



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS EN PLANTAS DE
Arabidopsis thaliana EXPUESTAS A BAJAS TEMPERATURAS**

TESIS MANCOMUNADA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTAN

FERNANDA MARIANA ROMERO COLÍN

CARLA DANIELA GONZÁLEZ CÓRDOVA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARINA GAVILANES RUIZ

VOCAL: CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ

SECRETARIO: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

1^{ER}. SUPLENTE: CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO

2° SUPLENTE: FÉLIX MORALES FLORES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 101, CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA.

FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARINA GAVILANES RUIZ _____

SUSTENTANTES:

FERNANDA MARIANA ROMERO COLÍN _____

CARLA DANIELA GONZÁLEZ CÓRDOVA _____

RECONOCIMIENTOS

A la M. en C. Beatriz King Díaz por su apoyo en el uso del Handy PEA y el análisis y procesamiento de datos con Biolyzer y Origin.

A la Q.F.B. Ma. del Consuelo Enríquez Arredondo por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Edgar Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska- Lincoln, E.U.A.), por proporcionarnos las semillas de las mutantes *Atlcb2a-1*, *Atlcb2b hp/lcb2a*, *sld1 sld2* y *sbh1-1*.

Al Dr. Ángel Arturo Guevara García (IBT, UNAM), por la donación de las mutantes *mpk3* y *mpk6*.

Al Dr. Néstor Carrillo (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina), por haber proporcionado la línea transgénica *pfl18-18*.

- Este proyecto de tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de la Facultad de Química a través de DGAPA, UNAM (PAPIIT IN222815), Fac. de Química (PAIP 50009115) y CONACYT, México (238368 and 252001).
- La alumna Carla Daniela González Córdova recibió beca del programa CONACYT, México (238368 and 252001).

INDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Modelo de estudio: <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.2 Las bajas temperaturas y el desarrollo de las plantas	3
1.3 Adaptación de las plantas a las bajas temperaturas	5
1.4 Fotosíntesis	7
1.4.a Clorofila	13
1.4.b Fluorescencia de la clorofila a	14
1.4.c Curva de inducción de la clorofila a (Cinética de Kautsky)	15
1.5 La membrana plasmática	17
1.6 La membrana plasmática como sensor de las bajas temperaturas en plantas	18
1.7 Esfingolípidos	19
1.7.a Esfingolípidos en la remodelación membranal	20
1.7.b Esfingolípidos como segundos mensajeros de respuestas al frío	20
1.8 Activación de las MAP Cinasas	22
2.ANTECEDENTES	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVO GENERAL	25
6. OBJETIVOS PARTICULARES	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1 Material biológico	26
7.2 Estrategia experimental	29
7.2.a Germinación de las semillas de <i>A. thaliana</i>	29
7.2.b Crecimiento de las plantas	30
7.3 Tratamiento de aclimatación	30
7.4 Registro fenotípico	31
7.5 Determinación de la fluorescencia de la clorofila a	31
7.6 Medición de clorofila	32
7.7 Tratamiento de los datos	32
7.7.a Fluorescencia de la clorofila a	32
8. RESULTADOS	35
8.1 Plantas incapaces de resistir temperaturas congelantes sin previa Aclimatación	35
8.2 Plantas de genotipos que resisten temperaturas congelantes sin Previa aclimatación	38
8.3 Plantas incapaces de aclimatarse	41
8.4 Diagrama de procesamiento de datos	43
8.5 Obtención de las curvas OJIP con el aparato Handy PEA	44
8.6 Normalizaciones	54
8.6.a Normalización F1-Fm	54
8.6.b Normalización F1-F4	56

8.7	Parámetros de JIP representados en gráficas de radar	58
8.7.a	Parámetros de JIP expresados en cifras absolutas.....	64
8.8	Contenido de clorofila.....	74
9.	DISCUSIÓN.....	75
9.1	La fluorescencia de la clorofila <i>a</i> y la curva OJIP	75
9.2	Efecto del proceso de aclimatación al frío en la curva OJIP.....	79
9.3	Afectación de los parámetros fotosintético por la aclimatación.....	80
9.4	Contenido de clorofila	84
9.5	Comparación de los fenotipos y los parámetros	85
9.6	Resistencia a temperaturas bajo cero sin previa aclimatación	86
9.6.a	Plantas incapaces de aclimatarse	87
10.	CONCLUSIONES	88
11.	PERSPECTIVAS	88
12.	BIBLIOGRAFÍA	89

Lista de abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
AC	Aclimatadas
ALA	Ácido δ-aminolevulínico
AP	Ácido fosfatídico
ATP	Adenosín trifosfato
BCL	Bases de cadena larga
CC	Contenido de clorofila
CR	Centro de reacción
F₀	Fluorescencia mínima
F_m	Fluorescencia máxima
F_v	Fluorescencia variable
ERO	Especies reactivas de oxígeno
MAP	Cinasa de proteína activada por mitógenos
MAPK	MAP cinasa
MAPKK	Cinasa de la MAP cinasa
MAPKKK	Cinasa de la cinasa de la MAP cinasa
Mb	Millones de pares de bases
NA	No aclimatadas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido, fosfato forma reducida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido, fosfato forma oxidada
Pc	Plastocianina
PS I	Fotosistema I
PS II	Fotosistema II
Q	Quinona
Q_A	Plastoquinona A
Q_B	Plastoquinona B
QH₂	Plastoquinol
qF	Decaimiento de fluorescencia
qN	Decaimiento no fotoquímico
qP	Decaimiento fotoquímico
SPT	Serina palmitoiltransferasa

Resumen

Los esfingolípidos se encuentran en todas las células eucariontes y son los lípidos más abundantes en las plantas pero su estudio es bastante reciente. Por ello, sus funciones están apenas descubriéndose. De las que se conocen hasta ahora, están las funciones estructurales, en las que los esfingolípidos forman parte de las membranas celulares y de sus microdominios. Además, tienen funciones de mediadores intracelulares en las que precursores biosintéticos de los esfingolípidos complejos, como las bases de cadena larga (BCL), se comportan como segundos mensajeros que median las respuestas a la sequía, a los patógenos y como se ha propuesto más recientemente, a las bajas temperaturas. En este último caso, las bajas temperaturas fueron usadas como factores de estrés, no de aclimatación. Muchas de las funciones señalizadoras de los esfingolípidos son complementadas por cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAP cinasas) y por especies reactivas de oxígeno (ERO).

La aclimatación constituye un fenómeno muy importante no solo en términos de la fisiología de la planta, sino en términos económicos, pues la habilidad para tolerar heladas o bajas temperaturas estacionales redundaría en el desempeño de especies ecológica o económicamente importantes. La identificación de los componentes celulares en la respuesta de las plantas a las bajas temperaturas es necesaria para entender los mecanismos moleculares que participan en las formas de tolerancia al frío y su posible aplicación en la agricultura. En la fotosíntesis, la clorofila es uno de los componentes claves que hace funcional este proceso.

En esta tesis se estudió si la exposición de las plantas a 4°C (periodo de aclimatación) durante una semana, afectaba parámetros fotosintéticos en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las plantas (control) se mantuvieron a 22°C por una semana (no aclimatadas). Se utilizaron ocho líneas de plantas tanto silvestres como modificadas genéticamente y que tienen perturbaciones en la síntesis de esfingolípidos o en proteínas o compuestos que están relacionados con la función de señalización de los esfingolípidos. Al cabo de la aclimatación se midieron los parámetros fotosintéticos con una técnica basada en la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* y también se determinó el contenido de clorofila de forma

independiente. Posteriormente a la aclimatación, otras plantas se destinaron a una prueba de reto a -15°C y se registraron fotográficamente los fenotipos post-aclimatación y post-reto. Los resultados se procesaron por el programa correspondiente del aparato utilizado. El resultado de este trabajo concluyó que la aclimatación es un proceso complejo que requiere de un nivel de fotosíntesis adecuado pero que depende de muchos factores que no requieren síntesis de novo de esfingolípidos y de señalización de MPK3 y ERO. La disminución escasa pero significativa en la funcionalidad del proceso fotosintético se explica por una disfunción al nivel de los centros de reacción del Fotosistema II (PSII), que se ve compensado con el aumento del contenido de clorofila total y la velocidad de transferencia de electrones hacia el Fotosistema I (PSI).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Modelo de estudio: *Arabidopsis thaliana*

La especie *Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia *Brassicaceae* o de las crucíferas, relacionada a plantas comestibles como el brócoli, la coliflor, la col, los rábanos, nabos y coles de Bruselas. Crece naturalmente en regiones de Asia, Europa y el norte de África y se ha introducido en otras áreas como Norteamérica y Australia (Koorneef et al., 2004).

Esta especie se utilizó en este trabajo debido a su tamaño pequeño (30 cm), su alto nivel de autofecundación, su abundante producción de semillas (más de 10,000 semillas por planta) y su ciclo de vida corto (de seis a ocho semanas). El tamaño de su genoma es de 125 millones de pares de bases (Mb) que es un tamaño relativamente pequeño comparado con los genomas de la mayoría de las especies vegetales. Además de las ventajas naturales de la planta, la investigación de genómica funcional de *A. thaliana* se ha visto impulsada por la disponibilidad de la secuencia de su genoma (*The Arabidopsis Initiative*, 2000). Se estima que codifica para más de 33,300 genes (incluyendo genes no codificantes). El genoma de *A. thaliana* presenta varias regiones duplicadas, y familias génicas numerosas en comparación con otros organismos. Esto es importante, pues implica que la inactivación de un gen no resulta en un genotipo alterado fácilmente observable bajo condiciones normales en una gran parte de los casos. Hay múltiples ejemplos donde es necesario tener dobles, triples y hasta cuádruples mutantes de genes con funciones sobrepuestas para poder identificar claramente su función. Como se verá en el desarrollo de esta tesis, la disponibilidad de mutantes hace factible explorar la significancia de componentes moleculares específicos en la fisiología de las plantas.

1.2 Las bajas temperaturas y el desarrollo de las plantas.

Las plantas se encuentran frecuentemente expuestas a una variedad de condiciones de estrés. El estrés en las plantas se refiere a condiciones adversas que no permiten el funcionamiento normal del organismo. Durante su desarrollo,

las plantas están sometidas a diversas fuentes de estrés abiótico, como cambios en la intensidad de la luz, disponibilidad de agua o cambios de temperatura, o bien a fuentes de estrés biótico, como presencia de patógenos. Estos factores de estrés son una amenaza para las plantas, ya que les impiden alcanzar su potencial genético completo manifestándose en su desarrollo y crecimiento (Mahajan y Tuteja, 2005; Ruelland y Zachowski, 2010).

El frío es un factor relevante que causa serias consecuencias en la productividad de las especies vegetales. Cada planta tiene su temperatura óptima para su crecimiento y desarrollo. Las condiciones ideales de temperatura para una planta pueden representar un estrés para otra planta, por ello la temperatura es una variable ambiental que limita la distribución de las plantas. Globalmente, las plantas han evolucionado a través de la implementación de mecanismos para sobrevivir a un amplio rango de climas (Wigge, 2010).

La temperatura es un factor abiótico de estrés, ya que no todas las plantas tienen la capacidad de sobrevivir a bajas temperaturas y/ o temperaturas de congelación. Sin embargo, aquellas con capacidad de respuesta, la llevarán a cabo mediante mecanismos que tienen como finalidad evitar la congelación o resistirla.

El estrés por frío causa daño por congelación y la formación de hielo en el espacio intracelular. El daño por frío y el daño por congelación, son términos diferentes debido a la forma en que impactan a la planta. El primero se refiere a un efecto directo de temperaturas bajas pero que se encuentran por encima de los 0°C. En estas condiciones, el daño en la planta se observa generalmente como clorosis (amarillamiento de las hojas), necrosis (muerte del tejido) y crecimiento retardado (Fleury y Walker, 2014). Así mismo, el estrés puede causar daño membranal que se refleja en la fuga de electrolitos. El daño por congelación se refiere al daño causado en la planta por la formación extracelular de cristales de hielo a temperaturas por debajo de los 0°C (Alonso et al., 1997; Fleury y Walker, 2014).

Los síntomas del estrés inducidos por daños en las plantas aparecen entre 48 o 72 h, sin embargo, esta duración varía de acuerdo a la especie y aún de individuo (Mahajan y Tuteja, 2005).

1.3 Adaptación de las plantas a las bajas temperaturas

Debido a que la mayoría de los cultivos de importancia económica son sensibles a temperaturas por debajo de los 10°C, hay pérdidas económicas debido a las inusuales heladas de otoño y a las temperaturas congelantes durante el invierno. Tales son los casos del maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*), algodón (*Gossypium hirsutum*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*) y plátano (*Musa sp.*), las cuales son especialmente sensibles a temperaturas por debajo de los 10-15°C. Estos son cultivos nativos de habitats templados o calientes, que presentan lesiones de ligeras a severas cuando son expuestos a bajas temperaturas, aún sin que estas sean congelantes (Mahajan y Tuteja, 2005). Sin embargo, hay plantas que pueden adquirir tolerancia a la congelación a través de un proceso llamado aclimatación al frío (Ouellet, 2007).

En la aclimatación, las plantas se exponen a un periodo de bajas temperaturas, por encima de los 0°C, con el fin de aumentar la tolerancia a subsecuentes temperaturas congelantes. La aclimatación lleva a cabo cambios celulares que incluyen la estabilización de la membrana contra el daño causado por congelación (Mahajan y Tuteja, 2005), por lo que aquellas plantas con capacidad de aclimatarse, podrán desarrollar resistencia a temperaturas por debajo de 0°C (Ouellet, 2007). Éste es un proceso de reprogramación metabólica y génica en el cual se implementan diversos mecanismos que tienen como finalidad permitir a la planta tolerar la congelación. Ocurren diversas alteraciones de las funciones bioquímicas, fisiológicas y metabólicas de la planta. Esto incluye un incremento en la expresión de enzimas de la vía de síntesis de la sacarosa, enzimas en el Ciclo de Calvin y en el contenido de proteínas en la hoja (Stitt, 2002).

Estos cambios son regulados a nivel de expresión del gen. En condiciones normales la aclimatación al frío ocurre en el otoño, cuando las temperaturas están por encima del punto de congelación.

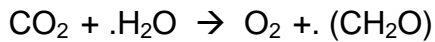
Las plantas que tienen una mejor habilidad a la aclimatación al frío responderán mejor a nivel molecular para expresar y activar enzimas requeridas para la desaturación o la hidrólisis de los ácidos grasos. Si este ajuste no sucediera cuando la temperatura decrece, ocurriría un grave daño estructural cuando las membranas de las células son sometidas a la transición de la fase de líquido a cristalino y luego a estado de gel (Ouellet, 2007).

La máxima tolerancia a la congelación se mantiene durante el invierno, cuando las temperaturas están por debajo del punto de congelación y se pierde en la primavera, cuando las temperaturas aumentan por encima del punto de congelación (Ouellet, 2007).

En el proceso de aclimatación al frío, las plantas tienen que procesar el aviso de descenso ambiental de temperatura. Para ello, son capaces de percibir los cambios de temperatura y responder a éstos. Estas respuestas involucran adaptaciones a nivel molecular, celular, bioquímico y fisiológico (Fleury y Walker, 2014). La respuesta de las plantas a las bajas temperaturas está dada por un sistema complejo de mecanismos de transducción a la señal de cambio de temperatura. En estos, están involucrados muchos elementos tales como receptores, cinasas, fosfatasas y segundos mensajeros. Algunos ejemplos de estos elementos son las bases de cadena larga (BCL), fitoesfingosina fosfato (PHS-P), ácido fosfatídico (AP), especies reactivas de oxígeno (ERO), y proteínas de cinasas activadas por mitógenos (MAPK), conjuntamente con muchos otros factores celulares.

1.4 Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso bioquímico por medio del cual las plantas convierten energía luminosa en energía química. La reacción que describe la fotosíntesis es una reacción de óxido-reducción en la que el H₂O cede electrones (en forma de hidrógeno) para la reducción del CO₂ para sintetizar un carbohidrato (CH₂O):



Este proceso sucede en dos etapas:

En la primera etapa, las reacciones consisten en la captación de luz para llevar a un estado energético a las moléculas de clorofila que inician una serie de reacciones de óxido-reducción en donde los electrones provenientes del H₂O son conducidos a través de los transportadores unidos a la membrana para producir nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma reducida (NADPH) y adenosín trifosfato (ATP).

En la segunda fase están las reacciones de asimilación de carbono, en las cuales se utilizan el ATP y NADPH para reducir el CO₂ y formar triosas fosfato, almidón, sacarosa y otros productos derivados de los mismos.

La fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos, orgánulos intracelulares que están rodeados de dos membranas: la externa que es permeable a pequeñas moléculas e iones y la interna que encierra el compartimento interno. Este compartimento interno tiene muchas vesículas o sacos aplanados rodeados de membrana llamados tilacoides, los cuales se ordenan en forma de pilas llamadas grana. Los pigmentos fotosintéticos y los complejos enzimáticos que llevan a cabo las reacciones luminosas y la síntesis de ATP están incrustados en las membranas de los tilacoides. El estroma (la fase acuosa encerrada por la membrana interna) contiene la mayoría de las enzimas requeridas para las reacciones de asimilación de carbono.

En la fotosíntesis, los electrones fluyen a través de una serie de transportadores insertados en la membrana. Entre ellos se encuentran los citocromos, quinonas y

proteínas ferro-sulfuradas. Simultáneamente, se bombean protones a través de la membrana para crear un potencial electroquímico. Este potencial es la fuerza motriz para la síntesis de ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato (Pi), catalizada por el complejo ATP sintasa.

Las membranas tilacoidales contienen dos complejos proteicos que se comportan funcionalmente como fotosistemas (fotosistemas I y II). Cada fotosistema contiene en su complejo de varias subunidades proteicas con dos tipos de pigmentos que tienen dos funciones diferentes: los pigmentos antena o cosechadores de luz y un par de clorofilas especiales que son los centros de reacción. Los pigmentos antena en plantas son carotenos y clorofilas y se encargan de absorber fotones de la luz solar. Estas moléculas son excitadas al absorber los fotones y sumarse la energía de la molécula y el fotón. El exceso de energía tras la absorción del fotón se denomina excitón. Estos excitones son colectados y transferidos al centro de reacción, el cual se compone por un par de clorofilas especializadas en las que solo una de ellas se excita y por esto adquiere un potencial redox muy negativo que le hace perder un electrón. Todas las moléculas de pigmento de un fotosistema pueden absorber fotones o energía luminosa y la transmiten rápida y eficientemente hasta el centro de reacción, que es una sola molécula de clorofila que puede perder un electrón y es por tanto el centro de reacción fotoquímico especializado en transducir la energía luminosa en energía química.

El fotosistema II o P680 (PSII) es un sistema tipo feofitina-quinona que contiene cantidades aproximadamente iguales de clorofilas *a* y *b*. El fotosistema I (PSI) está estructural y funcionalmente relacionado con el centro de reacción de las bacterias verdes del azufre. Tiene un centro de reacción designado P700 y una elevada proporción de clorofila *a* respecto a clorofila *b*.

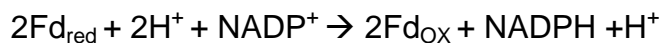
La excitación de P680 (en PSII) genera P680*, un excelente donador de electrones que, en picosegundos, transfiere un electrón a la feofitina, lo que le confiere una carga negativa (Pheo⁻). Con la pérdida de su electrón, el P680* se transforma en un radical catiónico, P680⁺. La Pheo⁻ pasa muy rápidamente su electrón extra a una plastoquinona, PQ_A o (Q_A), unida a una proteína que a su vez

pasa su electrón a otra quinona, PQ_B o (Q_B), unida más débilmente. Cuando PQ_B ha adquirido dos electrones en dos transferencias de este tipo a partir de PQ_A y dos protones del agua disolvente, se encuentra en su forma quinol totalmente reducida o PQ_BH_2 (Figura 1). La reacción global iniciada por la luz en PSII es, por tanto:



Finalmente, los electrones de PQ_BH_2 pasan a través del complejo citocromo b_6f y de aquí a la plastocianina, la cual restituirá el electrón del P700, perdido por excitación por la luz, de la misma manera que el P680 lo hizo a su vez. En el caso del P680, el electrón eliminado inicialmente (por su excitación por luz) es reemplazado por un electrón obtenido de la oxidación del agua. Por tanto, los electrones son transportados de un fotosistema a otro por la proteína soluble plastocianina, un transportador de un único electrón.

El centro de reacción P700 excitado a su vez por luz ($P700^*$), cede un electrón a un aceptor, A_0 , generando A_0^- y $P700^+$; una vez más, la excitación genera la separación de cargas en el centro de reacción fotoquímico. $P700^+$ es un agente oxidante fuerte, que capta rápidamente un electrón de la plastocianina, una proteína soluble transportadora de electrones que contiene Cu. A_0^- es un agente reductor excepcionalmente fuerte que pasa su electrón a través de una cadena de transportadores que llega finalmente al $NADP^+$. En primer lugar, la filoquinona (A_1) acepta un electrón y lo cede a una proteína ferro-sulfurada (a través de tres centros Fe-S de PSI). A partir de este punto el electrón pasa a la ferredoxina (Fd), otra proteína ferro-sulfurada asociada débilmente a la membrana del tilacoide (Lehninger, 2008). El siguiente transportador electrónico de la cadena es la flavoproteína ferredoxina: $NADP^+$ oxidoreductasa, que transfiere electrones desde la ferredoxina reducida (Fd_{red}) al $NADP^+$, dando así el último aceptor de electrones del PSI y con ello el producto reductor de la fotosíntesis, el NADPH:



Las cianobacterias y las plantas oxidan H₂O para reemplazar los electrones que se trasladan del PSII al PSI y finalmente al NADP⁺, con lo que se produce O₂.

Todas las reacciones que se llevan a cabo entre los componentes de los dos fotosistemas y los acarreadores de electrones, se expresan en el esquema Z, denominado así por su forma global, y que representa la ruta del flujo electrónico entre los dos fotosistemas así como las relaciones energéticas de las reacciones luminosas (Figura 1). Así, el esquema Z describe la ruta completa por la que fluyen electrones desde el H₂O al NADP⁺, según la ecuación:



Se transfiere un electrón desde el H₂O al NADP⁺ por cada dos fotones absorbidos (uno por cada fotosistema). Para formar una molécula de O₂ que requiere la transferencia de cuatro electrones desde dos H₂O a dos NADP⁺, se han de absorber un total de ocho fotones, cuatro para cada fotosistema.

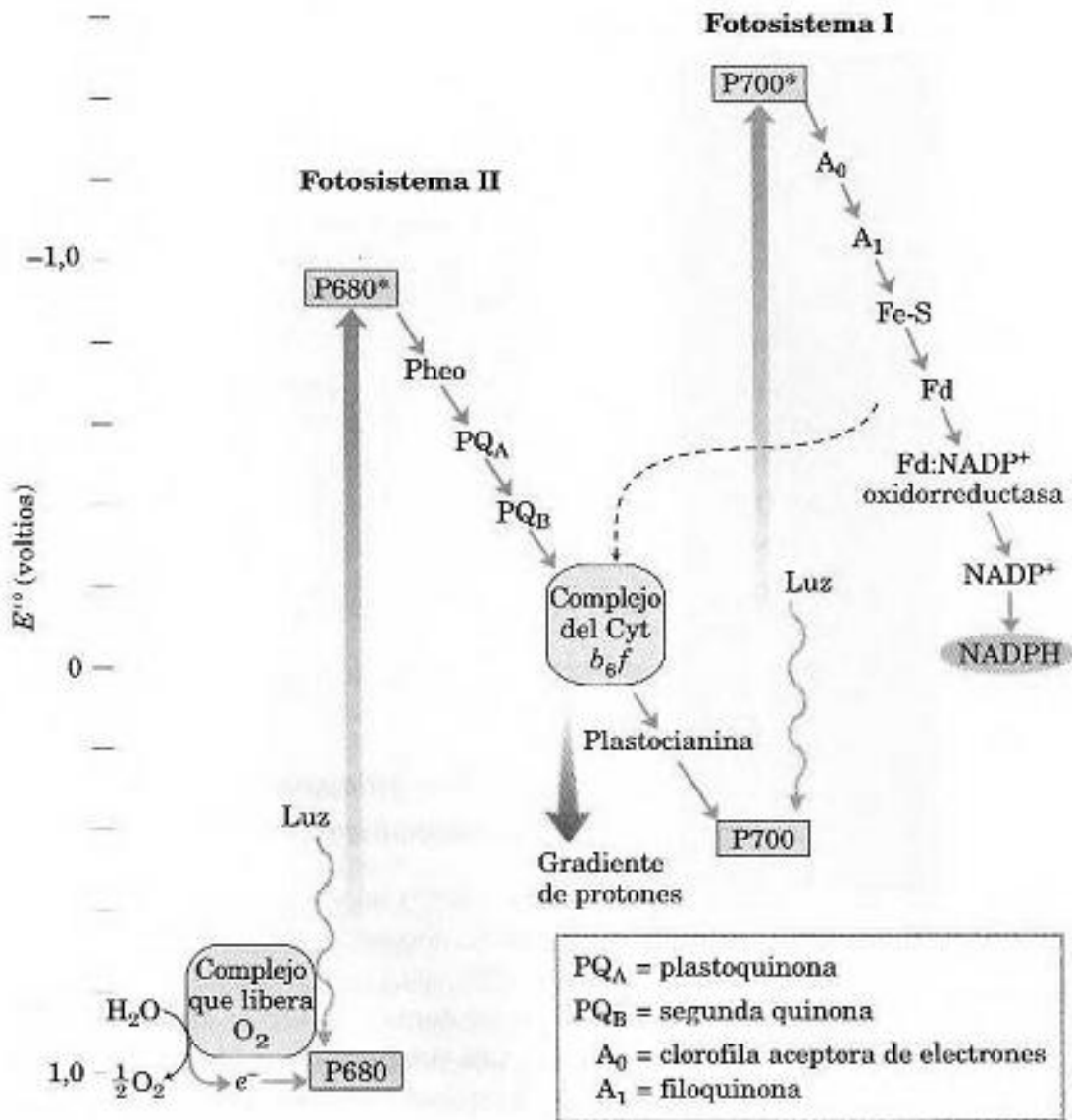


Figura 1. Esquema Z. Muestra la ruta de transferencia de electrones desde el H_2O al NADP^+ . La posición de cada transportador electrónico sobre la escala vertical es un reflejo de su potencial de reducción estándar. Para elevar la energía de los electrones que provienen del H_2O al nivel de energía requerido para reducir el NADP^+ a NADPH , cada electrón ha de ser “elevado” dos veces (flechas gruesas) por energía luminosa o fotones absorbidos en PSII y PSI. Se requiere un fotón por cada electrón elevado en cada fotosistema. Después de la excitación, los electrones de alta energía fluyen energéticamente “cuesta abajo” a través de la cadena de transportadores mostrada entre P680 y P700. Durante la reacción de escisión del agua y durante la transferencia de electrones a través del complejo del citocromo b_6f se transportan protones a través de la membrana tilacoide produciendo el gradiente de protones que es crucial para la formación de ATP.

El gradiente de protones generado a partir del paso de los electrones desde el PSII, el citocromo *b₆f* y la ferredoxina-NADP⁺ reductasa, queda localizado a través de la membrana del tilacoide, generándose una fuerza protomotriz, utilizada por la ATP sintasa para producir ATP, que es el otro compuesto que origina la fotosíntesis (Stryer et al., 2003).

La siguiente etapa de la fotosíntesis es la fase oscura, la cual no depende de la luz, pero utiliza los productos generados en la fase luminosa: el NADPH y el ATP. En esta fase, el CO₂, componente del aire que penetra por los estomas, es fijado en la forma de un compuesto orgánico de tres carbonos que luego se va modificando para producir hexosas y otros compuestos de los que se crea el metabolismo de la planta.

En condiciones naturales, el sistema fotosintético cambia continuamente para adaptarse al ambiente cambiante que introduce variaciones de factores físicos o químicos que afectan la función de los fotosistemas. Las evidencias acumuladas indican que las proteínas fotosintéticas se someten a una reorganización supramolecular dentro de un tiempo corto durante la aclimatación al frío. Esta reorganización incluye estados de transición que equilibran la excitación del PSI y del PSII (González 2008; Minagawa 2013).

Los daños a la estructura del cloroplasto interrumpen la capacidad fotosintética, por lo que se ha sugerido que la fotosíntesis probablemente podría ser un sensor de desequilibrio a través de las reacciones redox durante el transporte de electrones, dando como resultado la regulación del metabolismo y de procesos fotoquímicos en el cloroplasto. Dado que la luz es esencial para el desarrollo de la tolerancia al frío, parece probable que la fotosíntesis y tal vez otros procesos que tienen lugar en el cloroplasto, sean cruciales para la aclimatación y tolerancia al frío (Ouellet 2007).

1.4.a Clorofila

La clorofila es un pigmento fotorreceptor, localizado en la membrana tilacoidal. Es una molécula con estructura planar y policíclica que tiene una red de enlaces dobles y simples llamadas polienos que forman un tetrapirrol en donde uno de los anillos se encuentra reducido, una cadena de fitol (alcohol de 20 átomos) unido por un enlace éster y un ion magnesio en el centro coordinado por cuatro átomos de nitrógeno, (Figura 2).

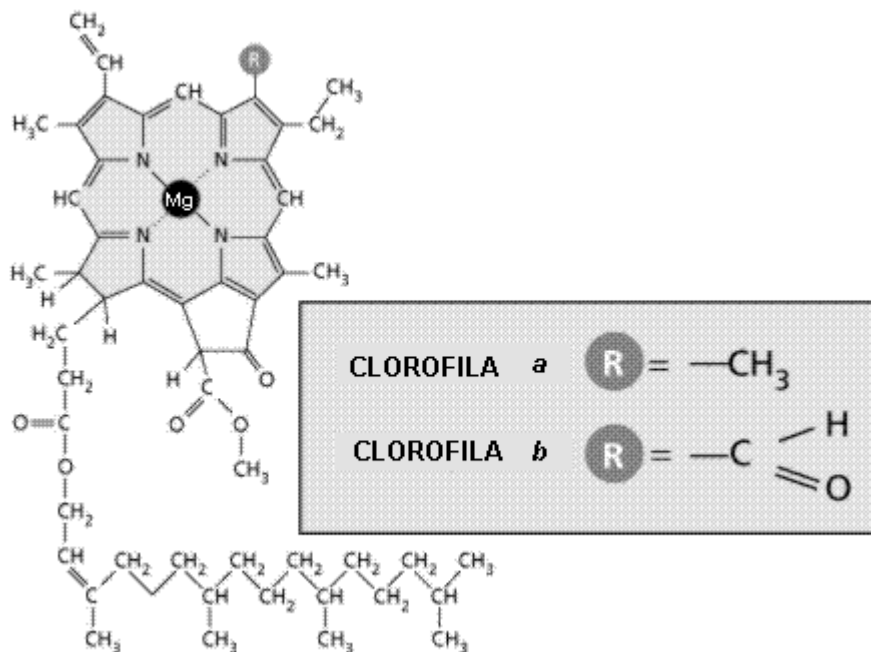


Figura 2. Estructura de la clorofila, principal colector de energía luminosa.

El ácido δ -aminolevulínico (ALA) es la molécula precursora de la clorofila, la cual es sintetizada en el cloroplasto. Existen diferentes tipos de clorofila, la diferencia entre ellas es la parte del fitol, que es una cadena larga hidrofóbica que puede presentar diferentes grados de saturación, por ejemplo, la clorofila *b* es sintetizada a partir de la clorofila por medio de la transformación del grupo metilo en formilo, mediante la enzima oxigenasa. Estos pequeños cambios en la estructura alteran las propiedades de absorción de las especies de clorofila, debido a esto la clorofila *b* absorbe a 430 nm (azul) y la clorofila *a* a 680 nm (rojo) (Voet, 1999; Stryer et al., 2003).

1.4.b Fluorescencia de la clorofila a.

En los cloroplastos, la emisión de fluorescencia es un indicador sensible de la funcionalidad e integridad del aparato fotosintético, mismo que está embebido en la membrana tilacoidal. En una disfunción de la fotosíntesis debida al estrés en la planta, la membrana puede estar dañada por la peroxidación de lípidos por ejemplo, pero también puede haber daño a nivel de las proteínas formadoras de los complejos fotosintéticos.

Cuando la energía proveniente del sol es absorbida por una molécula de clorofila a, la configuración electrónica de esta se ve temporalmente alterada. Esta configuración excitada es inestable y de corta vida, existiendo diferentes procesos para disipar la energía absorbida. En los sistemas fotosintéticos la energía se puede disipar por la vía fotoquímica durante la cual ocurre la donación de un electrón a una molécula aceptora, también llamado decaimiento fotoquímico (**qP**) ya que la energía de la luz absorbida por la molécula de clorofila se convierte en energía química de la molécula aceptora que se utiliza para la fotosíntesis. Debido a que la luz que requiere la planta para la fotosíntesis es a menudo pequeña en relación con la absorbida, gran parte de esta energía extra se disipa como calor y esto es llamado decaimiento no fotoquímico (**qN**), porque no se invierte en la fotosíntesis; Finalmente, una pequeña pero importante parte del exceso de energía se desprende como la emisión de fluorescencia de las moléculas de clorofila. Esto es llamado decaimiento de fluorescencia (**qF**). La competencia entre estos procesos por absorber la energía asegura una reducción en alguno de ellos y consecuentemente se asocia con un incremento de los otros procesos (Ritchie et al., 2006).

Cualquier forma de estrés biótico o abiótico tiene un efecto sobre el rendimiento fotosintético, por lo que el uso de los parámetros de fluorescencia ha contribuido a entender y monitorear los efectos del estrés en la fotosíntesis. Anatómica y estructuralmente, los cambios en el cloroplasto por el efecto de un estrés incluyen alteraciones en dimensiones del organelo, reorganización de los tilacoides y estroma, daño en membranas, incremento de las vacuolas, disminución o

acumulación de los gránulos de almidón, entre otros (Mahajan y Tuteja, 2005; Lage, 2008).

1.4.c Curva de inducción de la clorofila a (Cinética de Kautsky).

Cuando un tejido fotosintético es adaptado a la oscuridad por un cierto tiempo, la clorofila del PSII que estuviera reducida va transfiriendo sus electrones remanentes al aceptor de electrones del PSII, el cual es gradualmente re-oxidado hasta el punto donde todo el centro de reacción PS II es capaz de captar la energía fotoquímica. Si entonces la muestra se ilumina con una fuente de luz de alta intensidad, se presenta una fase de incremento rápido de la fluorescencia en el primer segundo de iluminación seguida por una subsecuente fase lenta de declive (2 min) de la intensidad de la fluorescencia hasta alcanzar un nivel continuo de fluorescencia máxima. Este fenómeno es conocido como la curva de Inducción de Kautsky.

Las curvas de inducción de Kautsky pueden ser graficadas logarítmicamente para observar la subida polifásica de todos los valores de fluorescencia hasta el valor máximo de la fluorescencia. Esto es debido a que las reacciones de la cinética ocurren en los primeros 300 msec de iluminación. La cinética de la curva de inducción es universal para organismos fotosintéticos incluyendo las microalgas y las cianobacterias. Las características cinéticas de las reacciones causantes de la emisión de la fluorescencia son determinadas por la intensidad luminosa de excitación, la concentración de la clorofila y el estado redox de los aceptores y donadores del PSII, entre otros (González et al., 2008).

La cinética de la fluorescencia de la clorofila a presenta cuatro inflexiones nombradas **OJIP** cuando se grafica el tiempo en logaritmo (Figura 3). **O** es el valor mínimo de la fluorescencia (**F_o**) y por tanto en el momento en el que todos los centros de reacción están oxidados o “abiertos”; o “vacíos”; **J** está relacionada con la reducción parcial de la Q_A ; **I** se vincula con la reducción parcial de Q_A y Q_B ; mientras que **P** (**F_m**) infiere el valor máximo de la fluorescencia y en el momento

en el que todos los centros de reacción esta reducidos o “cerrados” (González et al., 2008).

Otros valores obtenidos de la curva de OJIP son la fluorescencia variable (F_v) calculada como la diferencia entre el valor de F_m y F_o . El cociente de F_v/F_m ha sido largamente aceptado y usado como indicador de la máxima eficiencia del PS II (González et al.,2008). Muestras fotosintéticas saludables presentan un valor máximo de F_v/F_m aproximadamente de 0.83. Es un parámetro efectivo y sensible que puede ser utilizado como indicador de estrés. Valores debajo de 0.85 indican que la muestra se ha expuesto algún tipo de estrés biótico ó abiótico lo cual reduce la capacidad de la energía en el PS II.

Las mediciones de la fluorescencia de la clorofila a no son absolutas. La fluorescencia emitida depende de la intensidad de luz y la respuesta de la planta a las nuevas condiciones de luz. Por ello, sus unidades son arbitrarias (u.a.) y es importante realizar las mediciones en las mismas circunstancias para que los parámetros de la fluorescencia sean comparables.

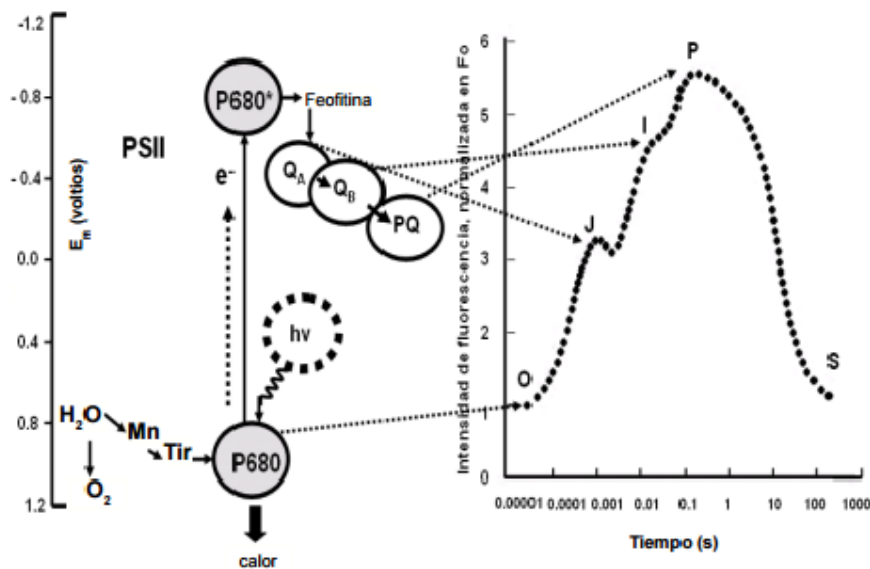


Figura 3. Curva de inducción de fluorescencia de la clorofila a. Se muestran las diferentes etapas de la curva nombradas por las letras O, J, I, P y su correspondencia con el proceso fotosintético expresado en el esquema Z de la izquierda.

Debido a que en este trabajo de tesis se explora el papel de componentes membranales y de transducción de señales en la aclimatación al frío, en relación con el funcionamiento del proceso fotosintético, se revisan a continuación estos componentes.

1.5 La membrana plasmática

La membrana plasmática está compuesta por una bicapa lipídica enriquecida con proteínas y carbohidratos. En general, la membrana es permeable a sustancias no polares pero las sustancias hidrofílicas y/o con carga eléctrica penetran gracias a las proteínas formadoras de canales y transportadores. Esta permeabilidad selectiva permite a las células mantener gradientes de concentración y carga eléctrica, críticos para el metabolismo de la célula (Luckey, 2008).

Los lípidos membranales están constituidos por glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides y todos ellos son anfipáticos, es decir, tienen una porción hidrofóbica y otra hidrofílica. Gracias a lo anterior, los lípidos membranales se arreglan en dos monocapas contrapuestas entre sí, en la que los grupos polares se exponen hacia el medio acuoso, mientras que las cadenas acílicas forman un dominio no polar en la parte interna de la bicapa. Estas cadenas acílicas están compuestas por ácidos grasos y bases de cadena larga. Ambos pueden ser saturados, insaturados o hidroxilados. Se sabe que los lípidos que contienen ácidos grasos saturados solidifican a temperaturas más bajas que los que contienen ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, la proporción de ácidos grasos insaturados en la membrana influye fuertemente en la fluidez de la membrana. La temperatura a la cual la membrana cambia de una fase más fluida a otra menos fluida se conoce como temperatura de transición y el paso de un estado semi-fluido a un estado semi-cristalino es conocido como transición de fases. Las plantas sensibles a las bajas temperaturas usualmente tienen una proporción más grande de ácidos grasos saturados y por lo tanto una temperatura de transición más alta. Mientras que las plantas resistentes a las bajas temperaturas tienen una gran cantidad de ácidos grasos insaturados, por lo cual tienen una temperatura de transición baja.

1.6 La membrana plasmática como sensor de las bajas temperaturas en plantas

Se ha propuesto que en las plantas el estrés ambiental por bajas temperaturas o frío es percibido por la membrana plasmática sin la necesidad de tener un receptor proteico en la membrana, sino que las alteraciones en la fluidez, debidas a la proporción de los lípidos membranales saturados, es la encargada de la señalización (Mahajan y Tuteja, 2005).

La fluidez de las membranas es una propiedad fisiológica que depende de la temperatura y de la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados presentes. Las plantas modifican la composición de ácidos grasos de las membranas con el cambio gradual de temperaturas, lo que mantiene la fluidez de la membrana (Voet, 1999; Chen et al., 2009; Carmona-Salazar et al., 2011).

La membrana plasmática es el sitio en donde ocurre mayor daño por congelamiento, pues es la interfase entre los medios extracelular y citoplásmico, en los que se pueden formar los cristales de hielo. La formación de hielo inicia en el espacio apoplástico. Como la presión de vapor del hielo es mucho menor que la del agua a cualquier temperatura, la formación de hielo en el apoplasto establece un gradiente de presión de vapor entre el apoplasto y lo que rodea a la células. El agua citoplasmática no congelada migra BAJO el gradiente del citosol de la célula hacia el apoplasto, lo cual contribuye a la deshidratación intracelular, la ampliación de los cristales de hielo existentes y con ello las tensiones mecánicas en la pared celular y la membrana plasmática, conduciendo así a la ruptura de la célula (Mahajan y Tuteja, 2005).

De lo anterior se desprende que la membrana plasmática actúa como barrera semipermeable que permite la entrada y salida de agua durante los periodos de congelación y descongelación (Uemura y Steponkus, 1999). Por lo tanto, la estabilización de la membrana plasmática es necesaria para la supervivencia de las plantas cuando se exponen a temperaturas congelantes (Minami et al., 2009).

Existen diversos mecanismos de estabilización membranar, que incluyen la modificación química de los lípidos membranales, la síntesis de solutos, compuestos crioprotectores incluyendo la glicilbetaína y un incremento de los niveles de antioxidantes. Por ello, durante el periodo de aclimatación, ocurren cambios en la composición lipídica, aumentando la proporción de especies di-insaturadas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y una disminución en la proporción de esfingolípidos, particularmente glucocerebrósidos (Minami et al., 2009).

1.7 Esfingolípidos

Los esfingolípidos tienen como base estructural un amino alcohol de cadena larga, también llamada base de cadena larga (BCL). Esta es una cadena compuesta por 18 átomos de carbono, con hidroxilaciones en C1 Y C3 y con un grupo amino en C2. La esfingosina es una de las BCL más abundantes en las plantas. A esta base se une un ácido graso mediante un enlace amida para formar la estructura de la ceramida. La unión de un alcohol fosforilado al OH del C1 de la BCL da lugar a las esfingomielinas o en el caso de un carbohidrato, a los glicoesfingolípidos.

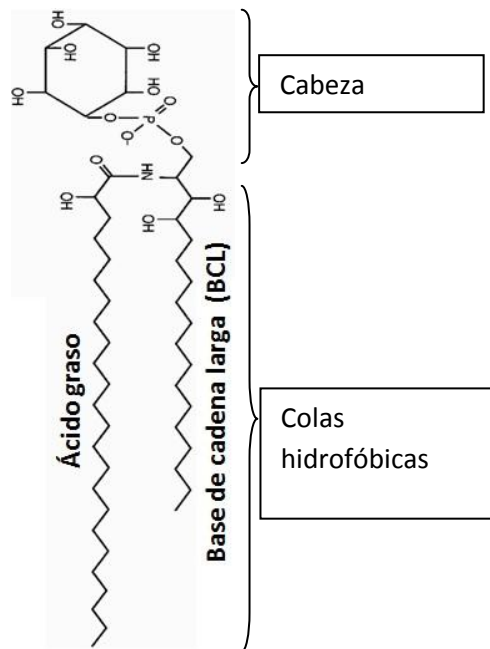


Figura 4. Estructura básica de un esfingolípido complejo. Se muestra la cabeza polar y las dos colas hidrofóbicas compuestas por un ácido graso y una base de cadena larga (BCL).

1.7a Esfingolípidos en la remodelación membranal

Las células vegetales responden a factores bióticos y abióticos. Uno de los cambios durante la aclimatación al frío en las membranas celulares es una producción de fosfolípidos poco abundantes que desempeñan un papel clave en la señalización celular y la disminución de los esfingolípidos, que tienen temperaturas de fusión más altas que los fosfolípidos. Así que se considera que las disminuciones cuantitativas de la fracción membranal de los esfingolípidos conducen a un aumento en la fluidez de la membrana. Los esfingolípidos son el principal componente estructural de las membranas en plantas, además de ser reguladores dinámicos de procesos celulares en las plantas, por lo que es probable que el contenido de esfingolípidos pueda impactar significativamente las propiedades de la membrana y el tonoplasto. Debido a que son importantes para la adaptación osmótica y el flujo de iones, el contenido de esfingolípidos y su composición pueden cambiar la habilidad de las plantas para responder al estrés. Durante la aclimatación hay un incremento de fosfolípidos mono o disaturados como la fosfatidilcolina y fosfatidil etanolamina y tomando en cuenta consideraciones fisicoquímicas, se presume que tales cambios podrían mediar el cambio de la formación de vesículas endocíticas a la formación de extrusiones exocitóticas (Leeuwen et al., 2004; Chen et al., 2009; Minami et al., 2010).

1.7.b Esfingolípidos como segundos mensajeros de respuestas al frío

Los procesos de respuesta se producen en las plantas que sufren un estrés para ajustar su metabolismo celular y evitar daños. El estrés se percibe por receptores de la membrana plasmática, la señal es transducida hacia el interior de la célula y posteriormente es transferida al núcleo, lo que provoca un cambio en la expresión de varios genes por vías complejas de transducción de señales, como es el aumento de segundos mensajeros como Ca^{2+} , inositol 1,4-5 trifosfato, fosforilación de proteínas, ácido abscísico (ABA), entre otros (García et al., 2005).

Los esfingolípidos actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares y regulan la dinámica de las membranas biológicas formando parte de los microdominios de las membranas y como segundos mensajeros a través de la modulación de cascadas de señalización, regulan diferentes procesos de la actividad celular. Los esfingolípidos, como la ceramida y sus derivados fosforilados como la ceramida-1-fosfato y la esfingosina-1-fosfato, están estrechamente vinculados con la señalización intracelular en plantas y animales. La ceramida una molécula central del metabolismo de los esfingolípidos, es capaz de activar enzimas implicadas en redes de señalización ante estrés, por ejemplo se ha implicado en la respuesta de las plantas al frío y en la regulación de la concentración de Ca^{2+} (Figura 5) (Sánchez y Días., 2006). Por otra parte, se sabe que en plantas, la fitoesfingosina-1-fosfato se sintetiza rápida y transitoriamente durante la exposición a bajas temperaturas y que además activa a la MPK6 que es una cinasa involucradas en otras formas de estrés como el biótico (Figura 5) (Dutilleul et al., 2012).

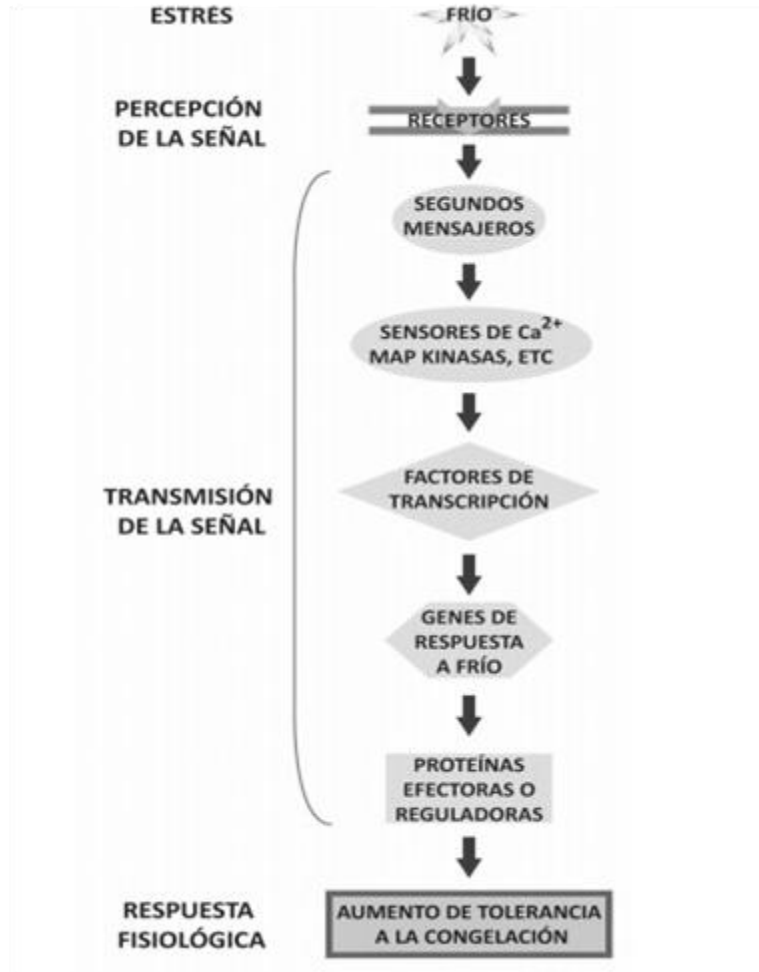


Figura 5. Ruta genérica celular del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. La señal es percibida por receptores, posiblemente localizados en la membrana celular, que activan una cascada de señalización intracelular, la cual incluye segundos mensajeros y provoca la expresión de múltiples genes de respuesta a frío, lo cual lleva a la síntesis de proteínas que producen cambios en el metabolismo para desplegar una tolerancia a la congelación.

1.8 Activación de las MAP cinasas

Dentro de los componentes de una serie de reacciones que se activan para responder ante estrés están las MAP cinasas. Los miembros de las cascadas MAPK se activan por más de un tipo de estrés, lo que sugiere que las cascadas MAPK actúan como punto de convergencia en la señalización del estrés abiótico y biótico también. Se ha encontrado evidencia de la participación de las proteínas cinasas de cascadas activadas por mitógenos ante las bajas temperaturas

(Dutilleul et al., 2012) y en la transducción de señales de estrés. Las vías de MAPK primero se han descrito en sistemas de animales; pero la evidencia hasta ahora claramente ha establecido que los reinos vegetal y animal comparten muchas características similares en sus vías de transducción de señales, entre ellas, las mediadas por MAP cinasas (Chávez y Ramírez 2010; Saucedo et al., 2011; Okazaki et al. 2014)

Las MAP cinasas forman parte de cascadas de transducción, están activadas por fosforilación y están integradas por tres elementos consecutivos que forman un cassette: cinasa de la cinasa de la MAP cinasa (MAPKKK), cinasa de la MAP cinasa (MAPKK) y MAP cinasa (MAPK). Estas cinasas son activadas por fosforilación de residuos localizados en los sitios catalíticos de la MAP cinasa sustrato respectiva. Las cascadas MAPK son importantes en la señalización mediada por especies reactivas de oxígeno (ERO). Las vías MAPK de señalización, inducen y regulan la producción de ERO; particularmente las MPK3 y MPK6 presentan efectos pleiotrópicos en varios procesos controlados por ERO y la apertura estomática (Saucedo y Gavilanes, 2005; Pitzschke y Hirt, 2009).

2. ANTECEDENTES

Este laboratorio ha estudiado las funciones de los esfingolípidos en las plantas. En particular, con respecto al estrés biótico. Ha determinado que la membrana plasmática tiene la capacidad de ser un sensor ante bajas temperaturas, que los esfingolípidos aumentan el orden y la rigidez de la membrana plasmática y además que las MAP cinasas, las ERO y los esfingolípidos son moléculas involucradas en la vía de señalización a bajas temperaturas y la remodelación de la membrana plasmática (Cano, 2014).

En este tema, el grupo de trabajo ha estudiado el comportamiento de las plantas frente a estrés por frío y ha estandarizado el proceso de aclimatación, en el cual las plantas se someten a 4°C durante una semana previamente a un reto de congelación de -15°C.

Por otra parte, diversos artículos refieren que las técnicas relacionadas con la clorofila como lo son el análisis de su contenido y de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del PS II hacen posible caracterizar los efectos y modos de acción de diferentes tipos de estrés ambiental en la fotosíntesis (González, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

La fotosíntesis es un proceso vital en las plantas que está coordinado con múltiples y variadas actividades celulares que son reguladas en conjunto ante situaciones de estrés. La asociación que existe entre las formas moleculares de detección de las bajas temperaturas a nivel de la membrana plasmática, la transducción de señales a través del interior celular y la fotosíntesis que ocurre en el cloroplasto, son fenómenos que no se han explorado en conjunto. En este trabajo, se tiene un diseño experimental que pretende acercarse al conocimiento de estas interrelaciones. Para ello, nos apoyamos en el uso de plantas de *Arabidopsis thaliana* que son mutantes en genes del metabolismo de esfingolípidos de la membrana plasmática, en mutantes de MAP cinasas y en una mutante en la generación de ERO en el cloroplasto. En todas estas líneas mutantes disponemos de resultados previos que nos pueden ayudar a establecer posibles mecanismos que llevan a las plantas a aclimatarse a las bajas temperaturas y a poder tolerar la congelación. Entender estos mecanismos es fundamental para poder aplicar este conocimiento al mejoramiento de cultivos que resistan la congelación.

4. HIPÓTESIS

Plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* que varían en contenido de esfingolípidos, MAP cinasas y ERO, expresan cambios en su capacidad fotosintética y niveles de clorofila ante una exposición a bajas temperaturas. De acuerdo a lo anterior, tanto la fotosíntesis, como el fenotipo de cada mutante se verán afectados al someterlas al tratamiento de aclimatación al frío.

5. OBJETIVO GENERAL

Conocer cómo son afectados los parámetros fotosintéticos durante la aclimatación al frío en plantas de *Arabidopsis thaliana* que tienen diferentes niveles de esfingolípidos, MAP cinasas y ERO, para establecer la relación que existe entre la aclimatación y la capacidad fotosintética de plantas modificadas genéticamente.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

Germinar y crecer las plantas de la planta silvestre y 8 líneas mutantes: *wt*, *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *lcb2b hp/lcb2a*, *pfl18-18*, *mpk3* y *mpk6*.

Asociar la aclimatación con la respuesta a bajas temperaturas en las diferentes líneas estudiadas mediante el registro de los fenotipos de las plantas no aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC) antes y una semana después de someterse al reto de -15°C.

Determinar los parámetros fotosintéticos y de contenido de clorofila por mediciones de fluorescencia de las plantas NA y AC en todas las líneas mutantes.

Determinar la influencia de los esfingolípidos, MAP cinasas y ERO en la fotosíntesis de plantas expuestas al frío (como parte de un tratamiento de aclimatación) en los parámetros fotosintéticos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico.

Como se ha mencionado, en el laboratorio estamos interesados en el papel de los esfingolípidos durante la aclimatación a frío, es por ello que se usaron mutantes que tienen afectada la síntesis de esfingolípidos ó de proteínas (MPK3 y MPK6) o de ERO que están involucrados en su señalización. En la tabla 1 se describen las plantas *wt* de *A. thaliana* y sus líneas mutantes *lcb2a*, *hp-*, *sbh1-1* y *sld1 sld2* que tienen deficiencias en la síntesis de esfingolípidos, las mutantes *mpk3* y *mpk6* que no expresan las MAP cinasas correspondientes que se activan para responder antes estrés, además de la mutante *pfl18-18* que produce menor cantidad de ERO en el cloroplasto.

Tabla 1. Características de las líneas de *A. thaliana* usadas en este trabajo.

Línea	Contenido de esfingolípidos	Características de la línea
<i>Wt</i>	Contenido basal de esfingolípidos.	Sin modificaciones genéticas. Expresión normal de sus genes.
<i>Atlcb2a-1</i>	Contenido esfingolípidos igual al basal de wt.	Con modificaciones en el gene de la subunidad LCB2a de la Serina palmitoiltransferasa (SPT), primera enzima en la síntesis de esfingolípidos por lo que esta subunidad no se expresa y no se puede formar el heterodímero LCB1/LCB2a con la subunidad LCB1 de la SPT. Solo se forma el LCB1/LCB2b (Dietrich et al., 2008), el cual es redundante funcionalmente.
<i>Atlcb2b</i> <i>hp/lcb2a</i>	A medida que avanza el tiempo de silenciamiento, los esfingolípidos endógenos totales decrecen un 34%, lo cual se expresa en un fenotipo de muerte celular.	Mutante denominada <i>hp</i> . Con una horquilla (hairpin) de RNA, que silencia específicamente al gen de la subunidad LCB2b de la SPT cuando se encuentra en presencia de metoxifenazida (silenciamiento inducible). Tampoco cuenta con la subunidad LCB2a pues la construcción de la horquilla está en el fondo genético <i>lcb2a-1</i> (Dietrich et al., 2008). Cuando a estas plantas no se les añade el inductor para servir como controles, se les denomina <i>hp-</i> . Cuando se les añade el inductor del silenciamiento, se les denomina <i>hp⁺</i> .

Continuación de la Tabla 1.

<i>sbh1-1</i>	Menor contenido de BCL tri hidroxiladas. Sólo contiene 50% de bases tri-hidroxiladas de cadena larga totales (BCL) y muestran 1.5 veces más especies di-hidroxiladas.	Con inserciones de T-DNA en el gen que codifica para la hidroxilasa 1 de las bases esfingoideas (SBH1), por lo que sus esfingolípidos carecen del grupo hidroxilo en el C4 de la base esfingoidea. (Chen et al., 2008).
<i>sld1/sld2</i>	Disminución de la cantidad de BCL insaturadas.	Con modificaciones en los dos genes que codifican para la 8 desaturasa, revela una disminución en la cantidad de BCL insaturadas y una reducción en los niveles de glucosilceramidas (Chen et al., 2012).
<i>pfld18-18</i>	Contenido basal de esfingolípidos.	Con la inserción en el cloroplasto del gen que codifica para la flavodoxina bacteriana. Posee una reducción de las especies reactivas de oxígeno de cloroplasto (Tognetti et al., 2006).
<i>mpk3</i>	Contenido basal de esfingolípidos.	Con una inserción de T-DNA en el gen que codifica para la MAP cinasa 3. Carece de la expresión de la MPK3 (Saucedo-García et al., 2005).
<i>mpk6</i>	Contenido basal de esfingolípidos.	Contiene una inserción de T-DNA en el gen que codifica para la MAP cinasa 6. Carece de la expresión de la MPK6 (Saucedo-García et al., 2005).

7.2 Estrategia experimental

La estrategia experimental que se llevó a cabo para cumplir los objetivos, se presenta en la Figura 6, en la cual se describe la cronología de las diferentes técnicas experimentales utilizadas, como son el registro de fenotipos, medición de la fluorescencia y contenido de clorofila, las cuales se realizaron tanto en la planta silvestre *wt* como en las líneas mutantes.

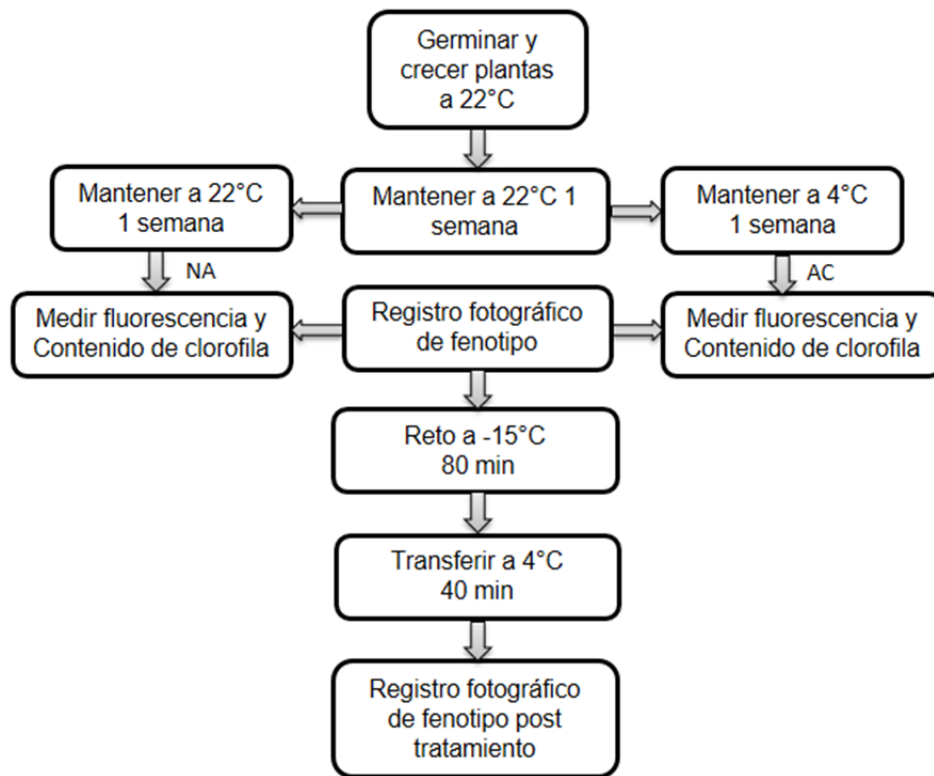


Figura 6. Diagrama de la estrategia experimental. NA se refiere al lote de plantas que no fueron sometidas al tratamiento de aclimatación y AC al lote de plantas que se les dio el tratamiento de aclimatación (4°C durante una semana), antes de realizarse las determinaciones de fluorescencia y contenido de clorofila ambos lotes de plantas estuvieron expuestos a un fotoperiodo 8 h de luz y 16 h de oscuridad.

7.2.a Germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* se germinaron. Se tomó una cantidad pequeña de las semillas de *A. thaliana* (*wt*) y de cada línea mutante con la punta de una espátula metálica para posteriormente esparcirlas con los dedos sobre la superficie de

distintas macetas con sustrato. Este estuvo compuesto por 3 partes de Mix 3 Agregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), 1 parte de agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlalnepantla, Edo de México) y 1 parte de verniculita Premium Grade (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canda Ltd.). Posteriormente se agregó suficiente agua para humedecer el sustrato mezclado, llenando luego las macetas de plástico etiquetadas con el nombre de la línea mutante o silvestre. Las macetas se colocaron en la cámara a 22°C con una foto periodo de 8 h luz y 16 h oscuridad, regándolas periódicamente.

7.2.b Crecimiento de las plantas adultas

Después de la germinación, las plántulas se dejaron crecer hasta las tres semanas, para después trasplantarlas individualmente a macetas con el sustrato. Esto se hizo con ayuda de pinzas y espátula metálicas, tomando cada plántula y separándola de las otras y del sustrato para no dañar sus raíces. Con la espátula se hizo una excavación pequeña en el sustrato y se enterró la raíz de la plántula. Al final, cada maceta contenía de 1 a 3 plántulas. Las macetas se colocaron en charolas y se cubrieron con un domo transparente y una servitoalla ubicándolas en el invernadero a 22°C con una foto periodo de 8 h luz y 16 h oscuridad y regándolas periódicamente. El riego fue con agua durante las primeras tres semanas después del trasplante y luego con solución Hoagland la cual contiene micronutrientes y macronutrientes para el crecimiento de las plantas.

7.3 Tratamiento de aclimatación

Las plantas experimentales de todas las mutantes crecieron a 22°C con foto periodo de 8 h luz y 16 h oscuridad y se distribuyeron en dos lotes de plantas adultas, un lote fueron plantas control y se nombraron no aclimatadas (NA), ya que se mantuvieron a 22°C con un fotoperiodo 8 h de luz y 16 h de oscuridad, mientras que el otro lote permaneció a 22°C durante una semana y posteriormente se sometió a un período de aclimatación (AC), que consistió en la exposición a una temperatura de 4°C por una semana con el mismo fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad.

7.4 Registro fenotípico

Las plantas de ambos lotes AC y NA se registraron fotográficamente (15 plantas por cada tratamiento) y posteriormente se sometieron a un reto de -15°C durante 80 min. Después se exponen a 4°C por 40 min y al terminar el tiempo se transfieren a 22°C con un fotoperiodo 8 h de luz y 16 h de oscuridad durante una semana y se registran nuevamente fotográficamente.

7.5 Determinación de la fluorescencia de la clorofila a

Se midió la emisión de la fluorescencia de la clorofila a usando el aparato Handy Pea (Hansatech). Las mediciones se hicieron en doce hojas provenientes de seis plantas por cada mutante tanto NA como AC. Se colocaron los leafclips (pinzas) a la hoja de la planta (Figura 7A) para someterla a oscuridad por 5 min para posteriormente realizar la medición conectando el sensor head (LEDs de alta intensidad a 650 nm) al leafclip (Figura 7B). Se procedió a retirar el leafclip de la hoja teniendo cuidado de no maltratarla y se hizo el registro de los datos. Una hoja fue utilizada para hacer una determinación individual, realizándose, como se indicó anteriormente, doce determinaciones en total por línea y condición experimental.

A).....

B)



Figura 7. Medición de la fluorescencia con el aparato Handy Pea (Hansatech). Se utilizaron tres plantas de *Arabidopsis thaliana* en una maceta. A) Se indica como fueron colocadas las leafclips (pinzas) y el B) sensor head.

7.6 Medición de clorofila

La determinación de la clorofila se realizó con el dispositivo CL-01 Chlorophyll content meter (Hansatech). Las mediciones se realizaron en 36 hojas representativas provenientes de 18 plantas de cada mutante, las cuales se cortaron y se colocaron horizontalmente en la pinza del aparato con el peciolo quedando hacia afuera (Figura 8). Primero, las hojas se mantuvieron en obscuridad durante 1 min y en seguida se realizó la medición. Una hoja se utilizó para hacer una sola determinación. Las mediciones se hicieron tanto en plantas NA como en AC del mismo genotipo el mismo día.



Figura 8. Medición del contenido de clorofila con el dispositivo CL-01 Chlorophyll Content Meter de una hoja de *Arabidopsis thaliana*. Se indica cómo fue colocada en la pinza.

7.7 Tratamiento de los datos

7.7.a Fluorescencia de la clorofila a

El procesamiento de los datos se esquematiza en la Figura 9 que a continuación se detalla el procedimiento usado. Para el tratamiento de los datos obtenidos con el Handy PEA se utilizó el programa *PEA Plus V1.10* con el que se realizaron las gráficas de OJIP, utilizando un código de colores para diferenciar el control (*wt*) de

sus dos tratamientos (NA y AC) y las ocho líneas estudiadas. Se le asignó el color negro al control *wt* NA y al tratamiento *wt* AC rojo, mientras que las determinaciones de las mutantes NA se graficaron en color verde y la mutante AC en azul.

Posteriormente, utilizando el mismo código de colores, se realizaron gráficas de OJIP comparativas del promedio de las réplicas de *wt* NA y AC contra el promedio de las réplicas de cada línea mutantes NA y AC. Obteniéndose así 7 gráficas comparativas de OJIP (una por cada línea mutante). A partir de los valores de las gráficas promedio se realizaron gráficas de radar con los valores de F1 a Fm y los parámetros de JIP arrojados por el programa PEA Plus V1.10.

Con los valores de las curvas promedio de OJIP del control *wt* NA contra cada mutante, se procedió a utilizar el programa *BioLyzer* con el que se realizó una doble normalización de F1-Fm y de F1-F4. Una vez normalizados los valores, se copiaron en una hoja de Excel y posteriormente a cada valor obtenido de la normalización de *wt* AC y las líneas mutantes NA y AC se les restó el valor del control *wt* NA. Los valores de la resta se graficaron con el programa *Origin*.

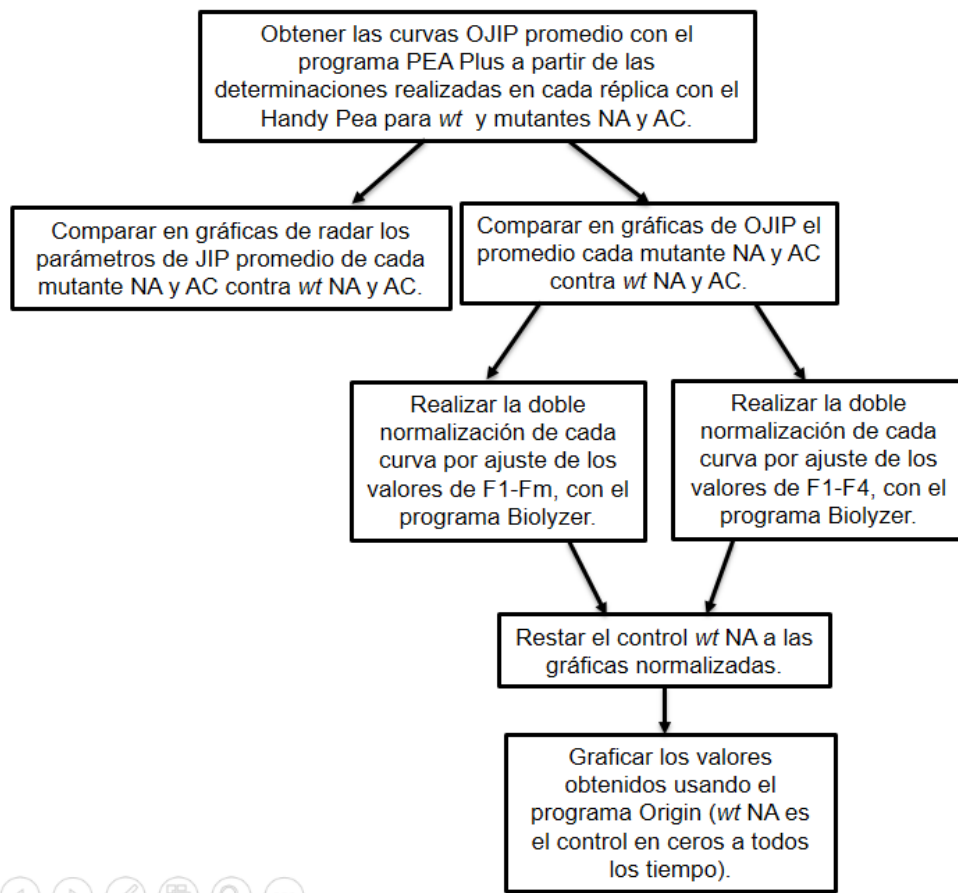


Figura 9. Diagrama de la estrategia llevada a cabo para el tratamiento de datos obtenidos a partir de las mediciones de la fluorescencia de la clorofila *a* realizadas con el aparato Handy Pea (Hansatech). Las mediciones fueron realizadas a *wt* y las 7 líneas mutantes NA y AC.

8. RESULTADOS

8.1 Plantas incapaces de resistir temperaturas congelantes sin previa aclimatación

Wt

Los resultados de la Figura 10A revelan como las plantas wt NA presentaron un fenotipo de muerte después del reto a 15°C durante 80 min. En la Figura 10B se presenta la gráfica del porcentaje de sobrevivencia de las plantas wt, donde el porcentaje de plantas AC que sobrevivieron fue mucho mayor comparado con las plantas NA.

A)

B)

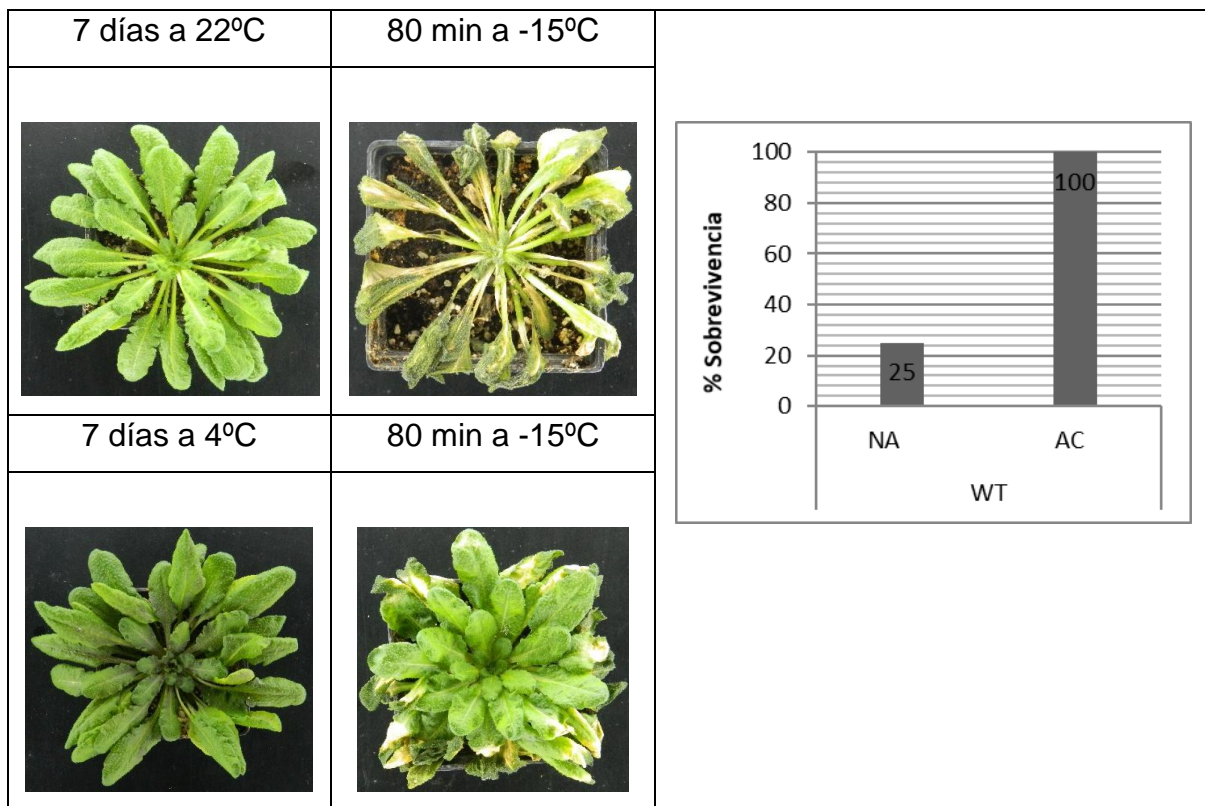


Figura 10. Capacidad de sobrevivencia de las plantas wt NA y AC antes y después de una semana del reto de congelación a 15°C por 80 min. A) Fenotipos representativos. B) Porcentaje de sobrevivencia de los fenotipos de las plantas wt de los tratamientos NA y AC, después de una semana del reto de congelación. Se tomó como el 100% las quince plantas para cada tratamiento.

hp-

En la Figura 11A presenta las plantas del fenotipo *hp-* que se caracterizan por no contar con la subunidad LCB2a de la SPT. El tratamiento de NA muestra un fenotipo de muerte después del reto de congelación, mientras que las plantas del tratamiento de AC sobrevivieron. En la Figura 11B se presenta el porcentaje de sobrevivencia de esta línea, en las cuales las plantas NA no sobrevivieron al reto de congelación a -15°C mientras que las plantas aclimatadas sobrevivieron el 80%.

A)

B)

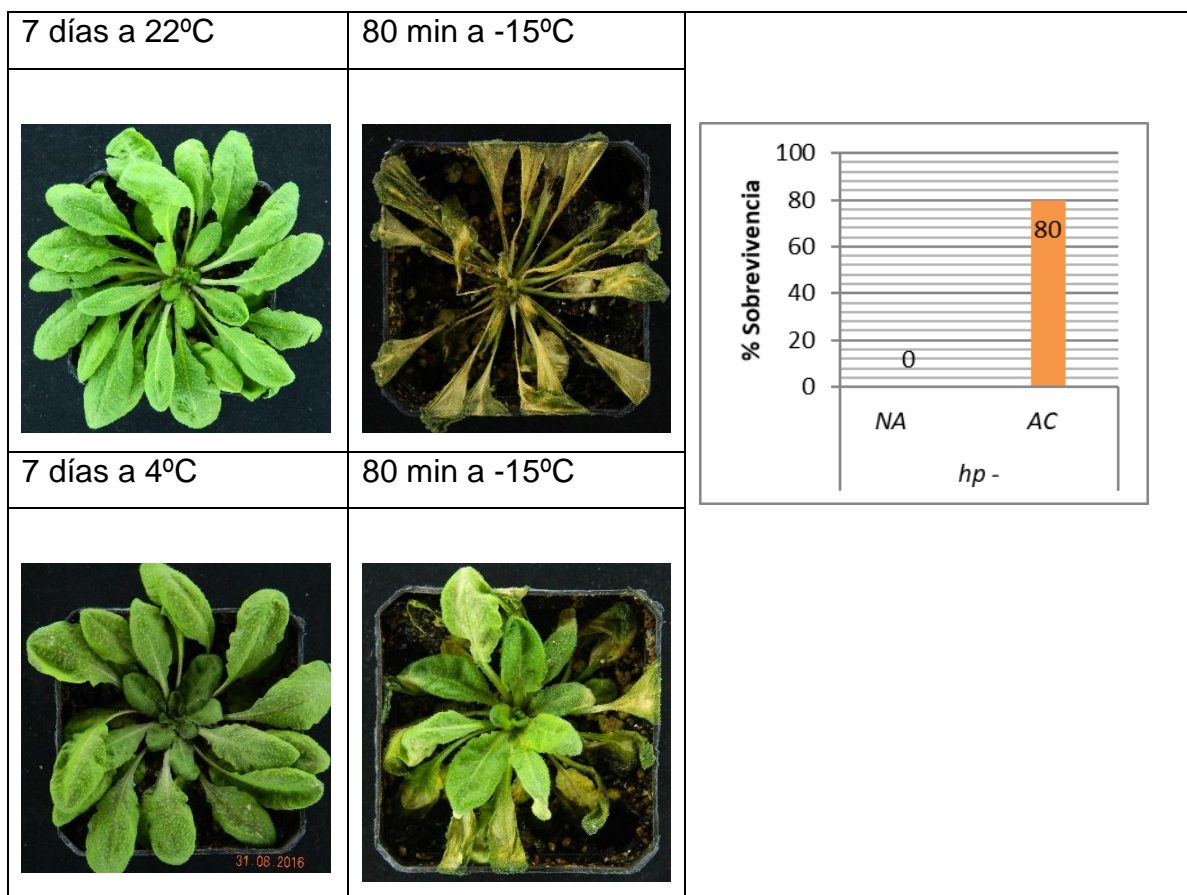


Figura 11. Capacidad de sobrevivencia de las plantas *hp*-NA y AC antes y después de una semana del reto de congelación a -15°C por 80 min. A) Fenotipos representativos. B) Porcentaje de sobrevivencia de los fenotipos de las plantas *hp*- de los tratamientos NA y AC, después de una semana del reto de congelación. Se tomó como el 100% quince plantas para cada tratamiento.

mpk3

La ausencia de la MPK3 en plantas NA tuvo como respuesta una sobrevivencia nula al exponerlas por 80 min a -15°C , mientras que las plantas AC como se muestra en la Figura 12A, mejoraron su capacidad de sobrevivencia de una manera notable (Figura 12B).

A)

B)

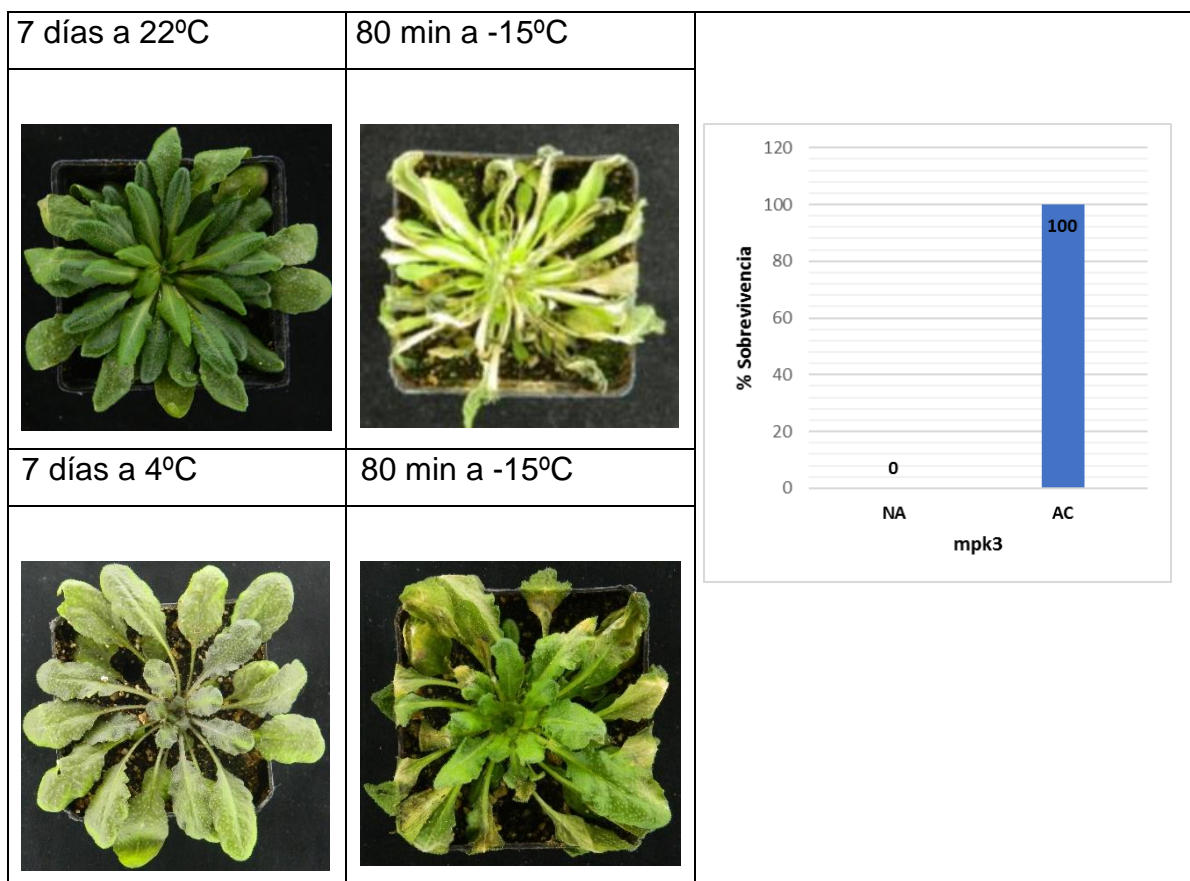


Figura 12. Capacidad de sobrevivencia de las plantas *mpk3* NA y AC antes y después de una semana del reto de congelación a -15°C por 80 min. A) Registro de fenotipos. B) Porcentaje de sobrevivencia de los fenotipos de las plantas *mpk3* de los tratamientos NA y AC, después de una semana del reto de congelación. Se tomó como el 100% quince plantas para cada tratamiento.

8.2 Plantas de genotipos que resisten temperaturas congelantes sin previa aclimatación

lcb2a-1

Los resultados mostraron cómo esta línea que carece de la subunidad LCB2a de la serina palmitoiltransferasa (SPT) (Dietrich et al., 2008), primera enzima en la síntesis de esfingolípidos, tiene la capacidad por sí misma de resistir temperaturas bajo cero. Como se presenta en la Figura 11A, las plantas no aclimatadas sobrevivieron. Sin embargo, la aclimatación en estas plantas aumentó en un 20% la sobrevivencia comparado con las plantas NA (Figura 13B).

A)

B)

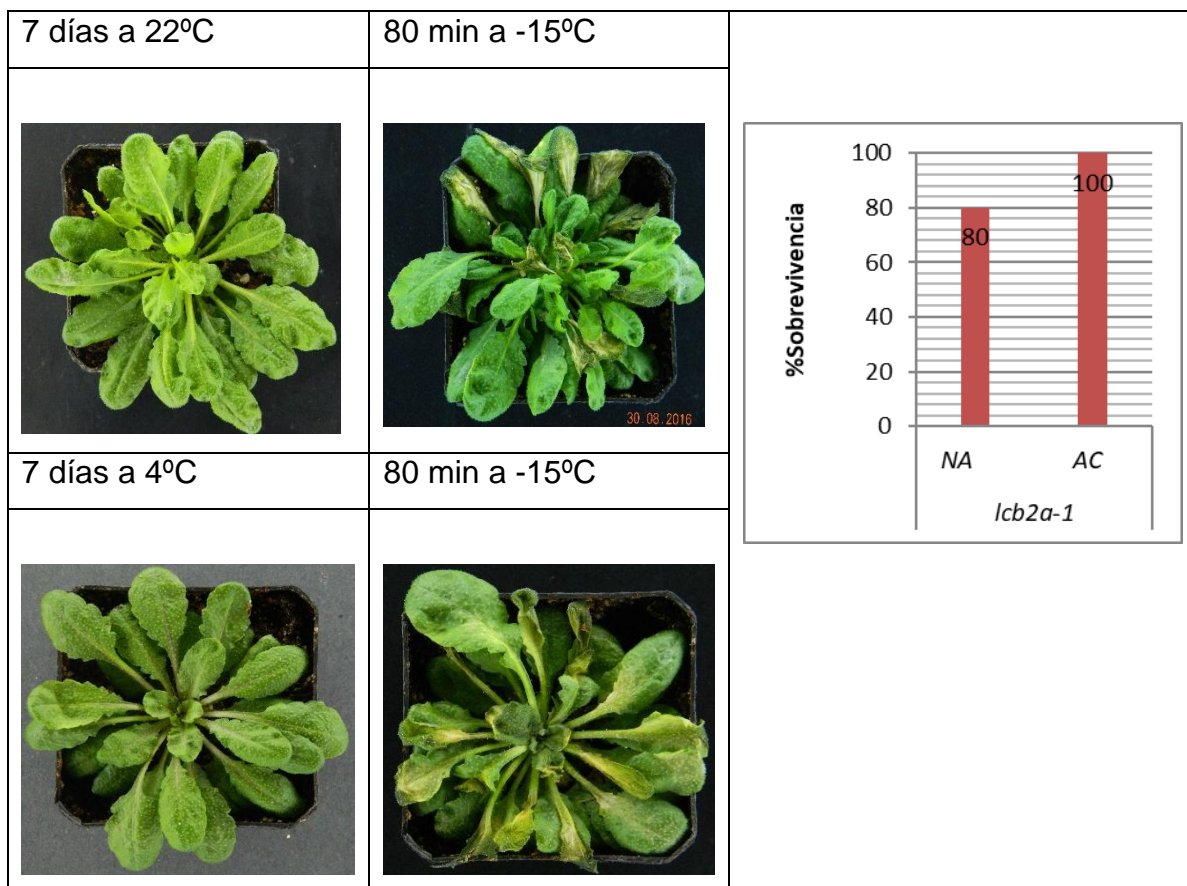


Figura 13. Capacidad de sobrevivencia de las plantas *lcb2a-1* NA y AC antes y después de una semana del reto de congelación a -15°C por 80 min. A) Fenotipos representativos. B) Porcentaje de sobrevivencia de los fenotipos de las plantas *lcb2a-1* de los tratamientos NA y AC, después de una semana del reto de congelación. Se tomó como el 100% quince plantas para cada tratamiento.

sld1 sld2

Esta línea presenta un menor contenido de BCL insaturadas que las wt. Las plantas AC sufrieron menor daño comparado con el tratamiento de NA, sin embargo, ambos lotes presentaron un fenotipo del 100% de sobrevivencia como se presenta en la Figura 14A, B.

A)

B)

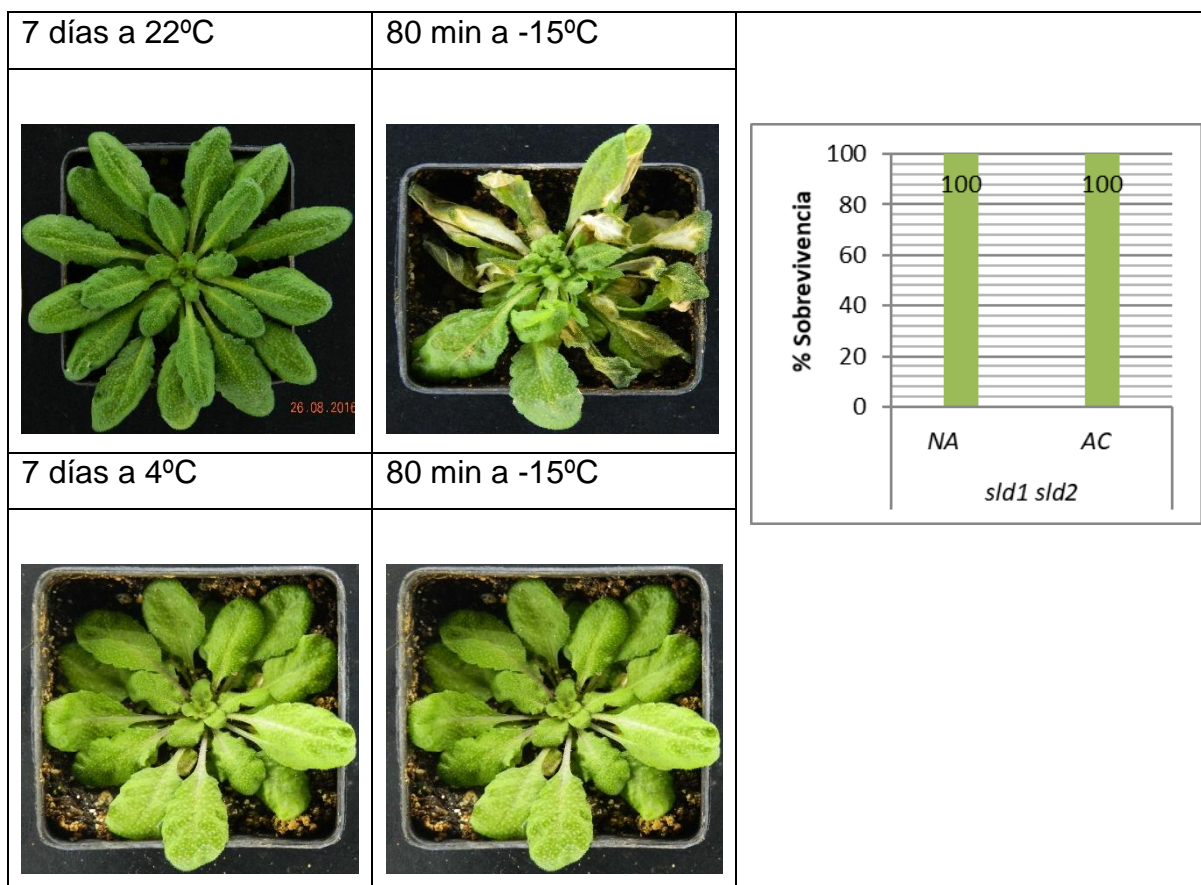


Figura 14. Capacidad de sobrevivencia de las plantas *sld1 sld2* NA y AC antes y después de una semana del reto de congelación a -15°C por 80 min. A) Fenotipos representativos. B) Porcentaje de sobrevivencia de los fenotipos de las plantas *sld1 sld2* de los tratamientos NA y AC, después de una semana del reto de congelación. Se tomó como el 100% quince plantas para cada tratamiento.

pfld18-18

El grupo *pfld18-18* NA una línea con menor contenidos de ERO en el cloroplasto. Sobrevivió al reto de congelación aun sin ser expuestas previamente a 4°C. De la misma manera, la aclimatación en este genotipo también logró una sobrevivencia del 100%. Por lo que la mutante fue capaz de sobrevivir por sí misma sin antes haber pasado por un periodo de aclimatación (Figura 15A, B).

A)

B)

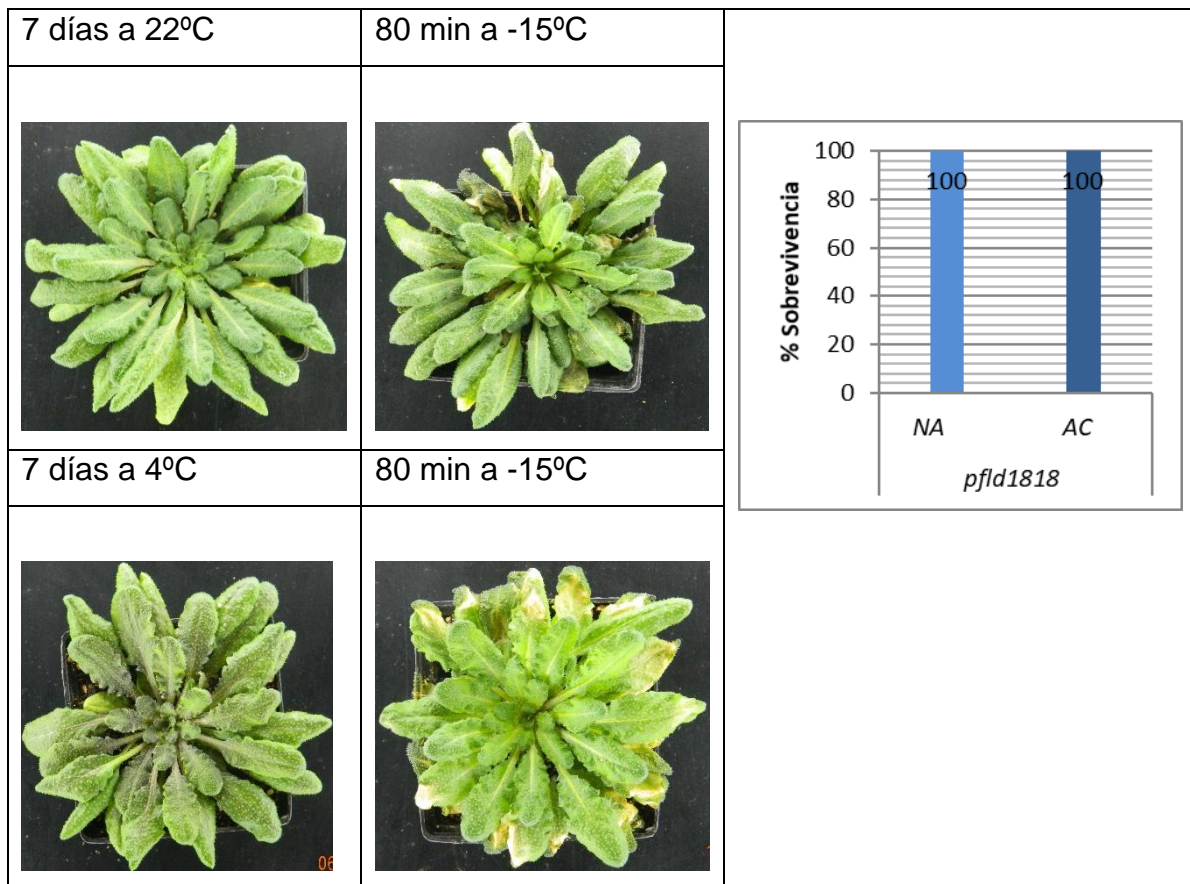


Figura 15. Capacidad de sobrevivencia de las plantas *pfld18-18* NA y AC antes y después de una semana del reto de congelación a -15°C por 80 min. A) Fenotipos representativos. B) Porcentaje de sobrevivencia de los fenotipos de las plantas *pfld18-18* de los tratamientos NA y AC, después de una semana del reto de congelación. Se tomó como el 100% quince plantas para cada tratamiento.

8.3 Plantas incapaces de aclimatarse

sbh1-1

Las plantas *sbh1-1*, con un menor contenido de BCL trihidroxiladas NA se recuperaron con un porcentaje del 40% de sobrevivencia después de someterlas a congelación. La aclimatación no favoreció la sobrevivencia, ya que del lote de AC solo sobrevivieron el 10% (Figura 16A, B).

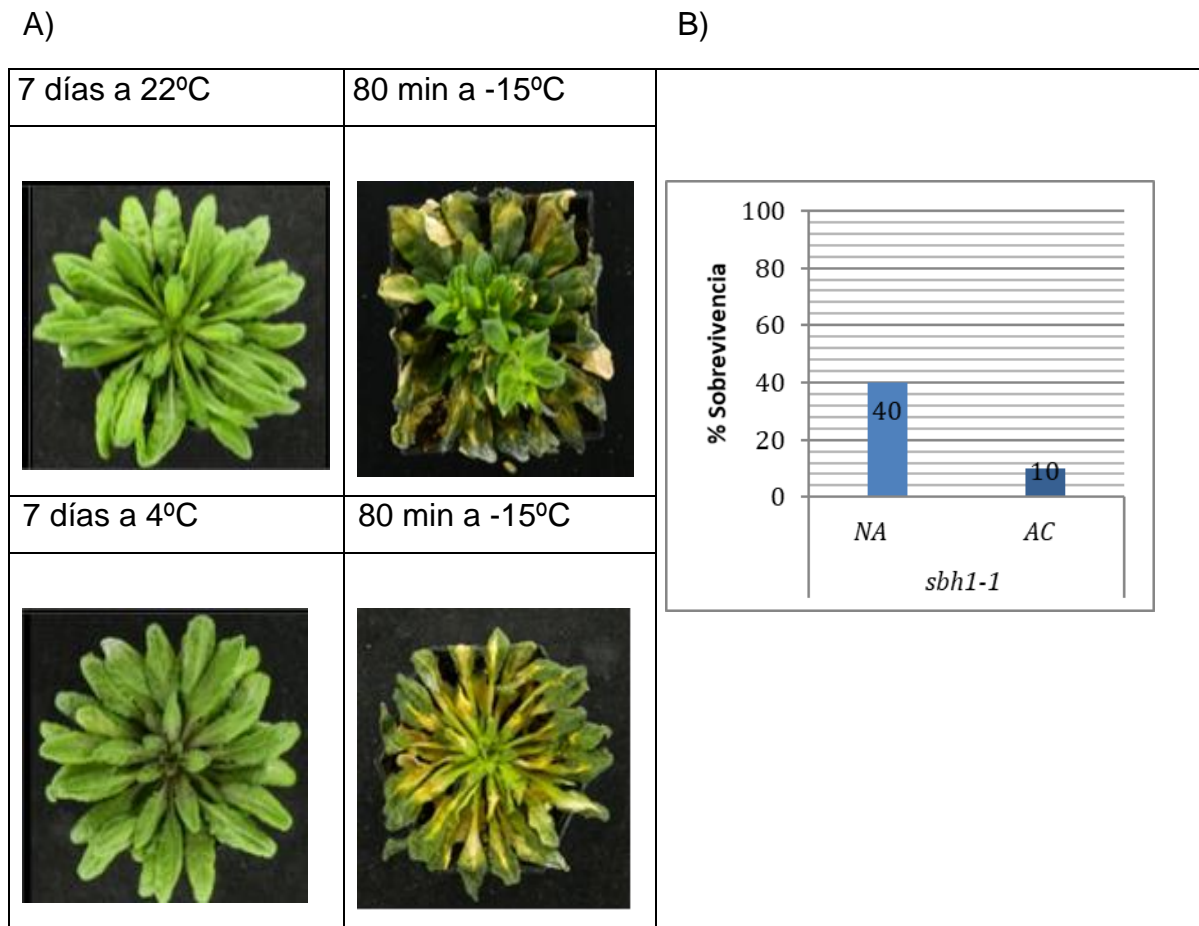


Figura 16. Capacidad de sobrevivencia de las plantas *lcb2a-1* NA y AC antes y después de una semana del reto de congelación a -15°C por 80 min. A) Fenotipos representativos. B) Porcentaje de sobrevivencia de los fenotipos de las plantas *lcb2a-1* de los tratamientos NA y AC, después de una semana del reto de congelación. Se tomó como el 100% quince plantas para cada tratamiento.

mpk6

En el caso de esta línea la cual carece de la MPK6, las plantas NA no sobrevivieron al reto de congelación pues se recuperó sólo el 40% después de someterlas a -15°C (Fig. 17A). La aclimatación no mejoró la capacidad de sobrevivencia de las plantas tal y como se muestra en la gráfica de la Fig. 17B. Por lo que se infiere que la MPK6 es un componente de la vía de transducción en la percepción de las bajas temperaturas.

A)

B)

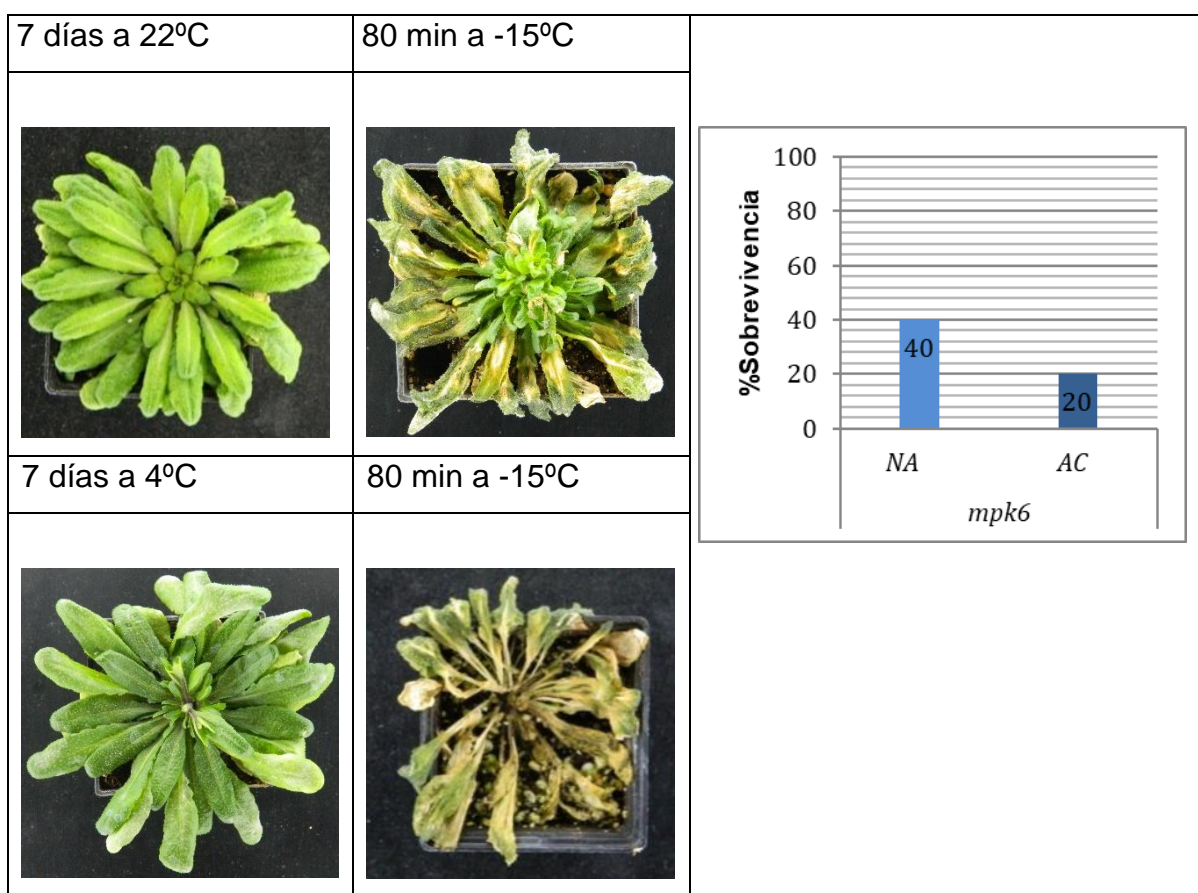


Figura 17. A) Capacidad de sobrevivencia de los fenotipos de las plantas *mpk6* NA y AC antes y después de una semana del reto de congelación a -15°C 80min. B) Porcentaje de sobrevivencia de los fenotipos de las plantas *mpk6* de los tratamientos NA y AC, después de una semana del reto de congelación. Se tomó como el 100% quince plantas para cada tratamiento.

8.4 Diagrama de procesamiento de datos

Con la determinación de la fluorescencia de la clorofila *a* se obtuvieron los datos para realizar las gráficas de OJIP y los parámetros de JIP que proporcionan información acerca del estado de los PSI y PSII. La Figura 18 muestra el diagrama de procesamiento de datos con las gráficas obtenidas a partir de las determinaciones de la clorofila *a*. Se presenta en recuadro rojo las correspondientes a 7 gráficas comparativas de OJIP, 7 gráficas comparativas de radar de los parámetros de JIP, 7 gráficas normalizadas de OJIP de F1-Fm y 7 gráficas normalizadas de OJIP de F1-F4, en todas se comparó *wt* NA y AC contra las líneas mutantes *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3 mpk6* y *pfl8-18* NA y AC. Para el tratamiento de datos se utilizó el programa PEA plus para hacer las gráficas de OJIP y de radar, los programas Biolyzer y Excel para realizar la normalización y Origin para graficar los valores normalizados.

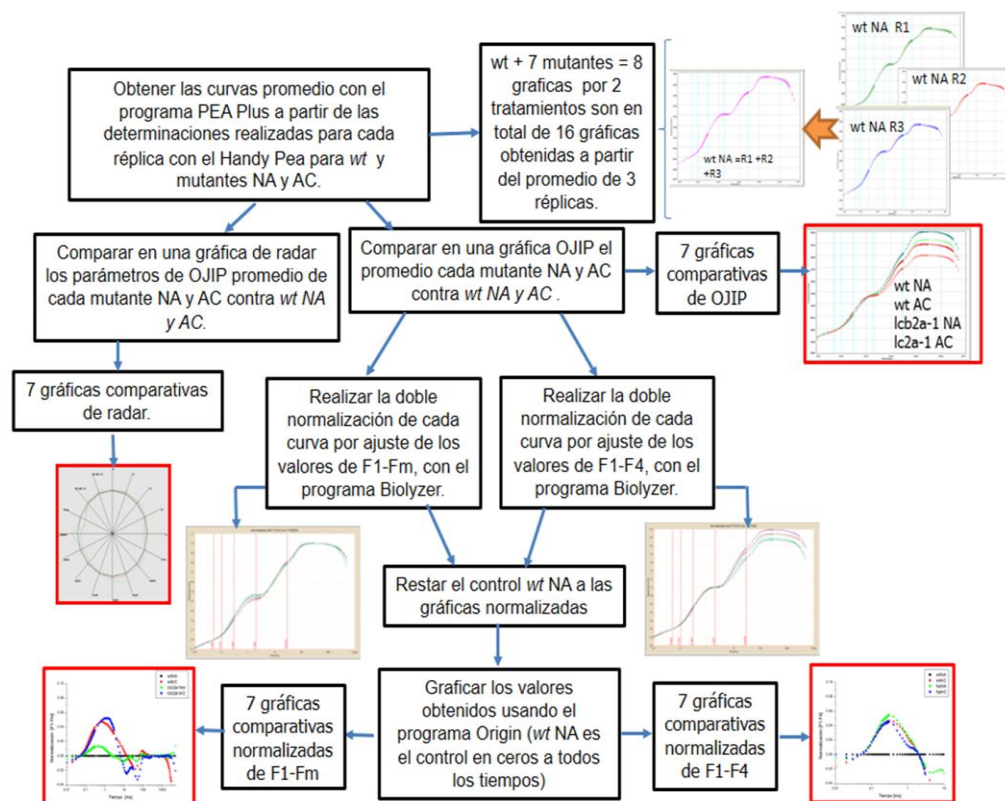


Figura 18. Diagrama de procesamiento de datos procesados de la fluorescencia de la clorofila *a* de plantas de *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt* y *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3 mpk6* y *pfl8-18* obtenidos con el instrumento Handy Pea.

8.5 Obtención de las curvas OJIP con el aparato Handy PEA.

Después de que la hoja permaneció en la oscuridad por cinco minutos se le incidió un rayo de luz actínica, de alta intensidad, en el área delimitada por la ventana de la pinza, obteniéndose las curvas denominadas OJIP, en las que está graficada la fluorescencia en función del tiempo de registro de la emisión de esa fluorescencia. Por ello, las curvas muestran un aumento gradual de la fluorescencia de la clorofila *a* al transcurrir el tiempo hasta llegar a un máximo de fluorescencia o la fase P de la curva. La Figura 19 presenta las curvas OJIP de la planta silvestres y mutantes estudiadas.

Como se observa en la gráfica de la Figura 19A, la fase de la fluorescencia máxima fue en donde se observó una mayor diferencia para los dos tratamientos aplicados a la *wt*. La *wt* AC mostró valores menores en esos tiempos en comparación con la *wt* NA.

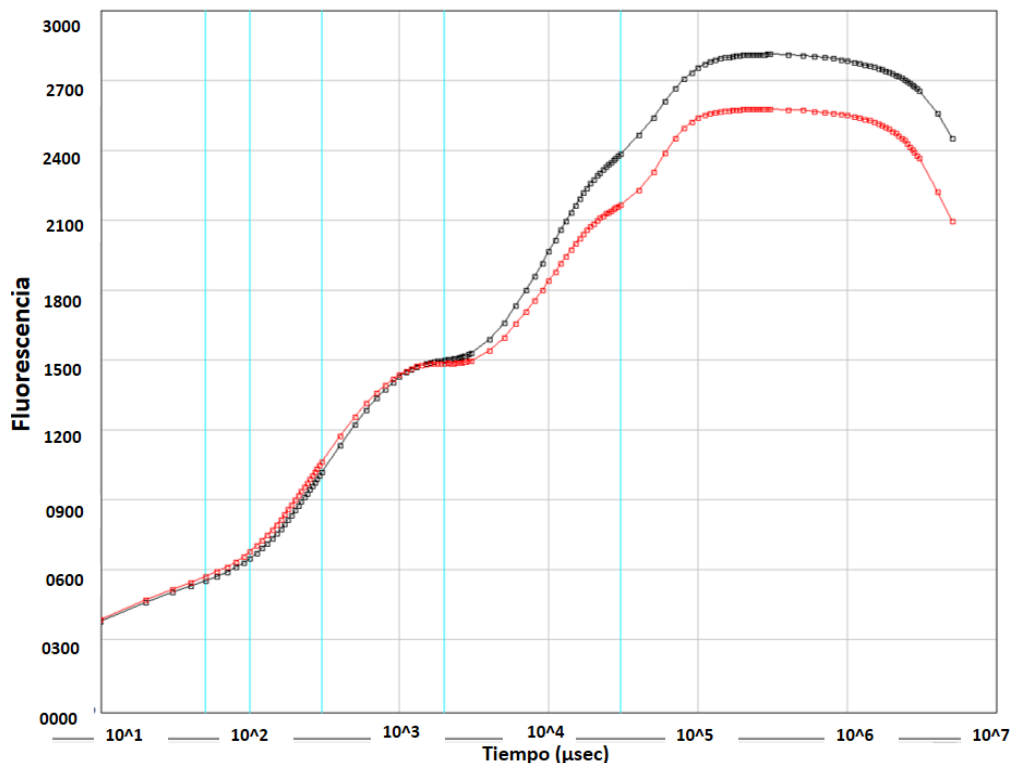
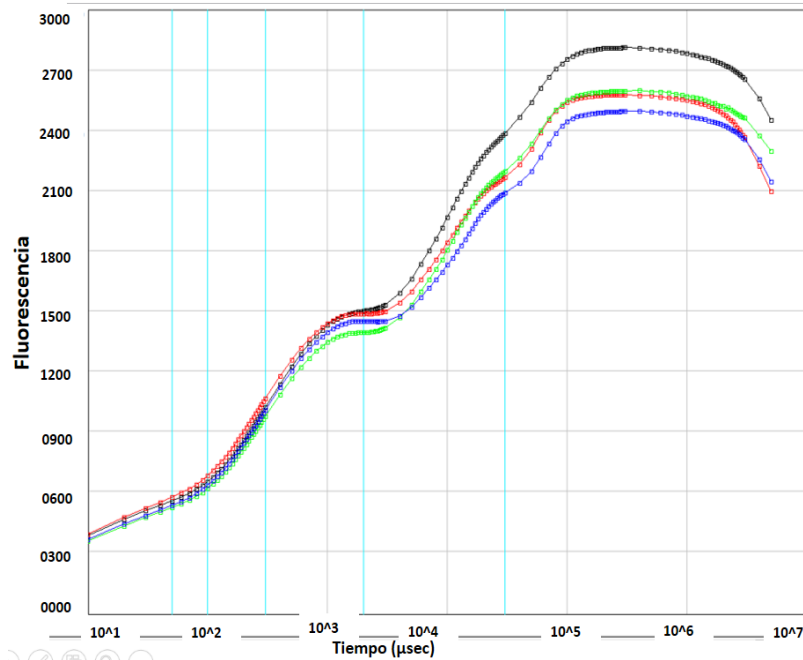


Figura 19A. Curvas OJIP promedio de plantas *wt* con los tratamientos NA (n=33) y AC (n=28). El promedio se obtuvo de las mediciones realizadas de los tres experimentos. El color negro representa la planta *wt* NA y la roja *wt* AC.

En cuanto a la gráfica de la Figura 19B se observó cómo los valores de la curva de la mutante *lcb2a-1* tanto NA como AC fueron menores a partir de la fase J. La *lcb2a-1* NA presentó un comportamiento idéntico al de la *wt* AC. Mientras que la *lcb2a-1* AC presentó valores menores al de *wt* AC. En cuanto a la línea *hp-* (Figura 19C), se observó una disminución en la fase P o fluorescencia máxima en sus dos tratamientos al comparar esa misma fase con la de la *wt* NA.

B) *lcb2a-1*



C) *hp-*

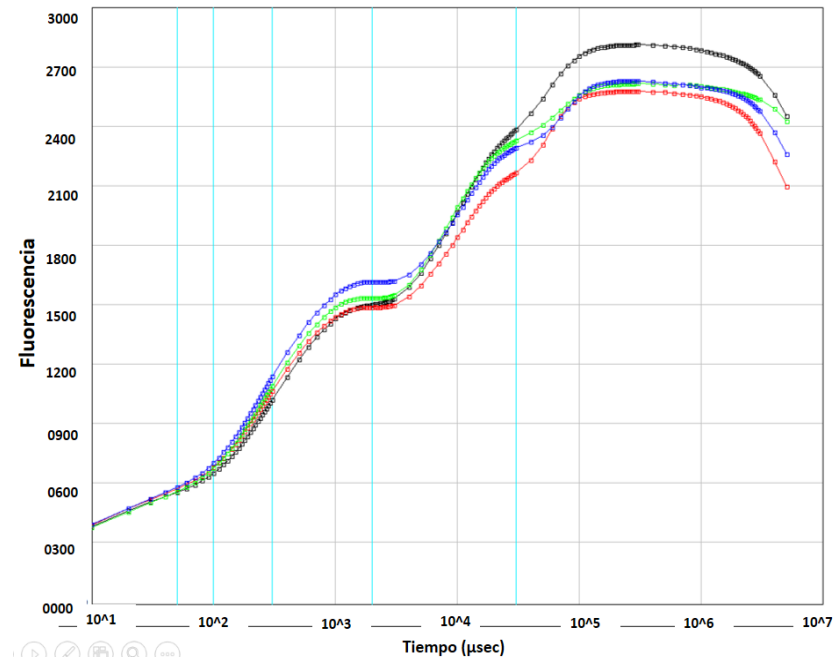


Figura 19. B) Curvas OJIP promedio de las plantas silvestres (*wt*) contra la mutante *lcb2a-1* bajo los tratamientos NA (n=20) y AC (n=22). C) Curvas OJIP promedio de la planta silvestre (*wt*) contra la mutante *hp-* bajo los tratamientos NA (n=16) y AC (n=13). El promedio se obtuvo de las mediciones realizadas de los tres experimentos realizados. El color negro representa la planta *wt* NA y la roja *wt* AC. El color verde y azul las mutantes NA y AC respectivamente.

La mutante *sbh1-1* presentó un patrón similar al del control donde NA es mayor a AC, pero ambos lotes con valores menores en comparación con *wt* NA y *wt* AC (Figura 19D). Para el caso de la línea *sld1 sld2* se observa que en sus dos tratamientos a partir de la fase I, los valores fueron menores en comparación con la *wt* NA. Se sigue el patrón del control donde la mutante AC fué menor en cuanto a sus valores al comparar con NA (Figura 19E).

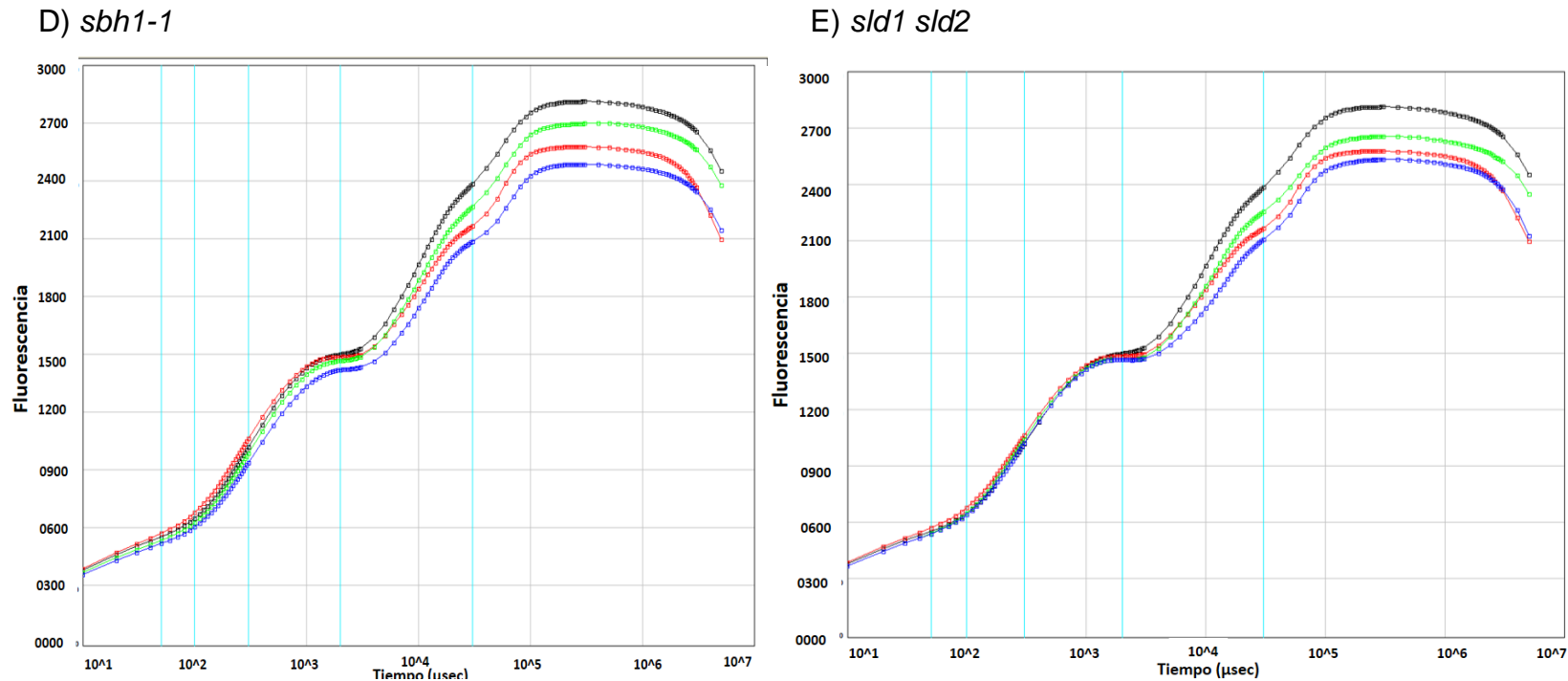
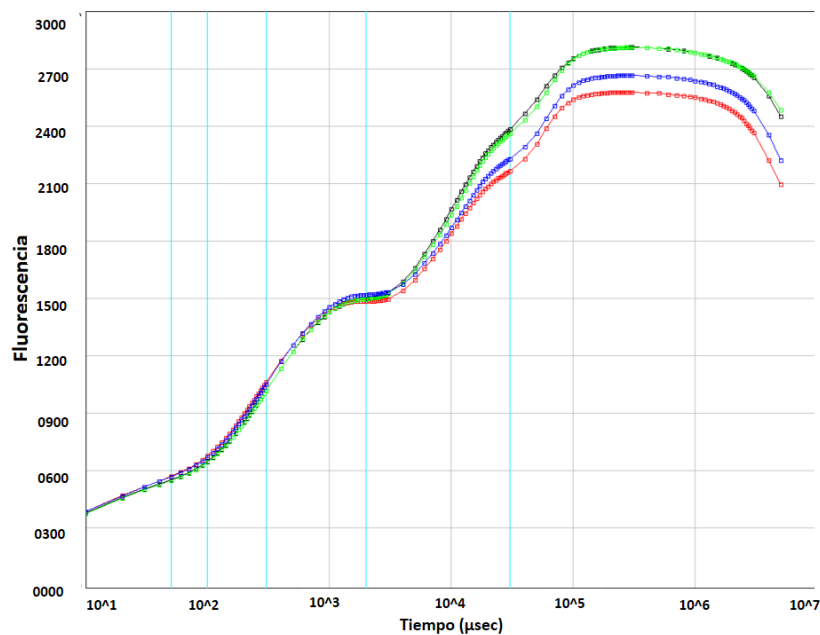


Figura 19. D) Curvas OJIP promedio de la planta silvestre (*wt*) contra la mutante *sbh1-1* bajo los tratamientos NA (n=49) y AC (n=21). E) Curvas OJIP promedio de la planta silvestre (*wt*) contra la mutante *sld1 sld2* bajo los tratamientos NA (n=21) y AC (n=20). El promedio se obtuvo de las mediciones realizadas de los tres experimentos realizados. El color negro representa la planta *wt* NA y la roja *wt* AC. El color verde y azul las mutantes NA y AC respectivamente.

En la línea *mpk3* NA el comportamiento fué idéntico a la *wt* NA a partir de la fase J. En cuanto a la *mpk3* AC, presentaron valores mayores a partir de la fase J, al compararla con *wt* AC (Figura 19F). La línea *mpk6* NA, mostró valores ligeramente menores al compararlos con *wt* NA a partir de la fase I. Mientras que la *mpk6* AC presentó valores mayores a partir de la fase I, en comparación con la *wt* AC (Figura 19G)

F) *mpk3*



G) *mpk6*

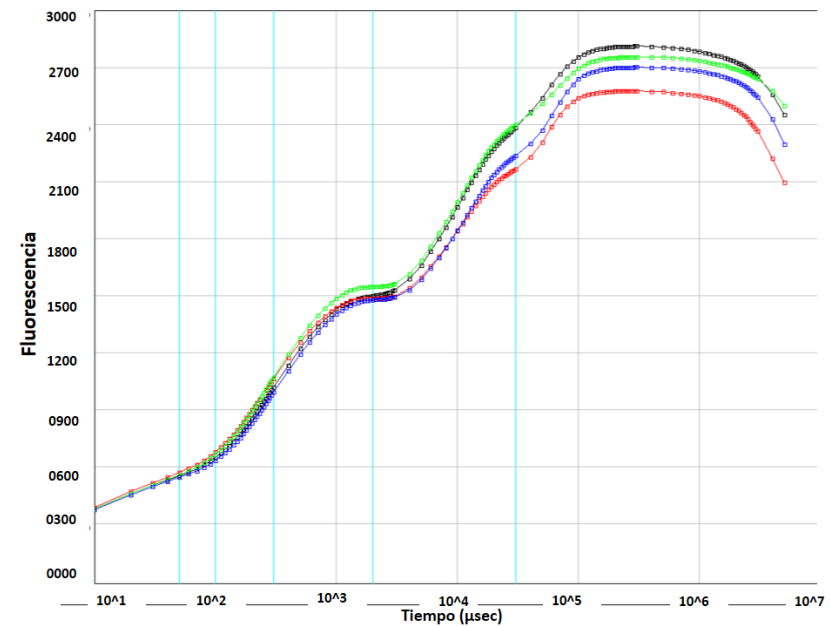


Figura 19. F) Curvas OJIP promedio de la planta silvestre (*wt*) contra la mutante *mpk3* bajo los tratamientos NA (n=29) y AC (n=33). G) Curvas OJIP promedio de la planta silvestre (*wt*) contra la mutante *mpk6* bajo los tratamientos NA (n=51) y AC (n=28). El promedio se obtuvo de las mediciones realizadas de los tres experimentos realizados. El color negro representa la planta *wt* NA y la roja *wt* AC. El color verde y azul las mutantes NA y AC respectivamente.

En el caso de la línea *pfl18-18* el comportamiento que presentó la mutante a partir de la fase J fue idéntico al compararlo del control *wt* ya sea NA o AC respectivamente (Figura 19H).

H) *pfl18-18*

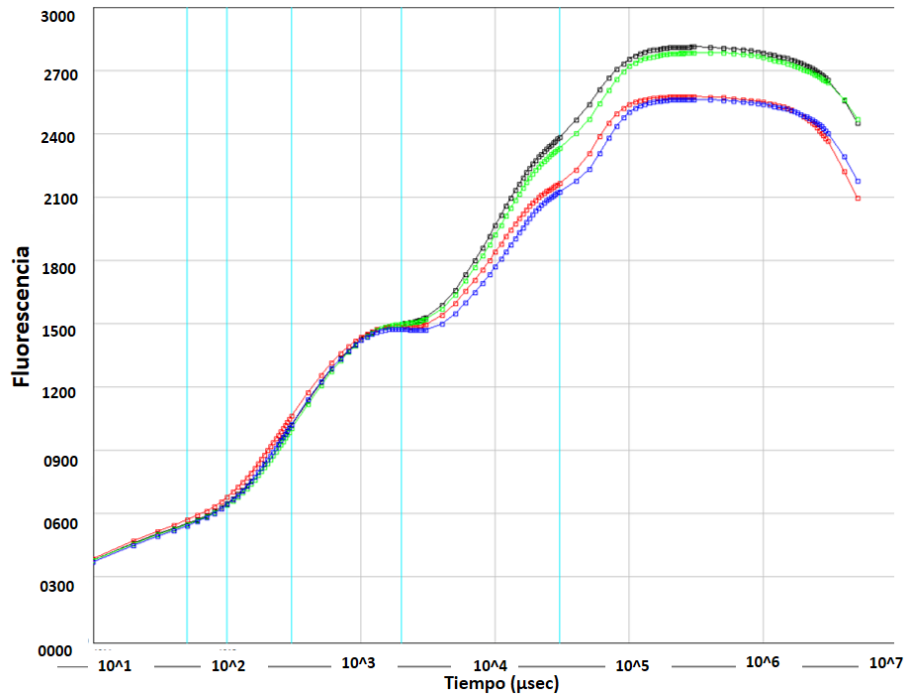


Figura 19H. Curvas OJIP promedio de la planta silvestre (*wt*) contra la mutante *pfl18-18* bajo los tratamientos NA (n=21) y AC (n=20). El promedio se obtuvo de las mediciones realizadas de los tres experimentos realizados. El color negro representa la planta *wt* NA y la roja *wt* AC. El color verde y azul las mutantes NA y AC respectivamente.

Las gráficas OJIP nos permiten obtener una imagen visual de las diferencias en la emisión de la fluorescencia respecto al tiempo entre las diferentes mutantes y el control, sin embargo, para poder establecer si hay una diferencia significativa entre el control, las mutantes y sus tratamientos, se copiaron los valores de la fluorescencia a los diferentes tiempos que conforman las gráficas OJIP, se tabularon y se obtuvieron los promedios y el error estándar de varias réplicas (ver la n respectiva para cada experimento). Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 2. Debido a que era difícil observar si había diferencia significativa entre los valores de la Tabla 2, se procedió a realizar gráficas de barras de cada una de las fases temporales en las diferentes mutantes, además se realizaron ANOVAS con $\alpha=0.05$ de significancia, comparando los dos tratamientos de la mutante y el control.

Se puede ver en la Figura 20 el promedio de los tiempos F1-Fm de los datos obtenidos de la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* con el instrumento Handy Pea de las plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt* y *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3 mpk6* y *pfld8-18*, los cuales provienen de cada una de las réplicas realizadas. Se observa un aumento gradual en la fluorescencia de la clorofila *a* respecto al tiempo en todas las mutantes.

Tabla 2. Promedios de la fluorescencia de la clorofila *a* de plantas *Arabidopsis thaliana* de los genotipos *wt* y *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3 mpk6* y *pfld8-18* a los tiempos F0=0 μ s, F1=10 μ s, F2=50 μ s, F3=100 μ s, F4=300 μ s, F5=2 ms y Fm=30ms, obtenidos con la ayuda del programa Excel de Microsoft Corp. Se presenta \pm Error estándar. El asterisco * muestra que hay diferencia significativa entre las plantas NA y AC del genotipo indicado de acuerdo a un valor de $\alpha=0.05$ y la X que hay diferencia significativa de la planta mutante NA respecto al control wt NA.

Planta	F0	F1	F2	F3	F4	F5	Fm
<i>wt NA</i>	466.45 \pm 7.35	569.70 \pm 7.60	665.97 \pm 8.96	1033.73 \pm 17.94	1511.67 \pm 23.37	2391.06 \pm 23.99	2818.00 \pm 35.09
<i>wt AC</i>	473.50 \pm 10.87	586.75 \pm 14.75	695.57 \pm 19.57	1078.07 \pm 32.26	1498.54 \pm 37.21	2174.86 \pm 53.31*	2583.29 \pm 62.95*
<i>lcb2a-1 NA</i>	431.50 \pm 5.62	534.40 \pm 7.57	630.85 \pm 10.26	987.70 \pm 18.41	1404.60 \pm 21.17	2203.90 \pm 37.66 x	2605.50 \pm 38.83 x
<i>lcb2a-1 AC</i>	439.18 \pm 6.10	545.68 \pm 7.49	646.36 \pm 9.34	1018.68 \pm 14.13	1460.86 \pm 18.20	2096.18 \pm 24.30*	2502.50 \pm 34.44
<i>hp- NA</i>	449.06 \pm 6.13	572.25 \pm 9.20	689.81 \pm 13.10	1104.69 \pm 23.86	1545.38 \pm 30.04	2334.38 \pm 38.79	2626.81 \pm 47.67
<i>hp- AC</i>	464.64 \pm 10.84	594.08 \pm 12.55	717.57 \pm 14.62	1149.36 \pm 19.92	1626.29 \pm 19.72	2298.07 \pm 22.04	2634.69 \pm 28.93
<i>sbh1-1 NA</i>	451.55 \pm 5.45	550.63 \pm 7.39	642.78 \pm 9.32	1001.39 \pm 17.66	1478.51 \pm 25.50	2274.45 \pm 29.22	2707.55 \pm 30.97
<i>sbh1-1 AC</i>	442.05 \pm 7.91	534.23 \pm 10.75	620.51 \pm 13.77	952.82 \pm 24.40	1431.74 \pm 30.97	2093.67 \pm 45.77*	2494.37 \pm 57.18*
<i>sld1 sld2 NA</i>	442.71 \pm 7.16	555.60 \pm 7.40	665.38 \pm 8.51	1055.00 \pm 16.05	1478.10 \pm 16.55	2263.62 \pm 22.35 x	2663.05 \pm 30.06 x
<i>sld1 sld2 AC</i>	447.85 \pm 16	555.60 \pm 7.40	657.70 \pm 8.57	1036.95 \pm 15.16	1478.60 \pm 24.86	2114.35 \pm 24.86	2536.11 \pm 37.33*
<i>mpk3 NA</i>	460.24 \pm 7.19	564.55 \pm 9.51	662.17 \pm 12.20	1032.79 \pm 18.93	1509.86 \pm 19.28	2369.41 \pm 28.80	2817.45 \pm 33.94
<i>mpk3 AC</i>	473.21 \pm 9.11	582.88 \pm 13.02	687.64 \pm 17.81	1067.39 \pm 28.60	1531.70 \pm 24.57	2237.94 \pm 42.91*	2670.88 \pm 49.18*
<i>mpk6 NA</i>	457.75 \pm 4.09	573.61 \pm 5.19	681.67 \pm 7.36	1084.69 \pm 14.80	1559.08 \pm 15.38	2406.61 \pm 24.52	2764.73 \pm 29.56
<i>mpk6 AC</i>	463.07 \pm 8.33	560.89 \pm 10.76	651.46 \pm 13.81	1005.61 \pm 25.81	1490.93 \pm 30.28	2242.92 \pm 39.57	2707.53 \pm 35.09
<i>pfld18-18 NA</i>	465.95 \pm 4.54	565.19 \pm 5.80	656.95 \pm 7.69	1016.38 \pm 14.36	1511.00 \pm 16.60	2341.62 \pm 36.85	2792.42 \pm 43.21
<i>pfld18-18 AC</i>	450.57 \pm 6.83	558.17 \pm 8.87	659.65 \pm 11.50	1038.57 \pm 19.58	1486.22 \pm 19.33	2134.22 \pm 23.94*	2570.45 \pm 26.80

Lo que destaca en las gráficas de barras y las ANOVAS realizadas es que no hay diferencia significativa entre el control, las mutantes y sus tratamientos en los primeros tiempos, es decir, del tiempo F0 a F4 no hubo diferencias significativas (correspondientes a las fases **OJ**). Por otra parte, en las fases **IP** a los tiempos F5 y Fm ya se presentaron diferencias significativas (Figura 20).

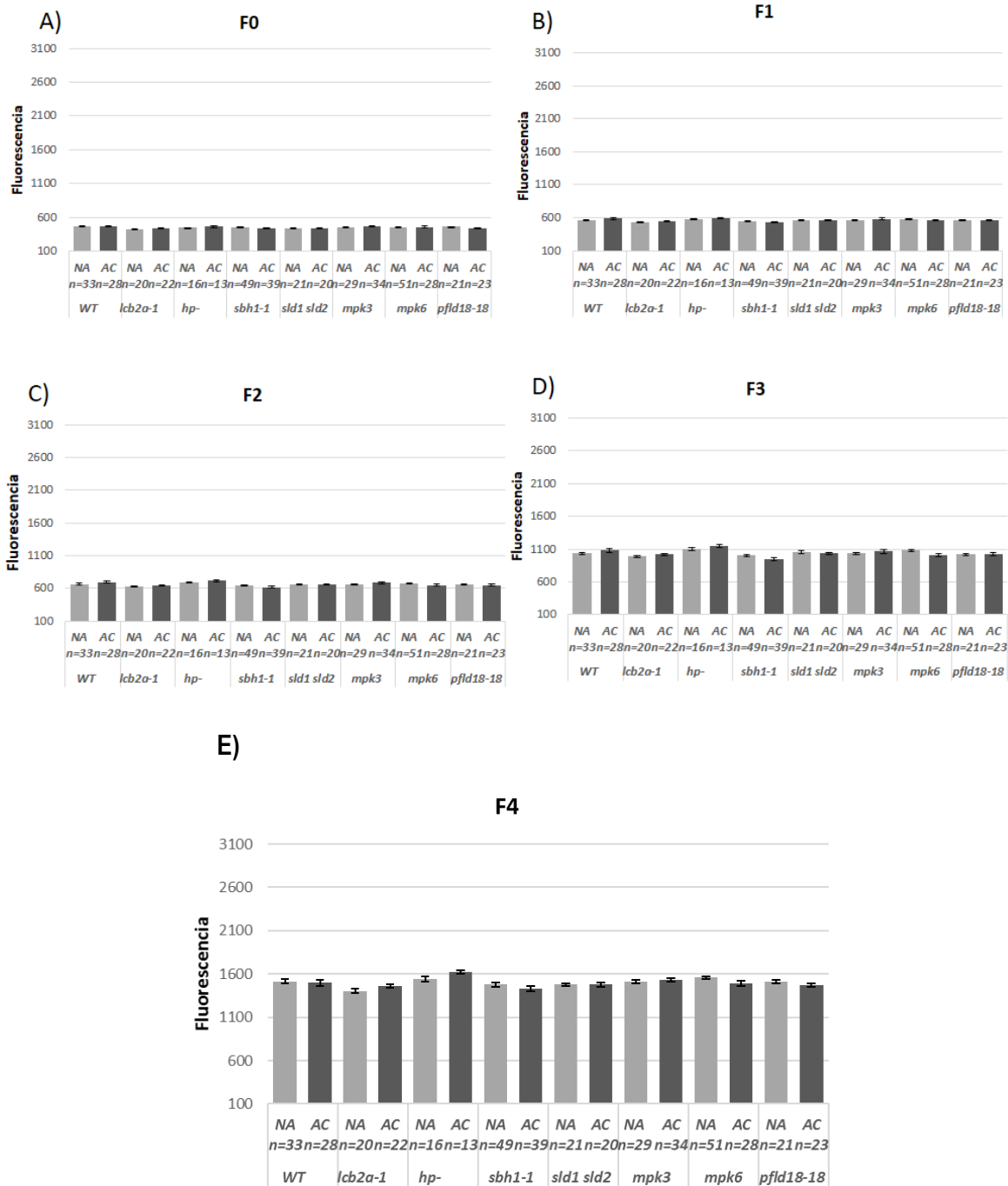


Figura 20. Emisión de la fluorescencia de la clorofila a de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2 α -1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid18-18* a los tiempos A) F0=0 μ s, B) F1=10 μ s, C) F2=50 μ s, D) F3=100 μ s, E) F4=300 μ s. Se indica el número de determinaciones para cada genotipo/tratamiento (n). Se presentan todas las gráficas bajo la misma escala para poder comparar las magnitudes. Se aplicó la prueba ANOVA en todos los casos pero no hubo diferencia significativa entre genotipos o tratamientos $\alpha=0.05$.

La Figura 20F presenta los valores de la fluorescencia obtenidos en el tiempo F5. Se observa que hubo diferencia significativa entre el control *wt* NA y AC con una disminución de la fluorescencia en el tratamiento de AC. De modo similar las líneas mutantes *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid18-18* tuvieron el mismo patrón de *wt*, la mutante *hp-* no presentó diferencia significativa entre sus tratamientos. Por otra parte, los valores de fluorescencia del tratamiento NA de las mutantes *lcb2a-1* y *sld1 sld2* fueron significativamente menores respecto al control *wt* NA.

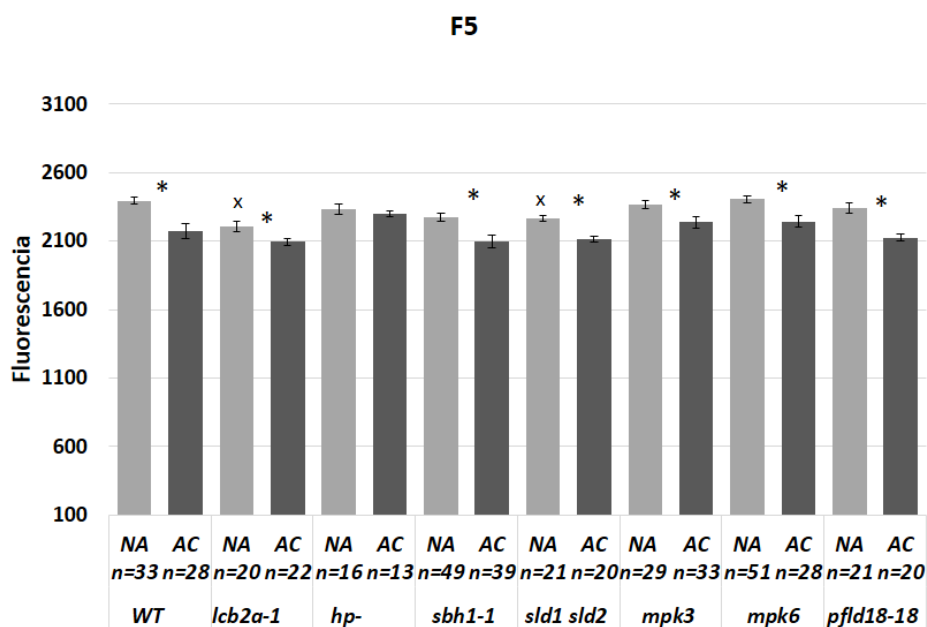


Figura 20F. Emisión de la fluorescencia de la clorofila a de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid18-18* a F5=2 ms. Se presentan todas las gráficas bajo la misma escala para poder comparar las magnitudes. Se indica el número de determinaciones para cada genotipo/tratamiento (n). El asterisco * muestra que hay diferencia significativa entre las plantas AC y NA del genotipo indicado de acuerdo a un valor de $\alpha=0.05$ y la X que hay diferencia significativa de la planta mutante NA respecto al control *wt* NA.

La Figura 20G presenta los valores de la fluorescencia obtenidos en el tiempo Fm. Se observa que hubo diferencia significativa entre el control *wt* NA y AC con una disminución de la fluorescencia en el tratamiento de AC. De modo similar las líneas mutantes *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *pfd18-18* tuvieron el mismo patrón de *wt*. Las mutantes *lcb2a-1*, *hp-* y *mpk6* no presentaron diferencia significativa entre sus tratamientos. Por otra parte, los valores de fluorescencia del tratamiento NA de las mutantes *lcb2a-1* y *sld1 sld2* presentaron valores significativamente menores respecto al control *wt* NA.

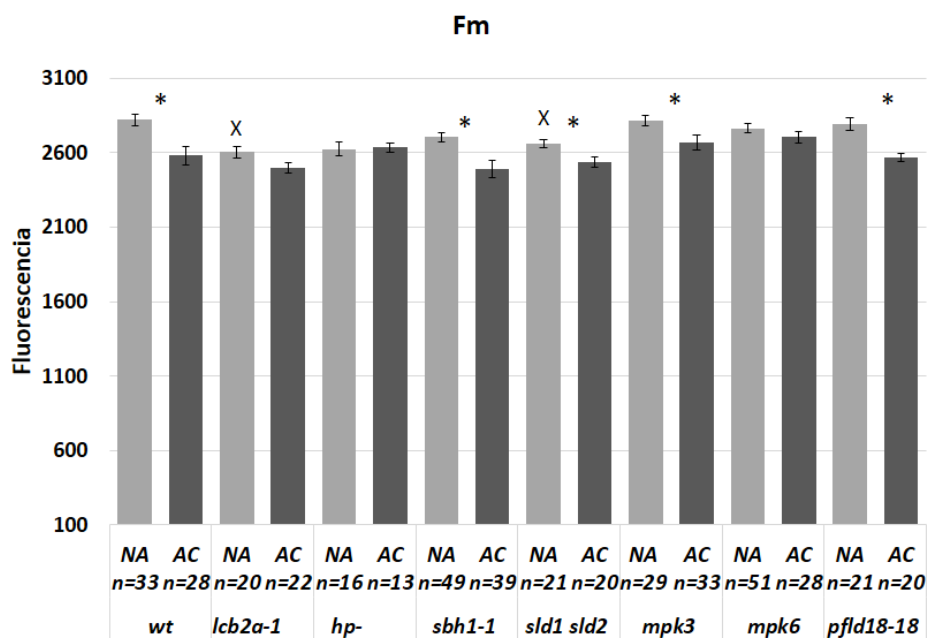


Figura 20G. Emisión de la fluorescencia de la clorofila a de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pfd8-18* a Fm=30ms. Se presentan todas las gráficas bajo la misma escala para poder comparar las magnitudes. Se indica el número de determinaciones para cada genotipo/tratamiento (n). El asterisco * muestra que hay diferencia significativa entre las plantas AC y NA del genotipo indicado de acuerdo a un valor de $\alpha=0.05$ y la X que hay diferencia significativa de la planta mutante respecto al control *wt*.

8.6 Normalizaciones

Como se describió anteriormente en Materiales y Métodos, las curvas obtenidas con el aparato Handy PEA fueron tratadas también con los programas Biolyzer y Origin, con el objetivo de normalizarlas y observar las diferencias de la fluorescencia de la clorofila *a* a los distintos tiempos entre las mutantes y el control *wt* NA y AC. La normalización consistió en la resta del control *wt* NA a los valores obtenidos de las mutantes y sus tratamientos. Cabe señalar que, aunque se observan diferencias en las gráficas normalizadas, las diferencias no resultaron significativas, como se observó anteriormente en las gráficas de barras. Esto se debe a que, en las gráficas normalizadas, debido a la apertura de la escala, se exageran las pequeñas diferencias.

La Figura 21 presenta la normalización de F1-Fm, es decir la comparación de cada mutante con respecto a la silvestre NA en todos los tiempos. Análogamente, la Figura 22 muestra otra normalización, esta vez, la de F1-F4.

8.6.a Normalización F1-Fm

La Figura 21B, C, D presenta los valores de F1-Fm de las mutantes cuya modificación genética radica en cambios en la cantidad de esfingolípidos y sometidas a los tratamientos NA y AC. El tratamiento AC estuvo por arriba del control *wt* NA hasta el tiempo de los 6 ms; posteriormente hubo una disminución de los valores hasta ser parecidos a los valores de *wt* NA.

En el caso de la mutante *mpk3* NA, la gráfica fue similar a el control *wt* NA hasta el tiempo de los 4 ms como se observa en la gráfica 21E, mientras que la *mpk3* AC presentó valores mayores en comparación con *wt* NA, pero fue similar a la gráfica de *wt* AC a lo largo de todos los tiempos graficados.

Para la mutante *mpk6* NA, como se presenta en la gráfica 21F, el comportamiento fue más parecido al control *wt* AC hasta el tiempo de 3 ms, mientras que la *mpk6* AC fue similar a la *wt* NA hasta el tiempo de 0.3 ms.

En el caso de la línea *pfl18-18* NA, el comportamiento fue similar al del control *wt* NA hasta el tiempo de los 6 ms tal y como se ve en la gráfica 21G. Para la *pfl18-*

18 AC, el comportamiento fue similar al de la *wt* AC durante todos los tiempos evaluados en la gráfica.

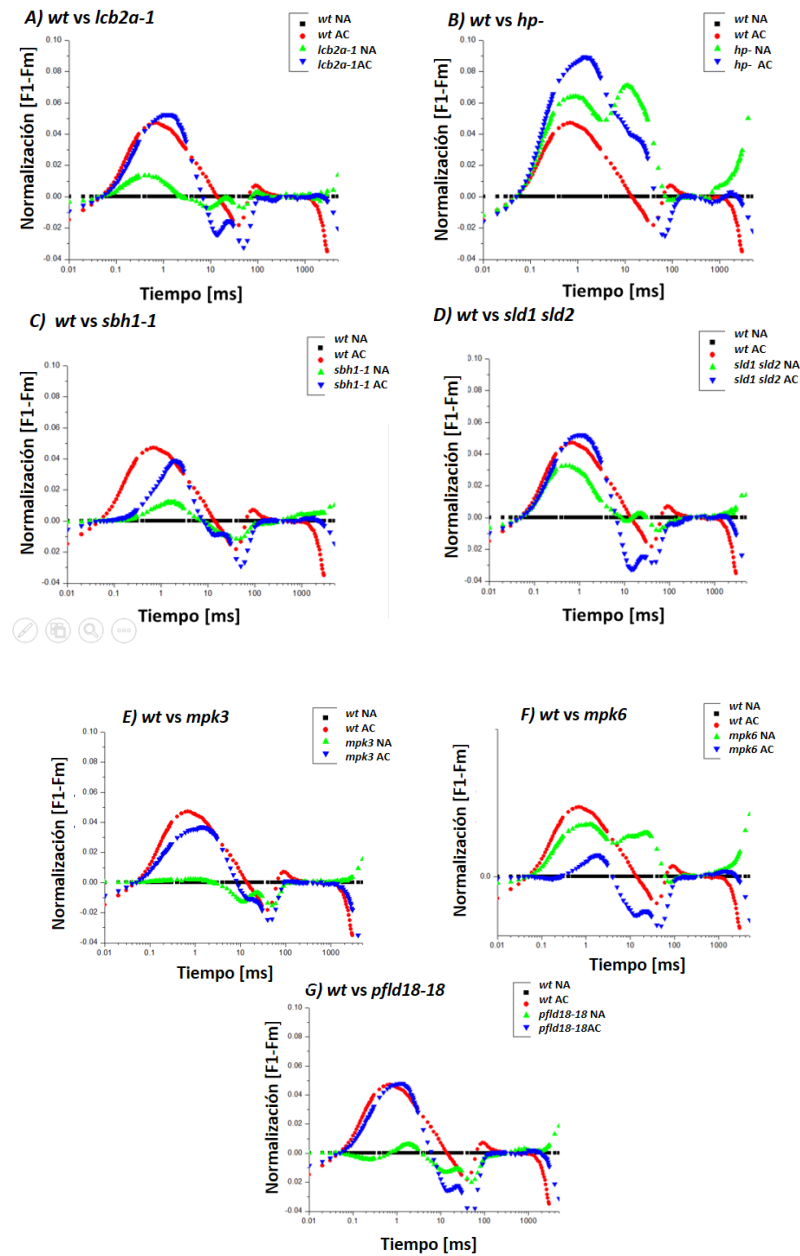
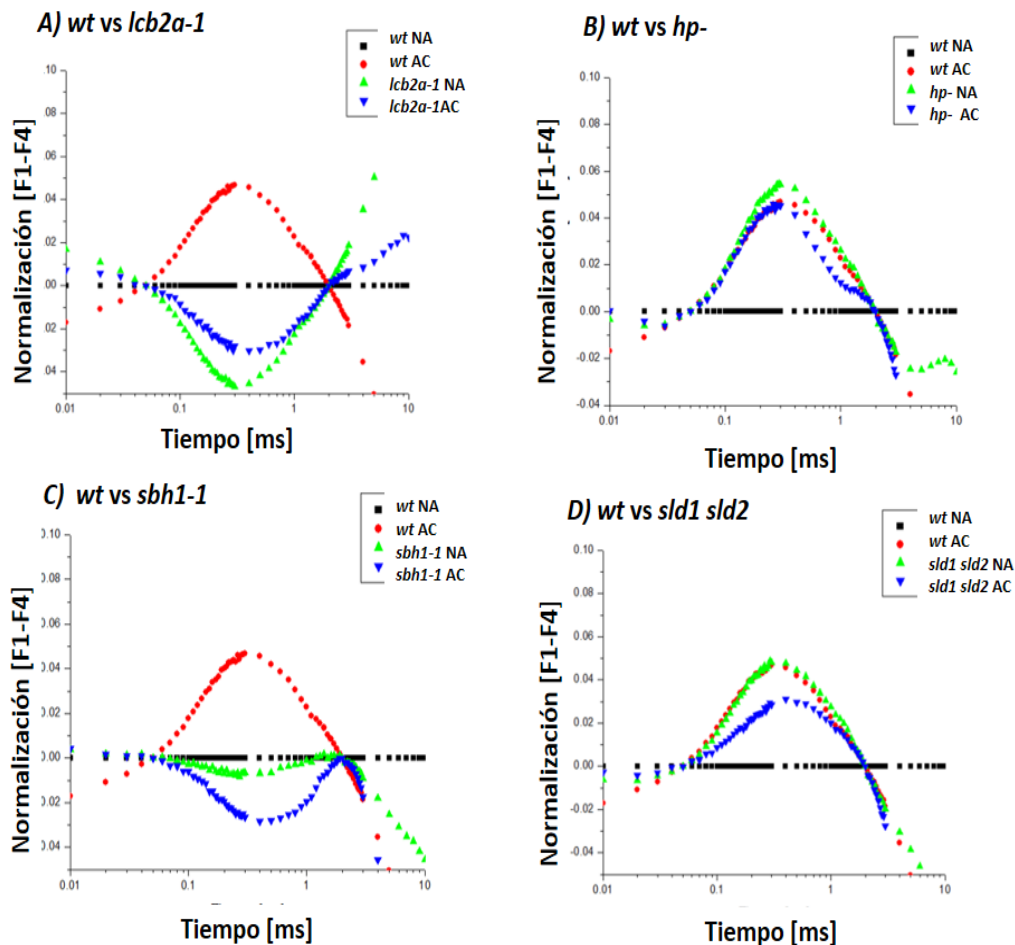


Figura 21. Gráficas normalizadas de F1-Fm de plantas control (WT) y las 7 líneas mutantes en condiciones NA y AC. A) *lcb2a-1*. B) *hp-*. C) *sbh1-1*. D) *sls1sls2*. E) *mpk3*. F) *mpk6*. G) *pfls18-18*. Las gráficas se realizaron con los programas Biolyzer y Origin. La línea negra representa el control *wt* NA, la roja *wt* AC, la verde es la mutante NA y la azul la mutante AC, según el caso.

8.6.b Normalización F1-F4

La Figura 22 revela que los valores normalizados y graficados de F1-F4 de la mutante *lcb2a-1* tanto NA y AC, se encontraron debajo de los valores del control *wt* NA, patrón que también presentó la mutante *sbh1-1* (Fig. 22C). Por otro lado, la mutante *hp-* NA y AC (Fig. 22 B) al igual que *sld1 sld2* NA y AC (Fig. 22D) presentan valores más cercanos a *wt* AC, mientras que en la mutante *mpk3* NA y AC (Fig. 22E) los valores obtenidos fueron muy cercanos a *wt* NA. Por último, los lotes de las mutantes *mpk6* (Fig. 22F) y *pfd18-18* AC (Fig. 22G) estuvieron por debajo del control *wt* NA. Aunque *mpk3* NA fue similar al control, *pfd18-18* fue superior a este.



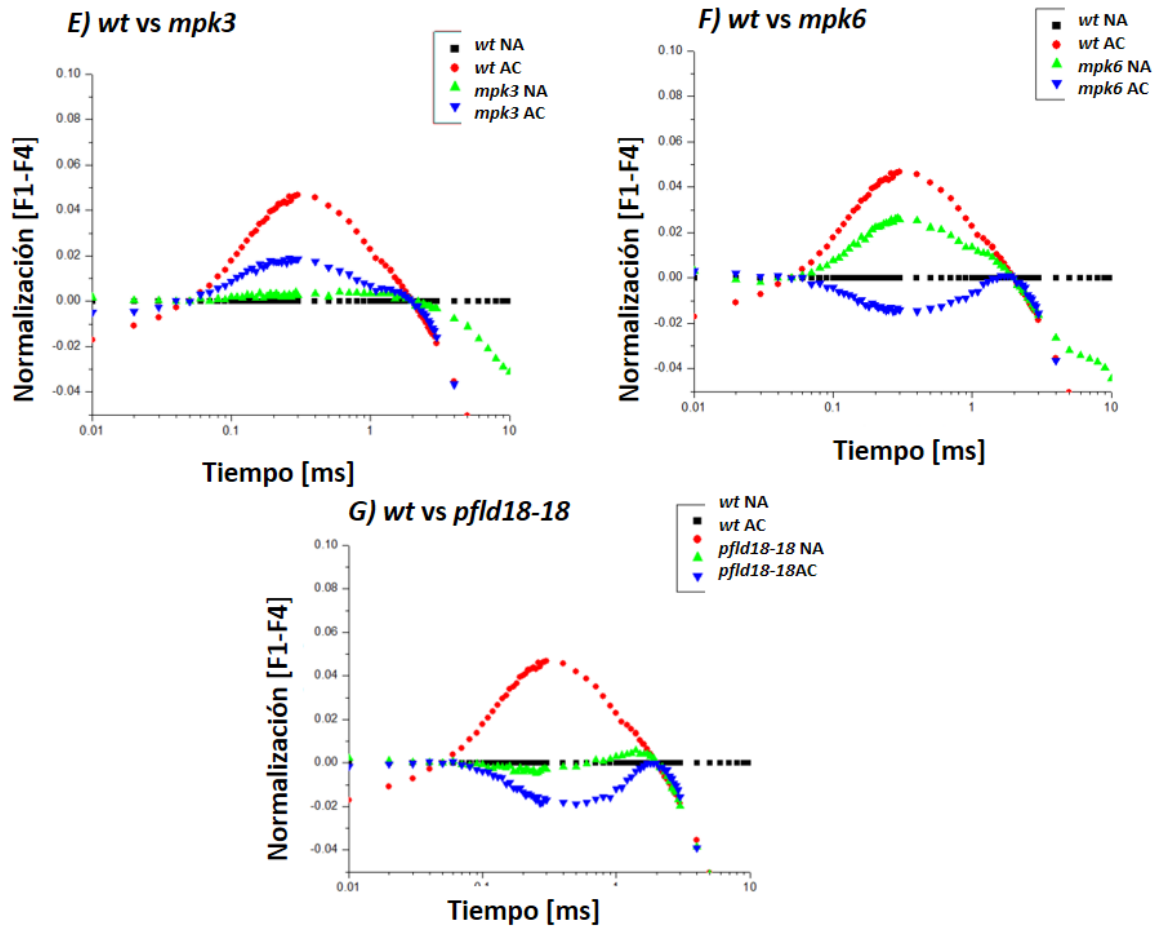


Figura 22. Gráficas normalizadas de F1-F4 de plantas control (WT) y las 7 líneas mutantes en condiciones NA y AC. A) *lcb2a-1*. B) *hp-*. C) *sbh1-1*. D) *sld1sld2*. E) *mpk3*. F) *mpk6*. G) *pfd18-18*. Las gráficas se realizaron con los programas Biolyzer y Origin. La línea negra representa el control *wt* NA, la roja *wt* AC, la verde es la mutante NA y la azul la mutante AC, según el caso.

8.7 Parámetros de JIP representados en gráficas de radar

El programa de Pea Plus que acompaña al aparato de determinación de las curvas de OJIP permite representar los valores de los parámetros fotosintéticos sin indicar los números en la gráfica. Estos parámetros de JIP de todas las líneas mutantes estudiadas se presentan en gráficas de radar (Figura 23), en donde los valores se comparan con el control *wt* NA. Este último es el valor de referencia que queda dibujado como el círculo negro que estandariza los valores de cada parámetro en 1. Los valores de las líneas mutantes o de los tratamientos se dibujan en un círculo de otro color en donde cualquier aumento o disminución en el parámetro, se indica como un punto de desviación hacia afuera (aumento) o hacia adentro (disminución) del círculo negro. Estas gráficas son muy útiles para identificar a simple vista los posibles parámetros modificados con respecto al control.

Los parámetros que se presentan en las gráficas de radar corresponden a F1-F5 (la fluorescencia a diversos tiempos), ABS/RC: que describe la capacidad de absorción de los pigmentos antena por centro de reacción activo, DI0/RC: la disipación de calor a tiempo 0, TR0/RC: atrapamiento de energía a tiempo 0 por centro de reacción, ETo/RC: indica el transporte electrónico a tiempo 0 por centro de reacción, $(\psi_i/(E_0))$: la eficiencia cuántica de la probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de QA-, $\phi_i/(E_0)$: el rendimiento cuántico en el transporte de electrones, $\delta(R_0)$: describe el transporte de los electrones desde el PSII hacia el PSI, PI abs: índice de funcionamiento del fotosistema, la constante de desexcitación fotoquímica ($K_p/ABS*KF$) y la constante de excitación en la antena ($K_n/ABS*NF$).

Se observaron cambios en parámetros específicos dependiendo la mutante y el tratamiento. Los parámetros JIP en *wt* AC (Figura 23A) que presentaron diferencias respecto al control *wt* NA con valores superiores a los del control *wt* NA fueron, (DI0/RC), ABS/RC y $\delta(R_0)$, mientras que los valores de $\phi_i/(E_0)$ y PIabs menores.

A) *wt* NA vs *wt* AC

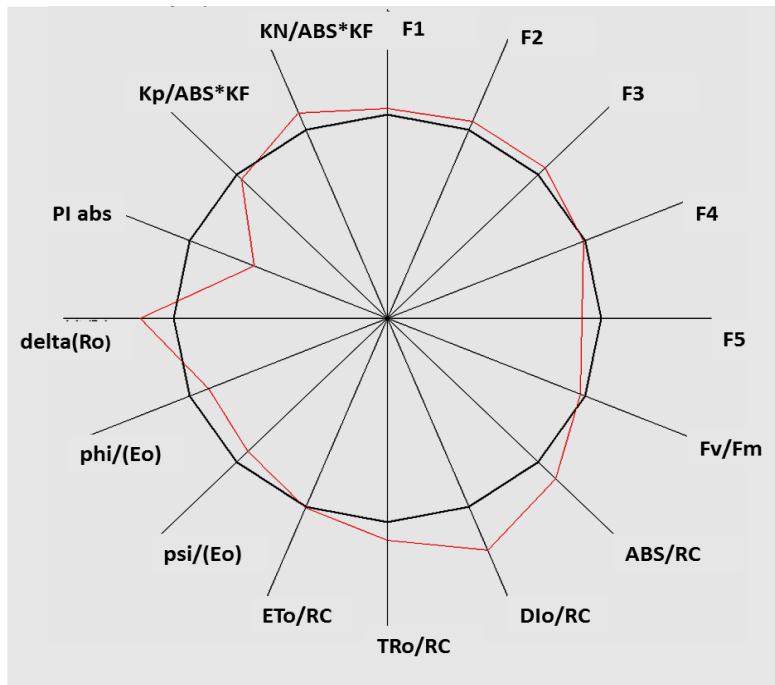


Figura 23A. Gráficas de radar de los parámetros de JIP obtenidos a partir de las curvas de OJIP de la fluorescencia de la clorofila *a*. A) Comparación de *wt* NA vs *wt* AC. La línea negra representa al control *wt* NA y la línea roja a *wt* AC.

Los parámetros JIP en la mutante *lcb2a-1* NA y AC fueron muy similares al control *wt* NA y *wt* AC respectivamente, (Figura 23B). La mutante *hp-* presentó un patrón distinto (Figura 23C), ya que los valores de los parámetros de los lotes NA y AC fueron similares a los de *wt* AC, explicado en la Figura 23A, excepto en el parámetro ΔRo que tuvo un valores menores comparado con las plantas *wt* AC.

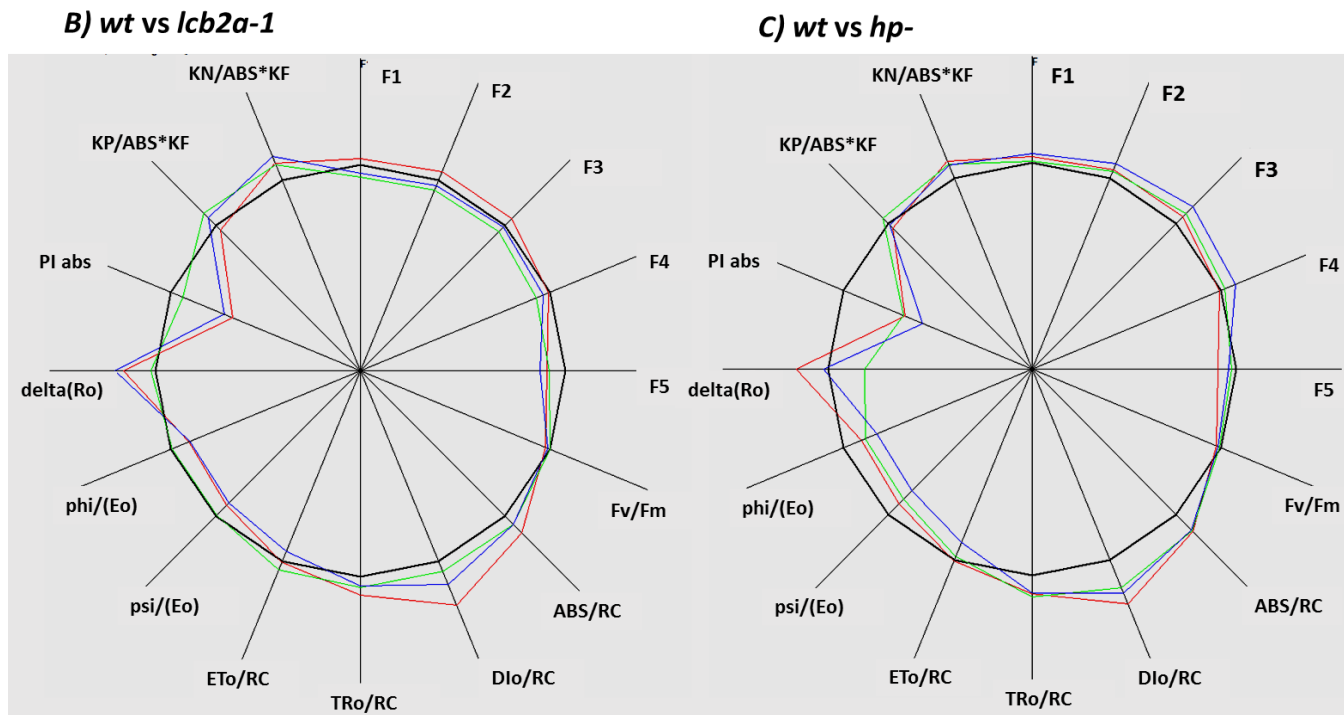


Figura 23. Gráficas de radar de los parámetros de JIP obtenidos a partir de la curvas de OJIP de la fluorescencia de la clorofila a. B) Comparación de *wt* (NA y AC) vs *lcb2a-1* (NA y AC). C) Comparación de *wt* NA y AC vs *hp-* (NA y AC). La línea negra representa al control *wt* NA, la línea roja a *wt* AC, la línea verde la mutante NA y la azul la mutante AC.

En el gráfico de la izquierda Figura 23D se observa que los parámetros de la mutante *sbh1-1* NA comparada con los de *wt* NA fueron muy parecidos. Por otro lado, *sbh1-1* AC tuvo un patrón similar al gráfico de *wt* AC, excepto por el parámetro Dio/RC que fue más cercano a *wt* NA. El gráfico de la derecha Figura 26E mostró que los parámetros de *sld1 sld2* tanto del lote NA como AC se aproximaron más a *wt* AC que al control *wt* NA.

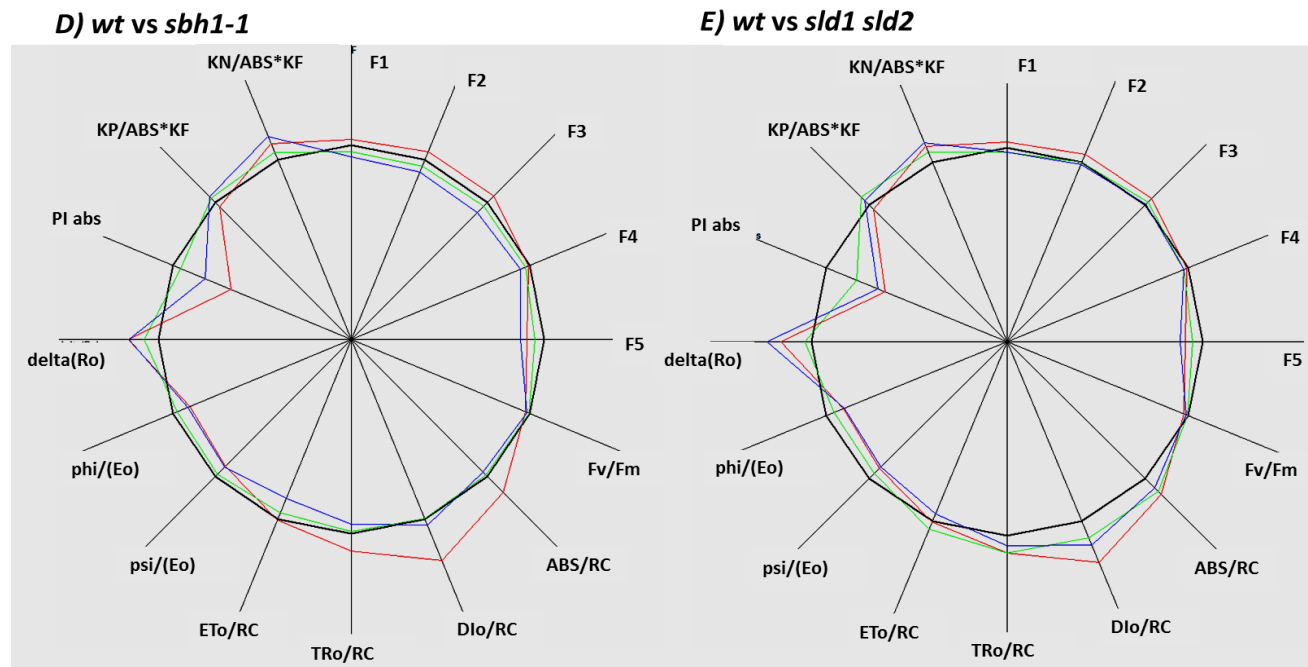


Figura 23. Gráficas de radar de los parámetros de JIP obtenidos a partir de la curvas de OJIP de la fluorescencia de la clorofila *a*. D) Comparación de *wt* (NA y AC) vs *sbh1-1* (NA y AC). E) Comparación de *wt* NA y AC vs *sld1 sld2* (NA y AC). La línea negra representa al control *wt* NA, la línea roja a *wt* AC, la línea verde la mutante NA y la azul la mutante AC.

La gráfica de la Figura 23F presenta los parámetros JIP de la mutante *mpk3* NA y AC, los cuales fueron muy similares al control *wt* NA y *wt* AC respectivamente. La mutante *mpk6* NA y AC presentó un patrón parecido al control *wt* NA y AC respectivamente, excepto los valores de Dlo/RC que es menor y Piabs mayor en *mpk3* AC comparados con el control *wt* AC (Figura 23G).

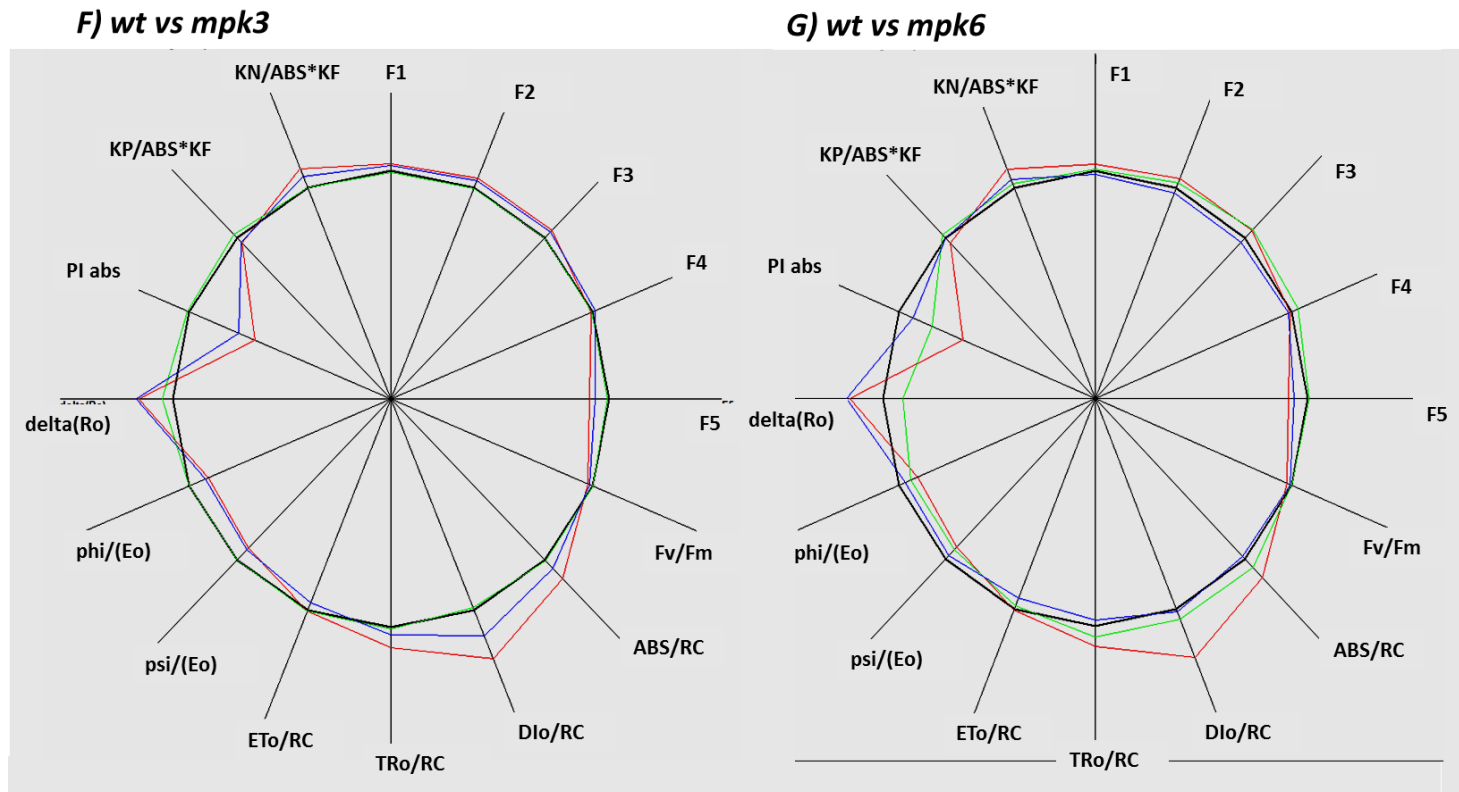


Figura 23. Gráficas de radar de los parámetros de JIP obtenidos a partir de la curvas de OJIP de la fluorescencia de la clorofila *a*. F) Comparación de *wt* (NA y AC) vs *sbh1-1* (NA y AC). G) Comparación de *wt* NA y AC vs *sls1 sls2* (NA y AC). La línea negra representa al control *wt* NA, la línea roja a *wt* AC, la línea verde la mutante NA y la azul la mutante AC.

La gráfica de la Figura 23H presenta los parámetros JIP de las mutantes *pfd18-18* NA y AC, los cuales fueron muy similares al control *wt* NA y *wt* AC, respectivamente.

H) *wt* vs *pfd18-18*

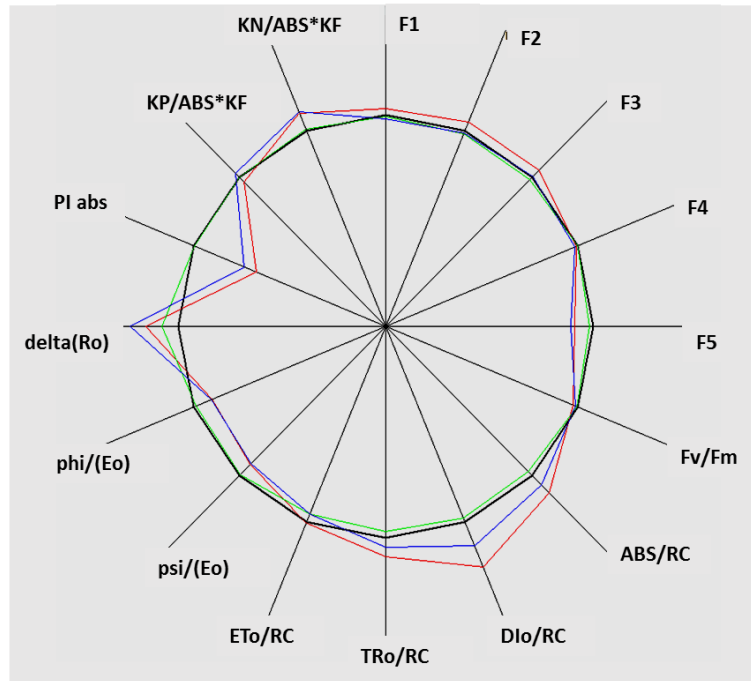


Figura 23. Gráficas de radar de los parámetros de JIP obtenidos a partir de la curvas de OJIP de la fluorescencia de la clorofila *a*. H) Comparación de *wt* (NA y AC) vs *sbh1-1* (NA y AC). La línea negra representa al control *wt* NA, la línea roja a *wt* AC, la línea verde la mutante NA y la azul la mutante AC.

8.7.a Parámetros de JIP expresados en cifras absolutas

Las gráficas de radar ofrecen una visión general comparativa de los valores relativos (en %) de los parámetros de JIP calculados entre diferentes genotipos o condiciones. Sin embargo, en estas gráficas no se aprecian los valores con su error estándar, lo cual es útil para discriminar las diferencias significativas entre los diferentes parámetros. Por ello, estos valores se presentan en las Tabla 2 y 3. En la Tabla 3 se presentan los parámetros: eficiencia fotosintética (F_v/F_m), flujo de fotones absorbidos por los pigmentos por centro de reacción (ABS/RC), disipación del flujo de calor al tiempo 0 por centro de reacción (Dio/RC), Atrapamiento de energía a tiempo 0 por centro de reacción (Tro/RC), Transporte electrónico a tiempo 0 por centro de reacción (ETo/RC), eficiencia cuántica de la probabilidad de que un excitón mueva un electrón después de Q_A^- ($\psi_i/(E_o)$), rendimiento cuántico en el transporte de electrones $\phi_i/(E_o)$, describe el transporte de los electrones desde el PSII hacia el PSI (ΔRo), índice del funcionamiento del fotosistema ($Piabs$), constante de desexcitación fotoquímica ($Kp/ABS*KF$) y excitación en la antena ($Kn/ABS*NF$). Sin embargo, como puede apreciarse, es difícil identificar diferencias cuantitativas entre los valores. Por ello, a partir de estas tablas, se construyeron las Figuras 20 y de la 24 a la 34 ya que es más fácil hacer comparaciones.

Tabla 3. Parámetros obtenidos de las gráficas de radar para el control *wt* y las líneas mutantes analizadas.

Mutantes	Fv/Fm	ABS/RC	Dlo/RC	TRo/RC	ETo/RC	PI abs
<i>wt NA</i>	0.835±0.001	2.1567±0.0343	0.3565±0.0059	1.8001±0.0290	0.990±0.0132	3.0705±0.1694
<i>wt AC</i>	0.816±0.001*	2.3997±0.0549	0.4416±0.0125*	1.9580±0.0436*	1.004±0.0194	2.0182±0.0774*
<i>lcb2a-1 NA</i>	0.834±0.0013	2.2825±0.0421x	0.3836±0.0091x	1.9034±0.0334x	1.0508±0.0184x	2.765±0.1048x
<i>lcb2a-1 AC</i>	0.824±0.0029*x	2.2972±0.0322	0.4055±0.0112x	1.8911±0.0231x	0.9539±0.0107*x	2.1156±0.0775*x
<i>hp- NA</i>	0.829±0.0017x	2.4043±0.0425x	0.411±0.0083x	1.9941±0.0354x	0.9899±0.0223x	2.0140±0.0823x
<i>hp- AC</i>	0.824±0.0048*	2.3871±0.0551	0.422±0.0171x	1.9650±0.0445x	0.9099±0.0245*x	1.7537±0.1234x
<i>sbh1-1 NA</i>	0.833±0.0010x	2.1398±0.0233	0.357±0.0048	1.9101±0.0190	0.9723±0.0129x	2.8847±0.0882
<i>sbh1-1 AC</i>	0.821±0.0022*	2.0834±0.0342 x	0.3731±0.0092x	1.7103±0.0263*x	0.8781±0.0106*x	2.4827±0.1231*x
<i>sld1 sld2 NA</i>	0.834±0.0007	2.3381±0.0445x	0.3929±0.0077x	1.9690±0.0374x	1.0502±0.0374x	2.4710±0.07950x
<i>sld1 sld2 AC</i>	0.823±0.0025*x	2.3286±0.0473*	0.4102±0.0111	1.9101±0.0389	0.9690±0.0239*	2.156±0.0790*
<i>mpk3NA</i>	0.837±0.0011	2.1685±0.0298	0.3547±0.0070	1.814±0.0232	1.0049±0.0117	2.9833±0.0805
<i>mpk3 AC</i>	0.822±0.0023*	2.2626±0.0566	0.4036±0.0134*x	1.8590±0.0443	0.9590±0.0207	2.2831±0.0966*
<i>mpk6 NA</i>	0.834±0.0013	2.2687±0.0346x	0.377±0.0075	1.8914±0.0278	0.9783±0.0116	2.5347±0.1010
<i>mpk6 AC</i>	0.829±0.0017*x	2.1042±0.0395*x	0.3597±0.0077x	1.7444±0.0329*	0.9419±0.0127	2.8412±0.1367
<i>pflid18-18 NA</i>	0.833±0.0016	2.1067±0.0420	0.3530±0.0083	1.7537±0.0263	0.9603±0.0103	2.9580±0.0134
<i>pflid18-18 AC</i>	0.825±0.0024*x	2.2897±0.0410*	0.3948±0.0099*x	1.8821±0.0335*	0.9669±0.0234	2.2897±0.1042*

Tabla 3. Parámetros obtenidos de las gráficas de radar para el control *wt* y las líneas mutantes analizadas. Continuación. Se presenta \pm el error estándar. El asterisco * muestra que hay diferencia significativa entre las plantas AC y NA del genotipo indicado de acuerdo a un valor de $\alpha=0.05$ y la X que hay diferencia significativa de la planta mutante respecto al control *wt*.

Mutantes	psi(Eo)	phi(Eo)	delta(Ro)	kP/ABS * kF	kN/ ABS * kF
<i>wt NA</i>	0.554 \pm 0.009	0.4197 \pm 0.0084	0.3211 \pm 0.0104	1.8000E-04 \pm 3.0151E-05	3.5152E-04 \pm 8.834E-06
<i>wt AC</i>	0.514 \pm 0.004*	0.4197 \pm 0.0041*	0.3767 \pm 0.010*	1.7000E-04 \pm 4.1627E-05	3.8571E-04 \pm 1.2295E-05*
<i>lcb2a-1 NA</i>	0.552 \pm 0.005	0.4605 \pm 0.0047	0.3353 \pm 0.012x	1.9940E-03 \pm 2.753E-05x	3.3950E-04 \pm 0.000005x
<i>lcb2a-1 AC</i>	0.505 \pm 0.002*	0.4158 \pm 0.0068*	0.3864 \pm 0.014x	1.8863E-03 \pm 3.0362E-05x	4.1364E-04 \pm 7.4887E-06*x
<i>hp- NA</i>	0.496 \pm 0.007x	0.4114 \pm 0.0062x	0.2687 \pm 0.014x	1.8500E-03 \pm 2.7386E-05	3.8750E-04 \pm 8.5391E-06
<i>hp- AC</i>	0.463 \pm 0.009*x	0.3820 \pm 0.0091x	0.3331 \pm 0.012x	1.7769E-03 \pm 5.3294E-05x	4.0000E-03 \pm 3.1298E-20x
<i>sbh1-1 NA</i>	0.546 \pm 0.005	0.4550 \pm 0.0048	0.3506 \pm 0.0076	1.8469E-03 \pm 2.2794E-05	3.7959E-04 \pm 6.5072E-06x
<i>sbh1-1 AC</i>	0.516 \pm 0.006*x	0.4240 \pm 0.0058*	0.3752 \pm 0.006x	1.8794 \pm 2.9658E-05x	4.0769E-04 \pm 1.1254E-05*x
<i>sld1 sld2 NA</i>	0.507 \pm 0.005	0.4444 \pm 0.0035	0.3349 \pm 0.007x	1.8885E-03 \pm 2.3182E-05x	0.0004 \pm 1.2122E-20x
<i>sld1 sld2 AC</i>	0.555 \pm 0.006*	0.4178 \pm 0.0058*	0.4011 \pm 0.0128	1.8857E-03 \pm 3.5169E-05	3.9500E-04 \pm 0.0000
<i>mpk3NA</i>	0.554 \pm 0.003	0.4639 \pm 0.0028	0.3422 \pm 0.0051	1.1827E-03 \pm 3.0146E-05x	3.5517E-04 \pm 9.3984E-06
<i>mpk3 AC</i>	0.516 \pm 0.003*	0.4252 \pm 0.0040*	0.3806 \pm 0.008*x	1.7575E-03 \pm 3.2284E-05	3.8182E-04 \pm 8.0887E-06*
<i>mpk6 NA</i>	0.520 \pm 0.006x	0.4343 \pm 0.0059x	0.2941 \pm 0.0068	1.8294E-03 \pm 1.7555E-05	3.6471E-04 \pm 6.7583E-06
<i>mpk6 AC</i>	0.543 \pm 0.007*	0.4499 \pm 0.0062x	0.3834 \pm 0.009x	1.8178E-03 \pm 3.3749E-05	3.3785E-04 \pm 7.90E-06
<i>pfl18-18 NA</i>	0.549 \pm 0.0061	0.4576 \pm 0.0058	0.3524 \pm 0.0106	1.7857E-03 \pm 3.3120E-05	3.5714E-04 \pm 3.4521E-06
<i>pfl18-18 AC</i>	0.515 \pm 0.006*	0.4261 \pm 0.0059*	0.4041 \pm 0.013*x	1.8650E-03 \pm 3.1014E-05*	4.0000E-04 \pm 3.8961E-06*

La Figura 24 presenta el parámetro Fv/Fm el cual refiere a la eficiencia fotosintética. El valor óptimo de Fv/Fm de una planta en buen estado es de alrededor de 0.83. Se observa que hubo diferencia significativa entre el control wt NA y AC respectivamente, con una disminución de la eficiencia fotosintética para el tratamiento de AC. De modo similar, las líneas mutantes *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18* tuvieron el mismo patrón de la wt. Por otra parte, las mutantes *lcb2a-1*, *sld1 sld2*, *mpk6* y *pflid8-18* del tratamiento AC presentaron valores mayores significativamente respecto al control wt AC, mientras que la mutante *hp-* NA mostró disminución significativa comparada con wt NA. Los valores de Fv/Fm de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

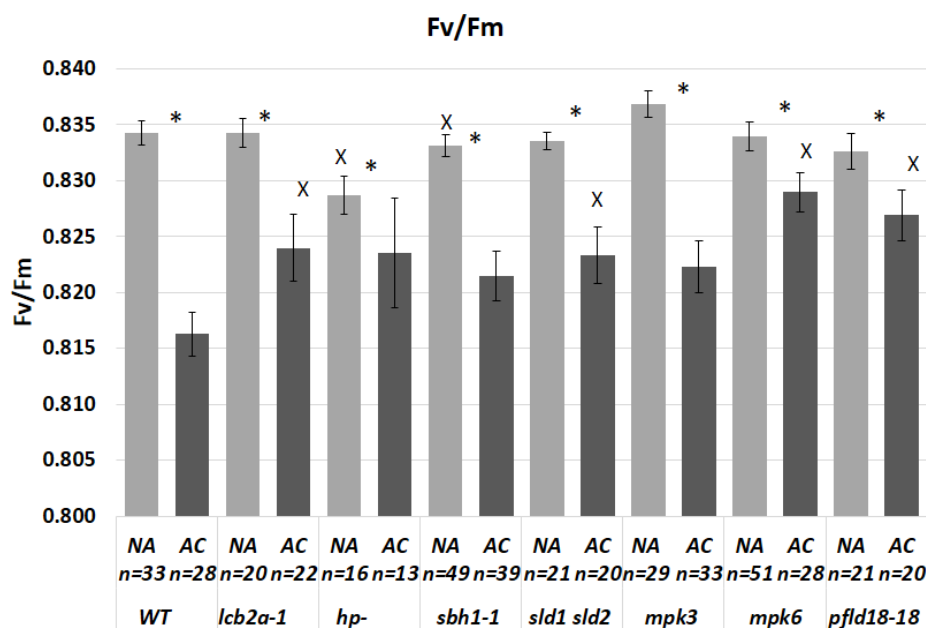


Figura 24. Parámetro Fv/Fm. Refiere a la eficiencia fotosintética determinada a partir de la fluorescencia de la clorofila *a* de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos wt, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18*. El asterisco * muestra que hay diferencia significativa entre las plantas AC y NA del genotipo indicado de acuerdo a un valor de $\alpha=0.05$ y la X que hay diferencia significativa de la planta mutante respecto al control wt.

La Figura 25 presenta el parámetro ABS/RC que proporciona información sobre el flujo de fotones absorbidos por los pigmentos por centro de reacción. Se observa que hubo diferencia significativa entre el control wt NA y AC respectivamente, aumentando el flujo para el tratamiento de AC. De modo similar, las líneas mutantes *sld1 sld2*, *mpk6* y *pflid8-18* que tuvieron el mismo patrón de wt. Por otra parte, las mutantes *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1* y *mpk3* no tuvieron diferencias

significativas entre sus tratamientos. Las mutantes *lcb2a-1*, *hp-*, *sld1 sld2* y *mpk6* que fueron significativamente mayores respecto al control wt NA. Para el tratamiento AC las mutantes *sbh1-1* y *mpk6* presentaron valores significativamente menores respecto al control wt AC. Los valores de ABS/RC *Arabidopsis thaliana* de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

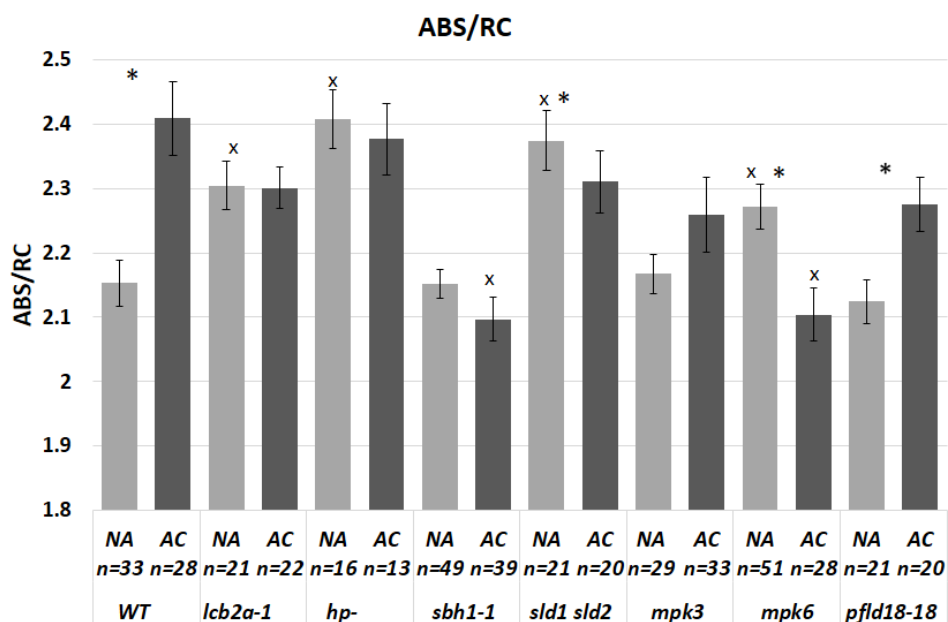


Figura 25. Parámetro ABS/RC. Refiere al cociente que proporciona información sobre el flujo de fotones absorbidos por los pigmentos por centro de reacción determinado a partir de la fluorescencia de la clorofila a de plantas AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pfl8-18*. El asterisco (*) marca la diferencia significativa, $\alpha=0.05$ entre los tratamientos de NA y AC de cada mutante y (X) diferencia significativa, de $\alpha=0.05$, respecto al control wt NA y AC según el caso.

En la Figura 26 se presenta el parámetro DIO/RC que se refiere a la disipación de calor al tiempo 0 por centro de reacción. Se observa como en el control *wt* y las mutantes *mpk3* y *pflD18-18* siguieron el comportamiento en el que las plantas AC aumentaron este parámetro. Las líneas *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1* y *mpk6* no presentaron diferencia significativa entre tratamientos. Los valores de *lcb2a-1*, *hp-* y *sld1 sld2* NA son significativamente mayores respecto a *wt* NA mientras que *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *mpk3* y *pflD18-18* AC tienen valores significativamente menores al control *wt* AC. Los valores de DIO/RC de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

En la Figura 27 se presenta el parámetro TRo/RC el cual se refiere al atrapamiento de energía al tiempo 0 por centro de reacción. Se observa como que el control *wt* fue ligeramente mayor en el tratamiento de aclimatación; este comportamiento fue inverso por las líneas *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2* y *mpk6*. Excepto *mpk3* y *pflD18-18*, las cuales presentaron valores mayores con la aclimatación. Los valores de *lcb2a-1*, *hp-* y *sld1 sld2* NA son significativamente mayores respecto a *wt* NA y Los valores de *lcb2a-1* y *hp-* AC significativamente menores comparados con control *wt* AC. TRo/RC de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

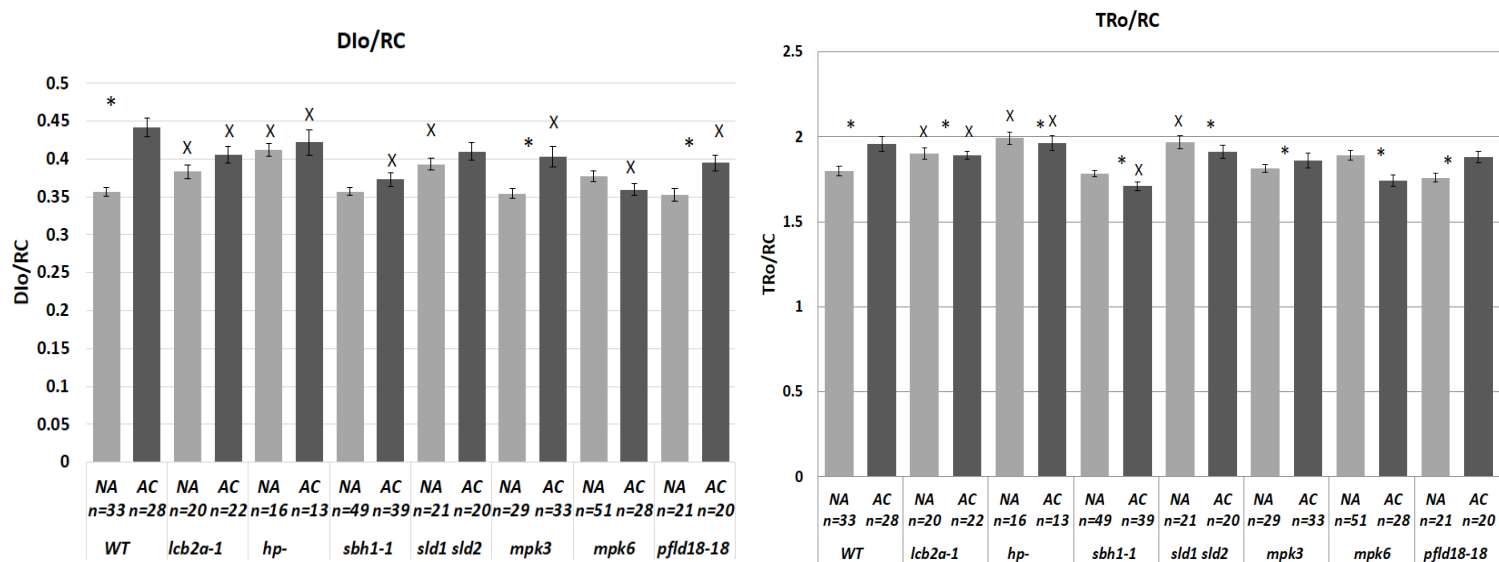


Figura 26. Parámetro DIO/RC. Refiere a la disipación del flujo determinada a partir de la fluorescencia de la clorofila a de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflD18-18*. Figura 27. Parámetro TRo/RC es el transporte electrónico determinado a partir de la fluorescencia de la clorofila a de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflD18-18*.

En la Figura 28 se presenta el parámetro ETo/RC, el cual se refiere al transporte electrónico a tiempo 0 por centro de reacción. Se observa como en las mutantes *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1* y *sld1sld2* la aclimatación produjo una disminución de este parámetro. Los valores de ETo/RC de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

En la Figura 29 se presenta el parámetro PI abs, el cual se refiere al índice de funcionamiento. Se observa como con la aclimatación este parámetro se ve disminuido significativamente en el tratamiento AC para control wt y las *lcb2a-1*, *sld1 sld2*, *mpk3* y *pflid18-18* mutantes a comparación del control NA. Los valores de PI abs de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

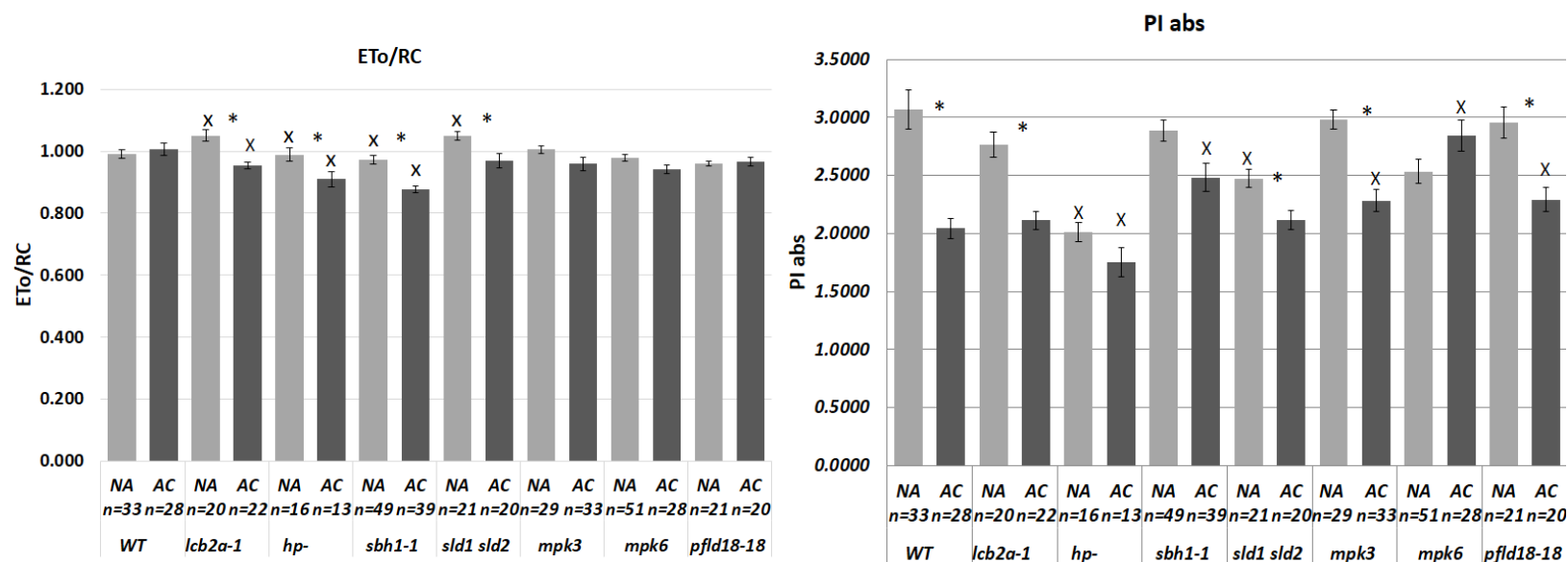


Figura 28. Parámetro TRo/RC, es el atrapamiento al tiempo 0 determinado a partir de la fluorescencia de la clorofila a de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18*. Figura 29. índice del funcionamiento del aparato fotosintético. determinado a partir de la fluorescencia de la clorofila a de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18*.

En la Figura 30 se presenta el parámetro psi (Eo), el cual se refiere a la eficiencia cuántica de la probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de QA-. Se observa como en el control *wt* y todas las mutantes excepto la *mpk6* se siguió el comportamiento en el que con la aclimatación hubo un descenso de este parámetro al compararlo con el tratamiento de NA. Mientras que en la línea *mpk6* se obtuvo un valor mayor para el grupo de plantas AC. Los valores de psi (Eo) de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

En la Figura 31 se presenta el parámetro phi (Eo) el cual se refiere al rendimiento cuántico en el transporte de electrones. Se observa como con la aclimatación este parámetro se ve disminuido tanto en el control como en todas las mutantes excepto la línea *mpk6* se obtuvo un valor mayor de este parámetro en comparación con el grupo de plantas NA. Los valores de phi (Eo) de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

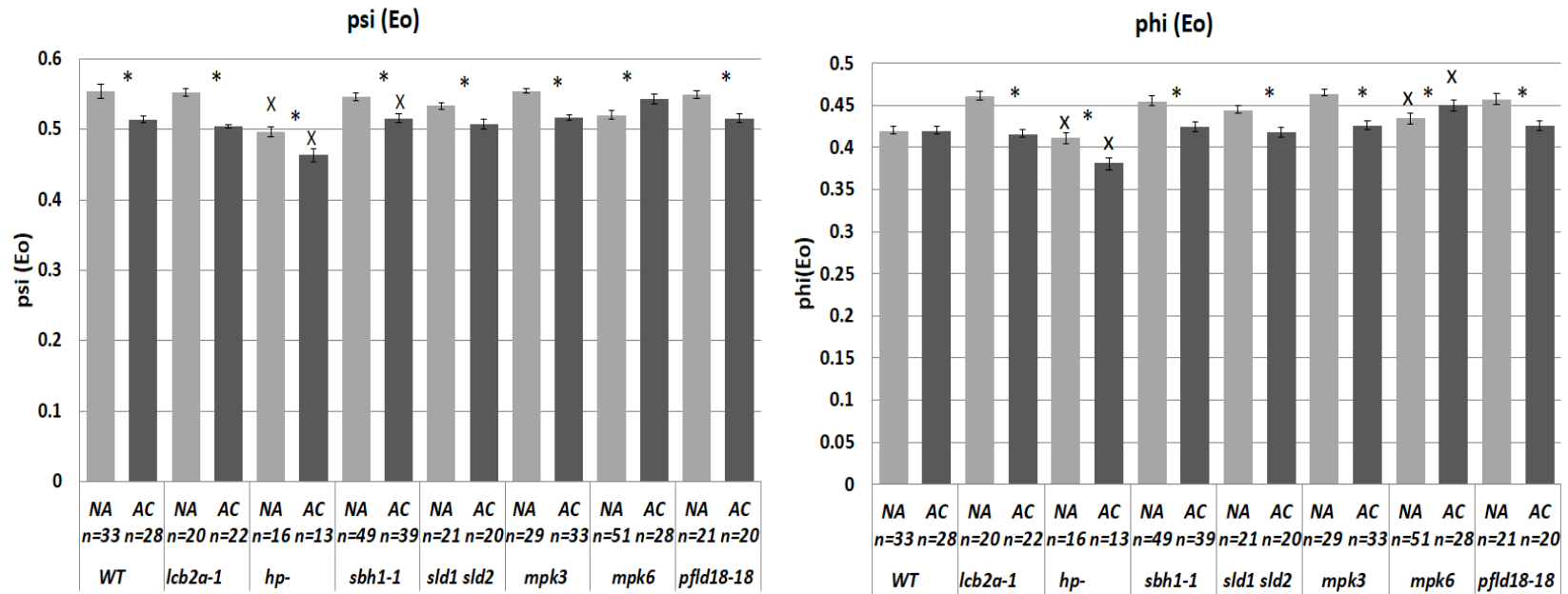


Figura 30. Parámetro psi(Eo), es el atrapamiento al tiempo 0 determinado a partir de la fluorescencia de la clorofila *a* de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18*. Figura 31. Parámetro phi (Eo) relativo a la eficiencia cuántica de la probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón después de QA-. determinado a partir de la fluorescencia de la clorofila *a* de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18*.

En la Figura 32 se presenta el parámetro delta (R_o) el cual se refiere al transporte de electrones a tiempo 0. Se observa como con la aclimatación para las líneas *mpk3*, *pflid18-18* y el control *wt* se presentaron valores significativamente mayores en comparación con el grupo de plantas NA. Los valores de delta (R_o) de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

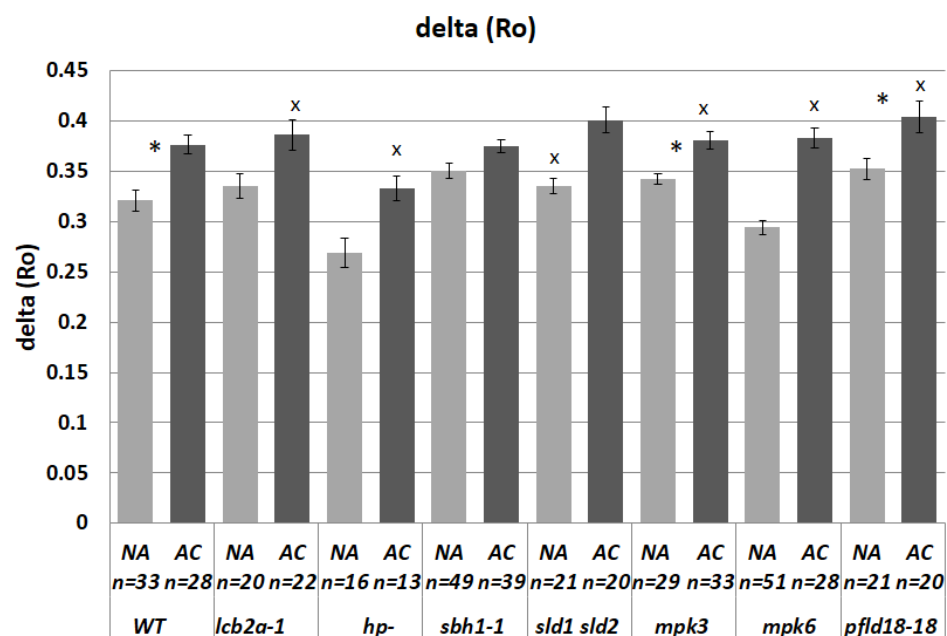


Figura 32. Parámetro delta (R_o), es el atrapamiento al tiempo 0 determinado a partir de la fluorescencia de la clorofila a de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18* determinado a partir de la fluorescencia de la clorofila a de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18*.

En la Figura 33 se presenta el parámetro $K_p/ABS*KF$, el cual se refiere a la constante de desexcitación fotoquímica. Se observa que el tratamiento de aclimatación recibido por el lote de plantas de cada línea no disminuyó significativamente en comparación con el control NA. Excepto en la líneas *pflid18-18* en la cual ocurrió lo contrario. Los valores de $K_p/ABS*KF$ de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

Figura 34. Presenta el parámetro $Kn/ABS*KF$ el cual se refiere a la excitación en la antena. Se observa como en el control *wt* y las mutantes *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *mpk3* y *pflid18-18* se siguió el comportamiento en el que con la aclimatación hubo un aumento de este parámetro en comparación del tratamiento NA. Los valores de $Kn/ABS*KF$ de todas las líneas se presentan en la Tabla 3.

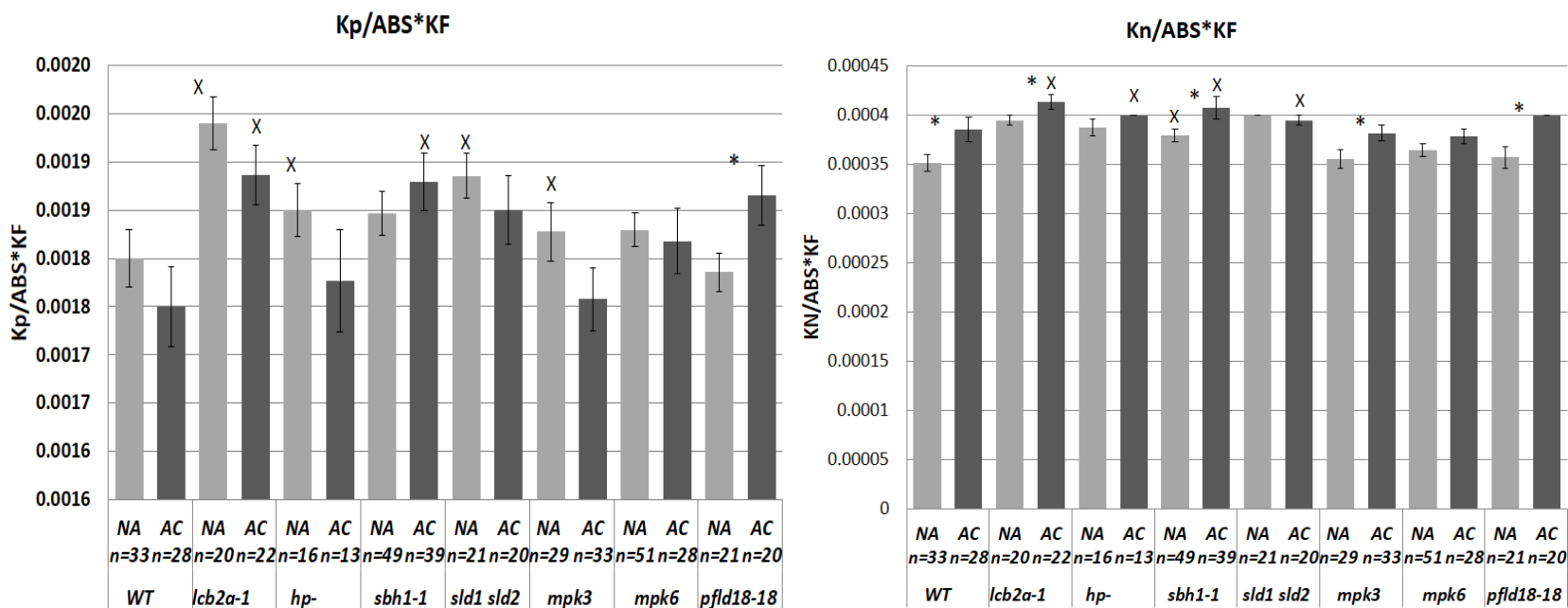


Figura 33. Parámetro $K_p/ABS*KF$ es la desexcitación fotoquímica determinada a partir de la fluorescencia de la clorofila *a* de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18*. Figura 34. Parámetro $Kn/ABS*KF$ se refiere a la excitación en la antena determinado a partir de la fluorescencia de la clorofila *a* de plantas *Arabidopsis thaliana* AC y NA de los genotipos *wt*, *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2*, *mpk3*, *mpk6* y *pflid8-18*.

8.8 Contenido de clorofila (CC)

Las mediciones de los niveles de clorofila de todas las líneas mutantes estudiadas tratadas como NA o AC (y que no fueron expuestas al reto de congelación), revelan si el contenido de clorofila fue modificado durante la semana de exposición a 4°C (Figura 35). La gráfica muestra que la aclimatación en la planta silvestre favoreció el aumento del nivel de clorofila, con un aumento del 42% respecto al control NA. Este patrón también lo presentaron las mutantes *mpk3*, *mpk6* y *pfd18-18*, con un aumento del 17%, 13% y 39%, respectivamente. En contraste, las mutantes en esfingolípidos: *hp-*, *sbh1-1*, *sld1 sld2* presentaron un patrón opuesto, es decir, las plantas NA presentaron un contenido menor de clorofila en relación a las AC, pues *hp-* y *sbh1* disminuyeron su contenido de clorofila a 86% y *sld1sld2* a 62%, siendo esta última la que obtuvo una mayor disminución de todas las mutantes y tratamientos. Por otra parte, el CC de la mutante *lcb2a-1* no presentó diferencia significativa entre los tratamientos NA y AC.

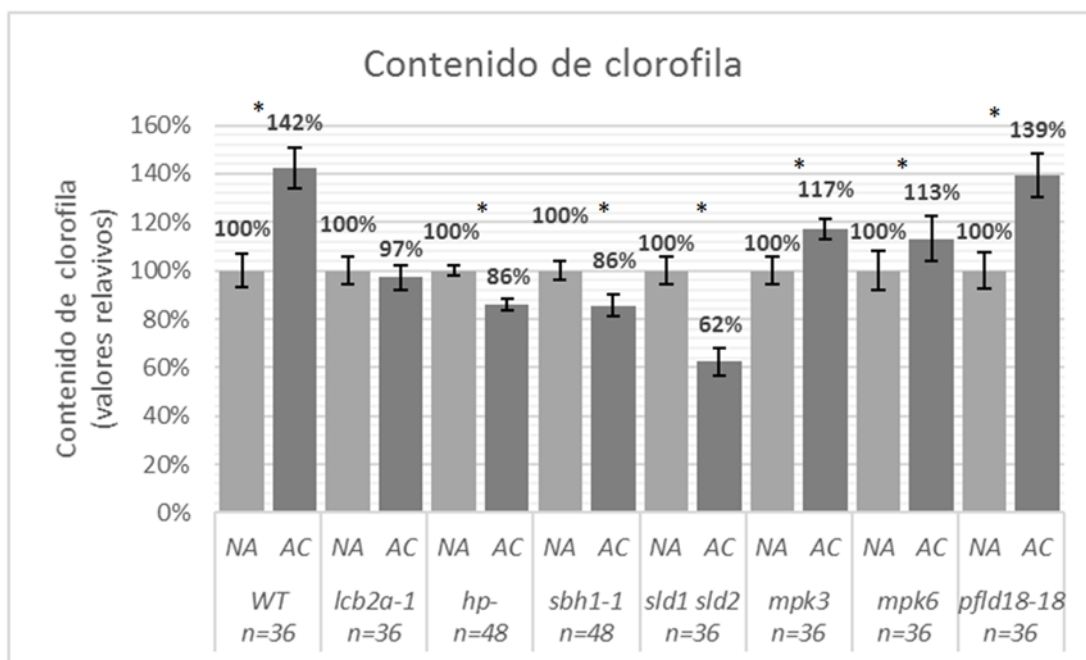


Figura 35. Contenido de clorofila de las plantas control (*wt*) y las 7 líneas mutantes. Las mediciones se realizaron con el dispositivo CL-01 Chlorophyll Content Meter después de los tratamientos de NA y de AC de 36 hojas de plantas antes de ser sometidas al reto de congelación, como se explica en el apartado de Materiales y Métodos. El número de determinaciones para cada genotipo/tratamiento se indica como n. El asterisco indica la diferencia significativa entre los tratamientos de NA y AC para cada genotipo (* P < 0.05).

9. DISCUSIÓN

9.1 La fluorescencia de la clorofila y la curva de OJIP

La fotosíntesis es un proceso imprescindible para las plantas ya que sin este es imposible su sobrevivencia. Cuando las plantas, en condiciones naturales experimentan cambios en el ambiente o se estresan puede verse afectado el proceso fotosintético, por lo que es importante para ellas mantener la mayor eficiencia posible en su aparato fotosintético ante la adversidad, para así evitar su muerte. Por tanto, conocer la eficiencia del aparato fotosintético de las plantas nos permite saber el grado del daño o afectación que presentan en diferentes tipos de estrés o cambios de condiciones ambientales.

El análisis de la fluorescencia de la clorofila *a* mediante la curva OJIP se ha utilizado como una herramienta eficaz para el estudio del aparato fotosintético, en especial el funcionamiento del PSII, de los daños en su actividad y en la cadena de transporte de electrones bajo diversos tipos de estrés (González 2008)). Esta técnica presenta como ventaja que no es invasiva o destructiva además de ser rápida y sensible. Además, es aplicable a las plantas *in situ* e *in vivo*, o a cloroplastos aislados. La técnica experimental utilizada en este estudio se basa en varias etapas: la adaptación de una zona delimitada de las hojas a la obscuridad, de modo que todos los centros de reacción son oxidados. Posteriormente, es incidido un rayo de luz actínica que induce un aumento rápido de la fluorescencia en los cloroplastos de la zona de la hoja y reduce los centros de reacción (Strasser et al.,2004). Estas etapas están basadas en el proceso natural que se inicia cuando la luz solar es absorbida por los pigmentos antena (ABS/RC), cuya energía se transfiere por resonancia como excitones y es canalizada al centro de reacción, en donde se encuentran dos clorofilas especializadas, de las cuales solo una de ellas usa la energía recibida para volverse fuertemente reductora (Fv/Fm) y así perder un electrón que continúa el proceso fotosintético a través de la cadena transportadora de electrones. Sin embargo, parte de la energía absorbida por las antenas no es utilizada para cambiar el potencial redox de la clorofila especializada y es disipada principalmente como calor y como radiación emitida como fluorescencia (González, 2008).

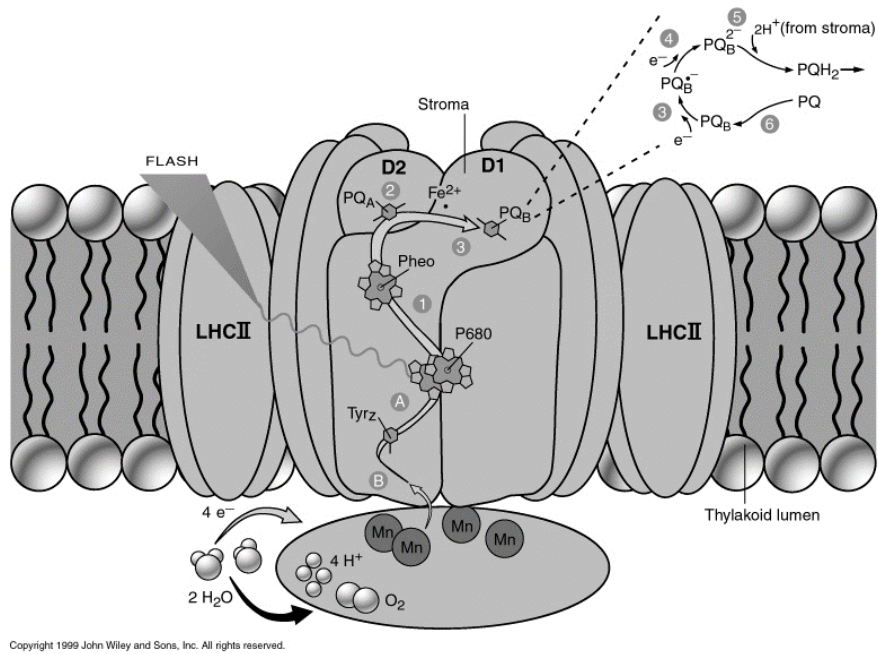


Figura 36. Diagrama del PSII. Se muestra el paso de los electrones a partir de la luz en el centro de reacción del PSII.(modificado de John wiley & sons)

La fluorescencia de la clorofila *a* se ha utilizado en diversos estudios para caracterizar diferentes tipos de eventos que pueden afectar el aparato fotosintético. La cinética Kautsky se ha utilizado como un indicador útil para monitorear el impacto del cambio climático y actividades humanas, alta y baja temperatura, sequía, salinidad, deficiencias de nutrientes y metales pesados. Esta técnica se ha utilizado específicamente como indicador de cambio en muchas especies agobiadas por un estrés como por ejemplo jacintos frente estrés ambiental (Lange, 2008), en plantas de tomate para monitorear peso y productividad ante estrés salino (Zushi et al., 2017), en plantas de arroz de diferentes variedades para comparar cambios fisiológicos que se producen durante la senescencia (Kazufumi, 2017), entre otros.

Como se mencionó en la introducción, los esfingolípidos tienen gran relevancia en las membranas celulares, ya que son un factor que les permite ser más o menos rígidas, permitiendo a las plantas adaptarse a los cambios climáticos. Por ejemplo, cuando las plantas se aclimatan al frío, la cantidad de esfingolípidos disminuye a la par que aumentan los fosfolípidos, de tal manera que su fluidez membranal se

ve afectada en menor grado, permitiendo así mantener los procesos metabólicos adecuadamente. Los cambios en los lípidos membranales forman parte de un proceso de remodelación que lleva a una adaptación que no sucede inmediatamente al ser las plantas expuestas a bajas temperaturas, sino que involucra una secuencia de cambios desde moleculares hasta fisiológicos en los que la fotosíntesis puede estar implicada y que además involucra cierto período de tiempo.

Tomando en cuenta que tanto la fluidez de la membrana plasmática (donde los esfingolípidos están involucrados) como la fotosíntesis son parte fundamental del bienestar y sobrevivencia de las plantas a bajas temperaturas, resulta relevante determinar el estado del aparato fotosintético en plantas mutantes en síntesis de esfingolípidos, así como de elementos transductores que están involucrados en la señalización de esfingolípidos, en particular, MAP cinasas (MPK3 y MPK6) o compuestos (ERO) (Saucedo García et al., 2011; Zurbriggen et al., 2009).

Para esta investigación usamos ocho líneas de *Arabidopsis thaliana* modificadas genéticamente cuyos cambios afectan la formación de esfingolípidos o la señalización mediada por ellos. En condiciones normales, la serina palmitoiltransferasa (SPT) es un heterodímero de gran relevancia que cataliza el primer paso de la síntesis de esfingolípidos, está compuesto de las subunidades LCB1 y LCB2 (Chen et al., 2006). En el caso de la línea *lcb2a-1*, ésta presenta modificaciones en el gene de la subunidad LCB2a de la SPT, lo que hace que esta subunidad no se exprese y no pueda formarse el heterodímero LCB1/LCB2a con la subunidad LCB1a de la SPT, formándose únicamente el LCB1/LCB2b (Dietrich et al., 2008), el cual puede funcionar sin la presencia de la LCB2a y así proseguir con la síntesis de BCL.

La segunda mutante, la línea *lcb2b hp/lcb2a* denominada *hp* posee el mismo fondo genético que la línea *lcb2a-1*. Mediante estas dos líneas se puede estudiar como las modificaciones en el contenido de esfingolípidos afecta en la planta el proceso de aclimatación.

El caso de la tercera mutante, la línea *sbh1-1*, con menor contenido de BCL tri-hidroxiadas y mayor proporción de especies di-hidroxiadas, es relevante en el

estudio debido a que las BCL tri-hidroxiladas son esenciales para el crecimiento y viabilidad de las plantas; además de que permiten la formación de esfingolípidos complejos como GIPCs y glucosilceramidas (Chen et al., 2008). Además, se ha descrito que la fitoesfingosina-1P aumenta en protoplastos expuestos a 4°C (Dutilleul et al., 2012). Mientras que las BCL di-hidroxiladas sólo forman complejos del tipo glucosilceramidas, las cuales al tener una cabeza polar de menor tamaño que las GIPCs, favorecen un mayor empaquetamiento membranal y una menor fluidez que las plantas wt (Cano Ramírez, 2014).

La cuarta mutante, la línea *sld1/sld2* que no presenta la enzima delta 8 desaturasa, revela una disminución en la cantidad de BCL insaturadas. Las insaturaciones cis delta 8 se ha estudiado que están involucradas en la resistencia a bajas temperaturas. Por lo cual es de gran relevancia estudiar a esta mutante en el proceso de aclimatación al frío.

Las siguientes líneas utilizadas se relacionan con las MAP cinasas, enzimas de señalización universales en eucariotas y que funcionan en diversas vías entre los que se encuentran involucrados los procesos de señalización ante estrés. En este proyecto se estudiaron mutantes de las cinasas MPK3 y MPK6 las cuales se han reportado estar asociadas a la percepción de estímulos bióticos. La MPK6 funciona en respuesta a la síntesis de etileno, estrés en frío y salino, señalización de patógenos y el control estomático (Pecher et al., 2014; Shabir et al., 2016). Mientras que MPK3 ha sido comúnmente descrita como redundante funcional de MPK6, se ha demostrado también que no señala produciendo una elevación de esfingalina, que es un precursor metabólico de esfingolípidos complejos; además, es menos sensible al cierre de estomas activado por ABA (Saucedo et al., 2011; Saucedo et al., 2015).

La ferredoxina (Fd) es una enzima muy importante para el metabolismo de las células vegetales ya que funciona en el transporte de electrones como uno de los aceptores anteriores al NADP⁺ en el metabolismo fotosintético. Se ha encontrado que los niveles de Fd disminuyen bajo condiciones ambientales adversas en muchos microorganismos, incluyendo cianobacterias, que comparten un antepasado evolutivo común con cloroplastos. Por el contrario, las situaciones de estrés inducen la síntesis de flavodoxina (Fld), una flavoproteína portadora de

electrones no encontrada en las plantas, que puede reemplazar eficientemente a la Fd en la mayoría de los procesos de transferencia de electrones. Esta última está presente en la mutante *pfl18-18*, utilizada en este trabajo, cuyo análogo en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) produce mayor tolerancia a múltiples fuentes de estrés porque acumula menor cantidad de EROS (Zurbriggen et al., 2009). Por ello, resulta interesante saber su comportamiento en la aclimatación al frío

9.2 Efecto del proceso de aclimatación al frío en la curva OJIP

Fluorescencia de F0 a F4.

A partir de los resultados obtenidos presentados en la Figuras 19, 20 y la Tabla 2, la fluorescencia de F0 a F4 (F0=0 μ s, F1=10 μ s, F2=50 μ s, F3=100 μ s y F4=300 μ s), no presentó cambios en ninguna de las líneas estudiadas tanto entre tratamientos de NA y AC como entre genotipos. Esto significa que en el control y en las líneas mutantes estudiadas y sus tratamientos (NA y AC), los centros de reacción del proceso fotosintético mantuvieron el mismo funcionamiento, al momento de incidir el rayo de luz.

F5-Fm

La fluorescencia proviene de la clorofila *a* del PSII. La cantidad de fluorescencia emitida es una forma de medida de la eficiencia de la transferencia de los electrones; ésta se incrementa si la transferencia o el proceso fotoquímico está limitado por estrés o en condiciones de luz excesiva (Manrique 2003). La planta control wt AC presenta una disminución discreta pero significativa de la fluorescencia a partir del tiempo F5=2ms hasta Fm=30ms (fluorescencia máxima) respecto al control NA, este patrón se conserva significativa mente en todas las líneas estudiadas excepto en las mutantes *hp-* y *mpk6*. De lo anterior se infiere que la aclimatación limita moderadamente el transporte de electrones. De todas las mutantes, las que se vieron más afectadas fueron *lcb2a-1*, *sbh1-1*, *sld1 sld2* y *mpk3*, al tener una diferencia significativa menor de fluorescencia en F5-Fm respecto al control wt NA (Figuras 20F y 20G).

9.3 Afectación de los parámetros fotosintéticos por la aclimatación.

Los pigmentos antena al recibir la energía de los fotones excitan las clorofilas del centro de reacción. Parte de la energía de excitación es disipada mayormente en calor, fluorescencia en menor grado y otra parte es canalizada al centro de reacción (flujo de atrapamiento=TR) para reducir la Q_A a Q_A^- que después será reoxidada.

Fv/Fm o nombrado también ϕPo

El parámetro Fv/Fm es un parámetro muy importante, ya que nos indica la eficiencia del aparato fotosintético, y es definido como el total de energía atrapada por los centros de reacción que es utilizada para realizar el trabajo fotoquímico. Se tiene registrado que un valor de alrededor de 0.83 indica que las plantas se encuentran sanas. El valor de Fv/Fm tanto para wt como para todas las mutantes y sus tratamientos fue de alrededor de 0.83 (Tabla 3), lo que indica que la aclimatación no es un factor que estrese en gran medida a la plantas, pero hay que considerar que la emisión de la fluorescencia de la clorofila a fue determinada al final de una semana de aclimatación (exposición a 4°C), lo cual implica que las plantas ya tenían una adaptación al frío, lo cual inicialmente, a los 1 o 3 días de aclimatación quizás sí pudo haber constituido un estrés mayor. Adicionalmente, en la Figura 24 se observa que para el control wt hubo una disminución significativa en la eficiencia del aparato fotosintético al cabo del tratamiento de aclimatación. Esta disminución significativa presentó en todas las líneas mutantes significativamente excepto en el genotipo *hp-*. El hecho de que haya una disminución mínima en la eficiencia fotosintética después de ser expuestas una semana las plantas a 4°C pero que al mismo tiempo mantengan un valor de Fv/Fm y condiciones fisiológicas sanas indica que durante la aclimatación suceden cambios adaptativos que no permiten ver un deterioro del proceso fotosintético o bien que si se presentan cambios que perturban la fotosíntesis, éstos se resuelven y se llevan al mínimo.

ABS/RC

La luz es captada como fotones por los pigmentos antena, es decir, las moléculas de clorofila excitadas. Por tanto, este parámetro nos da una idea de la capacidad

de absorción de los pigmentos antena por centro de reacción activo. La Figura 25 presenta este parámetro, el cual en la planta silvestre AC presentó un aumento significativo. Esto puede inferirse como un efecto compensatorio de la planta cuya eficiencia del aparato fotosintético disminuyó (ver Fv/Fm) (Strasser et al. 2004). Este mismo esfuerzo, pero en menor grado, lo presentan las mutantes *mpk3* y *pfl18-18*. Mientras que los genotipos *lcb2a-1*, *hp-sbh1-1* y *sld1 sld2* no lograron hacer este trabajo remedial, por lo que expresaron valores similares en los tratamientos de NA y AC. La mutante *mpk6* presentó una disminución en este parámetro. lo cual indica que la aclimatación no resultó muy benéfica para ninguna de las líneas mutantes en síntesis de esfingolípidos y en la mutante la *mpk6*. En cuanto a las mutantes en la síntesis de esfingolípidos es probable que tanto los sistemas membranales como los de señalización, al estar perturbados en estas mutantes, no puedan operar de manera óptima, lo cual les impida ejercer las estrategias adaptativas como la de aumentar el parámetro ABS/RC. En el caso de la MPK6 se ha descrito que esta MAPK es importante en la aclimatación al frío, por lo que al estar ausente en esta mutante, no responde fisiológicamente con la compensación en la relación ABS/RC (Dutilleul et al., 2012).

DI0/RC

Como se ha mencionado anteriormente, parte de la energía luminosa absorbida es disipada en forma de calor, el parámetro DI0/RC refiere a esta disipación. Después de ser aclimatado, el control wt y las líneas mutantes *mpk3* y *pfl18-18* presentaron un aumento en el parámetro DI0/RC (Figura 26), las mutantes restantes no presentaron diferencia significativa entre tratamientos. Lo anterior implica que en estas mutantes, la ausencia de los genes codificantes para la vía de síntesis de esfingolípidos influye en una menor eficiencia del aparato fotosintético, pues se presenta mayor disipación de calor. En el caso de las mutantes en las MPKs se asume un mismo efecto, si bien en el caso de la mutante *pfl18-18*, aparentemente, una mayor presencia de EROs es necesaria para tener menor disipación de energía. Se ha reportado que la fotoinhibición se identifica por un aumento en el flujo de energía disipado como calor por el centro de reacción (DI0/RC) indicando una pérdida en la conectividad entre la energía

que atrapa la antena pero que no va al centro de reacción, y que por tanto se disipa (Moreno et al., 2016). Lo anterior tiene congruencia con la disminución de la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) (explicada anteriormente) pues hay mayor disipación en forma de calor.

TRo/RC

Este parámetro se refiere al atrapamiento de energía a tiempo 0 por centro de reacción. Está relacionado con el parámetro de ABS/RC, el cual se refiere al flujo de fotones absorbido por los pigmentos antena. La energía de excitación es disipada principalmente como calor y un poco menos como emisión de fluorescencia. La otra parte es canalizada como el flujo de atrapamiento hacia el centro de reacción (TRo/RC) y convertida en energía redox para reducir al aceptor de electrones Q_A , creando el transporte de electrones (Stirbet, A. 1995). Analizando los resultados obtenidos (Figura 27) para *wt*, el flujo de energía que conduce al proceso fotoquímico (TRo/RC) aumentó ligeramente con la aclimatación, por lo que se incrementan el número de centros cerrados y el transporte de electrones decrece. El mismo comportamiento se siguió por las líneas *mpk3* y *pfl18-18*. Mientras que en líneas como *lcb2a-1*, *hp-*, *sbh1-1*, *sld1* *sld2* y *mpk6* el TRo/RC decreció con la aclimatación. Indicando que, en el caso de las líneas mutadas en esfingolípidos, el atrapamiento hacia el centro de reacción es menor.

ETo/RC

El transporte electrónico a tiempo 0 por centro de reacción nos da una apreciación del desempeño del transporte de electrones en general. De acuerdo con los resultados mostrados en las gráficas de barras (Figura 28), con la aclimatación no se observó una disminución o aumento en este parámetro para ninguno de los genotipos estudiados; esto indica que se mantuvo la eficiencia del transporte de electrones a través de los diferentes transportadores en el fotosistema II (Stirbet 1995). En este parámetro para *wt* NA se obtuvo un valor de 0.990 ± 0.013 , mientras que para la *wt* AC fue de 1.004 ± 0.019 , no habiendo diferencia entre el transporte de electrones durante los dos tratamientos. Este mismo comportamiento fue

seguido por la línea *pfl18-18*; por lo que una menor producción de especies reactivas de oxígeno ayuda a que el transporte de electrones esté equilibrado. Mientras que las líneas mutadas en esfingolípidos o en MAP cinasas presentaron valores más bajos de ETo/RC. El hecho de que el transporte de electrones, que es una parte fundamental del proceso fotosintético, no esté disminuido, implica que la aclimatación opera de un modo en el que esta función se sigue cumpliendo de manera adecuada para permitir la síntesis de ATP y la marcha del PSI.

phi/(Eo)

Este parámetro indica el rendimiento cuántico en el transporte de electrones, es decir cuanta de la energía del fotón pudo mandar el electrón más allá de Q_A^- , que equivale al número de fotones emitidos entre el número de fotones absorbidos. Debido a que no todos los fotones son absorbidos de forma efectiva, el rendimiento cuántico será normalmente un número menor que 1 (Stirbet, A. 1995). Para el control *wt*, este parámetro varió con la aclimatación (Figura 31). Mientras que las mutantes en esfingolípidos, la *mpk3* y la *pfl18-18*, el parámetro tendió a la baja con la aclimatación. Por el contrario, la *mpk6* en este parámetro con la aclimatación aumentó, lo que indica que esta MPK debe de estar implicada en el proceso de señalización a las bajas temperaturas, lo cual coincide con el reporte en la literatura (Dutilleul et al., 2012).

delta Ro

El transporte de electrones desde el PSII hacia el PSI está representado por delta (R_o). En el control (*wt*) y en todas las líneas mutantes estudiadas se presentó un aumento en este parámetro después del tratamiento de aclimatación. Lo anterior puede interpretarse como a que al ser afectado el PII por la AC, se tiene que incrementar la velocidad del transporte de electrones en el PSI para disminuir las afectaciones derivadas de las fallas en los centros de reacción del PSI y así poder llevar a una eficiente formación de tanto el gradiente de H^+ para que se realice la síntesis de ATP, como para que se llegue a reducir el aceptor final de electrones, que es el $NADP^+$ (Figura 32).

Plabs

El índice de funcionamiento (Plabs) es la sumatoria de los parámetros basados en la absorción de la energía [$PI_{abs} = (RC/abs) (\phi P_o/(1-\phi P_o)) (\psi_o/(1-\psi_o))$], donde ψ_o es la energía del excitón que mueve al electrón más allá de Q_A . Lo cual indica cómo se transportan los electrones más allá de Q_A que se encuentra en los centros de reacción: Este parámetro se vio disminuido tanto en el control como en todas las mutantes excepto en la *mpk6* (Figura 29), comprobándose así la no redundancia con la *mpk3* en la aclimatación a frío. Este parámetro concuerda con todos los anteriores con el que se concluye que la aclimatación afecta de manera negativa el funcionamiento del PSII pero que este se ve compensado con un aumento en la ABS/RC y con una mayor eficiencia en la velocidad del PSI permitiendo se lleve a cabo la fotosíntesis adecuadamente.

9.4 Contenido de clorofila

El CC (Figura 35) del control wt fue mayor en el tratamiento de AC respecto al control NA. Con esto se propone que el contenido de clorofila en las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* aumenta discretamente durante la aclimatación, siendo entonces la síntesis de clorofila una estrategia de la planta para enfrentar retos posteriores de congelación. Las mutantes *mpk3*, *mpk6* y *pfld18-18* presentaron el mismo patrón del control, es decir, las plantas AC tuvieron valores de CC mayores a las NA. Para las mutantes en genes que codifican a proteínas de la vía de síntesis de esfingolípidos *hp-*, *sbh1-1* y *sld1 sld2*, el CC que presentaron todas las plantas AC fue de valores menores a los CC de las NA, patrón contrario al control wt. En estas mutantes, se infiere que la aclimatación afecta negativamente el CC.

El aumento de clorofila puede explicarse por una mayor síntesis o una menor degradación para prolongar su vida útil. Este resultado implica que durante la aclimatación hay un aumento en el contenido de clorofila para ajustar la demanda fotosintética y afrontar las bajas temperaturas subsecuentes. El hecho de que los genotipos wt, *mpk3*, *mpk6* y *pfld18-18* presenten este efecto, implica que la ausencia de la MPK3, MPK6 y de EROs del cloroplasto no es importante y que por tanto estos elementos no intervienen en este aumento. En cuanto a las

mutantes *hp-*, *sbh1-1* y *sld1 sld2*, su ausencia determina que el contenido de clorofila disminuya.

El contenido de clorofila se relaciona estrechamente con el parámetro ABS/RC, ya que entre mayor sea la cantidad de moléculas antena mayor será la capacidad de captación de luz. Las Figuras 25 y 35 que presentan la ABS/RC y CC, respectivamente, muestran esas similitudes. En ambos parámetros, el control wt aumenta en el tratamiento de AC respecto al control NA, también reflejado en las mutantes *mpk3* y *pfl1 18-18*. Otra semejanza es que en las mutantes en síntesis de esfingolípidos ambos parámetros se mantienen o disminuyen con la aclimatación. Mientras que la *mpk6* presenta un aumento en el CC, el parámetro de ABS/RC se vio disminuido. Esto puede deberse a que a pesar de que aumentó la cantidad de la clorofila en los centros de reacción, estos están inactivados. El hecho de que la MPK3 y MPK6 no tengan el mismo efecto en el parámetro ABS/RC después de la aclimatación implica que no tienen redundancia funcional en la defensa contra bajas temperaturas y contra patógenos (Saucedo et al., 2008; Dutilleul et al., 2012).

La medición de la fluorescencia y del contenido de clorofila fueron determinaciones que se realizaron independientemente una de la otra lo cual valida los resultados obtenidos.

9.5 Comparación de los fenotipos y los parámetros.

De acuerdo con los resultados ante el reto que se sometieron las plantas de las diferentes líneas, el control wt mostró que mediante la aclimatación la planta mejora su capacidad de sobrevivencia ante temperaturas congelantes. El mismo comportamiento mostró el genotipo *mpk3*, que mediante la aclimatación logró que la sobrevivencia de las plantas aumentara en comparación de las que no recibieron una aclimatación previa. Por ello, la ausencia de la MPK3 no es relevante para que la planta logre aclimatarse.

Los parámetros como ABS/RC, DIO/RC, y delta (Ro) tuvieron valores mayores en las AC al compararlos con el tratamiento NA para las dos líneas. Comprobándose con esto cómo la aclimatación permite que las plantas sigan en un estado fotosintético eficiente y que haya una adaptación a las temperaturas bajas. Esto

significa en términos de la fotosíntesis, que al aumentar la absorción por centro de reacción (ABS/RC) hay un mayor número de antenas (clorofilas y pigmentos) que captan más energía, por lo que llega más energía a las clorofilas y debido a que esta energía no se puede quedar en la molécula entonces debe de ser disipada en forma de fluorescencia o calor; en tanto que la fluorescencia disminuye ligeramente lo que indica que el proceso fotoquímico está siendo afectado por las bajas temperaturas a las que se somete a la planta y debe de ser compensado con un aumento en la disipación del calor, para que de esta forma el centro de reacción siga en funcionamiento. Al haber un aumento en la disipación de calor, disminuyó la emisión de la fluorescencia máxima.

El aumento que sufrió delta (Ro) está relacionado con el transporte de electrones hacia el PSI y está correlacionado con el aumento de ABS/RC, debido a que entre mayor sea el número de antenas que capten luz, habrá un aumento en la velocidad de transporte de electrones.

Mientras que el parámetro de PI abs disminuyó con la aclimatación para el control y *mpk3*, en el caso del genotipo *hp*- una línea con el mismo fondo genético que la línea *lcb2a-1*, la aclimatación también ayudó a la sobrevivencia de las plantas ante la congelación con un 80% de sobrevivencia. Sin embargo, el único parámetro que se vió afectado con la aclimatación fue delta (Ro) obteniéndose valores mayores con la aclimatación. El índice de potencial fotosintético (PI abs), al igual que las otras dos líneas ya mencionadas anteriormente disminuyó. Lo que indica que en esta línea, al carecer de la subunidad LCB2a de la SPT, no resulta relevante para que la planta pueda aclimatarse y seguir con su proceso fotosintético.

9.6 Resistencia a temperaturas bajo cero sin previa aclimatación

Las líneas *lcb2a-1*, *sld1 sld2* y *pfl18-18* siguieron el mismo comportamiento al tener un porcentaje de sobrevivencia a la congelación con o sin un tratamiento previo de aclimatación. Como ya se mencionó anteriormente, la producción de BCL en la *lcb2a-1* no se afectó. Por lo que las modificaciones que presentan estos genotipos como ya se mencionó, permitieron a las plantas resistir la congelación y

el periodo de aclimatación para estas plantas resultó irrelevante. En el caso de la línea *pfl18-18*, un menor contenido de ERO no aumentó la sobrevivencia a temperaturas congelantes sin haber tenido un tratamiento previo de aclimatación.

Se observó como con la aclimatación de éstas tres líneas; parámetros como la disipación de calor por centro de reacción Dlo/RC y delta (Ro) resultaron mayores que cuando la planta no se aclimatava. Lo que sugiere que con la aclimatación, la planta busca equilibrarse a las bajas temperaturas, por lo que hay una aumento en la disipación de calor con el fin de mantener a la planta a temperaturas adecuadas para que siga con su proceso fotosintético.

9.6.a Plantas incapaces de aclimatarse

Un mayor contenido de BCL di-hidroxiladas, lo cual corresponde a una mayor cantidad de esfingolípidos del tipo glucosilceramidas no permitió que la planta del genotipo *sbh1-1* pudiera subsistir con o sin aclimatación ante un reto de temperaturas bajo cero. Esto coincide con el parámetro de PI abs que presentó una disminución con la aclimatación, lo que indica que el proceso fotoquímico se afectó.

Mediante la aclimatación, las plantas *mpk6* NA no lograron recuperarse después del reto de congelación, la aclimatación no logró mejorar este porcentaje de sobrevivencia. Por lo que la MPK6 debe estar relacionada con las bajas temperaturas. Parámetros como ABS/RC y Dlo/RC disminuyeron con la aclimatación lo que significa que el número de antenas captadoras de luz disminuyó al aclimatar la planta y por ende la disipación en forma de calor fue menor, al no lograr la planta establecer un equilibrio entre el frío y el proceso fotosintético.

A. thaliana debe mantener una eficiencia fotoquímica del PSII sin llegar a la fotoinhibición debido a que la planta está en un proceso de adaptación a temperaturas bajas para posteriormente subsistir a temperaturas congelantes.

10. CONCLUSIONES

El proceso fotosintético disminuye escasa pero significativamente en plantas de *Arabidopsis thaliana* y es independiente de la operación de la vía de síntesis de esfingolípidos y de la presencia de transductores de señales como MPK3 y ERO.

Los parámetros ABS/RC, ETo/RC y Plabs de la mpk3 y mpk6 sugieren la no redundancia en estas enzimas en la aclimatación, siendo MPK6 importante ante estés por frío como se ha encontrado en trabajos anteriores (Pecher et al., 2014; Shabir et al., 2016).

La disminución en la funcionalidad del proceso fotosintético se explica por una disfunción al nivel de los centros de reacción del PSII.

El aumento del contenido de clorofila total y el aumento en la velocidad de transferencia de electrones hacia el PSI sugieren un mecanismo compensatorio para el funcionamiento del centro de reacción.

No hay una correlación absoluta entre la adquisición de la tolerancia al frío y un cambio en la fotosíntesis de los diferentes genotipos.

Por lo tanto, la aclimatación es un proceso complejo que requiere de un nivel de fotosíntesis adecuado pero que depende de muchos factores que no requieren síntesis de en novo de esfingolípidos y de señalización de MPK3 y ERO.

11. PERSPECTIVAS

Incluir en el estudio a la mutante *hp+* con la inducción del silenciamiento génico, para poder evaluar el efecto de una disminución drástica en el contenido total de esfingolípidos.

Analizar el mismo análisis de OJIP a tiempos tempranos de la aclimatación cuando la exposición a bajas temperaturas corresponde a un estímulo de estrés.

Estudiar el mecanismo mediante el cual el centro de reacción disminuye su actividad ligeramente en condiciones de aclimatación.

12. BIBLIOGRAFÍA

Alonso, A., Queiroz, C., Magalhaes, A. (1997). Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1323, 75-84.

Butler, W. y Kitajima, M., 1975. Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 376, 116–125.

Dutilleul, C., Benhassaine, G., Demandre, C., Rézé, N., Launay, A., Pelletier, S., Renou, P., Zachowski, A., Badouin, E., Guillas, I. (2012). Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and Arabidopsis response to chilling. *New Phytologist*, 194, 181-191.

Cano Ramírez, Dora Luz. (2014). Contribución de los esfingolípidos a la fluidez de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Chávez, S. y Ramírez, F., 2010. Mecanismos de transducción de señales en plantas afectadas por salinidad y sequía. *Información Técnica Económica Agraria* 106, 157-169.

Chen, M., Markham, J., Dietrich, R., Jaworski, J., Cahoon, E. (2008). Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20, 1862-1878.

Chen, M., Cahoon, E., Saucedo-García M, Plasencia, J., and Gavilanes-Ruíz, M. (2009). Plant Sphingolipids: Structure, Synthesis, and Function. En: *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*. (H. Wada and N. Murata eds.). *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Vol. 30. Series editor, Govindjee. ISBN 978-90-481-2862-4 (Hb) e ISBN 978-90-481-2863-1 (e-book). Springer. New York. 77-116.

Chen, M., Markham, J., Cahoon, E. (2012). Sphingolipid 8 unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 69, 769-781.

Dietrich, C., Han, G., Chen, M., Berg, R., Dunn, T., Cahoon, E. (2008). Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis *LCB2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *The Plant Journal*, 54, 284-298.

Fleury, antelmo r. falqueto¹, fabio s. p. silva², Daniela cassol², ariano M. Magalhães Júnior³ antônio c. oliveira⁴ and Marcos a. bacarin^{2*} D. y Walker, J., 2014. Plant Cold Acclimation. *Methods in Molecular Biology*, 1166, 748-752.

Gable, K., Han, G., Monaghan, E., Bacikova, D., Natarajan, M., Williams, R., Dunn, M. (2002). Mutations in the yeast *LCB1* and *LCB2* genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 10194–10200.

García, O., Trejo, C., Pedroza, S., Gómez, M., Sepúlveda, B. (2005). Bases moleculares de la resistencia a sequía en plantas, Chapingo Serie Zonas Áridas IV, 2.

González, A., Cano, D., Morales, F., Tapia, C., Gavilanes, M. (2014). Arabidopsis mutants in sphingolipid synthesis as tools to understand the structure and function of membrane microdomains in plasmodesmata. *Frontiers in Plant Science*, 5, 243-350.

González, M., Perales-Vela, H., Salcedo-Álvarez, M. (2008). La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27, 119-129.

Hansen, H. y Dörffling, K., 1999. Changes in free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1599–1605.

Krause, H. y Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology*, 42, 313-349.

Kazufumi, Z. y Matsuzoe, N., 2017. Using of chlorophyll *a* fluorescence OJIP transients for sensing salt stress in the leaves and fruits of tomato. *Scientia Horticulturae*, 219, 216–221

Lage, F., Oliveira, J., Da Cunha, M., Souza, C., Rezende, C., Azevedo, R., Vitória, A., (2008). Chlorophyll *a* Fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. *Environmental and Experimental Botany*, Volumen 1-7.

Leeuwen, V., Okrész, L., Bogre, L., Munnik, T., (2004). Learning the lipid language of plant signaling. *Trends in Plant Science*, 8, 378 – 384.

Lehninger, D. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers. 10-1198.

- Levitt, J. 1980. *Chilling, freezing, and high temperature stresses. In Responses of Plant Environmental Stresses*. Michigan: Academic Press, 10-497.
- Luckey, M. 2008 *Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations*. London: Cambridge University Press, 24-423.
- Mahajan, S. y Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139-158.
- Michaelson, V., Napier, J., Molino, D., Faure, J. (2016). Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1329–1335.
- Minagawa, J. (2013). Dynamic reorganization of photosynthetic super complexes during environmental acclimation of photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 17.
- Minami, A., Furuto, A., Uemura, M. (2010). Dynamic compositional changes of detergent-resistant plasma membrane microdomains during plant cold acclimation. *Plant Signal and Behavior* 115-118.
- Minami, A., Masayuki, F., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y., Matsuo, U. (2009). Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant and Cell Physiology*, 50, 341-359.
- Ouellet, F., (2007). Cold acclimation and freezing tolerance in plants. *Encyclopedia of Life Sciences*, 38, 396-403
- Pecher, P., Eschen, P., Herklotz, S., Kuhle, K., Naumann, K., Bethke G., Uhrig J., Weyhe, M., Scheel D., Lee, J. The *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of 'VQ-motif'-containing proteins to regulate immune responses, 203,592–606
- Pitzschke, A. y Hirt, H., 2009. Disentangling the Complexity of Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species Signaling. *Plant Physiology*, 149, 606-615.
- Ritchie, A., Riley, L., Dumroese, R., Landis, T. (2006). Chlorophyll fluorescence: What is it and what do the numbers mean. *USDA Forest Service Proceedings, Forest and Conservation Nursery Associations*, 34-43.
- Ruelland, E. y Zachowski, A., 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 69, 225-232.

- Sanghera, A., Gulzar, S., Shabir, H., Wasim, W., Singh, N. (2011). Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Current Genomics*, 12, 30-43.
- Sánchez, D. 2006. Papel de los esfingolipidos en la señalización celular. *Dianas*, 1-10.
- Saucedo-García, M. y Gavilanes-Ruíz, M., 2005. MAP Cinasas de plantas y defensa contra patógenos. *Revista de Educación Bioquímica UNAM*, 4-11.
- Saucedo-García, M. Gavilanes-Ruíz. Arce-Cervantes., 2015 Long-chain bases, phosphatidic acid, MAPKs, and reactive oxygen species as nodal signal transducers in stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 5, 1-14.
- Saucedo-García, M., González-Solís, A., Rodríguez-Mejía, P., Olivera-Flores, T., Vázquez-Santana, S., Cahoon, E., Gavilanes-Ruiz., 2011. Reactive oxygen species as transducers of sphinganine-mediated cell death pathway., *Plant Signaling & Behavior*, 10, 1616-1619.
- Stitt, M. y Hurry, V., 2002. A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*
- Stirbet, A. y Strasser, J., 1995. Numerical simulation of the fluorescence induction in plants. *Arch. Sci. Genève* 48: 42–59.
- Strasser, R., Srivastava A., Tsimilli-Michael. 2004, Analisis of the fluorescence transient, Papageongion, Govindjee, *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. Kluwen Academic Publishers Netherlands, 321-362.
- Shabir, H., Wani, M., Hossain. A., 2015., *Salt Tolerance in Plants, Molecular and Genomic Perspectives*, 1, 66-67.
- Thomashow, M., (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 571-59.
- Tognetti, V., Palatnik, J., Fillat, M., Melzer, M., Hajirezaei, M., Valle, M., Carrillo, N. (2006). Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance. *The Plant Cell*, 18, 2035-2050.
- Uemura, M. y Steponkus, P., 1999. Cold acclimation in plants: Relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *Journal of Plant Research*, 112, 245-254.

Voet, D., 2006. Bioquímica. Ed. Médica Panamericana. 3ª Edición, Buenos Aires, 2006.

Wigge, P., (2010). Nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*, 140, 136-147.

Zhu, K., (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 53, 247-273.

Zurbriggen, M., Carrillo, N., Tognetti, V., Melzer, M., Peisker, M., Hause, B., Reza, M., Hajirezaei. Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, 2009., *The Plant Journal*, 1-12.