largo del desarrollo de la planta hasta el comienzo de una nueva generación. Por otro lado, la fitohormona giberelina promueve la germinación y genera una influencia negativa sobre la acción de ABA (Kucera 2005; Lee 2014). De esta manera, la reprogramación transcripcional durante la germinación requiere, simultáneamente, de la represión de genes embrionarios (entre los que se incluye maduración y dormancia) y la activación de genes dirigidos hacia el crecimiento fotoautotrófico (Zhang 2008; Comai 1990).

La acetilación de histonas es un mecanismo de activación epigenética ampliamente estudiado (Chinnusamy 2008). La unidad básica del cromosoma eucariótico es el nucleosoma, que consiste de un complejo histónico (H2A, H2B, H3 yH4) rodeado por aproximadamente 146 pares de bases de ADN y una histona de unión nucleosómica H1. La estructura del nucleosoma depende de las variantes histónicas y las modificaciones postraduccionales en los extremos N-terminales de las histonas. Por ejemplo, la acetilación de histonas impide la compactación entre los nucleosomas y con ello permite la interacción de los factores transcripcionales en esa región. Por el contrario, las histonas hipoacetiladas se compactan e impiden que esa región de ADN interactúe con factores transcripcionales y por lo tanto la región es transcripcionalmente inactiva.

Se ha encontrado que para el inicio de la germinación (durante la imbibición), la cromatina de los genes de maduración y dormancia se desacetilan y con ello, se silencian; en contraste, los genes involucrados en el desarrollo germinal se acetilan, y en esto están involucrados genes que codifican para acetiltransferasas como HAT, estudiados principalmente en maíz (Zhang et al. 2011). En cuanto al silenciamiento por desacetilación, en *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que los genes que codifican para las desacetilasas de histonas del grupo HDAC/HD juegan un rol importante en el inicio de la germinación (van Zanten, 2013; Chinnusamy 2008). En especial HD2C (Tipo 2 histona desacetilasa c) juega un papel preponderante (Sridha, 2006). Mutantes de *Arabidopsis thaliana* en HD2C presentan una dormancia extendida



y graves defectos de germinación (Colville, 2011). Así, la expresión de HD2C en *Arabidopsis thaliana* representa un excelente referente del inicio de la germinación.

Se ha reportado que una planta, al sufrir estrés por bajas temperaturas, puede generar alteraciones en el número de semillas y en la eficiencia de germinación, aún en plantas que recibieron el estrés durante su crecimiento vegetativo (Chen *et al.*, 2014).

En una revisión de especies de *Brassica*, se concluyó que la sequía, salinidad, las heladas y las altas temperaturas afectan significativamente los procesos morfofisiológicos de algunas de estas especies, incluida la germinación (Jan *et al.*, 2017).

Es de resaltar que no se encontraron reportes que estudien específicamente los efectos de la congelación sobre la eficiencia germinativa de semillas imbibidas.



III. JUSTIFICACIÓN

Por todo lo anterior el cambio climático global nos obliga a implementar estrategias que nos conduzcan a la protección de la ecología y la adecuación de sistemas agroproductivos a estos medios ambientes agresivos, los cuales afectan negativamente a las plantas en todo su ciclo de vida. En el caso de las plantas adultas las bajas temperaturas afectan su productividad, en las plantas jóvenes estas bajas temperaturas son casi letales destruyendo membranas y organelos.

Las bajas temperaturas generadas por la alteración del medio ambiente afecta a todas las plantas. Debido a la poca información que hay acerca del efecto que tienen las bajas temperaturas extremas en la eficiencia de germinación de semillas imbibidas, y su potencial repercusión en el sector agrícola, se vuelve imprescindible estudiar este efecto. El estudio de la eficiencia de germinación en semillas imbibidas de la familia *Brassicaceae* permitirá desarrollar un modelo para estudios relacionados a la memoria transgeneracional por exposición a temperaturas bajas extremas.



IV. HIPÓTESIS

La exposición de las semillas imbibidas a temperaturas de congelación y ultracongelación afectarán su eficiencia germinativa.



V. OBJETIVOS

Objetivo General

- Establecer un modelo de semilla imbibida para el estudio del efecto que tienen las bajas temperaturas en la eficiencia de germinación.

Objetivos Particulares

- Evaluar la eficiencia de germinación en semillas imbibidas sometidas a un shock de congelación (-20°C).
- Evaluar la eficiencia de germinación en semillas imbibidas sometidas a un shock de ultracongelación (-80°C).



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Modelos experimentales

En la presente tesis planteamos el análisis de tres modelos biológicos experimentales, que son las semillas imbibidas de la planta más utilizada en investigación, *Arabidopsis thaliana* y dos miembros de la misma familia de Brassicaceae, *Nasturtium officinale* (Berro) y *Brassica juncea* (Mostaza), para exponerlas a bajas temperaturas (congelación y ultracongelación).

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana pertenece a la familia Brassicaceae, llegando a medir hasta 30 cm presentando un ciclo de vida de 4 a 6 meses, produciendo miles de semillas en silicuas a lo largo de su vida, su temperatura óptima de crecimiento es 22 °C siendo una planta que se autofecunda y la más usada en investigación.

Brassica juncea (mostaza)

Brassica juncea pertenece a la familia Brassicaceae, es una hierba anual, llega a medir de 30 a 130 cm, presentan un ciclo de vida de 4 a 6 meses, recolectándose entre los 40 y 60 días, antes que de frutos, crece en temperaturas cálidas de hasta 27°C, y es endémica del Sur de la India.

Nasturtium officinale (berro)

Miembro de la familia Brassicaceae, es una hierba perenne rizomatosa, con tallos de hasta 50 cm de largo, presentan un ciclo de vida de 4 a 6 meses, sus semillas son producidas en silicuas. Esta planta es endémica del Norte de la India, creciendo en clima templado, es uno de los vegetales más antiguos consumido por el ser humano.



6.2. Germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre (Col 0), *Brassica juncea* (Mostaza de la India) y *Nasturtium officinale* (Berro).

1. Iniciamos con la selección de semillas, colocándolos en tubos eppendorf de 2 ml.
2. Posteriormente en campana de flujo laminar hacemos un lavado aséptico de la siguiente manera:
 - Agregar a las semillas 1ml de cloro al 20% durante 5 min y agitar.
 - Decantar el cloro y agregar 1 ml de alcohol al 96% durante 5 min y agitar.
 - Decantar el alcohol y agregar 1 ml de agua destilada estéril durante un minuto y agitar.
 - Decantar el agua y volver a agregar 1 ml de agua destilada estéril durante un minuto agitando y repetir este mismo paso 7 veces.
 - Agregar 1 ml de agua destilada estéril e incubar a 4 °C durante 48 h.
3. Pasadas las 48 h, en campana de flujo laminar eliminamos el agua de los tubos, y las semillas las pasamos a cajas Petri, dejándolas un tiempo en campana para la evaporación del agua remanente.
4. Ya eliminada el agua pasamos las cajas Petri con semillas a una cámara de crecimiento que presenta condiciones controladas (fotoperiodo, temperatura y humedad) y las dejamos por una hora para su aclimatación a 22 °C.
5. Pasada la hora aplicamos shock frío a las semillas tanto para -20 °C como -80 °C en diferentes tiempos (1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 14 h, 16 h, 24 h y 48 h).



6. Terminado su tiempo de shock las semillas son sembradas en medio MS 0.2X para su germinación.
7. Para medir los porcentajes de germinación se monitorean cada 24h durante 10 días y se cuentan las semillas germinadas.
8. Graficamos la germinación en porcentajes.

6.3. Preparación de medio MS al 0.2X

Para 1 lt de medio MS (4.43 1X) al 0.2X se disuelve en 900 ml de agua destilada; 0.886 g de MS (Murashige and Skoog) medio basal (Tropigen), 6 g de sacarosa (Sigma), ajustar el pH a 7 con KOH 10 M, aforar a 1 L, agregar 10 g de agar bacteriológico (Sigma), y esterilizar en autoclave por 25 min. Salidos de autoclave se vierte el MS a cajas petri.

6.4. Diseño de cámara de cultivo

Esta cámara fue hecha con láminas de acrílico de 6 mm, con una altura de 80 cm de alto, 220 cm de ancho y 76 cm de profundidad, contando con 3 cámaras independientes (fig. 1), en las que se controlarán condiciones físicas para el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, tales como temperatura a 22°C, luminosidad controlada entre 1800 a 1920 lúmenes a nivel de piso y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad (medidos con los aparatos que se muestran en la figura 2).

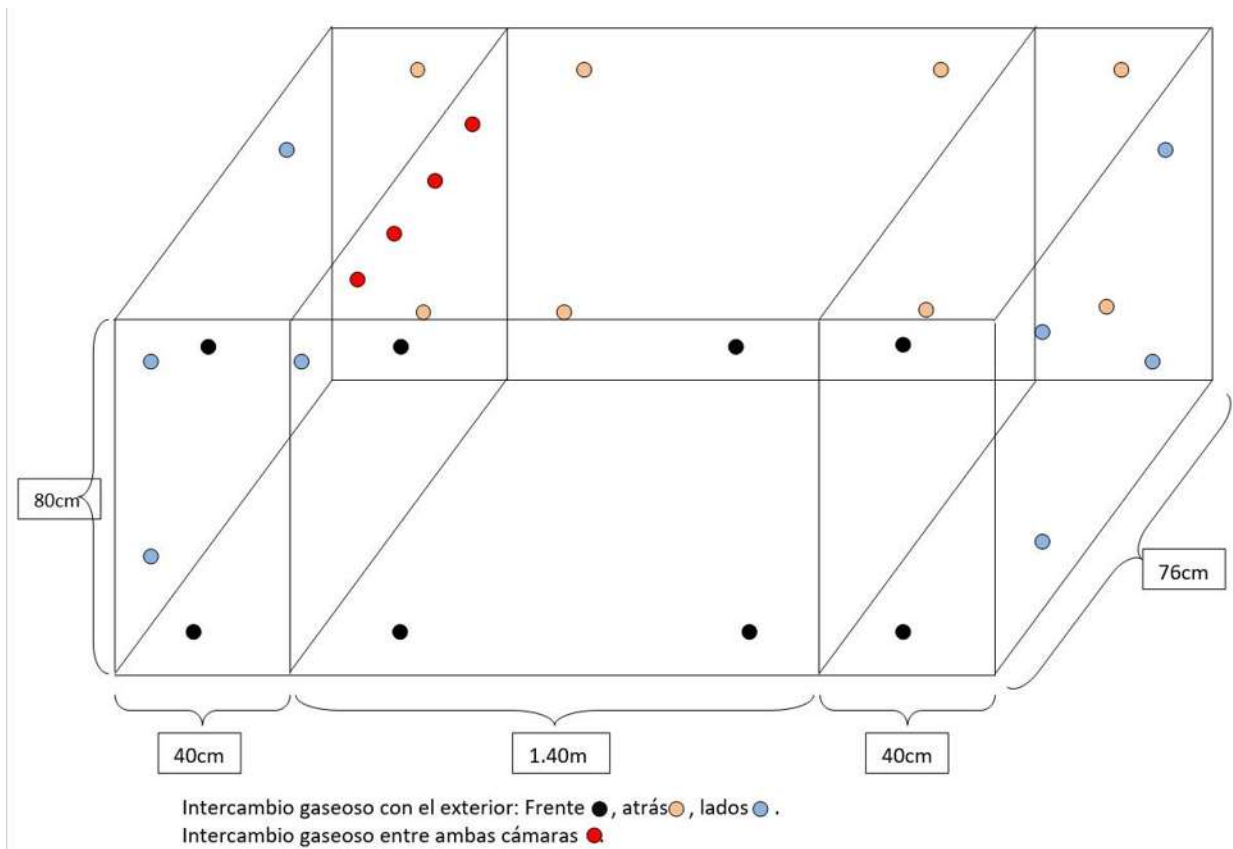


Figura 1. Medidas de la cámara de crecimiento.



A



B



D



E



C



D



F

Figura 2. Cámara y equipo utilizado para mantener y medir las condiciones necesarias para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea*, *Nasturtium officinale*. A) cámara de crecimiento. B) Aire acondicionado marca Mirage controlado a 23°C. C) Timer para controlar el fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. D) Focos Philips para una intensidad de 1800-1920 lúmenes. E) Medidor de temperatura y humedad marca Extech, controlado a 22°C. F) Medidor de lúmenes marca STEREN.



6.5. Trasplante de plántulas de *Arabidopsis thaliana* a tierra

1. Esterilizar tierra “para crecimiento” (comprada en el Cinvestav Irapuato) durante una hora a 120°C un día antes de usarla.
2. Limpiar charolas de plástico con alcohol al 70%.
3. Hacer agujeros en la base de la charola para que drene el agua.
4. Vaciar la tierra a la charola de manera uniforme y por capas, regando cada capa con agua destilada.
5. Ya colocadas todas las capas de tierra se riega nuevamente con agua destilada hasta su punto de saturación.
6. Con un rodillo aplanamos la superficie de la tierra sin hacer presión.
7. Hacemos pequeños agujeros sobre la tierra en hileras.
8. Tomamos las plántulas de las cajas Petri y colocamos las raíces con cuidado dentro de los agujeros.
9. Tapamos los agujeros sin hacer mucha presión y regamos uniformemente con fertilizante Miracle-Gro (solo se utilizará en esa ocasión).
10. Cerramos la caja de plástico y la pasamos a la cámara de crecimiento.
11. Hacer riegos periódicamente con agua destilada.

6.6. Cosecha de semillas

1. Una vez maduras las vainas se colectan las semillas en tubos eppendorf (tubo por planta) y son guardados a 4°C.
2. Ya colectadas todas las semillas se elimina los restos de vainas y suciedad que tengan las semillas.
3. Se selecciona las semillas de la planta más vigorosa para hacer los experimentos.



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestro modelo biológico inicial es *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre (Col 0), elegida por ser una planta muy pequeña y la más conocida dentro de las angiospermas, su ciclo de vida es de 4 a 6 meses llegando a producir miles de semillas a lo largo de su vida, mide aproximadamente 30 cm, es una planta que se autofecunda, siendo la planta más usada como modelo de investigación.

Establecimiento y optimización de la condición de germinación en *Arabidopsis thaliana*.

Hice pruebas para ver en qué condiciones de medio MS (vitaminado o no vitaminado) y fuente de carbono (azúcar de mesa o sacarosa nivel reactivo) las semillas pueden germinar mejor.

Medios usados:

- A. MS con azúcar de mesa.
- B. MS con sacarosa (nivel reactivo).
- C. MS con vitaminas y azúcar de mesa.
- D. MS con vitaminas y sacarosa (nivel reactivo).

Las semillas fueron colocadas en una cámara de cultivo marca Fitotrón a 22°C con fotoperiodo durante 18 días para su germinación y crecimiento, obteniendo un mejor crecimiento en la condición (D) MS con vitaminas y sacarosa nivel reactivo (Fig. 1), medio a utilizar en los experimentos.

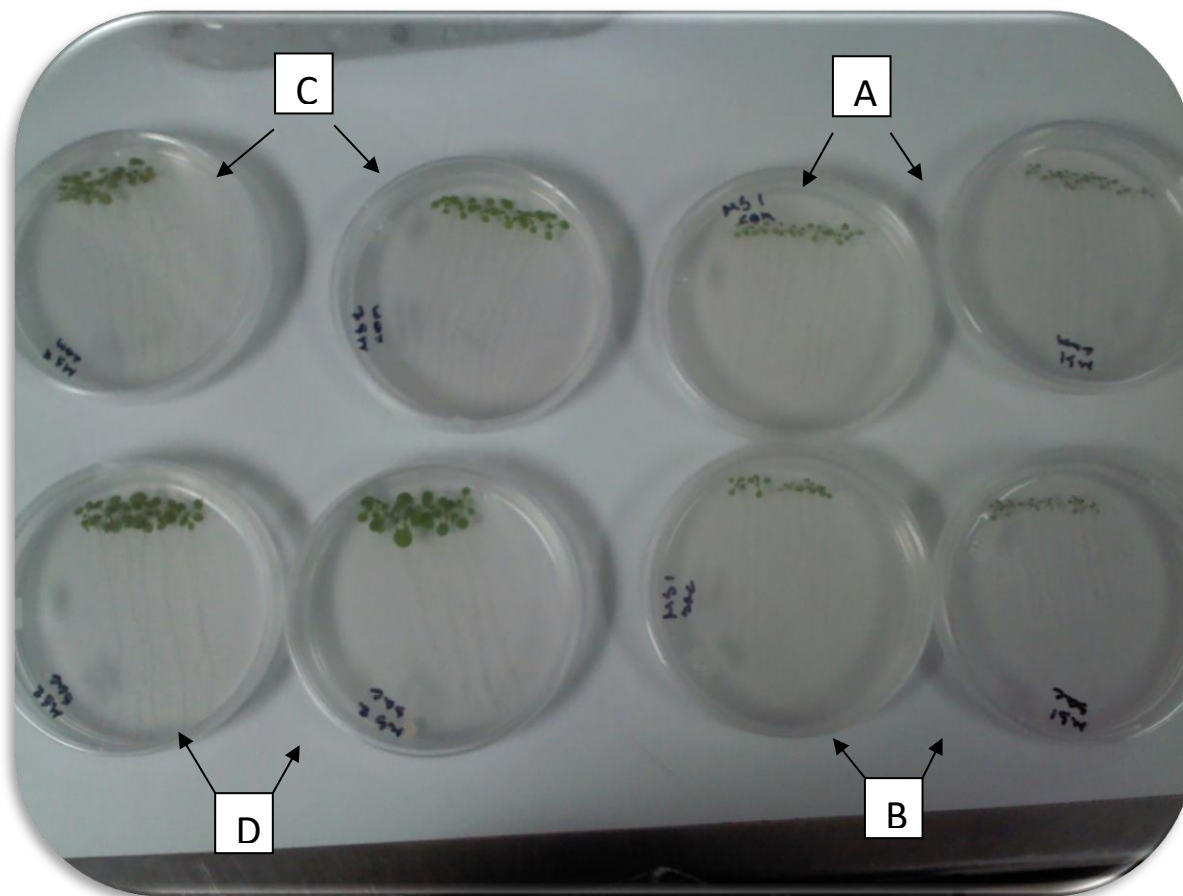


Figura 1. *Arabidopsis thaliana* a 18 días de germinación. A) MS con azúcar de mesa (MS1 com), B) MS con sacarosa nivel reactivo (MS1 sac), C) MS vitaminado con azúcar de mesa (MS2 com), D) MS vitaminado con sacarosa nivel reactivo (MS2 sac).

Para conocer el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* trasplante las plántulas a tierra a los 18 días de haber germinado (condición D), monitoreando su desarrollo en Fitotron.

A los 17 días de ser trasplantadas las plántulas a tierra, observamos crecimientos irregulares donde la única diferencia aparente era la cantidad de luz que incidía sobre las plantas, motivo por el cual se midió la intensidad luminosa con un luxómetro digital STEREN (HER-410) obteniendo distintas lecturas que van de los 1700 lúmenes hasta los 2710 lúmenes (fig. 3), además presentaba una temperatura máxima de 23.6°C y una mínima de 19.3°C. Las plantas presentaron floración a los 21 días de crecimiento



(fig. 4), generaron silicuas a los 56 días (fig. 5) y cosechamos las semillas a los 4 meses; las semillas fueron colocadas en tubos eppendorf y almacenadas a 4°C.



Figura 3. Mediciones tomadas con luxómetro (X10) 2000~19990. a) 198, b) 182, c) 170, d) 228, e) 229, f) 199, g) 257, h) 253, i) 244, j) 275, k) 271, l) 263.



Figura 4. Floración de las plantas presentada a los 21 días de ser trasplantadas a tierra.

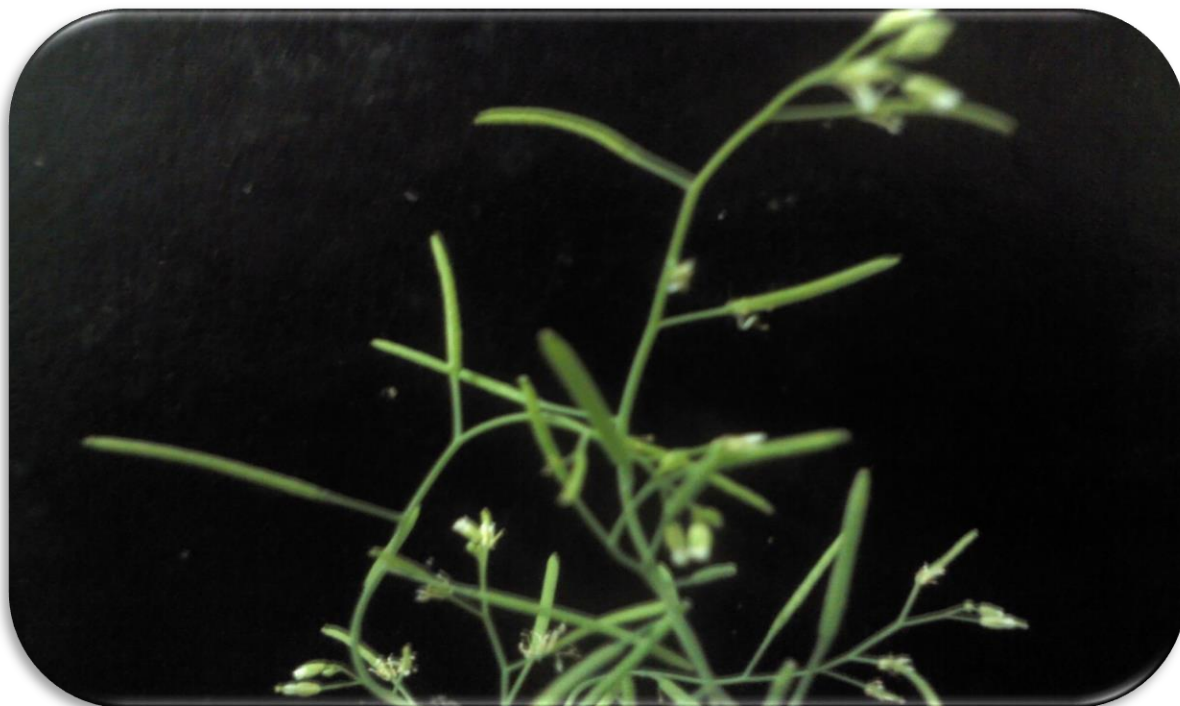


Figura 5. Formación de silicuas a los 56 días de ser trasplantadas.

Un problema presente en el Fitotron que nos afectaría en los experimentos posteriores era la variación de temperatura de 4.3°C que va de los 19.3°C a 23.6°C y la variación de 1050 lúmenes que marcaba de los 1700 a 2750, provocando un desarrollo distinto en las plantas. Y ya que la homogeneidad de las condiciones físicas es uno requisito fundamental para los experimentos de este trabajo, diseñé una cámara de cultivo (fig. 6) que me permitiera tener un mejor control con un mínimo de variación de las condiciones físicas tales como luminosidad, temperatura, fotoperiodo y humedad.

7.1. Diseño de la cámara de cultivo



Figura 6. Imágenes del desarrollo de la construcción de cámara de cultivo. 1) Se muestra la cámara con sus 3 subdivisiones y en la parte superior el montaje de 4 focos led. 2) Recubrimiento de la cámara con papel plateado para reflejar la luz y aumentar los lúmenes. 3) Recubrimiento de la cámara con papel corrugado para conservar la temperatura.



Esta cámara se montó en un cuarto aislado, y para regular la temperatura usamos un aire acondicionado programado a 22°C. La temperatura se monitoreó con un medidor de temperatura (EXTECH) alcanzando una temperatura máxima de 21.9°C y una mínima de 19.8°C (variación de 2.1° en comparación con los 4.3° del Fitotron). El fotoperiodo fue controlado con un timer digital (16hrs luz y 8hrs oscuridad), los focos usados para alcanzar los lúmenes requeridos fueron de luz fría; 2 de 1500 lúmenes y 2 de 800 lúmenes. Se midieron los lúmenes dentro de la cámara con un Luxómetro (STEREN) obteniendo un máximo de 1920 y mínimo de 1800 lúmenes (una variación de 120 en comparación de 1050 lúmenes del Fitotron).

7.2. Condición de shock térmico (congelación y ultracongelación).

Una vez establecidas las condiciones en la cámara de crecimiento teníamos que determinar una temperatura bajo cero y una duración del shock térmico para aplicar a las semillas de *Arabidopsis thaliana*, por lo que decidimos trabajar con -20°C y ver el comportamiento de la germinación a distintos tiempos de shock: 15 min, 30 min, 60 min y 120 min.

Siguiendo los protocolos de lavado aséptico, shock y germinación obtuvimos los siguientes resultados:

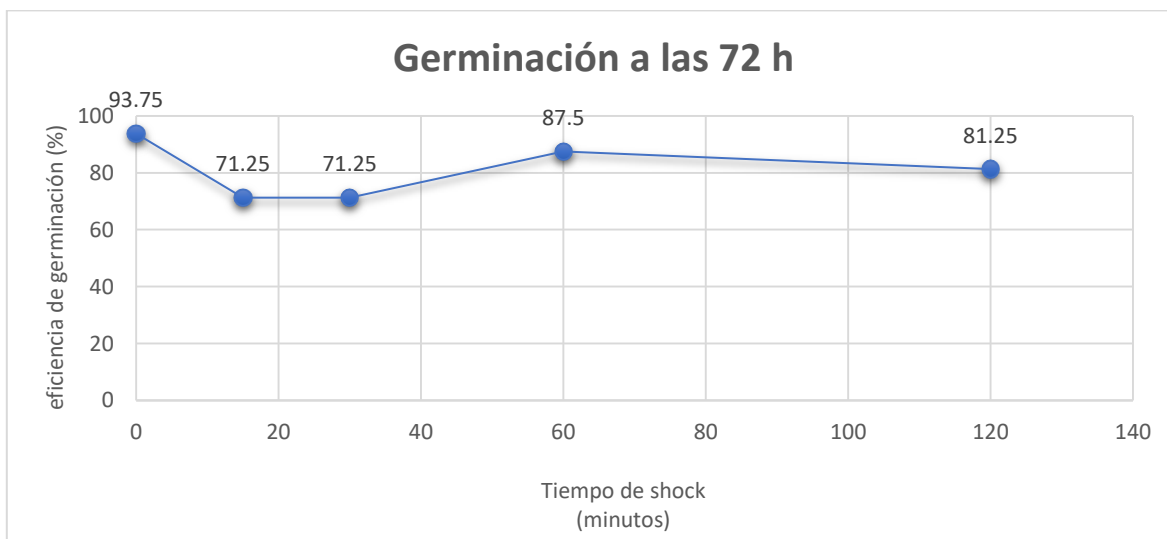
A las 72 h observamos una tasa de germinación variada (tabla 1 y gráfica 1) donde podemos observar una diferencia y disminución de la germinación con respecto al control (93.75%), con un 71.25% de germinación para las condiciones 15 min y 30 min, y una recuperación de la germinación en las condiciones 60 min y 120 min. En 60 min con un 87.5% seguido de una ligera disminución para 120 min con un 81.25%. Teniendo la germinación total a los 12 días después de del shock térmico con valores muy similares, en los cuales presenta un aumento en el porcentaje de germinación en los 30 min con un 82.5% en comparación de la muestra de los “15 min” con un 73.75% y un aumento en 60 min pasando de 87.5 a 90% con una muy ligera disminución en los 120 min pasando de 81.25 a 87.5% (tabla 2 y gráfica 2).



Germinación a las 72 h

Condiciones	# de semillas	Germinadas	% germinación
Control	80	75	93.75
15 min	80	57	71.25
30 min	80	57	71.25
60 min	80	70	87.5
120 min	80	65	81.25

Tabla 1. Porcentajes de germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* a las 72 h post-tratamiento a -20°C.



Gráfica 1. Germinación a 72 h después del shock térmico a -20°C. En el eje de las “X” tenemos tiempo en minutos a los cuales fueron expuestas al shock térmico (control-0 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min). En el eje de las “Y” se muestra la eficiencia de germinación en % a las 72 h.



Germinación a los 12 días

Muestras	# de semillas	Germinadas	% germinación
Control	80	76	95
15 min	80	59	73.75
30 min	80	66	82.5
60 min	80	72	90
120 min	80	70	87.5

Tabla 2. Porcentajes de germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* hasta los 12 días (tiempo máximo para la germinación de las semillas), shock a -20°C .

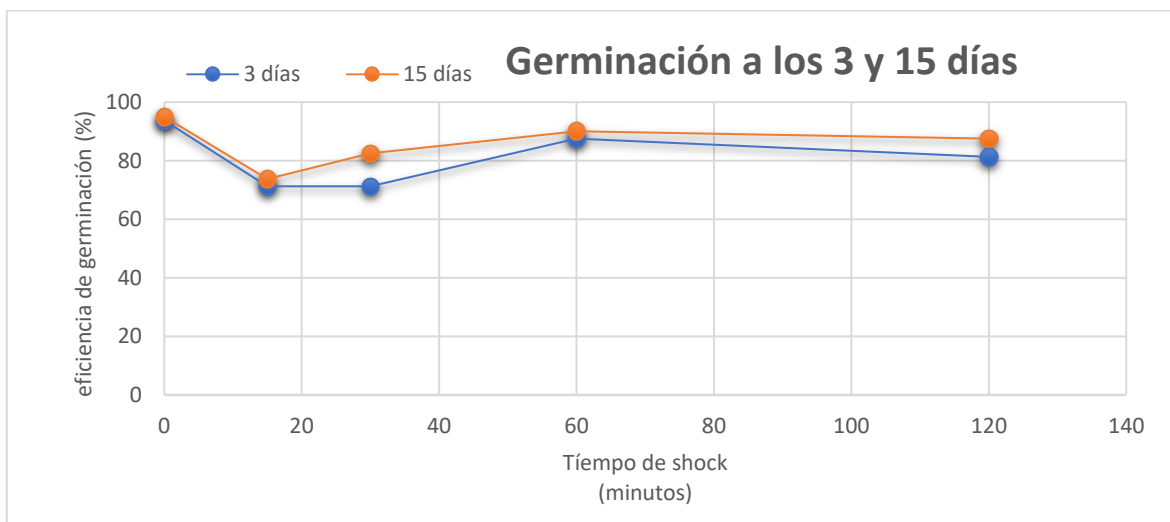


Gráfica 2. Germinación total a los 12 días después del shock térmico a -20°C . En el eje de las “X” tenemos tiempo en minutos, en los cuales fueron expuestos al shock térmico (control-0 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min). En el eje de las “Y” se muestra la eficiencia de germinación en % a los 12 días.

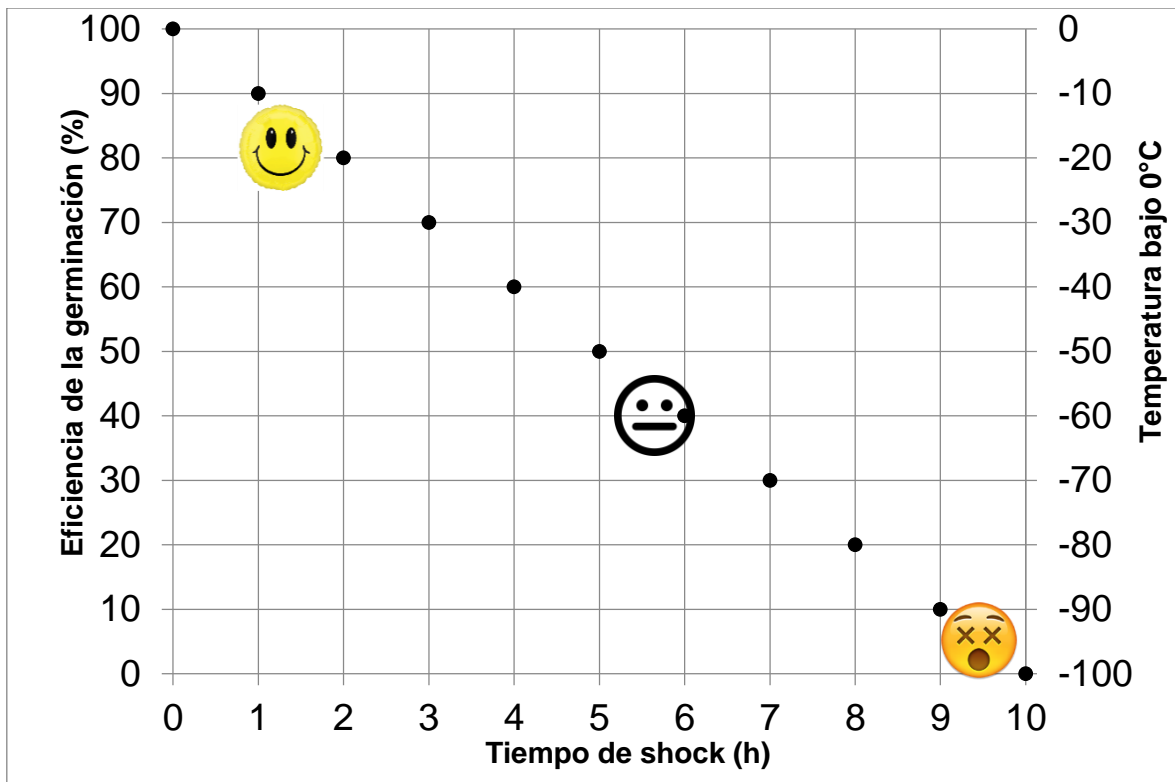
En una tercera gráfica se hace la comparativa del comportamiento de la germinación que se registraron a las 72 h y a los 12 días (gráfica 3) para ver si hay diferencia en los porcentajes y los días necesarios que se requiere para ver un efecto en la germinación.



Para estimar los límites de tiempo necesario de shock térmico que se pudiera requerir para ver un efecto en la disminución de los porcentajes de germinación tomamos como referencia los porcentajes que se generaron en la gráfica 1, tomando en cuenta solo los porcentajes del control, 1 y 2 h de shock, y suponiendo que el comportamiento fuera lineal y conforme aumentáramos las horas de shock los porcentajes se verían afectados disminuyendo gradualmente su porcentaje de germinación, podemos predecir la disminución de los porcentajes de la germinación que podría llevar el incremento de las horas de shock (gráfica 4).



Gráfica 3. Comparativa de los porcentajes de germinación a los 3 y a los 15 días. En azul se muestra la germinación a los 3 días y en naranja la germinación a los 12 días.



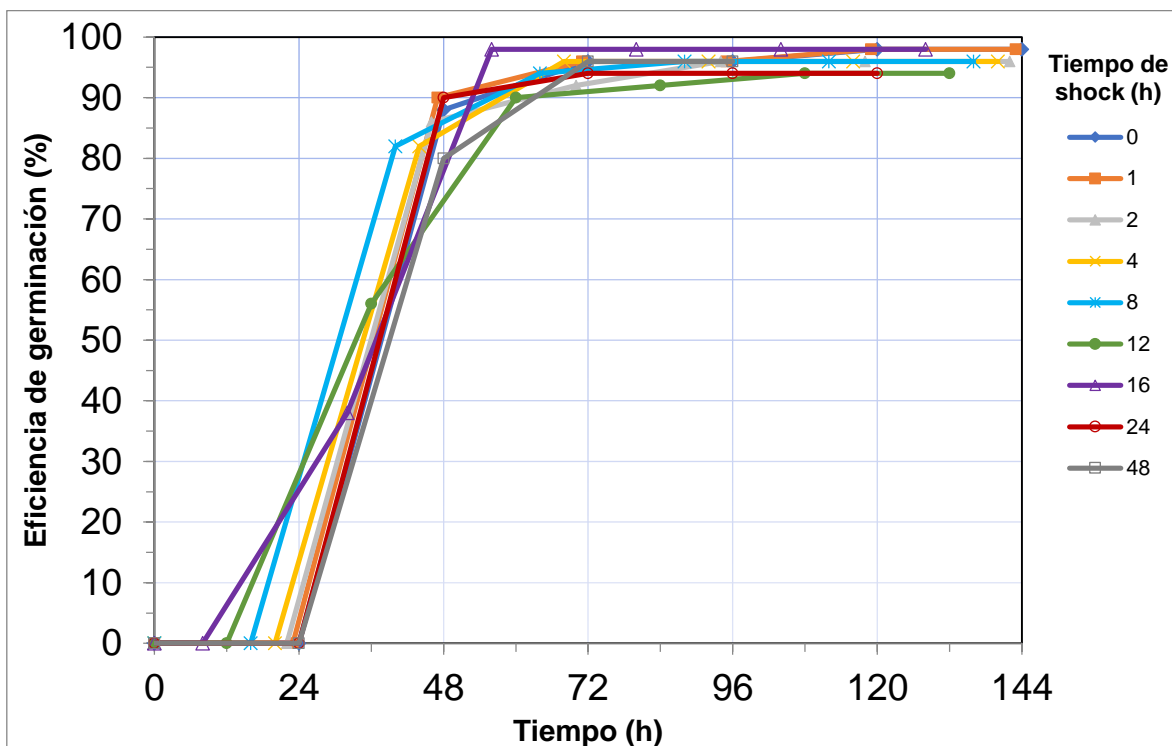
Gráfica 4. Se muestra una conjetura de la posible disminución de la eficiencia de la germinación con respecto al aumento del tiempo de shock de -20°C con una disminución gradual de 6.25% de la eficiencia germinativa por cada hora de shock.

En base a los datos obtenidos y nuestra predicción, se hizo un experimento para comprobar si ésta sería correcta, y encontrar el tiempo máximo de exposición a -20°C que toleran las semillas para germinar. Estableciendo de esta manera el tiempo de shock adecuado (casi letal) para los experimentos siguientes, en los que se determinará la resistencia de las semillas a las bajas temperaturas y sus límites de tolerancia al -20°C .

Los resultados obtenidos en *Arabidopsis* a -20°C (gráfica 5a) nos muestran claramente que esta temperatura no afecta la viabilidad germinativa, ni los tiempos de germinación, con un promedio de la germinación después de las 48 h igual (gráfica 5b).



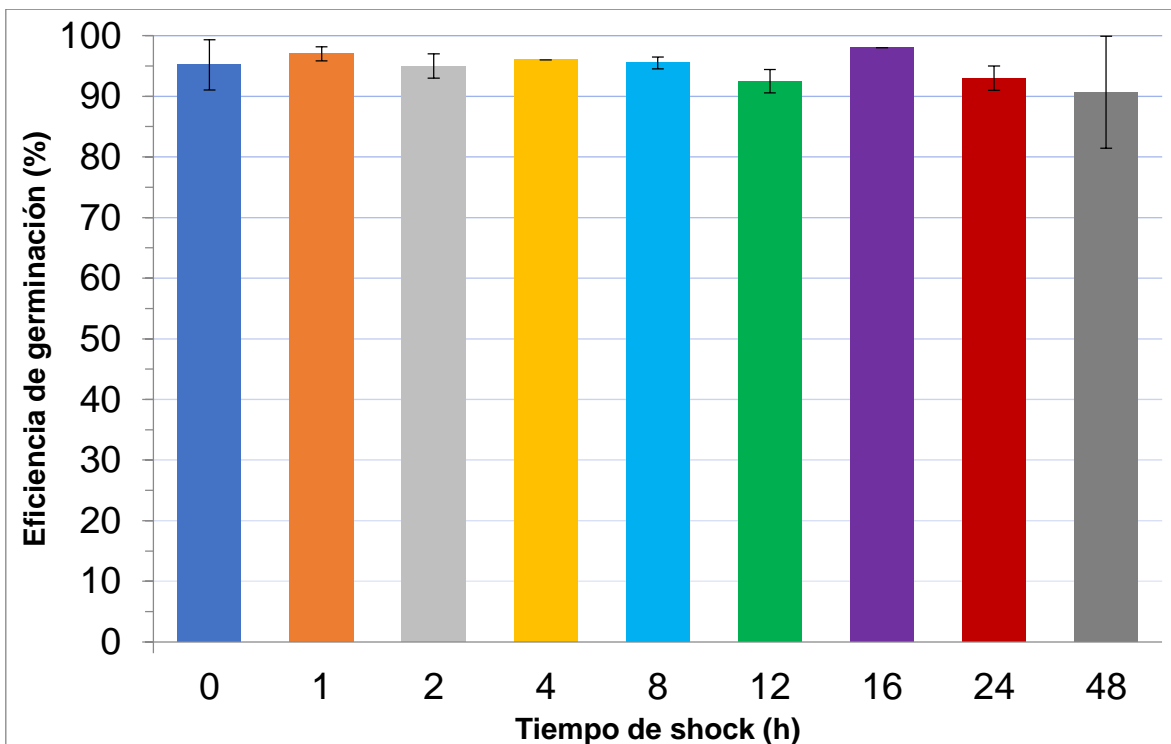
Eficiencia de la germinación post-shock a -20 °C



Gráfica 5a. Eficiencia germinativa de semillas de Arabidopsis expuestas a shock de -20°C (1, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 24 y 48 h). En el eje de las X tenemos el tiempo de germinación en horas y en el eje de las Y la eficiencia de germinación en %.



Eficiencia promedio de la germinación después de 48 h

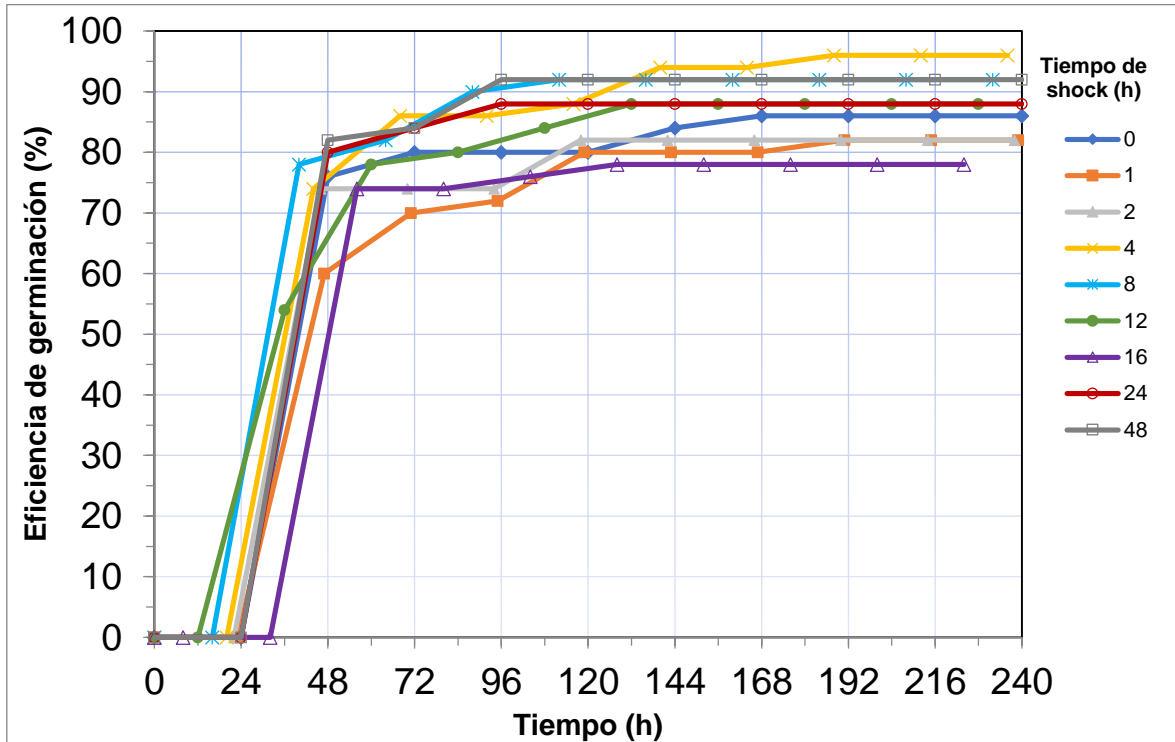


Grafica 5b. eficiencia promedio de semillas de *Arabidopsis* expuestas a shock de -20°C (1, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 24 y 48 h). En el eje de las X tenemos el tiempo shock en horas y en el eje de las Y la eficiencia de germinación en %.

Dado que -20°C no afecta la germinación, realicé otro experimento aplicando un shock de -80°C (gráfica 6a) bajo las mismas condiciones que los experimentos pasados y obteniendo los mismos resultados que en -20°C : -80°C no afecta la viabilidad germinativa ni los tiempos de germinación, con una oscilación del promedio de la germinación después de las 48 h igual (gráfica 6b). Haciendo una comparación de la eficiencia de germinación post-shock a -20 y a -80°C , observamos claramente una ligera disminución en la eficiencia germinativa en -80°C (gráfica 6c).



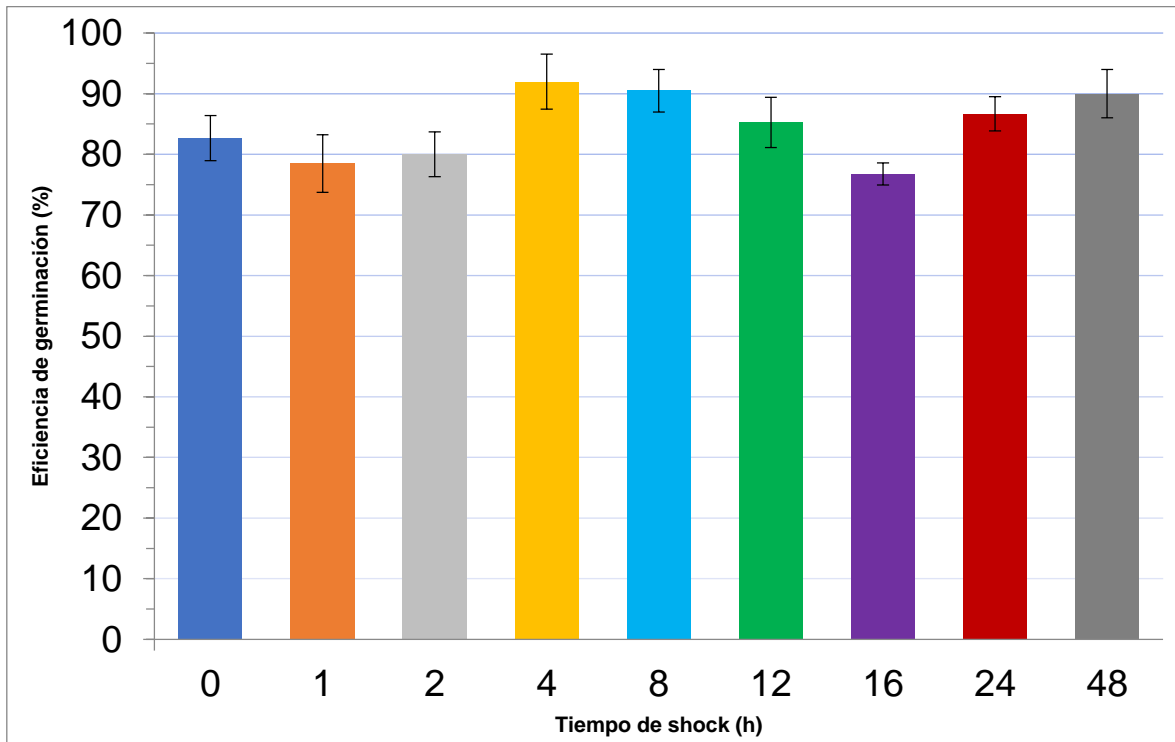
Eficiencia de la germinación post-shock a -80 °C



Gráfica 6a. Eficiencia germinativa de semillas de *Arabidopsis* expuestas a shock de -80°C (1, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 24 y 48 h). En el eje de las X tenemos el tiempo de germinación en horas y en el eje de las Y la eficiencia de germinación en %.



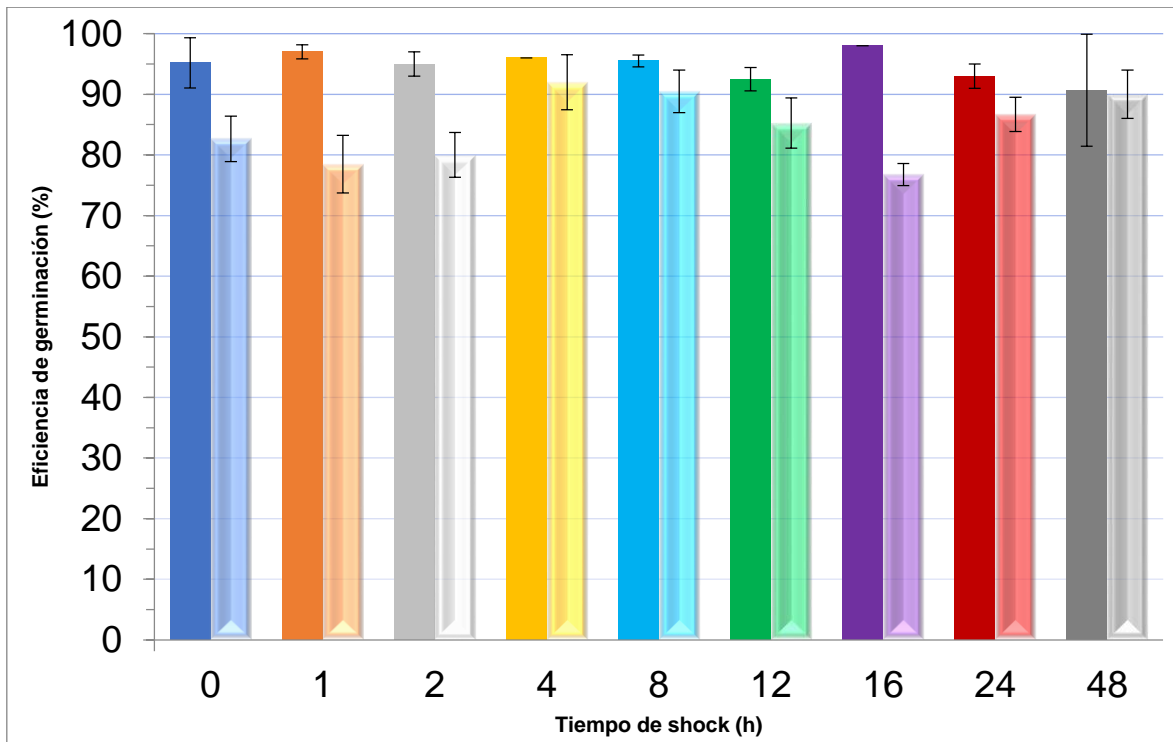
Eficiencia promedio de la germinación después de 48 h



Grafica 6b. Eficiencia promedio de semillas de *Arabidopsis* expuestas a shock de -80°C (1, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 24 y 48 h). En el eje de las X tenemos el tiempo shock en horas y en el eje de las Y la eficiencia de germinación en %.



Eficiencia de la germinación post-shock a -20 y -80 °C



Grafica 6c. En esta grafica se muestro una comparación de la eficiencia de germinación post-schock a -20°C, con las barras sólidas, y a -80°C con las barras translucidas, en el eje de las X tenemos el tiempo shock en horas y en el eje de las Y la eficiencia de germinación en %.

Para probar los limites de resistencia a las bajas temperaturas trabaje con nitrógeno líquido (-196°C) sometiendo las semillas de *Arabidopsis* a los mismos tratamientos de shock como en los experimentos pasados. Observando que bajo esta temperatura no hay germinación.

Estos resultados nos hace preguntarnos si la resistencia a bajas temperaturas pudiera ser un carácter general en el mundo vegetal o bien un carácter particular de *Arabidopsis thaliana*, adquirido posiblemente por crecer en un hábitat frío (endémica



del Norte de Europa). Y para darnos una idea si la resistencia de las semillas a las bajas temperaturas estaría o no relacionada con el clima de su hábitat, buscamos una segunda especie que perteneciera a la misma familia que *Arabidopsis thaliana*, Brassicaceae, y que fuera endémica de un lugar cuyo hábitat fuese clima cálido, la cual presentaría una alta sensibilidad a las bajas temperaturas, motivo por el que decidimos trabajar con semillas de *Brassica juncea* (mostaza), una planta perteneciente al género Brassica, originaria del Sur de la India con un clima cálido (Figura 7).



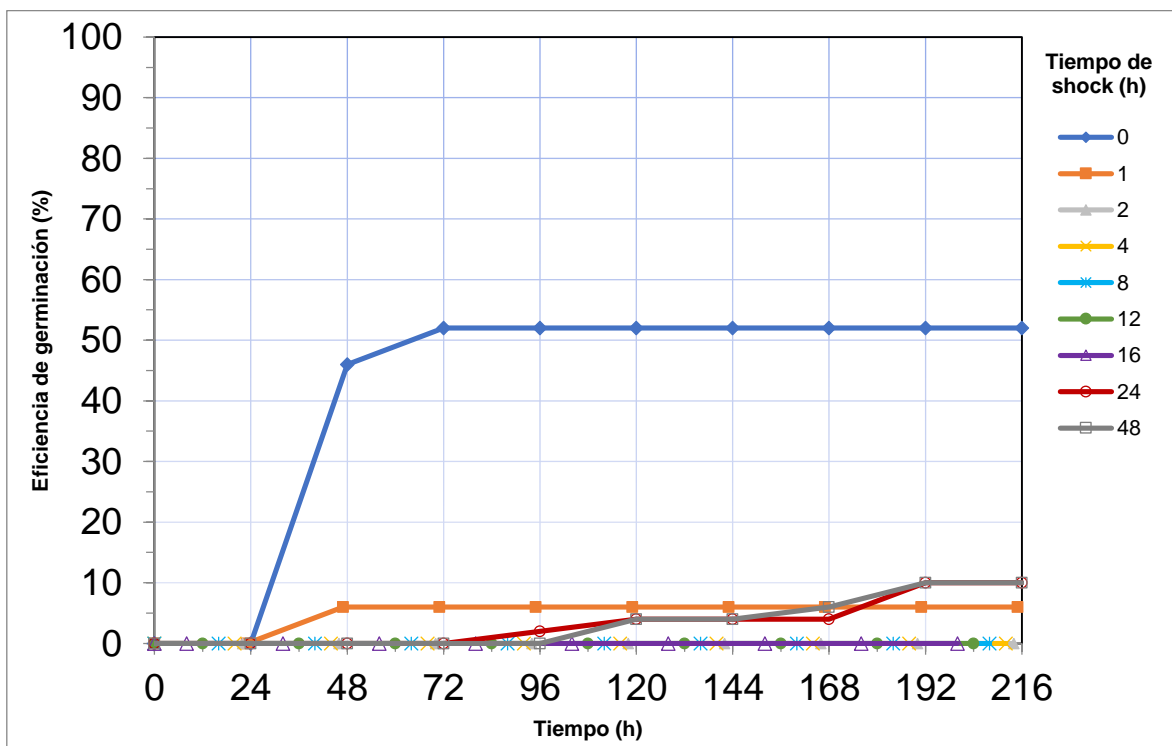
Figura 7. En la imagen izquierda tenemos a *Brassica juncea*, y del lado derecho las semillas.

Realizamos los mismos experimentos en mostaza, probando la resistencia a -20 y -80°C bajo los mismos tratamientos de shock, y observamos que mostaza no es resistente a bajas temperaturas. A -80°C las semillas no germinan, mientras que a -20°C la eficiencia de germinación es casi nula, (menos del 20% de eficiencia germinativa) con respecto al control, y solo algunos trataminetos logran germinar: 1, 8, 24 y 48 h (Gráfica 7a), además de presentar un amplio retraso en su germinación a excepción del tratamiento de 1 h que inicia la germinación al mismo tiempo que el control (48 h), manteniendo un promedio de la germinación de nulo a casi nulo (7b).



Esta diferencia que presentan estas dos especies a las bajas temperaturas nos muestra que la resistencia a las bajas temperaturas no es un carácter universal, sino más bien, un carácter adquirido de acuerdo con su ubicación geográfica y sus condiciones climáticas: *Arabidopsis thaliana* endémica del Norte de Europa con clima frío, mientras que mostaza es endémica del Sur de la India con un clima cálido. Si estamos en lo correcto y en base a estos resultados, la diferencia de climas en las que se desarrollan las plantas está correlacionado con la resistencia o sensibilidad de la germinación que presentan las semillas ante temperaturas de -20 y -80°C . Si nuestra interpretación es correcta, una tercera especie de la misma familia y endémica de un clima templado debería presentar una resistencia intermedia a las bajas temperatura.

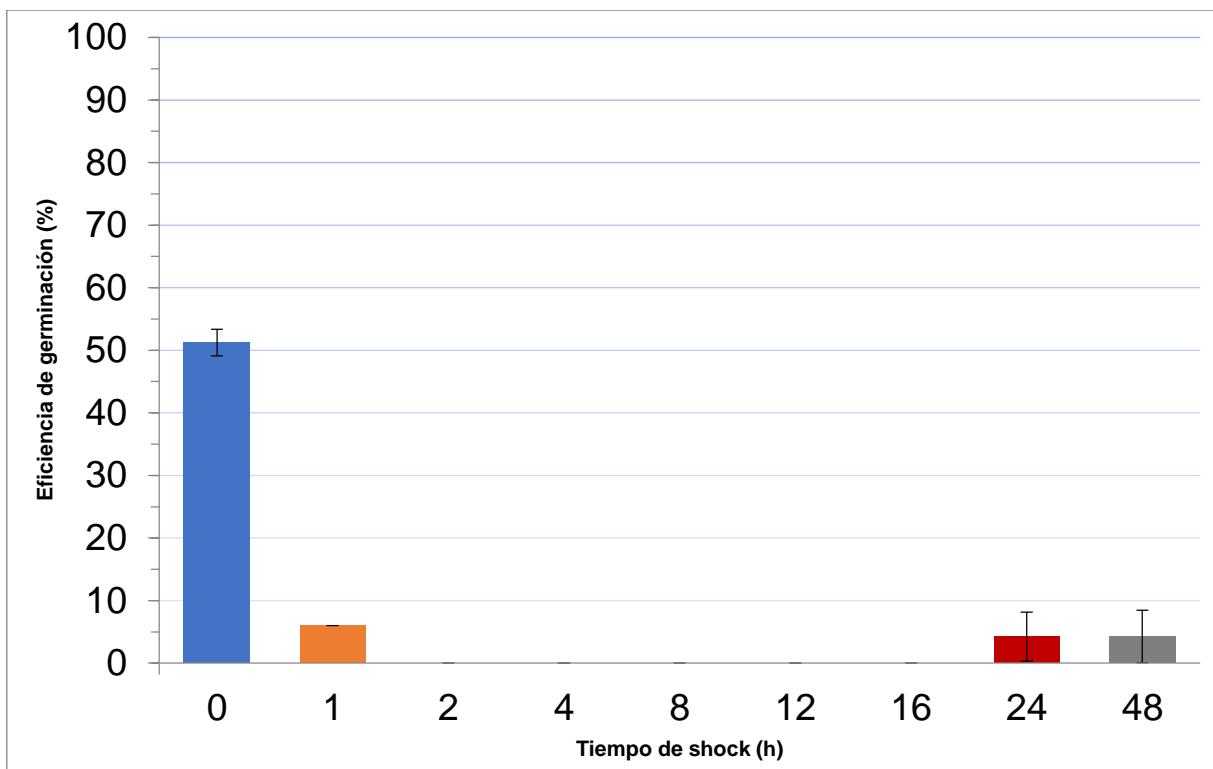
Eficiencia de la germinación post-shock a -20°C



Gráfica 7a. Germinación de semillas de mostaza a -20°C en diferentes tiempos (1, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 24 y 48 h). En el eje de las X tenemos tiempo de germinación en horas, y en el eje de las Y eficiencia de germinación en %.



Eficiencia promedio de la germinación después de 48 h



Grafica 7b. Eficiencia promedio de semillas de mostaza expuestas a shock de -20°C (1, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 24 y 48 h). En el eje de las X tenemos el tiempo shock en horas y en el eje de las Y la eficiencia de germinación en %.



Esta tercera especie es *Nasturtium officinale* (berro) perteneciente al género *Nasturtium*, con un origen endémico del Norte de la India, el cual es conocido por crecer en clima templado (Figura 8).



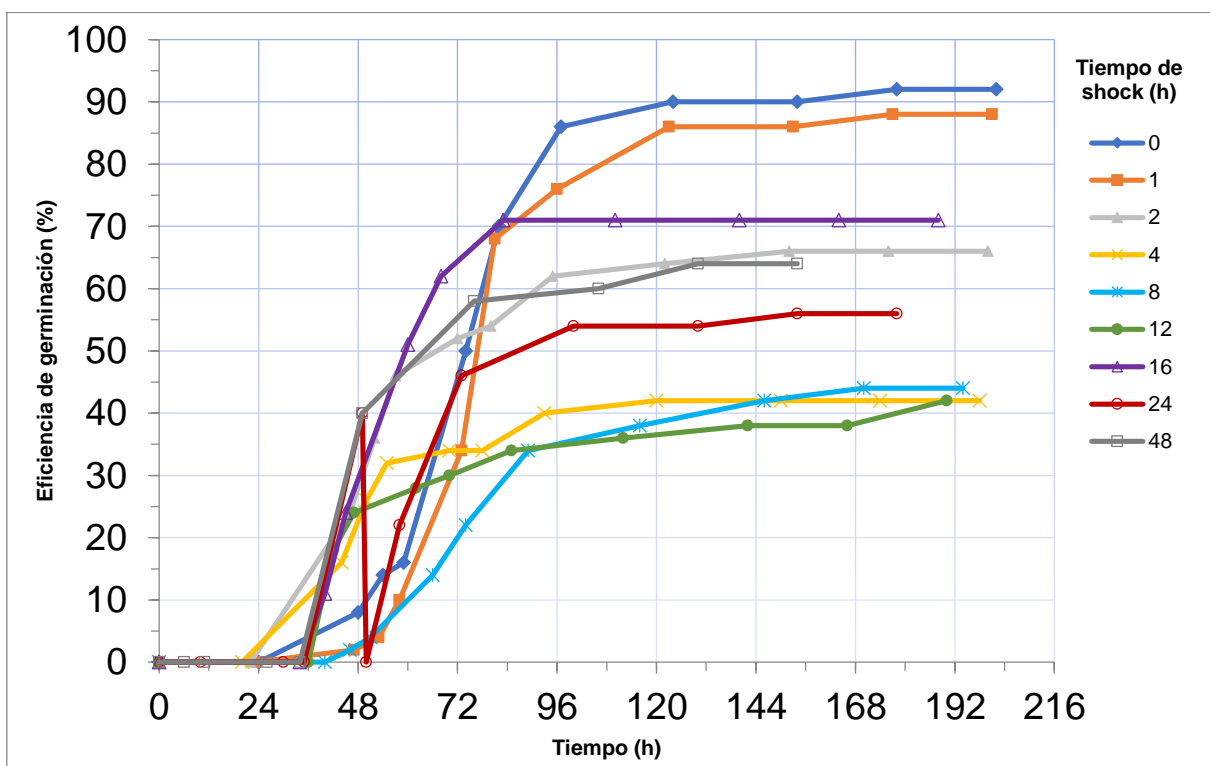
Figura 8. En la imagen izquierda tenemos a *Nasturtium officinale*, y del lado derecho las semillas.

A esta especie se aplicaron choques a los mismos tiempos y mismas temperaturas de -20 y -80°C . A -20°C (gráfica 8a). En el primer grupo tenemos el control y el tratamiento de 1 h con un inicio de la germinación entre las 47 y 48 h con una germinación de alrededor de un 90%, en el segundo grupo tenemos el tratamiento de 2, 14, 24 y 48 h con un inicio de la germinación entre las 40 y 58 h con una germinación entre 56 y 71%, y en el tercer grupo tenemos los tratamientos 4, 8 y 12 h iniciando su germinación entre las 42 y 46 h con una germinación de alrededor del 42%, mostrándonos una oscilación en el promedio de la eficiencia germinativa después de los 3.5 días (gráfica 8b). Y al igual que en *Arabidopsis thaliana*, no mostró germinación a -80°C .



Los resultados de esta tercera especie confirman que nuestra interpretación es correcta, mostrando berro una resistencia intermedia a las bajas temperaturas. Por lo tanto, proponemos que la resistencia y/o sensibilidad que presentan estas tres especies a las bajas temperaturas pueden ser un carácter adquirido correlacionado con su ubicación geográfica y sus condiciones climáticas: *Arabidopsis thaliana* endémica del Norte de Europa con clima frío presenta resistencia a las temperaturas de -20 y -80°C, berro endémico del Norte de India con climas templados presenta una resistencia intermedia a las bajas temperaturas y mostaza endémica del Sur de la India con clima cálido presenta resistencia casi nula a las bajas temperaturas (gráfica 9).

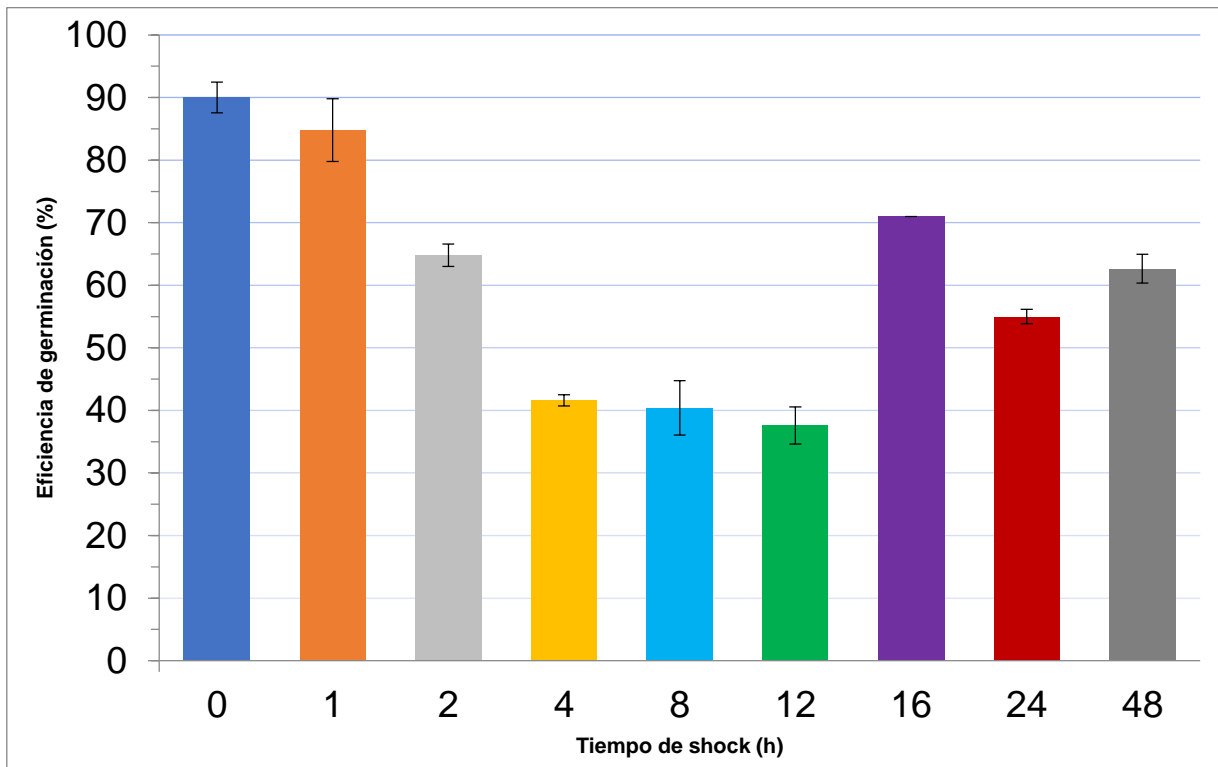
Eficiencia de la germinación post-shock a -20 °C



Gráfica 8a. Germinación de semillas de berro con shock de -20°C a diferentes tiempos (1, 2, 4, 8, 12, 14, 24 y 48 h). En el eje de las X tenemos las horas de germinación y en el eje de las Y % de germinación.



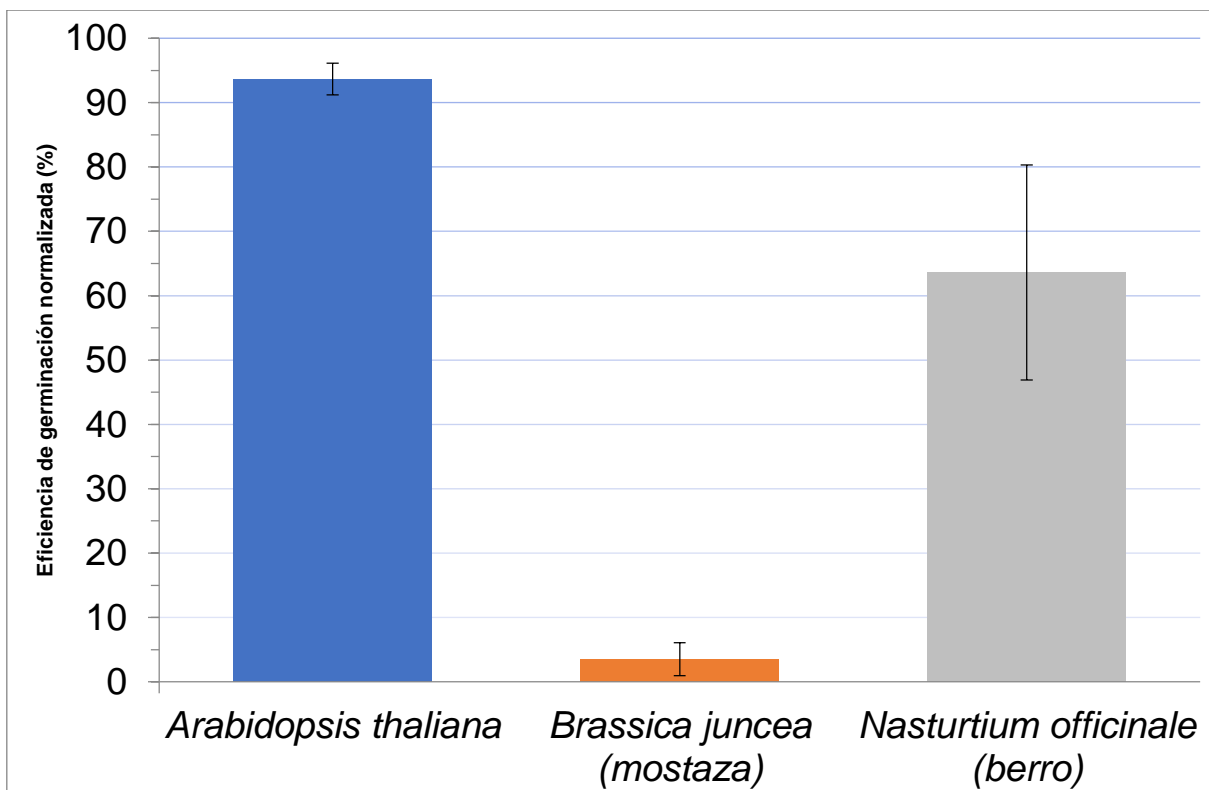
Eficiencia promedio de la germinación después de 3.5 días



Gráfica 8b. Eficiencia promedio de semillas de berro expuestas a shock de -20°C (1, 2, 4, 8, 12, 14, 16, 24 y 48 h). En el eje de las X tenemos el tiempo shock en horas y en el eje de las Y la eficiencia de germinación en %.



Eficiencia promedio de la germinación post-shock a -20 °C



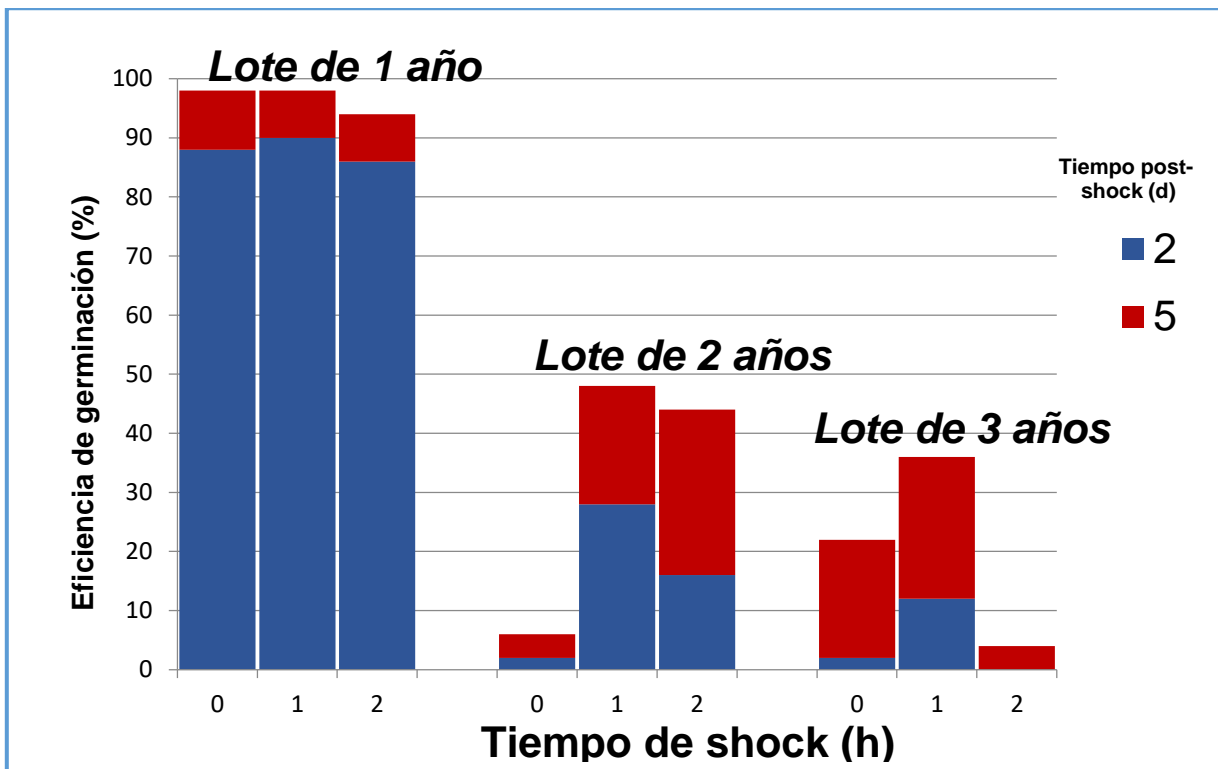
Gráfica 9. En estas gráficas se compara la eficiencia promedio de la germinación post-shock a -20°C de las diferentes especies: *Arabidopsis thaliana*, mostaza y berro.

También observamos que en *Arabidopsis thaliana* el shock de 1 h a -20°C estimula la eficiencia germinativa (gráfica 5), este dato observado también en experimentos pasados, en donde la única variación que había en los lotes de semillas era su antigüedad de almacenamiento.

Para comprobar si realmente el shock de una hora a -20°C estimulaba la eficiencia germinativa hicimos pruebas con diferentes lotes de semillas: lote 1 con 1 año de almacenamiento (gráfica 7a), lote 2 con 2 años de almacenamiento (gráfica 7b) y lote 3 con 3 años de almacenamiento (gráfica 7c), monitoreando 5 días su germinación observamos que en el lote de semillas de 1 año no se altera la eficiencia de



germinación. Sin embargo observamos que en semillas con mayor tiempo de almacenamiento (2 y 3 años) se ven seriamente afectadas en su germinación. Lo que nos indica que el tiempo de almacenamiento debe ser considerado por los agricultores como un factor que afectara la eficiencia de germinación de sus semillas.



Gráfica 10. Porcentajes de germinación de un lote de semillas de Arabidopsis de 2 años de antigüedad. En el eje de las X tenemos la duración de shock y en el eje de las Y los % de germinación.



VIII. DISCUSIÓN AMPLIADA

Por ser sésiles, las plantas deben poseer mecanismos que les permitan adecuarse a cambios medioambientales temporales que amenacen su supervivencia. Estas adecuaciones son de carácter reversible y/o modificables, y pueden influenciar caracteres seminales como el tamaño, el número, la dormancia, y la germinación.

Se ha reportado la influencia que tiene el estrés de congelación y ultracongelación en semillas en múltiples plantas, y estos estudios se han llevado a cabo especialmente con el propósito de obtener información para su almacenamiento; en breve, estresan a las semillas en su estado dormante (deshidratadas) y posteriormente miden su capacidad germinativa. Sin embargo, no encontramos reportes que nos indiquen el efecto de temperaturas de congelación y ultracongelación sobre la eficiencia de germinación en semillas inbibidas, es decir, en semillas no dormantes, que reinician su actividad genética y metabólica y así también, inician el proceso germinativo. Creemos que esto se debe a reportes previos que indican que congelar o ultracongelar a una semilla con un alto contenido de agua provoca la formación de cristales de hielo en el interior celular, induciendo su lisis, y por ende, eliminando la posibilidad de germinar. Nosotros decidimos averiguarlo.

La información obtenida es relevante en dos aspectos, a) en agricultura, el campesino sabrá del efecto de una helada sobre las semillas durante la siembra y b) si el estrés por temperaturas bajas extremas durante la germinación altera la resistencia al mismo, y si esta alteración se transmite a generaciones futuras (memoria transgeneracional). De ser así, se podrían seleccionar semillas con mayor resistencia “adquirida” a congelación, y así incrementar la



eficiencia de germinación, lo que contribuiría a aumentar la producción de la planta en cuestión.

Decidimos utilizar a *A. thaliana* por ser la planta mejor estudiada, simple, poseer un ciclo de vida relativamente corto, y porque produce muchas semillas por planta. La temperatura de congelación fue de -20°C , que es similar a las heladas naturales (de -15°C a -20°C). Y de ultracongelación a -80°C .

Nuestra expectativa inicial fue que la eficiencia germinativa de *A. thaliana* sería afectada gradualmente de acuerdo al tiempo de exposición al estrés. Sin embargo, nuestros datos nos indican que las temperaturas de congelación y ultracongelación afectan poco la eficiencia germinativa de *A. thaliana* (figs. 5 y 6). Consideramos interesante a este resultado por sorpresivo, ya que fue diferente a la expectativa. Simplemente resultó ser resistente a la congelación y a la ultracongelación. Este resultado nos indica que la semilla de *A. thaliana*, aun hidratada y habiendo sido sometida por días a temperaturas bajas extremas, mantiene la capacidad de germinar con alta eficiencia; un dato que podría ser de interés para aquellas investigaciones encaminadas a desarrollar estrategias de producción de plantas en lugares con temperaturas de congelación o ultracongelación.

Debido a que nuestro objetivo era el de identificar un modelo vegetal cuya germinación de sus semillas sea resistente a la congelación, y en donde se pueda incrementar esta resistencia, y poder monitorear la persistencia de este incremento en generaciones posteriores (transgeneracionalidad del carácter), resultó evidente que *Arabidopsis* no cumplía con esta condición puesto que resultó ser hiperresistente. Nuestra interpretación fue que *Arabidopsis* poseía esta resistencia posiblemente debido a que su origen es el frío norte de Europa, por lo



que resistir a la congelación sería parte de su estrategia de supervivencia. Decidimos entonces llevar a cabo los mismos experimentos con una planta de la misma familia pero cuyo origen geográfico implicara un clima cálido. Encontramos que la mostaza (*Brassica juncea*) cubría los requisitos. El resultado de los experimentos se muestra en la fig. 7. En breve, las semillas de mostaza resultaron ser hipersensibles a la congelación. Este modelo vegetal nos sería útil para medir transgeneracionalidad de resistencia adquirida, dando seguimiento a las pocas semillas que mostraron resistencia.

Los resultados tanto de *Arabidopsis* como de mostaza nos permitieron entonces predecir que, de existir una planta también de la familia de las *Brassicaceae* cuyo origen no fuese de ambiente ni frío ni cálido, es decir de clima templado, su germinación presentaría una resistencia intermedia a la congelación. Esta característica la encontramos con el berro (*Nasturtium officinale*), cuyo origen geográfico es el norte de la India (clima templado). Los resultados obtenidos con esta planta nos indicaron que posee, efectivamente y de acuerdo con nuestra predicción, una resistencia intermedia (fig. 8). De esta manera pudimos encontrar un modelo vegetal cuya germinación es medianamente resistente a la congelación, y con la posibilidad de que, al estresar las semillas, adquieran una “memoria” de la experiencia estresante y la manifiesten, con una resistencia incrementada, en generaciones posteriores (memoria transgeneracional).



IX. CONCLUSIÓN

Concluimos que, efectivamente, encontramos dos modelos ideales que nos permitirán valorar la transgeneracionalidad de la experiencia del estrés causado por bajas temperaturas extremas en semillas inhibidas.



X. BIBLIOGRAFÍA

1. Arnold Pieter A., Loeske E. B. Kruuk and Adrienne B. Nicota (2018). How to analyse plant phenotypic plasticity in response to a changing climate. *New Phytologist*. 222:1235-1241.
2. Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.
3. Bouyer D, Roudier F, Heese M, Andersen ED, Gey D, Nowack MK, Goodrich J, Renou JP, Grini PE, Colot V, Schnittger A. (2011) Polycomb repressive complex 2 controls the embryoto-seedling phase transition. *PLoS Genet* 7:e1002014.
4. Colville A, Alhattab R, Hu M, Labbe´ H, Xing T, Miki B (2011) Role of HD2 genes in seed germination and early seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 30:1969-1979.
5. Daszkowska-Golec A. (2011) *Arabidopsis* seed germination under abiotic stress as a concert of action of phytohormones. *OMICS* 15:763-774.
6. Footitt S, Douterelo-Soler I, Clay H, Finch-Savage WE. (2011) Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signalling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20236-20241.
7. Grant-Downton RT, Dickinson HG. (2006) Epigenetics and its implications for plant biology 2: the “epigenetic epiphany”: epigenetics, evolution and beyond. *Ann. Bot. (Lond.)*, 97: 11- 27. doi:10.1093/aob/mcj001. PMID:16260442.
8. Hatfield Jerry L., John H. Prueger (2015) *Temperature extremes: Effect on plant growth and development*. Elsevier.
9. Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ. (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol.* 179:33-54.
10. Huang Z., S. Footitt, A. Tang, W.E. Finch-Savage (2017) Predicted global warming scenarios impact on the mother plant to alter seed dormancy and germination behaviour in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 41:187-197.
11. Jablonka E. 2017 The evolutionary implications of epigenetic inheritance. *Interface Focus* 7: 20160135
12. Jan Sohail Ahmad, Nazma Bibi, Zabta Khan Shinwari, Malik Ashiq Rabbani (2017). Impact of salt, drought, head and Frost stresses on morpho-biochemical and physiological properties of *Brassica* species: An updated review. *Journal of Rural Development and Agriculture*.



13. Liz Patricia Moreno F. (2009) Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*. 179-191
14. Masuelli Ricardo W. y Carlos F. Marfil (2011) Variabilidad epigenética en plantas y evolución. *Jurnal of Basic & Applied Genetics*. 1852-6233.
15. Michael J. Meaney, PhD; Moshe Szyf, PhD (2005) Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at interface between a Dynamic environment and a fixed genoma. *Dialogues Clin Neurosci*. 7:103-123
16. Olivares A, Johnston M, Fernandez G. (1990) Efecto de la temperatura en la germinación de siete especies de la pradera anual mediterránea y caracterización de su emergencia. *Simiente* 60: 123-131.
17. Ruth Finkelstein, Wendy Reeves, Tohru Ariizumi, and Camille Steber (2008) Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Plant Biology*. 59:387-415.
18. Steven Penfiel and Dana R. MacGregor (2016) Effect of enviromental variation during seed production on seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 68, No. 4pp. 819-825.
19. Sung DY, Kaplan F, Lee KJ, Guy C. (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science* 8: 179-187.
20. T. Mendizabal, J. Pastor, A. Martín y S. Oliver. Germinación y efecto de las bajas temperaturas sobre la nascencia, supervivencia y desarrollo del trébol subterráneo. Instituto de Edafología y Biología Vegetal (C.S.I.C.). Madrid.
21. Thomashow MF. (1999) Plant Cold acclimation:freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 50:571-599.
22. Thomas L. P. Couvreur, Andreas Franzke, Ihsan A. Al-Shehbaz, Freek T. Bakker, Marcus A. Koch, and Klaus Mummenhoff (2009) Molecular Phylogenetics, Temporal Diversification, and Principles of Evolution in the Mustard Family (*Brassicaceae*). *Mol. Biol. Evol*. 27 (1):55-71
23. Lang-Mladek C, et al. (2010) Transgenerational inheritance and resetting of stress-induced loss of epigenetic gene silencing in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 3(3): 594–602.
24. Monterroso-Rivas, et al. (2018) Multi-temporal assessment of vulnerability to climate change: insights from the agricultural sector in Mexico. Springer. s10584-018-2157-7.
25. Palta J P, Whitaker BD, Weiss LS. (1993) Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species. *Plant Phys*. 103: 793-803.



26. Puhakainen T, Hess MW, Mäkelä P, Svensson J, Heino P, Palva ET. (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 54(5):743-53.
27. Skinner Michael K. (2015) Environmental Epigenetics and a Unified Theory of the Molecular Aspects of Evolution: A Neo-Lamarckian Concept that Facilitates Neo-Darwinian Evolution. *GBE.* 7(5):1296-1302
28. Vertucci CW, Farrant JM. (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. En: *Seed Development and Germination*; Kigel J, Galili G (eds). Marcel Dekker Inc. NY, pp. 237-272.
29. Wu Ct, Morris JR (2001) Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 293: 1103-1105.