



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DUF642 COMO POSIBLES REGULADORAS DE LA
REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR PARA LA INDUCCIÓN DE
TERMOTOLERANCIA EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

TESIS

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

**BIIDX1, a DUF642 Cell Wall Protein That Regulates Pectin Methyl Esterase
Activity, Is Involved in Thermotolerance Processes in *Arabidopsis thaliana***

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOSÉ EDUARDO PINEDA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL: DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSANA SÁNCHEZ LÓPEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. J ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. AGOSTO , 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD INSTITUTO DE ECOLOGÍA
OFICIO: CGEP/CPCB/IE/0635/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **29 de mayo de 2023**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del alumno **PINEDA HERNÁNDEZ JOSÉ EDUARDO** con número de cuenta: **522004065** por la modalidad de graduación de **tesis por artículo científico** titulado: **“BIIDX1, a DUF642 Cell Wall Protein That Regulates Pectin Methyl Esterase Activity, Is Involved in Thermotolerance Processes in Arabidopsis thaliana”**, que es producto del proyecto realizado en la maestría que lleva por título: **“PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DUF642 COMO POSIBLES REGULADORAS DE LA REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR PARA LA INDUCCIÓN DE TERMOTOLERANCIA EN Arabidopsis Thaliana”** ambos realizados bajo la dirección de la **DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
Vocal: DR. JORGE NIETO SOTELO
Secretario: DRA. ROSANA SÁNCHEZ LÓPEZ
Vocal: DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
Vocal: DR. ULISES YUNUEN ROSAS LÓPEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 21 de agosto de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/ERR/EARR/err



Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México por todo el apoyo en mi formación profesional a lo largo del posgrado.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada (800940) y al Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM (PAPITT 209523) por las beca recibida (titulación).

Agradezco al PAPIIT, UNAM por el financiamiento de este proyecto de investigación realizado en el Laboratorio de Ecología Fisiológica, Instituto de Ecología, cuyos fondos corresponden a los proyectos a cargo de la Dra. Alicia Gamboa de Buen: UNAM IN210621 "La participación de la pared celular en la respuesta a estrés por calor en plantas" y UNAM IN209523 "Participación de las proteínas de la familia DUF642 en la regulación de la actividad de pectin metil esterases durante el crecimiento vegetal y en condiciones de estrés por calor"

A mi tutora, la Dra. Alicia Gamboa de Buen por toda su dedicación, esfuerzo, apoyo y comprensión en el desarrollo del proyecto y mi formación académica y a los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Rosana Sánchez López y el Dr. J Eleazar Martínez Barajas por todo su apoyo, asesoría y dedicación a lo largo del posgrado.

Agradecimientos personales

Agradezco principalmente a Betty, mi mamá, quien a lo largo de mi vida me ha brindado todo su apoyo, comprensión y amor de manera incondicional. Nada de lo que tengo ni de lo que soy sería posible sin todas las enseñanzas y consejos que me has dado. Gracias por enseñarme que por más fuerte que nos golpee la vida siempre debemos mantenernos en pie y con la voluntad de superar cualquier adversidad. Te amo mami.

A la Dra. Alicia Gamboa, mi tutora, le agradezco todo el apoyo, paciencia y dedicación que ha tenido conmigo para mejorar mi formación como futuro investigador. Desde el primer día que toque a su puerta me ha brindado todo su apoyo y confianza y nunca encontraré forma de agradecerle todo lo que ha hecho por mí. Siempre le estaré eternamente agradecido y estoy feliz por seguir bajo su tutela en los futuros proyectos del laboratorio.

A Montserrat, agradezco todo el amor, comprensión, cariño y apoyo durante todo nuestro tiempo juntos. Muchas gracias por impulsarme a ser una mejor persona cada día y por enseñarme la importancia de observar las cosas desde una perspectiva diferente y como siempre te lo he dicho: "Gracias por siempre sacas la mejor versión de mí". Te amo.

A los miembros de mi jurado el Dr. Jorge Nieto Sotelo, Dra. Sobeida Sánchez Nieto, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y al Dr. Ulises Yunuen Rosas López por sus correcciones, comentarios y sugerencias acerca de esta tesis.

Al Dr. Erik Cruz, agradezco infinitamente todo el apoyo, comprensión, preocupación y paciencia que tuviste durante todo el tiempo que estuve a su lado en el laboratorio. Desde el primer momento que comenzamos a compartir, antes de que te fueras a LANGEBIO, me sentí como en la película de "Spiderman Into the Spider-verse" cuando Peter Parker le enseña a Miles Morales como ser un Spiderman. Espero entiendas la referencia.

A la Dra. Esther Zúñiga por su apoyo, consejos y enseñanzas durante la conclusión de la tesis y los proyectos en puerta.

A la Biol. Exp. Estela Corral y a la Biol. Leslie Hinojosa por todo el apoyo durante el desarrollo del proyecto y por los momentos juntos en el laboratorio.

A Carmen (Borre), Juan Carlos (Rente), Lucy por apoyarme y darme su amistad y cariño a lo largo de estos años. Les agradezco que siempre puedo contar con ustedes cuando estoy triste y me atrevo a contarle a alguien y ustedes me dan su comprensión y apoyo incondicional, libre de juicios y con interés real por ayudarme.

Y finalmente les agradezco a Vera, Chela (Peque), Tony (Michi) por darme todo su amor incondicional y acompañarme durante todas esas noches de desvelo a lo largo de estos años.

A mamá Betty
A Montse
A Vera, Peque y Tony

"Nunca es muy tarde para ser quien tú quieras ser. No hay límite de tiempo, empieza cuando quieras. Puedes cambiar o seguir igual, la vida no tiene reglas. Sácale provecho o desperdiciála. Espero que la aproveches.

Espero que veas cosas que te sorprendan, espero que sientas cosas que jamás hayas sentido, espero que conozcas personas con opiniones diferentes y espero que estes orgulloso de tu vida.

Y si descubres que no... **Espero que tengas la fuerza y empieces otra vez."**

Guion final de "El Curioso Caso de Benjamín Button"

Índice

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVO PARTICULAR	15
ARTÍCULO CIENTÍFICO	16
DISCUSIÓN GENERAL	28
CONCLUSIONES	33
ANEXOS	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

Resumen

La pared celular es una estructura dinámica cuya función es regular el crecimiento y desarrollo de las plantas, además de brindar protección ante el daño ocasionado por estrés de origen biótico y abiótico. El estrés por calor puede provocar daños a niveles morfo-anatómicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares, comprometiendo el crecimiento, desarrollo y la vida de las plantas. Por ello, las plantas han adquirido mecanismos involucrados en la tolerancia, aclimatación y adaptación ante eventos de temperaturas letales y subletales. Estos mecanismos están relacionados con la mitigación del daño por medio del control del balance osmótico, mantenimiento de la homeostasis celular, preservación de las membranas celulares y el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Entre los genes encargados de la regulación del grado de extensibilidad y dureza de la pared en *Arabidopsis thaliana*, se encuentran los genes de la familia *DUF642*, los cuales están involucrados en procesos del desarrollo, crecimiento y reproducción de las plantas. El objetivo de esta tesis es conocer el papel de los genes de la familia de proteínas *DUF642*, relacionadas con la regulación del grado de metilesterificación de las pectinas de pared, durante la adquisición de la termotolerancia y de la termomemoria en *A. thaliana*. Los resultados de este trabajo sugieren que *BIIDX1*, gen de la familia *DUF642*, está involucrado en la adquisición de la termotolerancia promoviendo el incremento de la actividad de la enzima Pectin Metil Esterasa (PME). La mutante de pérdida de función *bdx-1* presentó una mayor sensibilidad ante el estrés por calor mostrando un mayor porcentaje de daño en cotiledones, una menor producción de hojas de roseta y un retraso en el crecimiento de la raíz principal con respecto a plantas control. En esta mutante, el estrés por calor no disparó el aumento de la actividad de PME descrita por otros autores en plantas silvestres, en respuesta a diferentes tipos de estrés, incluyendo el de calor. Este incremento en la actividad de PME es parte de la vía de señalización involucrada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular en condiciones adversas. Por otro lado, la vía de respuesta al estrés por calor que involucra a los factores de transcripción de respuesta a calor (HSFs) no se alteró en la mutante *bdx-1*. Con base en los resultados obtenidos se sugiere que el gen *BIIDX1* está involucrado en la adquisición de la termotolerancia a partir de la modulación de la actividad de PME en respuesta a estrés por calor.

Palabras clave: Termotolerancia, Estrés por calor, Proteínas *DUF642*, Pared celular, pectinas, Pectin Metilesterasas, integridad de pared celular.

Abstract

The plant cell wall is a dynamic structure that regulates plant growth and development, as well as brings protection against the damage provided by biotic or abiotic stress. Heat stress can result in damage at different levels: morpho-anatomic, physiological, biochemical, and molecular, compromising the growth, development, and plant survival. In consequence, plants have evolved mechanisms involved in tolerance, acclimation, and adaptation to lethal and sublethal temperatures. These mechanisms decrease damage caused by stress through osmotic balance, cellular homeostasis maintenance, conservation of the cellular membranes, and the preservation of the integrity of the cell wall. In *Arabidopsis thaliana*, the genes of the *DUF642* family participate in the regulation of plant cell wall loosening and stiffening. These genes are involved in plant growth, development, and reproduction. The principal objective of this thesis was to understand the role of *DUF642* family genes, involved in methyl esterification of cell wall pectins, in the acquisition of thermotolerance, and thermomemory in *A. thaliana*. The results obtained from this work suggest that the *BIIDX1*, a *DUF642* family gene, is involved in thermotolerance acquisition by promoting an increase in Pectin methylesterase (PME) activity. The *BIIDX1* loss-of-function mutant (*bdx-1*) presents greater susceptibility to heat stress showing increased cotyledon damage, decreased leaf production, and reduced root primary growth with respect to control plants (WT). PME activity was not enhanced in the *bdx-1* mutant in response to heat stress, which occurs in the wild type in response to different types of stresses, including heat stress. This increase in PME activity is part of a pathway involved in the preservation of cell wall integrity under stress conditions. Furthermore, the heat stress pathway that involves Heat Shock Factors (HSFs) showed no alterations in *bdx-1* plants. These results suggest that *BIIDX1* gene is involved in thermotolerance acquisition by increasing PME activity in response to heat stress.

Keywords: Thermotolerance, Heat stress, DUF642 proteins, Plant cell wall, pectins, Pectin methyl esterases, cell wall integrity.

Introducción

A nivel global, la temperatura se ha incrementado de manera constante durante las últimas décadas a partir del exceso de emisiones de CO₂ a la atmósfera por el abuso del uso de combustibles fósiles (*Global Energy Review: CO₂ Emissions in 2021 – Analysis*, 2022). El incremento en la producción de CO₂ ha impactado en el ambiente promoviendo eventos climáticos extremos como sequías, inundaciones y erosión del suelo, repercutiendo en la sobrevivencia de la vegetación (Ezquer *et al.*, 2020)

Las plantas, al ser organismos sésiles, deben enfrentarse a retos ambientales durante todo su ciclo de vida. Desde el momento en que ocurre la germinación, hasta el inicio de la floración y fructificación, las plantas son susceptibles a cambios en el ambiente ocasionados por la interacción con agentes que pueden inducir estrés de tipo biótico y abiótico (He *et al.*, 2018). La interacción con otros organismos, así como la fluctuación de las condiciones en el medio ambiente, como temperatura, luz, salinidad del suelo y disponibilidad de nutrientes, pueden afectar el desarrollo adecuado de las plantas al ejercer un efecto a nivel morfológico, fisiológico y molecular (Ashraf, 2021; Novaković *et al.*, 2018).

Gran parte de las emisiones de CO₂ atmosférico son utilizadas por las plantas para la captura del carbono necesario para cubrir la demanda energética de todos sus tejidos (Kochhar & Gujral, 2020). Además del almacenamiento de energía en forma de almidón, otro de los procesos con mayor demanda de carbono, y que depende en gran medida de la captura de CO₂ atmosférico, es la construcción de la pared celular, debido a la amplia gama de polisacáridos que la componen y cuya composición se ve afectada por los cambios en el ambiente (Ezquer *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2018a).

LA PARED CELULAR DE LAS PLANTAS

La pared celular es una estructura dinámica de gran importancia para las células vegetales que participa activamente en los procesos de división y elongación celular que repercuten en el crecimiento y desarrollo de las diferentes estructuras que las conforman, además brinda soporte, resistencia y protección ante estrés biótico y abiótico (Cosgrove, 2005). La pared celular está compuesta por diferentes polisacáridos que otorgan características únicas a los tejidos que conforman. Las células vegetales presentan dos tipos de paredes: la pared primaria y la secundaria, esto a partir de su composición (Taiz & Zeiger, 2006).

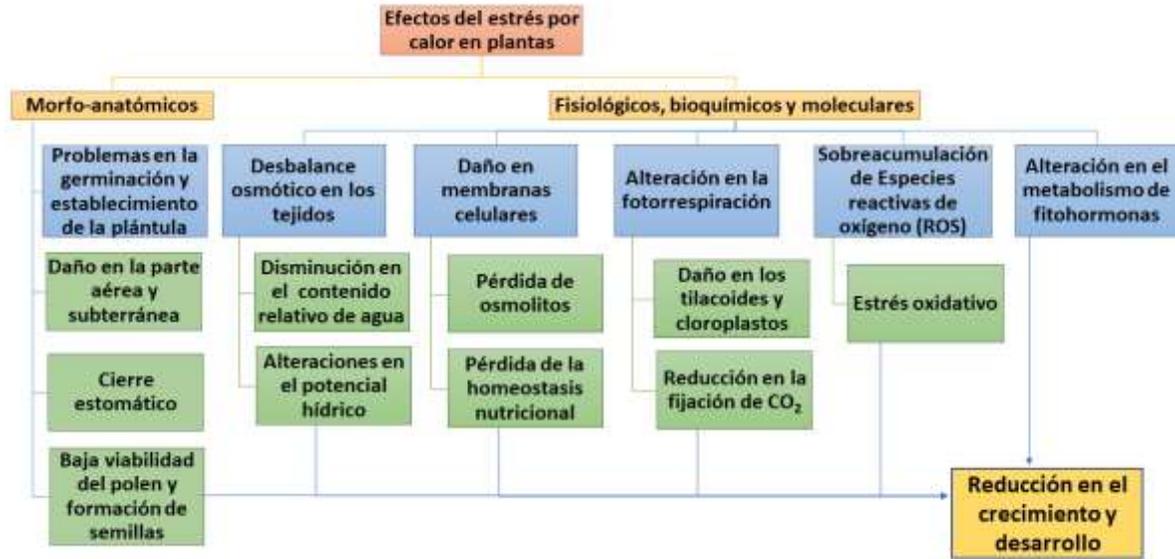


Figura 1. Efectos del estrés por calor en las plantas (modificado de: Ashraf, 2021).

La pared celular primaria está compuesta por proteínas, compuestos fenólicos, agua y iones, además de polisacáridos (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012; Taiz & Zeiger, 2006). Los polisacáridos que constituyen a la pared celular son celulosa, hemicelulosas y pectinas. La celulosa está construida a partir de la unión de monómeros de glucosa por medio de enlaces β 1,4, que forman una estructura de anclaje y soporte para otros polisacáridos que constituyen la pared. Las cadenas de celulosa son estructuras que no presentan ramificaciones y tienen gran resistencia a la degradación. Las hemicelulosas son polisacáridos con una estructura similar a las cadenas de celulosa, pero presentan ramificaciones en su estructura principal (Cosgrove, 2005). Se pueden clasificar en xiloglucanos, los cuales constan de un esqueleto de celulosa con ramificaciones donde pueden adicionarse otros carbohidratos como xilosa, galactosa y fucosa. Los xilanos presentan una estructura lineal conformada por xilosa y con ramificaciones de ácido ferúlico, arabinosa, galactosa y otras moléculas de xilosa (Wu *et al.*, 2018a). Las cadenas de celulosa forman microfibrillas y, en conjunto con las hemicelulosas, se encuentran inmersas en una matriz altamente hidratada que está constituida por pectinas (Fig 2A) (Cosgrove, 2005).

Las pectinas presentan un esqueleto principal que está compuesto por monómeros de ácido D-galacturónico unidos mediante un enlace α -1,4. Se clasifican en 5 tipos principales:

Homogalacturonanos (HGs), Ramnogalacturonanos tipo I y II (RG-I y RG-II), Xilogalacturonanos (XGA) y Apiogalacturonanos (AGA). Los homogalacturonanos son el tipo de pectina más abundante, constituyendo alrededor del 60% de las pectinas de la pared (Wolf *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2018a; Zhang *et al.*, 2021).

Los HGs son homopolímeros no ramificados sintetizados en el aparato de Golgi y transportados en vesículas de secreción por la red del aparato de Golgi (Sinclair *et al.*, 2018; Wolf, 2022) con un alto grado de metilesterificación en su estructura (Fig. 2B) (Yu *et al.*, 2022). La metilación de los HGs es realizada en el grupo carboxilo del ácido galacturónico a partir de la actividad de S-adenosil metionina (SAM). La importación de SAMs está a cargo de transportadores presentes en el Golgi (GoSAMTs), cuya actividad participa en la regulación de la secreción y exportación de HGs con un alto grado de metilesterificación a la pared en *A. thaliana* (Temple *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022).

El grado de metilación de los HGs en la pared celular es modulado por una familia multigénica de proteínas con actividad de Pectin metilesterasa (PME) (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2018a). Las PMEs promueven un cambio en el grado de metilesterificación en los HGs por medio de la desesterificación de los grupos carboxilo. La desmetilesterificación puede promover el entrecruzamiento de los HGs poco esterificados al interactuar con Ca^{2+} (estructuras tipo “egg box”) o la degradación de los HGs por la actividad de Poligalacturonasas (PGs) o Pectato liasas (PLs) (Fig 2C) (Du *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2022).

La desmetilesterificación provee de cargas negativas a los HGs y disminuye el pH, formando posibles microdominios en la pared celular. Los cambios en la estructura de los HGs influyen en las propiedades de la pared celular y le brindan características fisicoquímicas únicas que favorecen la preservación de su integridad al regular el grado de hidratación, porosidad y adhesión celular durante el desarrollo y crecimiento de las plantas, así como en condiciones de estrés biótico y abiótico (Cosgrove, 2005; Du *et al.*, 2022; Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2018a; Zhang *et al.*, 2021). Los cambios en el pH también modulan la actividad de proteínas que modifican la estructura de los HGs como las proteínas inhibidoras de PME (PMEIs) y las PGs, entre otras proteínas embebidas en la pared celular (Cosgrove, 2022; Daher & Braybrook, 2015). La actividad de las PMEs y la acción inhibitoria de los PMEIs es dependiente de la acidez o basicidad del medio, debido a que, a un valor de pH más ácido, se forman complejos PME-PMEI más estables, mientras

que la inhibición resulta disminuida a pH cercano a 7.5, lo cual ha sido demostrado por ensayos de interacción *in vitro* en *A. thaliana* (Cosgrove, 2022; Sénéchal *et al.*, 2015).

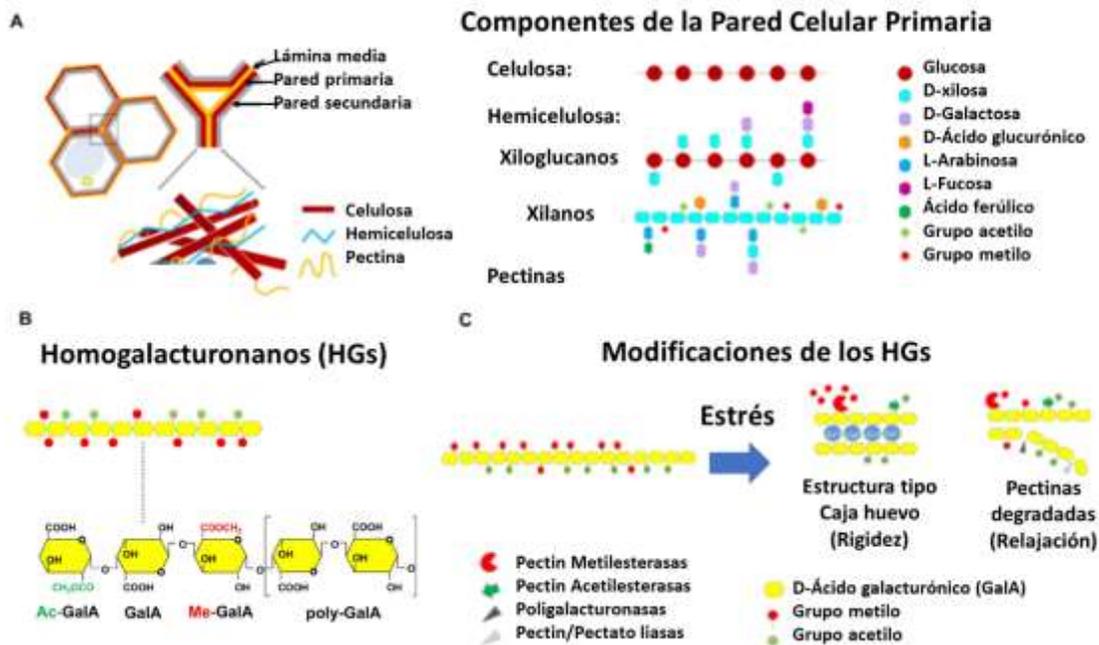


Figura 2. Composición y distribución general de los componentes de la pared celular y las modificaciones que influyen en la fluidez y rigidez de su estructura. **A)** Estructura y composición de los componentes principales de la pared celular primaria y su arreglo en la célula vegetal. **B)** Estructura de los Homogalacturonanos (HG), pectinas más abundantes de pared celular. **C)** Modificaciones de los HG en respuesta a estrés. (modificado de: Wu *et al.*, 2017)

Otra familia de proteínas que está involucrada en la modificación de la estructura de los HGs son las proteínas de la familia DUF642, ubicadas en la pared celular primaria. Esta familia de proteínas está altamente conservada y es específica de plantas espermatofitas (Vázquez-Lobo *et al.*, 2012). La familia DUF642 ha sido detectada en diferentes tejidos como plántulas, meristemos, hojas de roseta y caulinares y estructuras reproductivas a nivel transcripcional y proteico. (Jamet *et al.*, 2006; Zúñiga-Sánchez & Gamboa-de, 2012). En *Arabidopsis thaliana*, la familia DUF642 está conformada por 10 genes, con una estructura génica que consta de 3 exones que codifican un péptido señal, un dominio con función desconocida (dominio DUF642) y un dominio de unión a carbohidratos que puede estar o no acompañado de una secuencia de unión a GPI (glicosilfosfatidilinositol), característica compartida entre las proteínas remodeladoras de pared celular (Calderan-Rodrigues *et al.*, 2019; Vázquez-Lobo *et al.*, 2012; Zúñiga-Sánchez & Gamboa-de, 2012).

Las proteínas de la familia DUF642 codificadas por los genes *At4g32460/BIIDX1* y *At5g11420* interactúan *in vitro* con proteínas remodeladoras de pared, como son el inhibidor de Poligalacturonasas (FLOR 1) y con la pectin metilesterasa ATPME3, tanto en extractos

de hojas como de flores de *A. thaliana* (Zúñiga-Sánchez & Gamboa-de, 2012). Estudios recientes en *Oryza sativa* han corroborado la interacción *in vitro* de la proteína ortóloga de la familia DUF642, DIURNAL OPENING FLOWERING TIME-1 (DFOT1), con la proteína ortóloga de ATPME3 por medio de ensayos de doble híbrido y complementación de luciferasa (Wang *et al.*, 2022). Por otro lado, se ha determinado que la actividad de PME se incrementa o disminuye en líneas de sobreexpresión y pérdida de función para los genes DUF642 respectivamente.

De manera particular, en la línea de sobreexpresión del gen *BIIDX1* (*OEBDX*) se ha detectado un incremento en la actividad de PME en semillas durante la hidratación, en tejido meristemático, así como en plántulas y hojas de roseta en comparación a las plantas de la línea control (WT). En estas líneas también se presenta un incremento en la velocidad de la ruptura de la testa y del endospermo, acelerando la velocidad de germinación. No obstante, a nivel morfológico no hay cambios durante las fases vegetativa o reproductiva en comparación con la línea WT (Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014)

Por otra parte, en la línea de pérdida de función del gen *BIIDX1* (*bdx-1*) se ha detectado un mayor grado de HGs metilesterificados en la pared celular del embrión y del endospermo durante el desarrollo, plegamiento y maduración del embrión. A nivel morfológico, se han observado malformaciones del embrión en un alto porcentaje de las semillas (Cruz-Valderrama *et al.*, 2018) Todas las plantas de la línea *bdx-1* presentan una reducción en la longitud de las silicuas, una menor producción de semillas. La actividad de PME es menor en las plántulas (Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014). En el caso de la línea mutante (*dfot-1*) de *O. sativa* en el gen ortólogo a *BIIDX1* también se ha detectado la reducción en la actividad de PME y los cambios en el grado de metil esterificación de las paredes del lodículo, células que se expanden para promover la apertura de la flor, en comparación a las líneas control (Wang *et al.*, 2022).

RESPUESTA AL ESTRÉS POR CALOR EN LAS PLANTAS

El estrés por calor se define como un incremento en la temperatura que es superior al intervalo de temperatura adecuada para el establecimiento de las plantas (Wu *et al.*, 2017). La exposición de manera prolongada a temperaturas elevadas puede ocasionar un daño a nivel morfológico, fisiológico, celular y molecular produciendo un desbalance en la homeostasis que compromete la vida de las plantas (Fig. 1) (Ashraf, 2021; Novaković *et al.*, 2018).

Las plantas presentan una resistencia basal al estrés utilizando mecanismos que disminuyen el efecto del calor a partir de la regulación de la evapotranspiración, el cambio en la disposición de las hojas y la producción de solutos que permiten el mantenimiento de la turgencia celular (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Yeh *et al.*, 2012). Si la termotolerancia basal no es suficiente para mitigar el daño ocasionado por el estrés por calor, puede resultar en la muerte de la planta. Sin embargo, dependiendo del tiempo y duración del episodio de estrés puede inducirse una respuesta a estrés térmico (HSR) y con ello la activación de mecanismos para la mitigación y la supervivencia al estrés a partir de la adquisición de termotolerancia activado por medio de la HSR (Wu *et al.*, 2018a), llamado termotolerancia inducida (Yeh *et al.*, 2012).

La termotolerancia inducida se define como la resistencia a temperaturas letales determinada por un preacondicionamiento durante periodos cortos o prolongados de temperaturas no letales (Huang *et al.*, 2017; Serrano *et al.*, 2019). Por lo tanto, la termotolerancia se puede promover mediante la exposición de manera moderada a temperaturas mayores en comparación a las óptimas de cultivo (Fig.3) (Wu *et al.*, 2018a). La exposición a altas temperaturas puede afectar a nivel estructural a algunas moléculas susceptibles al calor acelerando la pérdida de agua y la formación de agregados proteicos (Guihur *et al.*, 2022) . Sin embargo, si el estímulo no es letal puede promoverse la activación de mecanismos de reparación de daño al restablecer y proteger moléculas lábiles ante el estrés por calor, por medio de la expresión de genes involucrados en la adquisición de la termotolerancia (Olas *et al.*, 2021).

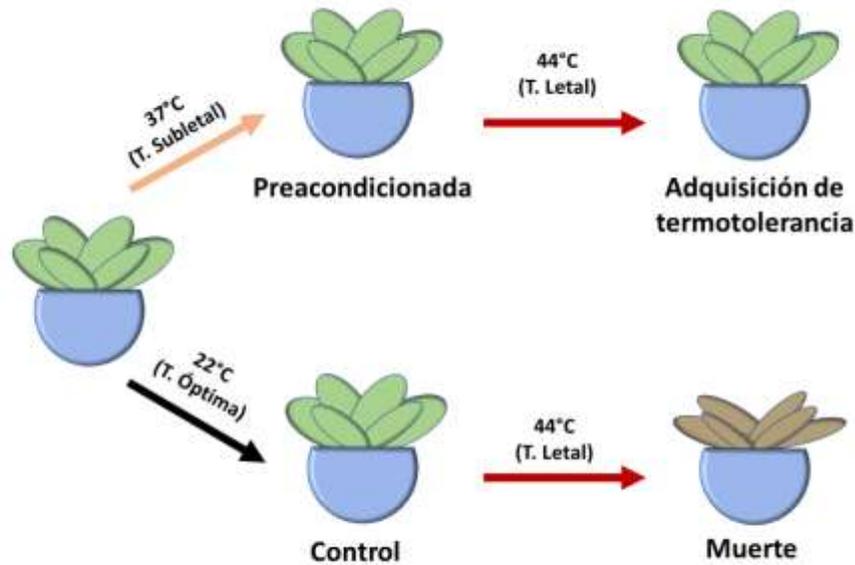


Figura 3. Esquema general de la adquisición de termotolerancia durante episodios de estrés por calor basado en Olas *et al.*, 2021.

En la adquisición de termotolerancia, los principales genes involucrados expresan Factores de Choque de Calor (HSFs), representados en *A. thaliana* por 21 genes y clasificados en tres familias: *HSFA*, *HSFB* y *HSFC* (Guihur *et al.*, 2022; Mesihovic *et al.*, 2022). Los *HSFs* se consideran reguladores de la respuesta ante el estrés por calor (Fragkostefanakis *et al.*, 2016; Mesihovic *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2020), debido a que regulan la expresión de genes codificantes para proteínas de choque de calor (HSPs), proteínas involucradas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (PMEs), además de la producción de moléculas antioxidantes y síntesis de fitohormonas para el mantenimiento del balance metabólico (Huang *et al.*, 2017; Olas *et al.*, 2021).

La regulación de la respuesta a estrés por calor ha sido estudiada principalmente en la subfamilia *HSFA1*, debido a que está involucrada en la inducción de la expresión de otros *HSFs* que promueven la respuesta inicial y la regulación negativa de la respuesta ante el estrés por calor en conjunto con *HSFB*. Por otra parte, *HSFA1* también está involucrado en la aclimatación a temperaturas subletales y la adquisición de la termotolerancia a través de promover la expresión *HSFs* como: *HSFA2* y *HSFA7*, así como el incremento en la expresión de *HSPs* (Mesihovic *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2020).

La vía de respuesta ante el estrés por calor más estudiada es detonada a partir de cambios en la fluidez de la membrana plasmática, permitiendo la salida de Ca^{2+} del espacio periplásmico para activar las vías de señalización Ca^{2+} /Calmodulina en el citosol, promoviendo la activación de cascadas de señalización dependientes de cinasa (MAPKs, CBK3) que activan por fosforilación a HSFs como HSFA1. La vía de señalización Ca^{2+} /Calmodulina, podría estar reforzada por medio de la activación de fosfolipasas que mediante la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2) y producción de inositol trifosfato (IP_3), inducen la liberación de Ca^{2+} proveniente del retículo endoplásmico. Posteriormente, HSFA1 en su forma activa formará la estructura trimérica que permite su relocalización hacia el núcleo y su unión a elementos de estrés por calor (HSE), presentes en la región promotora de genes *HSP* (Guihur *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018a).

Las HSPs han sido ampliamente estudiadas en condiciones de estrés por calor y se clasifican conforme a su peso molecular (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y sHSPs (40-12kDa). La función de las HSPs con actividad chaperona ha sido estudiada con relación a la regulación del plegamiento adecuado de las proteínas durante condiciones de estrés, evitando la formación de agregados proteicos con otras proteínas desnaturalizadas e incluso a recuperar su estructura nativa en condiciones de estrés por calor y estrés oxidativo (Guihur *et al.*, 2022; Usman *et al.*, 2017). La formación de agregados proteicos a diferentes niveles celulares, puede generar un funcionamiento inadecuado de las proteínas y promover procesos de muerte celular programada por estrés a nivel del retículo plasmático (Simoni *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2020).

La familia de proteínas HSP70 están encargadas del inicio de la respuesta ante el estrés por calor y promover una termo protección por medio de la formación de un complejo con otras proteínas co-chaperonas. Esta familia de proteínas se encuentra altamente conservada en los eucariontes y su expresión es tanto basal como inducida por calor (Guihur *et al.*, 2022). Su acción principal es la inducción de termotolerancia por medio del ensamble de complejos termo protectores con otras chaperonas cuya expresión es inducida por estrés como HSP90, HIP, HOP, HSP100. Este complejo participa en el plegamiento adecuado de otras proteínas tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés por calor a partir del mantenimiento de su forma nativa (Guihur *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2016; Toribio *et al.*, 2020; Usman *et al.*, 2017).

Otra familia de HSPs que tiene gran importancia en la respuesta a estrés por calor y la adquisición de termotolerancia es HSP20. La expresión de *HSP20* se induce durante los

episodios de estrés por calor y los niveles de proteína corresponden al 30% del total de proteínas inducidas por estrés por calor (Guihur *et al.*, 2022). El mecanismo de acción de esta familia de proteínas aún es desconocido, pero se sugiere que podría actuar en colaboración con las chaperonas HSP40, HSP60 y HSP70 por medio de la formación de agregados proteicos para promover el plegamiento adecuado en conjunto con la familia de proteínas HSP100 y promover la desagregación de proteínas desnaturalizadas para recuperar su estructura nativa o inducir una rápida degradación por proteasas (Avelange-Macherel *et al.*, 2019).

Para la familia HSP100, se ha descrito que su función principal es la formación de un complejo hexamérico y promover la renaturalización de proteínas a su estado nativo en respuesta a estrés por calor. De manera particular, se ha demostrado que los mutantes de pérdida de función para el gen *HSP101* son más susceptibles ante el estrés por calor durante los procesos de termotolerancia basal y termotolerancia adquirida en *A. thaliana* y *Zea mays* (Hong & Vierling, 2000; Nieto-Sotelo *et al.*, 2002). En conjunto con la familia de proteínas HSP70, la familia HSP100 es esencial para la respuesta basal ante el estrés por calor, así como la inducción de termotolerancia adquirida en *A. thaliana* y *Z. mays* (Guihur *et al.*, 2022; Nieto-Sotelo *et al.*, 2002; Queitsch *et al.*, 2000). Por lo tanto, el desarrollo de mecanismos de desagregación de proteínas y renaturalización de proteínas son esenciales para la supervivencia de las plantas en condiciones de estrés.

El mantenimiento de estos mecanismos involucrados en otorgar la termotolerancia también puede inducir la resistencia al estrés por calor durante períodos prolongados de tiempo a través de la memoria térmica transcripcional (termomemoria) en las plantas (Olas *et al.*, 2021; Serrano *et al.*, 2019; Yeh *et al.*, 2012). La termomemoria es un mecanismo que, en conjunto con la termotolerancia inducida, influye en la regulación de la expresión génica (Balazadeh, 2022). Esto determina la regulación de factores involucrados en la resistencia al estrés por calor y su presencia de manera activa en el metabolismo de las plantas, debido a que solo una fracción de genes inducibles por choque de calor (*HSFs*, *HSPs*, *PMEs*, etc.) se mantienen presentes y son considerados genes de termotolerancia y/o termomemoria (Bäurle & Trindade, 2020; Hilker *et al.*, 2016; Olas *et al.*, 2021; Sedaghatmehr *et al.*, 2022).

RELACIÓN DEL ESTRÉS POR CALOR Y LA PARED CELULAR

A pesar de que la pared celular es la estructura de mayor resistencia mecánica y que puede contribuir a la tolerancia al estrés biótico y algunos tipos de estrés abiótico, la relación entre

el estrés por calor, la preservación de la integridad y la remodelación de la pared celular han sido poco estudiadas. El estudio de los mecanismos de mantenimiento de la integridad de la pared en condiciones de estrés es fundamental para comprender la importancia de la plasticidad de las plantas para aclimatarse y adaptarse al ambiente.

Los mecanismos fundamentales para favorecer la plasticidad de la pared celular en respuesta a estrés incluyen la capacidad de monitorear los cambios en su estructura y la capacidad de promover los mecanismos encargados de mantener su integridad. El daño ejercido en la pared celular puede producir moléculas derivadas de la ruptura y degradación de los componentes. Un ejemplo de estas moléculas son los oligogalacturónidos (OGs), derivados de HGs, que están involucrados en la respuesta a la infección por patógenos y a daños mecánicos de la pared causados, por ejemplo, por temperaturas extremas. Estas moléculas son capaces de promover la activación de vías de señalización que posiblemente estén involucradas en el mantenimiento de la integridad de la pared vía unión a proteínas asociadas a la pared celular (Fig. 4).

Otro de los mecanismos que puede estar involucrado en la preservación de la integridad de la pared celular durante el estrés por calor es la modulación del grado de relajación y rigidez de la pared vía PME y sus reguladores (PMEs y proteínas DUF642). Se ha estudiado el papel de las PME durante varios tipos de estrés abiótico y se han encontrado cambios en la expresión de PME, así como cambios en la acumulación de HGs no esterificados. Por ejemplo, en *A. thaliana* se ha observado un cambio en la expresión de los genes codificantes para PME41 Y PME2 durante la exposición a cantidades tóxicas de boro y durante estrés por frío (İşkil & Surgun-Acar, 2018; Qu *et al.*, 2011).

Con relación al papel de las PME y sus proteínas reguladoras durante el estrés por calor se ha demostrado que PME34 y PME7 cumplen un papel fundamental en la termotolerancia (basal y adquirida) en *A. thaliana*, debido a que mutantes para estos genes presentan una menor supervivencia en comparación a la línea WT (Huang *et al.*, 2017). En estudios realizados en *Prunus persica* y *Fragaria x ananassa* se ha determinado que existen cambios en la expresión de los genes *PpPME2* y *PME3*, además ortólogos para genes DUF642 en frutos sometidos a un tratamiento de temperaturas subletales (Bustamante *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2022). El gen *PpPME2* es un ortólogo del gen *AtPME2*, el cual codifica para una pectin metilesterasa con alrededor del 90% de homología con *AtPME3*, proteína con interacción demostrada con el gen *BIIDX1* y *DFOT1* en *A. thaliana* y *O. sativa* respectivamente (Wang *et al.*, 2022; Zúñiga-Sánchez & Gamboa-deBuen, 2012). Además,

se ha reportado una baja acumulación de la proteína ortóloga de BIIDX1 (Bradi2g43230) en condiciones de estrés por calor en *Brachipodium distachion* y *Sorghum bicolor* (Ngcala *et al.*, 2020; Pinski *et al.*, 2021)

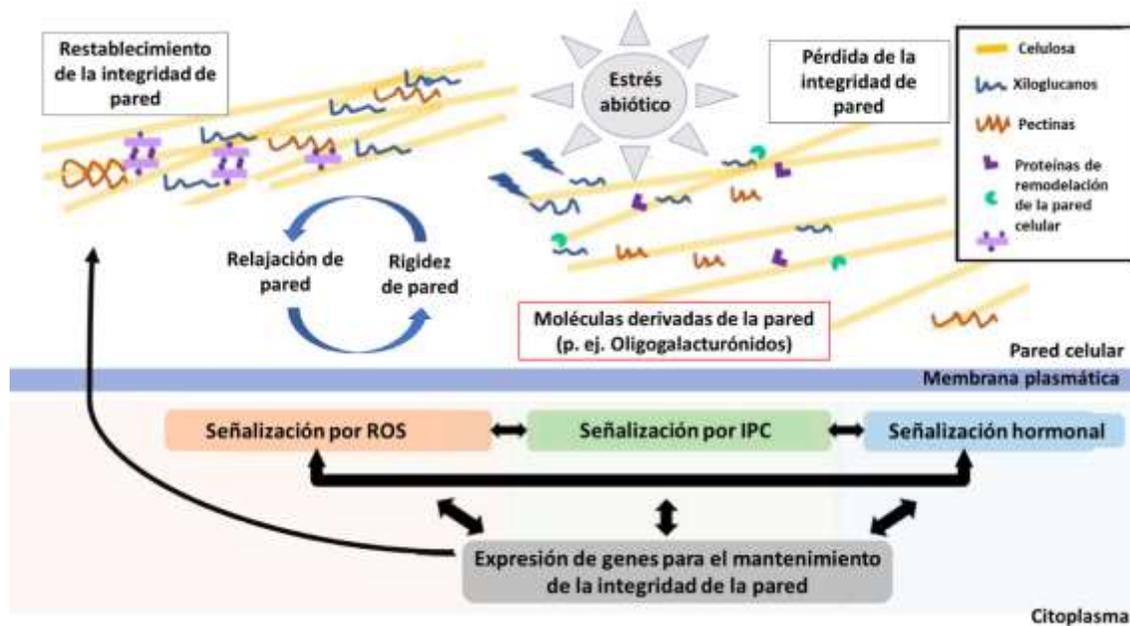


Figura 4. Cambios en la pared celular durante el estrés abiótico y las vías de mantenimiento y restablecimiento de la integridad de la pared celular. Durante el estrés abiótico los cambios en la integridad de la pared conllevan alteraciones que promueven la activación de vías de señalización relacionadas con las especies reactivas de oxígeno (ROS), mantenimiento de la integridad de la pared celular (IPC) y en el metabolismo de fitohormonas. Los derivados producidos por el daño en la pared celular y cambios en su integridad pueden actuar como moléculas de señalización para activar vías de regulación para el mantenimiento de la integridad de la pared (señalización por IPC) y tolerar episodios de estrés. (modificado de Novaković *et al.*, 2018).

Lo anterior sugiere que las proteínas de la familia DUF642 podrían estar relacionadas con mecanismos de respuesta a estrés térmico debido a la modulación del grado de metilesterificación de los HGs de la pared, además de que presentan cambios en su expresión y acumulación a nivel de proteína durante el estrés térmico.

Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo el estudio de la participación del gen *At4g32460/BIIDX1* durante el estrés por calor durante los procesos de adquisición de termotolerancia en *A. thaliana*. Los resultados de este trabajo se presentarán a continuación en el artículo “ BIIDX1 a DUF642 Cell Wall Protein That Regulates Pectin Methyl Esterase Activity Is Involved in Thermotolerance Processes in *Arabidopsis thaliana*”

Hipótesis general

La proteína de la familia DUF642 BIIDX1/AT4G32460 está involucrada en los mecanismos de adquisición de termotolerancia a través de la regulación del grado de esterificación de las pectinas en *Arabidopsis thaliana*

Objetivo general

Estudiar la función de la proteína de la familia DUF642 BIIDX1 durante los mecanismos de adquisición de termotolerancia y termomemoria asociados a la pared celular en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos específicos

1. Determinación de la termotolerancia en plántulas de líneas de ganancia y pérdida de función de los genes de la familia DUF642 *BIIDX1/At4g32460* en *A. thaliana*
2. Análisis fenotípicos de las líneas de ganancia y pérdida de función de los genes de la familia DUF642 *BIIDX1/At4g32460* en *A. thaliana* sometidas a estrés por calor.
3. Determinación de la expresión de genes codificantes para PME, HSFs, HSPs y proteínas DUF642 (BIIDX1) en plántulas de *A. thaliana* durante el proceso de termotolerancia utilizando qRT-PCR.
4. Determinación de la actividad de PME en las plántulas de *A. thaliana* durante el proceso de termotolerancia, así como el cambio en el grado de esterificación de pectinas de la pared celular.

Article

BIIDX1, a DUF642 Cell Wall Protein That Regulates Pectin Methyl Esterase Activity, Is Involved in Thermotolerance Processes in *Arabidopsis thaliana*

Eduardo Pineda-Hernández ¹, José Erik Cruz-Valderrama ¹, Ximena Gómez-Maqueo ¹, Eleazar Martínez-Barajas ² and Alicia Gamboa-deBuen ^{1,*}

¹ Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México 04510, Mexico

² Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México 04510, Mexico

* Correspondence: agamboa@ecologia.unam.mx



Citation: Pineda-Hernández, E.; Cruz-Valderrama, J.E.; Gómez-Maqueo, X.; Martínez-Barajas, E.; Gamboa-deBuen, A. BIIDX1, a DUF642 Cell Wall Protein That Regulates Pectin Methyl Esterase Activity, Is Involved in Thermotolerance Processes in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* **2022**, *11*, 3049. <https://doi.org/10.3390/plants11223049>

Academic Editor: Marcello Salvatore Lenucci

Received: 11 October 2022
Accepted: 8 November 2022
Published: 11 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Plant cell wall remodeling is an important process during plant responses to heat stress. Pectins, a group of cell wall polysaccharides with a great diversity of complex chemical structures, are also involved in heat stress responses. Enzymatic activity of the pectin methyl esterases, which remove methyl groups from pectins in the cell wall, is regulated by DUF642 proteins, as described in different plants, including *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. Our results demonstrated that heat stress altered the expression of the DUF642 gene, *BIIDX1*. There was an important decrease in *BIIDX1* expression during the first hour of HS, followed by an increase at 24 h. *bdx-1* seedlings had less tolerance to heat stress but presented a normal heat stress response; *HSFA2* and *HSP22* expressions were highly increased, as they were in WT seedlings. Thermopriming triggered changes in pectin methyl esterase activity in WT seedlings, while no increases in PME activity were detected in *bdx-1* seedlings at the same conditions. Taken together, our results suggest that *BIIDX1* is involved in thermotolerance via PME activation.

Keywords: plant cell wall; thermotolerance; DUF642 proteins; pectin methyl esterases

1. Introduction

The cell wall has a complex structure, formed mainly by the polysaccharide cellulose, hemicelluloses and pectins, and by proteins from different families. The cell wall actively participates during the different stages of plant development and in response to abiotic and biotic stresses [1]. High temperatures induce heat stress by promoting important alterations in plant growth and development [2]. Plants exposed to sublethal temperatures acquire thermotolerance, a mechanism that allows survival at higher temperatures that are normally lethal. Under laboratory conditions, thermotolerance acquisition can be induced using thermopriming treatment. In addition to the accumulation of heat shock proteins (HSPs), plant cell wall remodeling has also been considered as an integral part of the heat response network, as it was recently demonstrated for salt-induced responses [3,4]. In the mold *Aspergillus fumigatus*, cell wall stress generated by heat stress actively participates in the perception and signaling of stress, triggering the coordinated expression of heat shock transcription factors (HSFs) and HSPs [5].

Heat stress may also promote mechanisms to resist recurrent heat stress events, i.e., thermomemory. The participation of HSFs, HSPs, primary metabolism enzymes, growth regulators, and epigenetic processes in thermomemory has been widely described [2]. The involvement of plant cell wall remodeling processes in thermomemory has not yet been described but is suggested by the upregulation of plant cell wall protein-encoding genes by the transcription factor *HSFA2* [6].

The plant cell wall polysaccharides known as pectins are the most sensitive to the mechanical deformation that occurs in plant cells during the different stages of develop-

ment and during the responses to biotic and abiotic stresses [3,7]. Pectins have a great diversity of complex chemical structures. Among the five different groups of pectins, homogalacturonans (HGs) are the most abundant. These polysaccharides are linear chains of α -1,4-linked D-galacturonic acid (DGalA) residues whose chemical properties, determined by methyl esterification and acetyl esterification, may be influenced by development and environmental conditions [8].

Highly methyl-esterified HGs are secreted into the cell wall, where their degree of esterification is determined by the activity of pectin methyl esterases (PMEs). The removal of the methyl group by PMEs determines the degree of methylation of pectins, promoting both relaxation and increased rigidity of the cell wall: the de-methyl-esterified HGs chains can be the substrate for enzymes such as polygalacturonases (PGs) and pectate lyases (PLs) that promote cell wall relaxation; likewise, the acid groups present in the de-methyl-esterified HG chains can interact with calcium ions found in the cell wall, forming structures called “egg boxes” that confer greater rigidity to the wall [9]. The regulation of the degree of pectin-methyl esterification present in the cell wall is determined by the combined activity of PMEs and the proteins that regulate their activity: the pectin methyl esterase inhibitors (PMEIs) and the DUF642 family proteins [10,11].

PMEs constitute a multigene family in plants that are involved in different physiological processes during plant development. In *Arabidopsis thaliana*, there are 66 PME-related genes with differential expressions during plant development [12]. In *A. thaliana* seedlings, decreases in gene expression of some PMEs resulted from exposure to heat shock, and the PME7, PME28, PME34, and PME53 were observed to participate in the thermotolerance process. The seedlings of the *pme7*, *pme28*, and *pme34* mutant lines have a higher sensitivity to HS [13], while the seedlings of the *pme53* mutant line have a higher thermotolerance [14]. The increase in temperature promotes an increase in PME activity that participates in cell wall remodeling in response to heat stress, a crucial process for the acquisition of thermotolerance [3,13,15]. The increase in PME activity could be a result of their regulation through other interacting proteins, as has been suggested by Bosch and Hepler [16]; PME enzymatic activity regulation is likely more crucial than the regulation at the translation or protein accumulation level.

PMEI proteins were first identified in kiwi [17], and ever since, they have been reported to modulate PME activity in a wide variety of biological contexts, participating in cell adhesion, cell wall stress signaling, and defense, among other processes [18]. The participation of these proteins has been described in response to cold and salinity stress [19], but they are poorly studied during heat stress response, despite previous suggestions by Wu et al. [3] that specific PMEIs might be involved in the regulation of PME34 activity during this process.

The DUF642 family is a family of cell wall proteins specific to spermatophyte plants. In *Arabidopsis*, 10 genes have been described for this family that are grouped into four different clades (A-D) and are differentially expressed during plant development [11,20]. DUF642 proteins have been described in cell wall proteomes of different tissues in *Arabidopsis* and other plants [21]. The DUF642 proteins encoded by the genes *At4g32460* (*BIIDX1*) and *At5g11420* interact *in vitro* with the AtPME3 (pectin methyl esterase 3, *At3g14310*) protein [22]. The DUF642–PME protein interaction has been verified for the rice DUF642 protein, named DFOT1, and the homologue of PME3 [23]. Different tissues in the *BIIDX1* and *At2g41800* (*TEEBE*) loss-of-function and overexpression lines show alterations in PME activity. In seedlings, the *bdx-1* and *teb-1* mutants show a decrease in PME activity, while *OEBDX* and *GCTEB* overexpression lines show an increase [24]. For *bdx-1* and *teb-1*, a decrease in the detection of demethyl-esterified pectins in the seed endosperm and in the epidermal cells of the hypocotyl, respectively, has also been described [25,26]. In rice, the *dfot 1* mutant showed a lower degree of methyl esterification in the cell wall of the lodicule cells, a structure involved in the opening of the flower [23].

The increase in PME activity in response to high temperature determines a remodeling of the cell wall that could participate in the perception and signaling of heat

stress [3,27]. To address the role of the DUF642 proteins in the processes of thermotolerance and thermomemory through the regulation of PME activity, we first investigated the effect of different temperatures on the expression levels of three DUF642 genes: *At3g08030*, *BIIDX1*, and *DGR2* (*DUF642 L-GALL RESPONSIVE GENE 2 (At5g25460)*). We found that *bdx-1* seedlings are more sensitive to heat, and the dynamics of total PME activity during treatment is different from that of WT plants. Our results provide evidence that the DUF642 family proteins could be involved in the regulation of PME activity under heat stress.

2. Results

2.1. *BIIDX1* Expression Decreases during Thermopriming

Heat stress decreased the expression levels of DUF642 genes from peach fruits, and a decrease in the accumulation of DUF642 proteins in peach fruits and *Brachipodium* leaves in response to heat was also reported [28]. To investigate if DUF642 genes from *A. thaliana* could be involved in thermotolerance acquisition and/or in thermomemory (Figure 1A), we first determined the expression levels of *At3g08030*, *BIIDX1*, and *At5g25460*, the DUF642 genes that are highly expressed in seedlings (Figure S1 and Figure 1B). No differences in expression levels of *At3g08030* and *At5g25460* were recorded during thermotolerance and thermomemory, described in Figure 1A. The *BIIDX1* gene expression level decreased in response to heat stress at 37 °C, with no further increase throughout the thermopriming phase (Figure 1B). At 24 h after priming, an increase in *BIIDX1* expression was observed (Figure 1C).

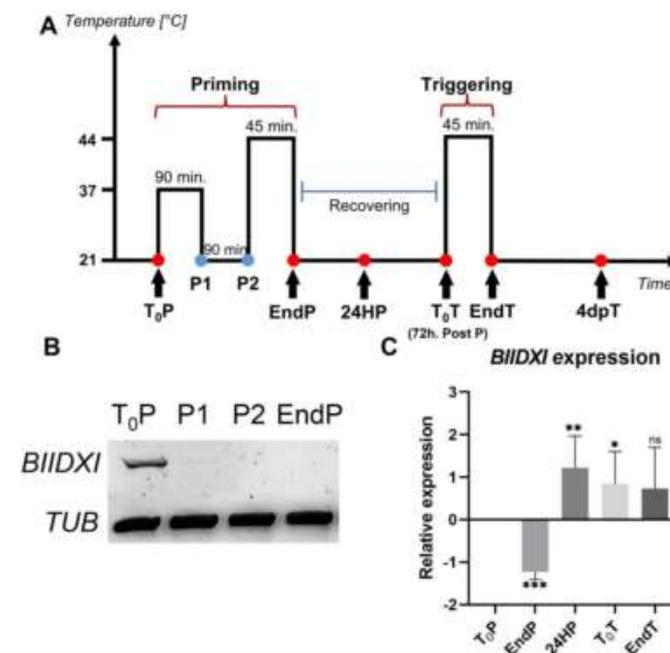


Figure 1. *BIIDX1* expression during thermotolerance and thermomemory. (A) Schematic representation of the protocol (based on Olas et al. [29]). Seedlings were collected and frozen immediately at the beginning and at the end of priming (T_0P and $EndP$), 24 h after the end of priming (24HP), 72 h after priming/start of triggering (T_0T), at the end of triggering ($EndT$), and 4 days after triggering (4dpT). (B) *BIIDX1* expression within the priming, including sublethal heat treatment (C) on the *BIIDX1* expression level during triggering. The expression values are relative to T_0P expression. Error bars indicate S.D. ($n = 4$). Statistical analyses were performed using Student's *t*-test. Asterisks indicate statistically significant differences to T_0P (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns, not significant).

2.2. The *bdx-1* Mutant Is Affected by Thermopriming Treatment

The differential effects of priming and triggering on *BIIDX1* gene expression suggest that this gene could be involved in thermotolerance and/or thermomemory processes, so the effect of both treatments on the development of WT, overexpression (*OEBDX*) transgenic lines, and loss-of-function transgenic line seedlings (*bdx-1*) were performed. The detrimental effects of priming and triggering on seedling development were quantified as the percentage of cotyledon bleaching in seedlings (Figure 2). After three days of priming treatment, 80% of the *bdx-1* seedlings showed cotyledon bleaching, a significantly higher percentage than WT and *OEBDX* seedlings, which did not show significant differences between them (Figure 2A,B). Leaf number in *bdx-1* seedlings was also significantly lower after priming, in contrast to untreated seedlings (7d post priming). Triggering did not affect the percentage of cotyledon bleaching in any of the three lines, but a lower growth of rosette leaves was observed.

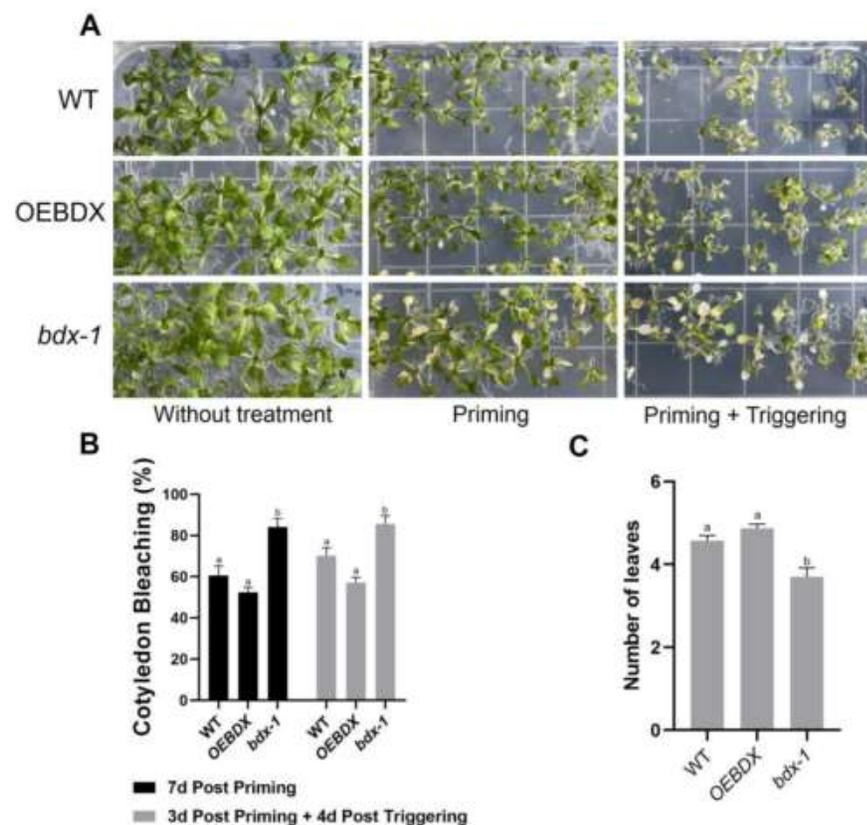


Figure 2. Phenotypic changes of WT, *bdx-1*, and *OEBDX* seedlings during thermotolerance and thermomemory. (A) WT Col-0, *bdx-1*, and *OEBDX* seedlings were grown on MS medium. Seedlings with two leaves were subjected to priming treatment (T_P). Seedling phenotypes of control, 7d post priming and 3d post priming, and 4d post triggering are shown. (B) The bleaching cotyledon phenotype was quantified in seedlings shown in (A) and represented as a percentage. (C) Leaves observed at 4d post triggering. Error bars indicate SEM ($n = 3$). An amount of 10–12 seedlings constituted each biological replicate. For cotyledon bleaching, statistical analyses were performed using arcsine conversion of percentages. Different letters indicate significant differences calculated using one-way ANOVA with *post-hoc* Tukey's test ($p < 0.05$).

To further investigate the effect of priming on seedling development and because of previous reports indicating that root growth is reduced in seedlings grown at 30 °C for 3–4 days [30], we determined the root length of thermoprimered seedlings. We observed that heat reduced root growth in WT, *OEBDX*, and *bdx-1*, but the length of the *bdx-1* roots after the thermoprimering was significantly reduced, with respect to the treated WT and *OEBDX* lines. At 24 h after priming (24HP), no difference in root length between lines was observed; at 72 h after priming (72HP), there was a significant increase in root length that was not observed in *bdx-1* roots (Figure 3). These results suggest that *BIIDX1* is involved in thermotolerance acquisition.

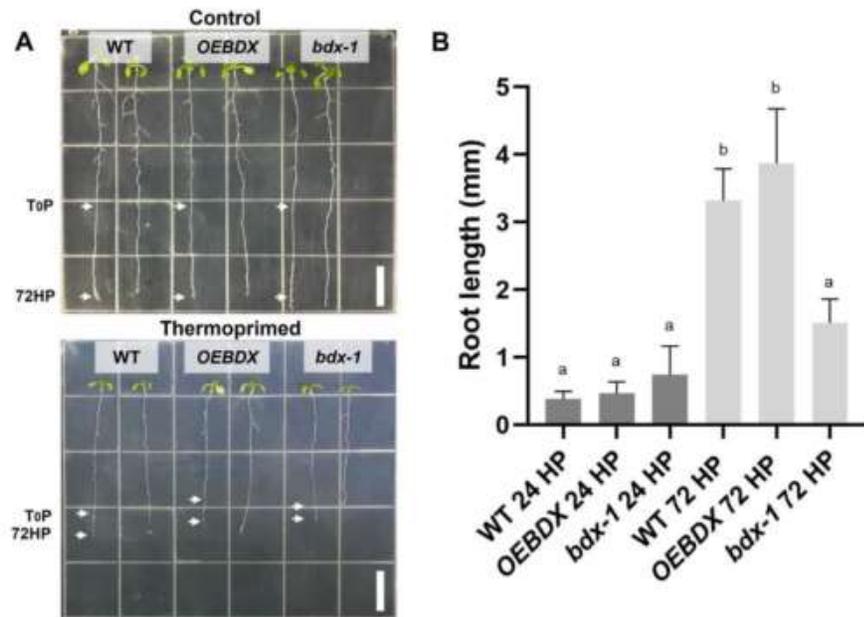


Figure 3. Effect of thermoprimering treatment on root growth. (A) Seedlings of WT, *OEBDX*, and *bdx-1* were sown vertically on MS medium. The seedlings were exposed to priming treatment, and the comparisons of the root lengths between the lines were performed 72 h after priming. (B) Root length average after 24 and 72 h of priming. Error bars indicate SEM (n = 3). An amount of 30 seedlings constituted each biological replicate. Different letters indicate significant differences calculated using one-way ANOVA with *post-hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). White bars = 10 mm.

2.3. *BIIDX1* Participates in the Regulation of PME Activity in Thermotolerance

The proteins of the DUF642 family participate in different stages of plant development, mainly by increasing the PME activity [11,23]. *In vitro* interaction analyses indicate that a possible target is AtPME3, a PME that is highly expressed in seedlings [22]. Heat stress promotes an increase in total PME activity that is involved in cell wall remodeling, which is crucial for thermotolerance [3]. The total PME activity of T₀P seedlings from *bdx-1* corresponded to 50% of the total PME activity of WT seedlings at T₀P (Figure 4A), although there were no differences in *AtPME3* expression levels. To investigate if the *bdx-1* heat sensitivity phenotype was related to PME activity modulation, we determined the total PME activity of the WT and *bdx-1* seedlings during thermoprimering and thermotriggering treatments (Figure 4). The difference in PME activity between WT and *bdx-1* seedlings was observed during both treatments, except for 24 h after priming treatment; the decrease in PME activity detected in WT was similar to the PME activity levels in 24HP seedlings. As it was previously described [13], priming promoted a significant increase in total PME activity in WT seedlings. This increase was not detected in *bdx-1* seedlings (Figure 4A). As

expected, triggering also promoted an increase in PME activity in WT seedlings (Figure 4A). In seedlings, triggering treatment also promoted an increase in PME activity; this activity level was equivalent to the T₀P seedling from WT. These results suggest that BIIDX1 is mainly involved in the increase in PME activity caused by thermoprimering.

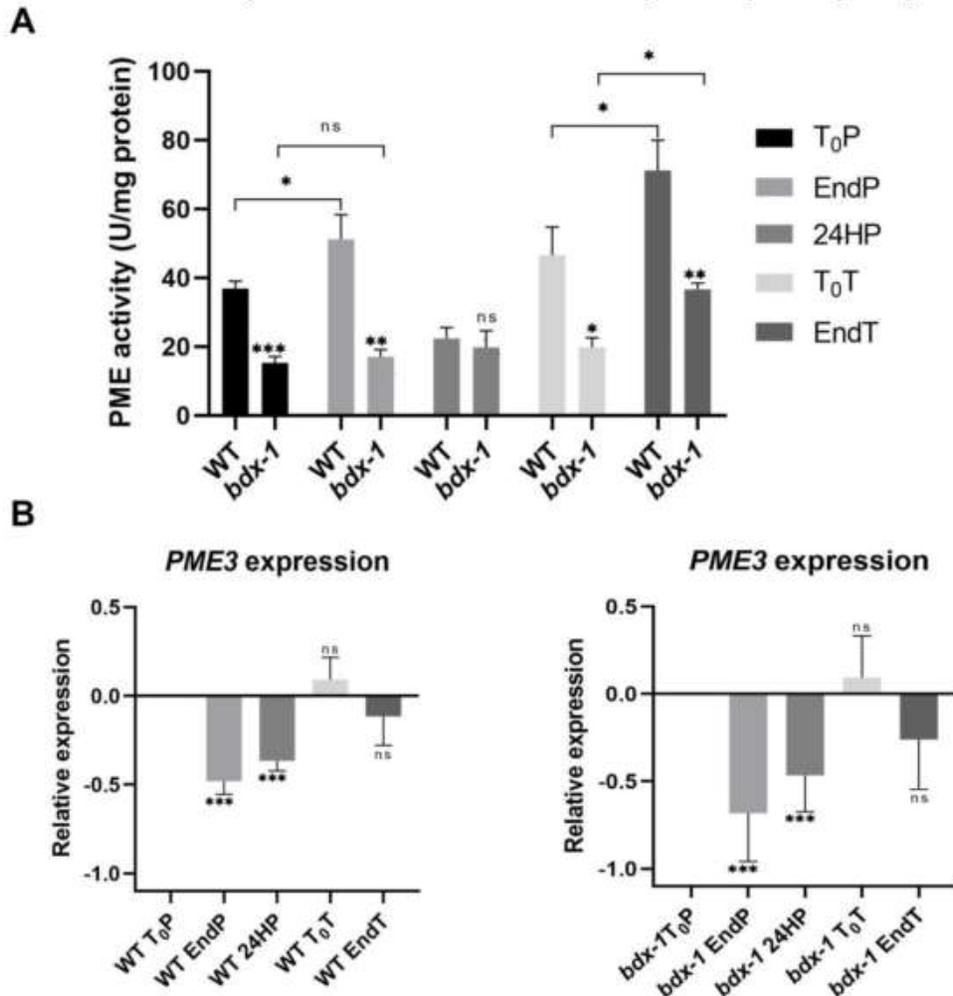


Figure 4. PME activity and *AtPME3* expression of WT and *bdx-1* lines during thermotolerance and thermomemory. **(A)** Effect of priming and triggering on the total PME activity of WT and *bdx-1* seedlings. Error bars indicate SEM (n = 4). Statistical analyses were performed using Student's *t*-test. Asterisks indicate statistically significant differences between WT and *bdx-1* and between treatments (* *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001). **(B)** Effect of priming and triggering on expression levels of *AtPME3* in WT and *bdx-1* seedlings. The expression values are relative to T₀P expression. Error bars indicate S.D. (n = 3). Statistical analyses were performed using Student's *t*-test. Asterisks indicate statistically significant differences to T₀P (* *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001, ns, not significant).

In general, it has been described that the expression levels of different PME isoforms decrease in response to heat shock or thermoprimering treatment [13]. *AtPME3* expressions in response to priming and triggering in WT and *bdx-1* seedlings exhibit similar dynamics (Figure 4B). The *AtPME3* expression decreased because of priming until after 24 h. At 72 h of

treatment, the expression levels had recovered, and the triggering treatment did not affect this expression level.

2.4. The HSF A2-Mediated Signaling Pathway Is Activated in *bdx-1* Seedlings

It has been proposed that PMEs and consequently, cell wall remodeling in response to heat shock, could activate the signaling pathway involved in heat shock response [3]; thus, we determined the expressions of *HSFA2* and *HSP22* during priming and triggering treatments on the WT and *bdx-1* lines. *HSFA2* expression increased markedly in both lines in response to priming (Figure 5A). *HSP22* expression increased in response to priming in both lines and remained at high levels up to 72 h after treatment. Triggering slightly promoted expressions in the WT and *bdx-1* lines (Figure 5B).

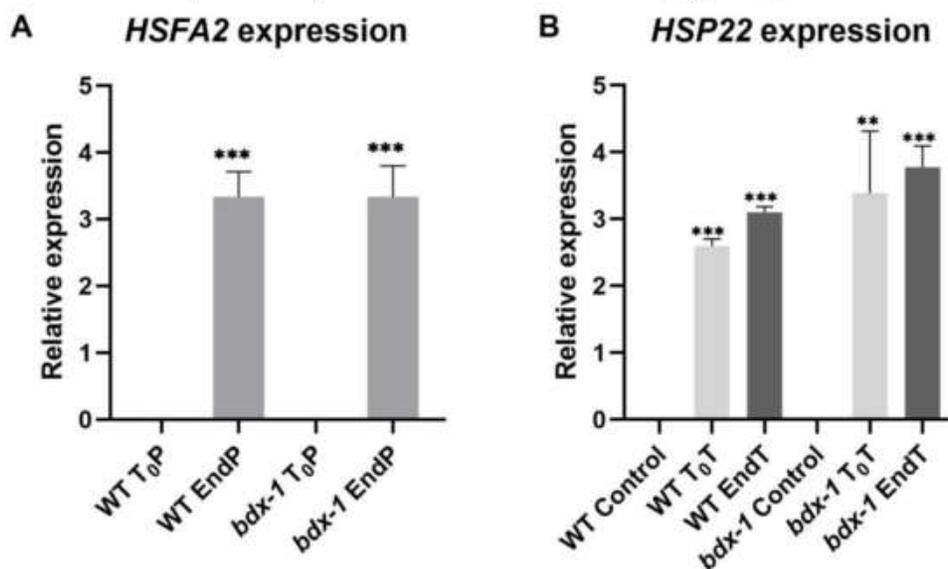


Figure 5. Expression of thermomemory genes in the *bdx-1* line. (A) *HSFA2* expression at the end of priming compared to T₀P in each line. The expression level is similar in WT and *bdx-1*. (B) *HSP22* expression at the beginning and the end of triggering, compared with plants without treatment. For *HSFA2*, the expression values are relative to T₀P expression and for *HSP22*, to WT control. Error bars indicate S.D. (n = 3). Statistical analyses were performed using Student's *t*-test. Asterisks indicate statistically significant differences to T₀P and to WT control (** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001).

3. Discussion

The cell walls of different plant cells have complex and dynamic structures that actively participate in the perception of environmental conditions and in the promotion of cellular responses [1]. Pectin modifications could be involved in the response to different abiotic stresses such as salinity, osmotic, heat, and cold, although the mechanisms involved in perceiving the cell wall damage are not yet known. It has been proposed that salt and heat stresses influence the mechanical properties of the cell wall, modifying the pectin degree of esterification [27]. Recently, Gigli-Bisceglia et al. [4] reported that PME activation by salt is a requirement for the activation of salt-induced responses. In our study, we focused on investigating the function of the DUF642 protein BIIDXI during thermotolerance acquisition and in thermomemory. *BIIDXI* gene expression decreased when the seedlings were subjected to 37 °C and to 44 °C during the priming treatment (Figure 1B). In tissues of different plants, it has been determined that heat shock inhibits the gene expression of the DUF642 family [27,31,32]. *BIIDXI* expression increased 24 h after priming (Figure 1C). This increase in expression, unaffected by the second heat shock, could be regulated by

HSFA2, a heat stress response factor involved in maintaining a high expression of genes, over several days; it could be involved in thermomemory [33]. The promoter region of *BIIDX1* presents several regulatory regions related to the response to heat stress, and the positive regulation of the expression of a gene of the DUF642 family by HSFA2 has been previously described in tomato [6].

BIIDX1 participates in seed development and germination by modifying the pectin degree of esterification by promoting PME activity. An abnormal embryo elongation, resulting from a high methyl esterification of pectins in the cell wall of endosperm cells, was observed in approximately 40% of *bdx-1* seeds. These misshapen seeds present altered germination and seedling development [24,25]. For this study, we used seedlings from normal seeds. These *bdx-1* seedlings presented a high sensitivity to the priming treatment, determined by a higher percentage of seedlings with cotyledon bleaching and by the retarded growth of the main root (Figures 2 and 3). An increase in the testa rupture rate was observed in *OEBDX* seeds, but seedling development was not affected. No difference in heat sensitivity was observed (Figure 2). The demethyl esterification rate of PME activity was increased substantially with increasing temperature, but the mechanism for temperature activation is less understood [3]. WT seedlings showed an increase in PME activity because of priming, as previously described (Figure 4; [13]), while at 24 h after treatment, the activity dropped considerably to similar levels determined in T_0P seedlings from the *bdx-1* mutant. This decrease in PME activity observed in WT seedlings could be related to the decrease in *BIIDX1* expression resulting from priming treatment (Figure 1B). *bdx-1* seedlings did not show any changes in PME activity during priming; the PME activity peak present in WT seedlings was not observed (Figure 4). Heat shock also causes decreases in the expressions of different PMEs. In winter oilseed rape, heat shock induced a nearly 10-fold reduction in *PME35* gene expression [34]. In *Arabidopsis*, the expressions of *AtPM34*, *AtPM28*, and *AtPM7* were reduced at the end of the priming treatment but recovered after 3 h [13]. In the current study, priming promoted a decrease in the expression of *AtPME3*, the PME isoform that interacts *in vitro* with *BIIDX1*, in both WT and *bdx-1* seedlings (Figure 4). Huang et al. [13] suggested that a regulator of PME activity might be involved in the increased activity during the response to heat stress. Our results support the hypothesis that *BIIDX1* is involved in the acquisition of thermotolerance by promoting an increase in PME activity. Furthermore, the mechanism by which *BIIDX1* participates in the response to heat is through promoting PME activity; this was supported by the identification of the thermotolerance impairment of *Arabidopsis bdx-1* mutant plants, which was independent from the expression of heat stress-responsive genes. The gene expression patterns of heat-responsive genes in *bdx-1*, such as *HSEFA2* and *HSP22*, were shown to be similar to those of WT plants (Figure 5).

In response to triggering, PME activity was significantly increased in WT seedlings, while *AtPME3* and *BIIDX1* expression levels were not affected (Figure 4). These results suggest that *BIIDX1* could also be involved in thermomemory by promoting cell wall remodeling. The relevance of cell wall remodeling in thermomemory is also suggested by the HSFA2 upregulation of the expression of a high number of genes involved in cell wall dynamics, including several PMEs [6]. However, triggering also promoted a PME activity increase in *bdx-1*, suggesting that in thermomemory, there could be alternate mechanisms to promote PME activation in the absence of *BIIDX1*. These results can be partially explained by the maintenance of *AtPME3* expression levels during triggering treatment (Figure 4).

The participation of cell wall proteins of the DUF642 family in plant development, especially in the response to stress, has been poorly studied. However, studies in *Arabidopsis* and rice indicate that this family of proteins actively participates in increasing the degree of demethyl esterification of pectins in the cell wall of different cell types by promoting PME activity, although the biochemical mechanism has not been described. The results obtained suggest that *BIIDX1* participates in the response to heat stress by the activation of PMEs, a process necessary for the acquisition of thermotolerance.

4. Methods

4.1. Plant Growth Conditions

Arabidopsis thaliana seeds of the WT (Col-0), *bdx-1*, and *OEBDX* lines were sown on sterile Murashige and Skoog (MS) medium with 1% sucrose and a pH of 5.7. Seeds were stratified at 4 °C for 48 h and subsequently placed in a CONVIRON growth chamber (Winnipeg, Canada) at 22 °C under long photoperiod conditions (16 h light; 8 h dark).

Transgenic Plants

bdx-1: 142260 SALK line with the T-DNA insertion at the end of the second exon of *BIIDX1*. In the homozygous line, the expression of *BIIDX1* was approximately reduced to a 60% [24].

OEBDX: Transgenic plants were transformed with a pBIN vector that contained the full-length coding *BIIDX1* sequence under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter [24]. Expression of *BIIDX1* was highly increased (1000-fold change) in the homozygous transgenic lines [35].

4.2. Thermotolerance and Thermomemory Analyses

Thermopriming and thermotriggering treatments were performed based on Olas et al., [29] and is briefly described as follows: Seedlings with two full leaves were subjected to priming stimulus at 6 h after dawn (90 min at 37 °C in a water bath; recovery at 22 °C for 90 min in the growth chamber; 45 min at 44 °C in a water bath), then returned to normal growth conditions (22 °C) for 72 h of the recovery phase, and then subjected to the triggering treatment (45 min at 44 °C) (Figure 1A). To have enough material for subsequent analyses, the treatment time was reduced to promote seedling survival, especially for *bdx-1* seedlings.

Whole seedling samples were collected and frozen immediately at the beginning and at the end of priming (T_0P and $EndP$), 24 h after the end of priming (24HP), 72 h after priming/start of triggering (T_0T), at the end of triggering ($EndT$), and 4 days after triggering (4dpT).

The analysis of the percentage of seedlings with cotyledon bleaching in the lines WT, *bdx-1*, and *OEBDX* after priming and triggering was carried out in three independent biological replicates with 10–12 seedlings. The effects of priming on root lengths were also performed in the lines WT, *bdx-1*, and *OEBDX* in three independent biological replicates with 30 seedlings.

All the data analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.0 for windows, Graph Pad software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com.

4.3. RNA Isolation, cDNA Synthesis, and Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from 50 mg of collected tissue at each thermomemory treatment point of WT and *bdx-1* plants using the TRIzol extraction technique (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. RNA was quantified by means of a NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The cDNA synthesis was performed from 200 ng of total RNA using the Im Prom-II Reverse Transcription System kit (Promega Corporation). The qRT-PCR measurements were performed using SYBR Green Master Mix and detected with an Applied Biosystems StepOne platform (Applied Biosystems). Three or four independent biological replicates with three technical replicates were performed, and either *TUB2* or *ACT7* was used as endogenous controls using the primers listed in Table S1. The specificity of *BIIDX1* primers was confirmed by cloning and sequencing different clones [24]. In silico analysis also confirmed the primer specificity (Table S2).

Expression analyses were performed using the method described by [36]. Student's *t*-tests were performed using GraphPad Prism version 8.0.0 for windows, Graph Pad software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com.

4.4. Determination of Pectin Methyl Esterase Activity

The assay was performed based on Huang et al., [13]. Seedlings samples (200 mg) were ground and resuspended in phosphate–citrate buffer (0.1 M citric acid; Na₂HPO₄ 0.2 M; NaCl 1 M; pH 5) at 4 °C, with a 3:1 ratio. Then, the samples were centrifuged at 12,000 rpm at 4 °C, the supernatants were recovered, and the total proteins were quantified with the Bradford method.

For the PME activity analysis, 5 µg of protein was added to 1 mL of 0.1% esterified pectin (SigmaAldrich) in 50 mM phosphate buffer (Na₂HPO₄ [0.2 M]; NaH₂PO₄ [0.2 M]; pH 7) and incubated at 37 °C for 1 h. At the end of the incubation, 200 µL of 0.02% ruthenium red was added and incubated at room temperature for 15 min. Finally, 200 µL of 0.6 M CaCl₂ was added and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. Supernatant absorbance at 534 nm was recorded. Four independent biological replicates for each sample, with three technical replicates, were performed. The activity of commercially purifying PME (SigmaAldrich) was performed using the protocol previously described. The standard curve was used to calculate the specific activity for each replicate (U/mg protein). Student's *t*-tests were performed using GraphPad Prism version 8.0.0 for windows, Graph Pad software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants11223049/s1>, Figure S1: *At3g08030* and *DGR2 (At5g25460)* gene expression in WT Col. during thermoprimering and thermo-triggering treatments. Table S1: List of primers used for qRT-PCR experiment. Table S2: Alignment of *BIIDX1* primers to *DUF642* gene sequences of *Arabidopsis thaliana*.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.-d. and E.P.-H.; methodology, E.P.-H., J.E.C.-V. and X.G.-M.; analysis, E.P.-H., J.E.C.-V., A.G.-d. and E.M.-B.; writing—original draft preparation, E.P.-H. and A.G.-d.; writing—review and editing, J.E.C.-V., X.G.-M. and E.M.-B.; visualization, E.P.-H. and A.G.-d.; supervision, A.G.-d.; project administration, A.G.-d.; funding acquisition, A.G.-d. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT UNAM) [grant IN210621] to A.G.-d., and E.P.-H. was supported by the scholarship provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [grant 800940].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Marco Tulio Solano de la Cruz for his technical assistance at the “Unidad de Genética Molecular” Instituto de Ecología, UNAM. We thank Teresa Caudillo and Q. Blanca Hernández Bautista for their technical assistance. E.P.-H. thanks Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional Autónoma de México).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wolf, S. Cell Wall Signaling in Plant Development and Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2022**, *73*, 323–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Balazadeh, S. A ‘hot’ cocktail: The multiple layers of thermomemory in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2022**, *65*, 102147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wu, H.-C.; Bulgakov, V.P.; Jinn, T.-L. Pectin methylesterases: Cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gigli-Bisceglia, N.; Van Zelm, E.; Huo, W.; Lamers, J.; Testerink, C. Arabidopsis root responses to salinity depend on pectin modification and cell wall sensing. *Development* **2022**, *149*, dev200363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fabri, J.H.T.M.; Rocha, M.C.; Fernandes, C.M.; Persinoti, G.F.; Ries, L.N.A.; Cunha, A.F.D.; Goldman, G.H.; Del Poeta, M.; Malavazi, I. The heat shock transcription factor HsfA is essential for thermotolerance and regulates cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 656548. [[CrossRef](#)]
6. Fragkostefanakis, S.; Mesihovic, A.; Simm, S.; Paupière, M.J.; Hu, Y.; Paul, P.; Mishra, S.K.; Tschiersch, B.; Theres, K.; Bovy, A.; et al. HsfA2 controls the activity of developmentally and stress-regulated heat stress protection mechanisms in tomato male reproductive tissues. *Plant Physiol.* **2016**, *170*, 2461–2477. [[CrossRef](#)]

7. Novaković, L.; Guo, T.; Bacic, A.; Sampathkumar, A.; Johnson, K.L. Hitting the wall—Sensing and signaling pathways involved in plant cell wall remodeling in response to abiotic stress. *Plants* **2018**, *7*, 89. [[CrossRef](#)]
8. Wolf, S.; Mouille, G.; Pelloux, J. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol. Plant* **2009**, *2*, 851–860. [[CrossRef](#)]
9. Willats, W.G.T.; Orfila, C.; Limberg, G.; Buchholtz, H.C.; van Alebeek, G.J.W.M.; Voragen, A.G.J.; Marcus, S.E.; Mikkelsen, J.D.; Murray, B.S.; Knox, J.P. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19404–19413. [[CrossRef](#)]
10. Wormit, A.; Usadel, B. The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs). *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2878. [[CrossRef](#)]
11. Cruz-Valderrama, J.E.; Gómez-Maqueo, X.; Salazar-Irbe, A.; Zúñiga-Sánchez, E.; Hernández-Barrera, A.; Quezada-Rodríguez, E.; Gamboa-deBuen, A. Overview of the role of cell wall DUF642 proteins in plant development. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pelloux, J.; Rusterucci, C.; Mellerowicz, E.J. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* **2007**, *12*, 267–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Huang, Y.-C.; Wu, H.C.; Wang, Y.D.; Liu, C.H.; Lin, C.C.; Luo, D.L.; Jinn, T.L. PECTIN METHYLESTERASE34 contributes to heat tolerance through its role in promoting stomatal movement. *Plant Physiol.* **2017**, *174*, 748–763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wu, H.C.; Yu, S.Y.; Wang, Y.D.; Jinn, T.L. Guard Cell-Specific Pectin METHYLESTERASE53 Is Required for Abscisic Acid-Mediated Stomatal Function and Heat Response in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wu, H.C.; Hsu, S.F.; Luo, D.L.; Chen, S.J.; Huang, W.D.; Lur, H.S.; Jinn, T.L. Recovery of heat shock-triggered released apoplastic Ca²⁺ accompanied by pectin methylesterase activity is required for thermotolerance in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 2843–2852. [[CrossRef](#)]
16. Bosch, M.; Hepler, P.K. Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* **2005**, *17*, 3219–3226. [[CrossRef](#)]
17. Balestrieri, C.; Castaldo, D.; Giovane, A.; Quagliuolo, L.; Servillo, L. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Eur. J. Biochem.* **1990**, *193*, 183–187. [[CrossRef](#)]
18. Coculo, D.; Lionetti, V. The Plant Invertase/Pectin Methylesterase Inhibitor Superfamily. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 863892. [[CrossRef](#)]
19. Chen, J.; Chen, X.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Ou, X.; An, L.; Feng, H.; Zhao, Z. A cold-induced pectin methyl-esterase inhibitor gene contributes negatively to freezing tolerance but positively to salt tolerance in Arabidopsis. *J. Plant Physiol.* **2018**, *222*, 67–78. [[CrossRef](#)]
20. Vázquez-Lobo, A.; Roujol, D.; Zúñiga-Sánchez, E.; Albenne, C.; Piñero, D.; de Buen, A.G.; Jamet, E. The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein family: Phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides in vitro. *Mol. Phylogenetics Evol.* **2012**, *63*, 510–520. [[CrossRef](#)]
21. Jamet, E.; Canut, H.; Boudart, G.; Pont-Lezica, R.F. Cell wall proteins: A new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* **2006**, *11*, 33–39. [[CrossRef](#)]
22. Zúñiga-Sánchez, E.; Gamboa-de Buen, A. The two DUF642 At5g11420 and At4g32460-encoded proteins interact in vitro with the AtPME3 catalytic domain. *Protein Interact.* **2012**, *7*, 119–142.
23. Wang, M.; Zhu, X.; Peng, G.; Liu, M.; Zhang, S.; Chen, M.; Liao, S.; Wei, X.; Xu, P.; Tan, X.; et al. Methylesterification of cell-wall pectin controls the diurnal flower-opening times in rice. *Mol. Plant* **2022**, *15*, 956–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zúñiga-Sánchez, E.; Soriano, D.; Martínez-Barajas, E.; Orozco-Segovia, A.; Gamboa-deBuen, A. *BIIDXI*, the At4g32460 DUF642 gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during *Arabidopsis thaliana* seed germination and plant development. *BMC Plant Biol.* **2014**, *14*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cruz-Valderrama, J.E.; Jiménez-Durán, K.; Zúñiga-Sánchez, E.; Salazar-Irbe, A.; Márquez-Guzmán, J.; Gamboa-deBuen, A. Degree of pectin methyl esterification in endosperm cell walls is involved in embryo bending in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *495*, 639–645. [[CrossRef](#)]
26. Salazar-Irbe, A.; Agredano-Moreno, L.T.; Zúñiga-Sánchez, E.; Jiménez-García, L.F.; Gamboa-deBuen, A. The cell wall DUF642 At2g41800 (TEB) protein is involved in hypocotyl cell elongation. *Plant Sci.* **2016**, *253*, 206–214. [[CrossRef](#)]
27. Shin, Y.; Chane, A.; Jung, M.; Lee, Y. Recent advances in understanding the roles of pectin as an active participant in plant signaling networks. *Plants* **2021**, *10*, 1712. [[CrossRef](#)]
28. Pinski, A.; Betekhtin, A.; Skupien-Rabian, B.; Jankowska, U.; Jamet, E.; Hasterok, R. Changes in the cell wall proteome of leaves in response to high temperature stress in *Brachypodium distachyon*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6750. [[CrossRef](#)]
29. Olas, J.J.; Apelt, E.; Annunziata, M.G.; John, S.; Richard, S.I.; Gupta, S.; Kragler, F.; Balazadeh, S.; Mueller-Roeber, B. Primary carbohydrate metabolism genes participate in heat-stress memory at the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* **2021**, *14*, 1508–1524. [[CrossRef](#)]
30. Liu, J.; Liu, Y.; Wang, S.; Cui, Y.; Yan, D. Heat Stress Reduces Root Meristem Size via Induction of Plasmodesmal Callose Accumulation Inhibiting Phloem Unloading in Arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2063. [[CrossRef](#)]
31. Bustamante, C.A.; Budde, C.O.; Borsani, J.; Lombardo, V.A.; Lauxmann, M.A.; Andreo, C.S.; Lara, M.V.; Drincovich, M.F. Heat treatment of peach fruit: Modifications in the extracellular compartment and identification of novel extracellular proteins. *Plant Physiol. Biochem.* **2012**, *60*, 35–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Ngcala, M.G.; Goche, T.; Brown, A.P.; Chivasa, S.; Ngara, R. Heat stress triggers differential protein accumulation in the extracellular matrix of sorghum cell suspension cultures. *Proteomes* **2020**, *8*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lämke, J.; Brzezinka, K.; Altmann, S.; Bäurle, I. A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *EMBO J.* **2016**, *35*, 162–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yu, E.; Fan, C.; Yang, Q.; Li, X.; Wan, B.; Dong, Y.; Wang, X.; Zhou, Y. Identification of heat responsive genes in *Brassica napus* siliques at the seed-filling stage through transcriptional profiling. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101914. [[CrossRef](#)]
35. Salazar-Iribe, A.; Cruz-Valderrama, J.E.; Jiménez-Durán, K.; Gómez-Maqueo, X.; Gamboa-deBuen, A. BIIDX1, a DUF642 cell wall protein, is involved in hypocotyl growth via auxin efflux. *J. Plant. Physiol.* **2018**, *231*, 105–109. [[CrossRef](#)]
36. Willems, E.; Leyns, L.; Vandesompele, J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal. Biochem.* **2008**, *379*, 127–129. [[CrossRef](#)]

Discusión

La regulación de la estructura y el mantenimiento de la integridad de la pared celular son fundamentales debido a que la pared es la barrera de protección más externa ante el daño por episodios de estrés. El estudio de los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los componentes de pared por acción de proteínas remodeladoras de pared es fundamental para la comprensión de los procesos de aclimatación y adaptación de las plantas. Por ejemplo, se sugiere que los cambios en el grado de metilesterificación de los HGs, resultado de un incremento en la actividad de PME, pueden influir en la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (Huang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2021). Sin embargo, las vías que involucran la regulación y mantenimiento de la pared celular en respuesta al estrés por calor se han descrito parcialmente.

El daño a la pared causado por un incremento en la temperatura promueve mecanismos para la mitigación y el mantenimiento de la integridad de la pared relacionados con el incremento en la actividad de PME. El estrés por calor, a través de este incremento, promueve la desmetilesterificación de los HGs de la pared facilitando la interacción de estas pectinas con el Ca²⁺. Esta interacción genera una mayor rigidez de la pared celular. Los HGs que no interaccionan con el Ca²⁺ pueden ser degradadas por acción de PGs y PLs resultando en un incremento en la relajación de la pared y en la generación de moléculas que pueden estar relacionados con las vías de señalización que inducen termotolerancia y/o termomemoria (Wu *et al.*, 2018b).

El grado de metilesterificación de los HGs está también determinado por las proteínas moduladoras de la actividad de PME de las familias PME1 y DUF642. Aunque no hay estudios de la participación de estas dos familias en la respuesta a estrés térmico, se ha reportado que hay una disminución en la expresión de genes DUF642 durante episodios de este tipo de estrés (Bustamante *et al.*, 2012; Ngcala *et al.*, 2020; Pinski *et al.*, 2021).

La expresión del gen *BIIDX1* disminuye durante el tratamiento de termotolerancia en condiciones de estrés por calor (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig.1A, p.3). Esta disminución de la expresión es consistente con lo reportado en frutos de *P. persica* y *F x ananassa*, células en suspensión de *S. bicolor* y hojas de *B. distachion* en respuesta a un estrés por calor (Bustamante *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2022; Ngcala *et al.*, 2020; Pinski *et al.*, 2021). Veinticuatro horas después del tratamiento se observó una recuperación en la

expresión del gen que no disminuye en respuesta a un segundo tratamiento con temperatura letal (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig. 1C, p.3) . Esta diferencia en la respuesta al choque térmico podría estar relacionada con la regulación de la expresión de *BIIDX1* por el factor de transcripción *HSFA2*. En *Solanum lycopersicum* ha sido reportado que los genes de la familia DUF642 presentan un motivo de unión a este factor de transcripción y en las mutantes *hsfa2* no se expresan los genes de esta familia (Fragkostefanakis *et al.*, 2016).

La línea de pérdida de función *bdx-1* presenta menor termotolerancia; las plántulas *bdx-1* presentan un daño mayor tanto en la parte aérea como en la raíz y una actividad menor de PME que las plántulas WT (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig. 2-3, p.4-5). La menor actividad de PME en *bdx-1* ha sido descrita en diferentes tejidos y está relacionada con alteraciones en el desarrollo embrionario y la germinación de la semilla (Cruz-Valderrama *et al.*, 2018; Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014). En estudios relacionados con la adquisición de la termotolerancia vía mantenimiento de la integridad de la pared, se ha reportado que líneas de pérdida de función para PME, que presentan una menor actividad de PME, son más susceptibles al estrés por calor que las WT (Huang *et al.*, 2017). La mayor susceptibilidad de las plántulas *bdx-1* podría estar relacionada con la menor actividad de PME a nivel basal (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig. 4, p. 6). Las plántulas de la línea de sobreexpresión *OEBDX* presentan un daño similar a la WT tal como ha sido reportado para las plántulas de la línea de sobreexpresión de la proteína PME34 (Huang *et al.*, 2017). Por otro lado, no se detectó en *bdx-1* el incremento en la actividad de PME en respuesta al tratamiento presentado en las plántulas WT tal como se ha descrito (Huang *et al.*, 2017). Considerando que el incremento en la actividad de PME en respuesta al segundo choque térmico sí se detectó en las plántulas de *bdx-1*, que además no presentaron un incremento en el daño, se plantea que *BIIDX1* participa en la activación de PME principalmente durante la adquisición de la termotolerancia (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig. 2-3, p.4-5).

La expresión del gen *PME3* disminuyó en respuesta al choque térmico durante el tratamiento de inducción de termotolerancia en las líneas control y *bdx-1*. Esta disminución en la expresión de *PME3* es congruente con lo descrito para otras PMEs en *A. thaliana*, *P. persica* y *F x ananassa* (Bustamante *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2017; Lv *et al.*, 2022). Sin embargo, el segundo choque térmico, para determinar la adquisición de termomemoria, no

altera la expresión de *PME3* en ninguna de las dos líneas. Estos patrones de expresión, relacionados con termotolerancia y termomemoria, son similares a los patrones de *BIIDXI*.

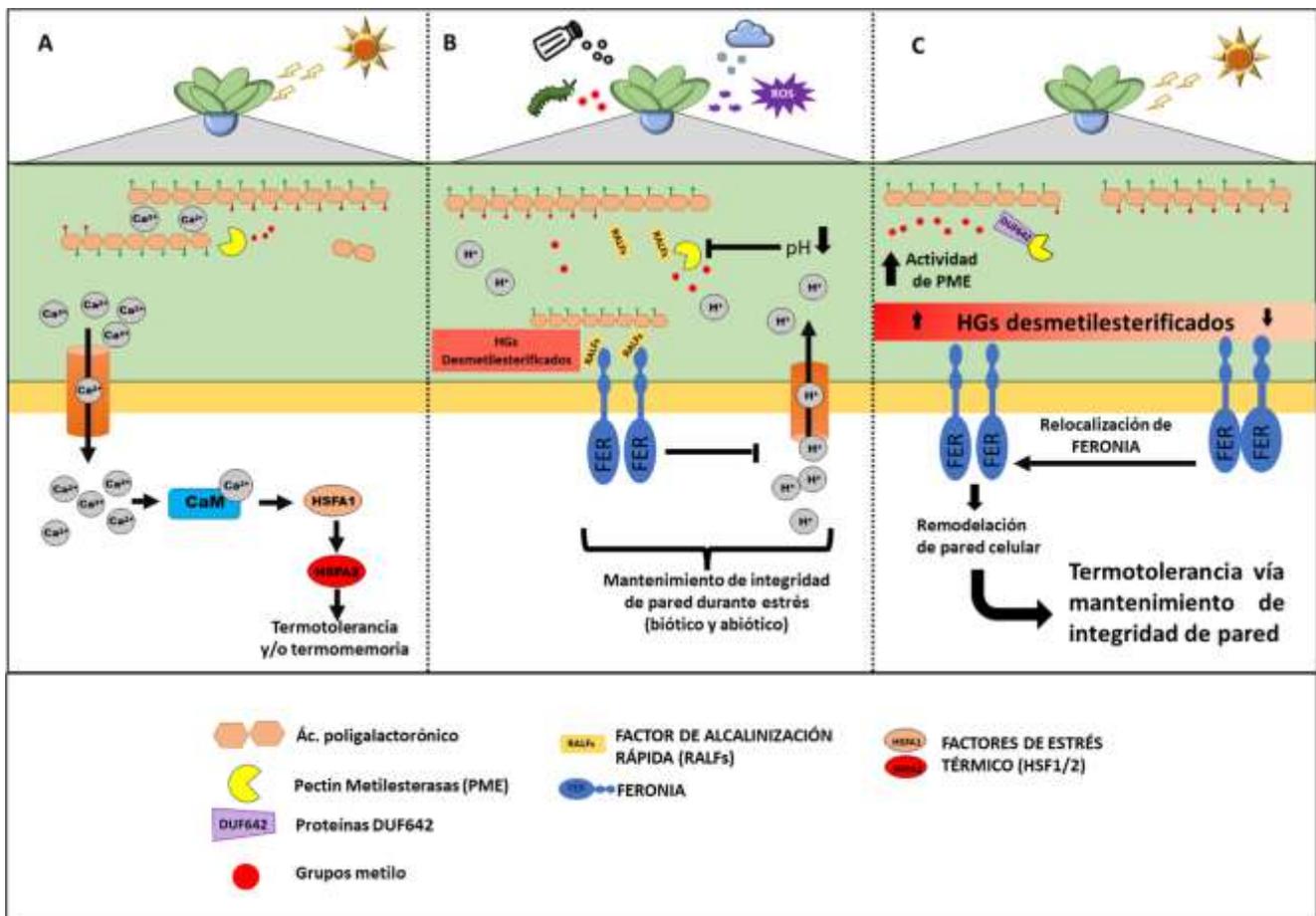


Figura 5. Vías de respuesta ante estrés y su relación con el mantenimiento de la integridad para la adquisición de termotolerancia. **A)** Vía de señalización canónica de respuesta ante estrés térmico e inducción de termotolerancia y/o termomemoria. **B)** Mecanismos de respuesta conocidos ante estrés biótico y abiótico para el mantenimiento de la integridad de la pared. **C)** Vía de señalización propuesta para la adquisición de termotolerancia vía mantenimiento de la integridad de pared por parte de las proteínas DUF642.

A pesar de la importancia de la comprensión de los mecanismos de regulación de la adecuación de la pared celular durante el estrés por calor, existe una cantidad limitada de estudios que exploran la relación entre la regulación de la expresión de genes y/o cambios en la actividad de PMEs con el estrés por calor. En estudios realizados en otras condiciones de estrés abiótico se ha detectado que existe una disminución en la expresión de los genes *PME41* y *PME2* durante estrés por altas concentraciones de boro y durante estrés por frío respectivamente en *A. thaliana* (İşkil & Surgun-Acar, 2018; Qu *et al.*, 2011). El estrés salino

altera la regulación de la expresión de diferentes PME en *Nicotiana tabacum* causando tanto un incremento como una disminución de la expresión (Sun *et al.*, 2022).

Durante el estudio se evaluó la expresión de genes relacionados con las vías principales de respuesta a estrés térmico como *HSFA2* Y *HSP22*, reguladores maestros de la respuesta al estrés por calor, para conocer si la respuesta en la línea de pérdida de función *bdx-1* estaba alterada. Sin embargo, la expresión de estos genes no presentó diferencias significativas al comparar la línea *bdx-1* con la WT (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig. 5, p.7). Considerando que los resultados sugieren que la participación de BIIDX1 en la adquisición de termotolerancia está relacionada con la regulación de la actividad de PME, la conservación de la vía de las HSPs en la línea mutante *bdx-1* es consistente con los estudios realizados por Huang *et al.*, 2017 en la línea mutante para *PME34* ya que la expresión de genes codificantes para *HSP101*, *HSP90* y *HSP70*, relacionadas con la adquisición de termotolerancia, no resulta afectada en comparación a la línea control. Lo anterior sugiere que, dado que la respuesta ante el estrés por calor modulada por *HSFA2* no se encuentra afectada en la línea *bdx-1*, como en *pme34* (Huang *et al.*, 2017), la función de BIIDX1 podría ser independiente de esta vía de señalización. Se propone que pudiesen existir mecanismos alternos que, en conjunto con los HSFs, promuevan la adquisición de la termotolerancia a partir del mantenimiento de la integridad de la pared celular.

Otros autores han sugerido que proteínas encargadas del mantenimiento de la integridad de la pared como la familia de receptores de tipo cinasa (RLKs) participan en la respuesta al estrés abiótico promoviendo la reducción del crecimiento y elongación celular, así como durante el desarrollo, morfogénesis celular. (Liao *et al.*, 2017; Malivert & Hamant, 2023; Yin *et al.*, 2018). Se ha descrito que las RLKs, como FERONIA, suelen ubicarse en zonas de alta desmetilesterificación de HGs en sitios específicos de la pared celular (Doblas *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2022). Considerando lo anterior, se propone que BIIDX1 pudiese actuar como una proteína de respuesta ante daños que ocasionen cambios en las propiedades fisicoquímicas de la pared. Estos cambios podrían generar una relocalización de BIIDX1 hacia sitios de mayor vulnerabilidad y compromiso estructural de la pared durante el estrés por calor e incrementar la actividad de PME y generar microdominios de HGs Desmetilesterificados para la promover la relocalización de FERONIA y activar la vía de señalización encargada del mantenimiento de la integridad de la pared celular ante el estrés (Fig. 5). La participación de FERONIA en el mantenimiento de la integridad de la pared celular ya ha sido reportada en condiciones de estrés biótico y abiótico, excepto en estrés por calor (Yin *et al.*, 2018; L. Zhang *et al.*, 2023). Lo anterior explicaría el hecho de que la

línea *bdx-1* es más termosensible en comparación a la línea WT a pesar de que la expresión de los genes de respuesta a estrés estudiados (*HSFA2* y *HSP22*) son similares en ambas líneas (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig. 5, p.7).

La regulación del grado de relajación y rigidez de la pared es fundamental para la tolerancia al daño por estrés por calor y, por ello, el estudio del mantenimiento de la integridad de la pared es fundamental para comprender la tolerancia de las plantas ante el cambio climático.

Los mecanismos de adquisición de termotolerancia a partir del mantenimiento en la integridad de la pared celular en función del grado de extensibilidad y dureza han sido poco estudiados en las plantas. Por ello, se sugiere que la regulación precisa del grado de metilesterificación de las pectinas de pared cumple un papel fundamental en la promoción de la termotolerancia al modular la plasticidad de la pared.

Conclusiones

BIIDX1 mantiene la regulación de la actividad de PME durante las primeras horas de exposición al estrés por calor y podría estar involucrado como proteína de respuesta ante cambios en las propiedades de la pared celular.

La participación de BIIDX1 en la adquisición de termotolerancia es independiente de la vía relacionada con las HSFs.

No hay cambios en la expresión de genes reguladores de la vía principal de inducción de termotolerancia (*HSFs* y *HSPs*) en mutantes de pérdida de función del gen *BIIDX1*.

Se sugiere que la función de BIIDX1 podría ser la generación de microdominios de desmetilesterificación de HGs para promover la acción de RLKs como FERONIA y para mantener la integridad de la pared celular en respuesta a estrés por calor, lo cual ha sido reportado para otros tipos de estrés abiótico.

Los resultados obtenidos sugieren que *BIIDX1* está relacionado con la adquisición de la termotolerancia durante el estrés por calor. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual los genes de la familia *DUF642*, como *BIIDX1*, actúan aún es desconocido. Por ello, es necesario el estudio a mayor profundidad de estos mecanismos de inducción de la termotolerancia y el papel de las proteínas *DUF642* en respuesta a estrés.

Apéndice I

Reflexiones finales del proyecto de investigación

El objetivo de esta sección es realizar un ejercicio de autoevaluación con el fin de mejorar mi formación como futuro investigador al identificar mis áreas de oportunidad durante el desarrollo de mi proyecto de investigación. Todo con el fin de desarrollar habilidades autocríticas que permitan continuar con el desarrollo de trabajos de alta calidad durante mi futura formación como científico. Este apartado es más reflexivo y de carácter personal, por lo cual no se considera necesario agregarse a la parte de la discusión y conclusiones del trabajo.

Durante la escritura de la tesis y las correcciones sugeridas por el sínodo, se lograron identificar de manera principal áreas de oportunidad que corresponden a la mejora en los protocolos de las técnicas de PCR tiempo final y qPCR, análisis estadísticos y la representación gráfica de los resultados obtenidos a partir de ellos.

Durante los experimentos para cuantificar la expresión del gen *BIIDX1*, los genes de respuesta a estrés *HSFA2*, *HSP22* y el gen *AtPME3* se utilizó el gen de referencia *TUB2* o *ACT7*. Se sabe que los genes de referencia en condiciones basales son estables, pero su expresión puede variar dependiendo de las condiciones, estadios de desarrollo de las plantas y tratamientos experimentales, por lo que es recomendable utilizar más de un gen de referencia en ensayos de qPCR (Li *et al.*, 2021). Sin embargo, los genes *TUB2* y *ACT7* han sido probados como genes de referencia en condiciones de estrés y su expresión resulta estable (Huang *et al.*, 2017; Olas *et al.*, 2021). No obstante, en un futuro los ensayos de qPCR podrían complementarse con otros genes de referencia que han sido descrito con mayor estabilidad durante condiciones de estrés por calor como *Elongation Factor 1 α* (*EF1- α*) en conjunto con *TUB2* o *ACT7* (Li *et al.*, 2021).

Los análisis estadísticos realizados a partir de los datos obtenidos de los experimentos de adquisición de la termotolerancia tienen como objetivo demostrar los cambios, ya sea en la expresión de los genes evaluados (*BIIDX1*, *HSFA2*, *HSP22*, *PME3*) o el cambio en la actividad de PME en condiciones de estrés por calor. Las comparaciones de estos datos se realizaron por pares por medio de la prueba *t* de Student, prueba recomendada para realizar comparaciones entre las medias de dos muestras. La prueba de *t* de Student puede ser

utilizada para realizar este tipo de comparaciones si solo queremos realizar la comparación entre dos grupos o medias, el cual fue el objetivo del análisis estadístico. Sin embargo, al realizar este tipo de comparaciones múltiples existe el riesgo de incrementar el error de tipo 1. Por ello, otro tipo de análisis que pudo haberse realizado es una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) con la prueba *post hoc* Dunnett. Este tipo de pruebas reducen el riesgo de incrementar el error de tipo 1 y realizar las comparaciones de las medias contra una media control. No obstante, el uso de pruebas múltiples de *t* de Student ha sido reportado previamente para el análisis de este tipo de experimentos para evaluación de termotolerancia (Huang *et al.*, 2017; Olas *et al.*, 2021).

Otro de los puntos a mejorar es el apartado gráfico de los resultados, debido a que en la manera en que se están representando pueden provocar confusión y una interpretación errónea de los resultados. El objetivo de la manera en que se representaron los resultados era resaltar las diferencias en la expresión de genes durante los tratamiento y/o el cambio en la actividad entre las líneas y el efecto del calor a nivel morfológico durante la exposición al choque de calor. Sin embargo, una mejor forma de representar los resultados pudo ser la división de las gráficas por puntos del tratamiento (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig.2B, p.4) y (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig.3B, p.5). Otro cambio que haría sería la forma de representación de los cambios en la actividad de PME (Pineda-Hernández *et al.*, 2022, Fig.4A, p.6), debido a que al separar el cambio en la actividad por línea experimental podrían reflejarse de mayor forma las diferencias entre ellas y no generar la confusión de que se están comparando todos los datos representados en dicha gráfica.

Finalmente, las correcciones propuestas anteriormente favorecerían el realizar una publicación con un mayor calidad a la ya presentada. Esto para aclarar algunos puntos en el apartado de resultados y favorecer que los datos brinden una mayor claridad al lector y sean más fáciles de comprender. Se llevaran a cabo estas recomendaciones y todas las propuestas durante la corrección de esta tesis por parte del alumno para fomentar un mayor crecimiento a nivel profesional y personal.

Referencias bibliográficas

- Ashraf, M. (2021). Thermotolerance in plants: Potential physio-biochemical and molecular markers for crop improvement. *Environmental and Experimental Botany*, 186, 104454.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104454>
- Avelange-Macherel, M.-H., Rolland, A., Hinault, M.-P., Tolleter, D., & Macherel, D. (2019). The Mitochondrial Small Heat Shock Protein HSP22 from Pea is a Thermosoluble Chaperone Prone to Co-Precipitate with Unfolding Client Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 97. <https://doi.org/10.3390/ijms21010097>
- Balazadeh, S. (2022). A ‘hot’ cocktail: The multiple layers of thermomemory in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 65, 102147. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102147>
- Bäurle, I., & Trindade, I. (2020). Chromatin regulation of somatic abiotic stress memory. *Journal of Experimental Botany*, 71(17), 5269–5279. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa098>
- Bustamante, C. A., Budde, C. O., Borsani, J., Lombardo, V. A., Lauxmann, M. A., Andreo, C. S., Lara, M. V., & Drincovich, M. F. (2012). Heat treatment of peach fruit: Modifications in the extracellular compartment and identification of novel extracellular proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.021>
- Calderan-Rodrigues, M. J., Guimarães Fonseca, J., de Moraes, F. E., Vaz Setem, L., Carmanhanis Begossi, A., & Labate, C. A. (2019). Plant Cell Wall Proteomics: A Focus on Monocot Species, *Brachypodium distachyon*, *Saccharum spp.* and *Oryza sativa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1975. <https://doi.org/10.3390/ijms20081975>
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Cosgrove, D. J. (2022). Building an extensible cell wall. *Plant Physiology*, 189(3), 1246–1277.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiac184>
- Cruz-Valderrama, J. E., Jiménez-Durán, K., Zúñiga-Sánchez, E., Salazar-Irbe, A., Márquez-Guzmán, J., & Gamboa-deBuen, A. (2018). Degree of pectin methyl esterification in endosperm cell walls is involved in embryo bending in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.077>

- Daher, F. B., & Braybrook, S. A. (2015). How to let go: Pectin and plant cell adhesion. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00523>
- Doblas, V. G., Gonneau, M., & Höfte, H. (2018). Cell wall integrity signaling in plants: Malectin-domain kinases and lessons from other kingdoms. *The Cell Surface*, 3, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.06.001>
- Du, J., Anderson, C. T., & Xiao, C. (2022). Dynamics of pectic homogalacturonan in cellular morphogenesis and adhesion, wall integrity sensing and plant development. *Nature Plants*, 8(4), 332–340. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01120-2>
- Ezquer, I., Salameh, I., Colombo, L., & Kalaitzis, P. (2020). Plant Cell Walls Tackling Climate Change: Biotechnological Strategies to Improve Crop Adaptations and Photosynthesis in Response to Global Warming. *Plants*, 9(2), 212. <https://doi.org/10.3390/plants9020212>
- Fragkostefanakis, S., Mesihovic, A., Simm, S., Paupière, M. J., Hu, Y., Paul, P., Mishra, S. K., Tschiersch, B., Theres, K., Bovy, A., Schleiff, E., & Scharf, K.-D. (2016). HsfA2 Controls the Activity of Developmentally and Stress-Regulated Heat Stress Protection Mechanisms in Tomato Male Reproductive Tissues. *Plant Physiology*, 170(4), 2461–2477. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01913>
- Guihur, A., Rebeaud, M. E., & Goloubinoff, P. (2022). How do plants feel the heat and survive? *Trends in Biochemical Sciences*, 47(10), 824–838. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.05.004>
- Guo, M., Liu, J.-H., Ma, X., Luo, D.-X., Gong, Z.-H., & Lu, M.-H. (2016). The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00114>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, Md., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2013). Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9643–9684. <https://doi.org/10.3390/ijms14059643>
- He, M., He, C.-Q., & Ding, N.-Z. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>
- Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Bäurle, I., Geiselhardt, S., Hinch, D. K., Kunze, R., Mueller-Roeber, B., Rillig, M. C., Rolff, J., Romeis, T., Schmölling, T., Steppuhn, A., van Dongen, J., Whitcomb, S. J., Wurst, S., Zuther, E., & Kopka, J. (2016). Priming and memory of stress

- responses in organisms lacking a nervous system: Priming and memory of stress responses. *Biological Reviews*, 91(4), 1118–1133. <https://doi.org/10.1111/brv.12215>
- Hong, S.-W., & Vierling, E. (2000). Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 4392–4397. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.4392>
- Huang, Y.-C., Wu, H.-C., Wang, Y.-D., Liu, C.-H., Lin, C.-C., Luo, D.-L., & Jinn, T.-L. (2017). PECTIN METHYLESTERASE34 Contributes to Heat Tolerance through Its Role in Promoting Stomatal Movement. *Plant Physiology*, 174(2), 748–763. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00335>
- İşkil, R., & Surgun-Acar, Y. (2018). Expression analysis of cell wall assembly and remodelling-related genes in *Arabidopsis* roots subjected to boron stress and brassinosteroid at different developmental stages. *Acta Botanica Brasilica*, 32(4), 546–554. <https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0023>
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., & Pont-Lezica, R. F. (2006). Cell wall proteins: A new insight through proteomics. *Trends in Plant Science*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.006>
- Kochhar, S. L., & Gujral, S. K. (2020). *Plant Physiology: Theory and Applications* (2a ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108486392>
- Li, R., Cui, K., Xie, Q., Xie, S., Chen, X., Zhuo, L., Cao, A., Shen, H., Jin, X., Wang, F., & Li, H. (2021). Selection of the reference genes for quantitative gene expression by RT-qPCR in the desert plant *Stipagrostis pennata*. *Scientific Reports*, 11(1), 21711. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00833-2>
- Li, X., Li, Y., Qu, M., Xiao, H., Feng, Y., Liu, J., Wu, L., & Yu, M. (2016). Cell Wall Pectin and its Methylesterification in Transition Zone Determine Al Resistance in Cultivars of Pea (*Pisum sativum*). *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00039>
- Liao, H., Tang, R., Zhang, X., Luan, S., & Yu, F. (2017). FERONIA Receptor Kinase at the Crossroads of Hormone Signaling and Stress Responses. *Plant and Cell Physiology*, 58(7), 1143–1150. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx048>
- Lin, W., Tang, W., Pan, X., Huang, A., Gao, X., Anderson, C. T., & Yang, Z. (2022). *Arabidopsis* pavement cell morphogenesis requires FERONIA binding to pectin for activation of ROP GTPase signaling. *Current Biology*, 32(3), 497-507.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.11.030>
- Lv, J., Zheng, T., Song, Z., Pervaiz, T., Dong, T., Zhang, Y., Jia, H., & Fang, J. (2022). Strawberry Proteome Responses to Controlled Hot and Cold Stress Partly Mimic Post-harvest Storage Temperature Effects on Fruit Quality. *Frontiers in Nutrition*, 8, 812666. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.812666>

- Malivert, A., & Hamant, O. (2023). Why is FERONIA pleiotropic? *Nature Plants*, 9(7), 1018–1025.
<https://doi.org/10.1038/s41477-023-01434-9>
- Mesihovic, A., Ullrich, S., Rosenkranz, R. R. E., Gebhardt, P., Bublak, D., Eich, H., Weber, D., Berberich, T., Scharf, K.-D., Schleiff, E., & Fragkostefanakis, S. (2022). HsfA7 coordinates the transition from mild to strong heat stress response by controlling the activity of the master regulator HsfA1a in tomato. *Cell Reports*, 38(2), 110224. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110224>
- Ngcala, M. G., Goche, T., Brown, A. P., Chivasa, S., & Ngara, R. (2020). Heat Stress Triggers Differential Protein Accumulation in the Extracellular Matrix of Sorghum Cell Suspension Cultures. *Proteomes*, 8(4), 29. <https://doi.org/10.3390/proteomes8040029>
- Nieto-Sotelo, J., Martínez, L. M., Ponce, G., Cassab, G. I., Alagón, A., Meeley, R. B., Ribaut, J.-M., & Yang, R. (2002). Maize HSP101 Plays Important Roles in Both Induced and Basal Thermotolerance and Primary Root Growth. *The Plant Cell*, 14(7), 1621–1633. <https://doi.org/10.1105/tpc.010487>
- Novaković, L., Guo, T., Bacic, A., Sampathkumar, A., & Johnson, K. (2018). Hitting the Wall—Sensing and Signaling Pathways Involved in Plant Cell Wall Remodeling in Response to Abiotic Stress. *Plants*, 7(4), 89. <https://doi.org/10.3390/plants7040089>
- Ochoa-Villarreal, M., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., & ngel, M. (2012). Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. En A. De Souza Gomes (Ed.), *Polymerization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/46094>
- Olas, J. J., Apelt, F., Annunziata, M. G., John, S., Richard, S. I., Gupta, S., Kragler, F., Balazadeh, S., & Mueller-Roeber, B. (2021). Primary carbohydrate metabolism genes participate in heat-stress memory at the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 14(9), 1508–1524. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.05.024>
- Pineda-Hernández, E., Cruz-Valderrama, J. E., Gómez-Maqueo, X., Martínez-Barajas, E., & Gamboa-deBuen, A. (2022). BIIDX1, a DUF642 Cell Wall Protein That Regulates Pectin Methyl Esterase Activity, Is Involved in Thermotolerance Processes in *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 11(22), 3049. <https://doi.org/10.3390/plants11223049>
- Pinski, A., Betekhtin, A., Skupien-Rabian, B., Jankowska, U., Jamet, E., & Hasterok, R. (2021). Changes in the Cell Wall Proteome of Leaves in Response to High Temperature Stress in *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6750. <https://doi.org/10.3390/ijms22136750>

- Qu, T., Liu, R., Wang, W., An, L., Chen, T., Liu, G., & Zhao, Z. (2011). Brassinosteroids regulate pectin methylesterase activity and AtPME41 expression in Arabidopsis under chilling stress. *Cryobiology*, 63(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.07.003>
- Queitsch, C., Hong, S.-W., Vierling, E., & Lindquist, S. (2000). Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(4), 479–492. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.479>
- Sedaghatmehr, M., Stüwe, B., Mueller-Roeber, B., & Balazadeh, S. (2022). Heat shock factor HSFA2 fine-tunes resetting of thermomemory via plastidic metalloprotease FtsH6. *Journal of Experimental Botany*, 73(18), 6394–6404. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac257>
- Sénéchal, F., L'Enfant, M., Domon, J.-M., Rosiau, E., Crépeau, M.-J., Surcouf, O., Esquivel-Rodriguez, J., Marcelo, P., Mareck, A., Guérineau, F., Kim, H.-R., Mravec, J., Bonnin, E., Jamet, E., Kihara, D., Lerouge, P., Ralet, M.-C., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Tuning of Pectin Methylesterification. *Journal of Biological Chemistry*, 290(38), 23320–23335. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639534>
- Serrano, N., Ling, Y., Bahieldin, A., & Mahfouz, M. M. (2019). Thermopriming reprograms metabolic homeostasis to confer heat tolerance. *Scientific Reports*, 9(1), 181. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36484-z>
- Shin, Y., Chane, A., Jung, M., & Lee, Y. (2021). Recent Advances in Understanding the Roles of Pectin as an Active Participant in Plant Signaling Networks. *Plants*, 10(8), 1712. <https://doi.org/10.3390/plants10081712>
- Simoni, E. B., Oliveira, C. C., Fraga, O. T., Reis, P. A. B., & Fontes, E. P. B. (2022). Cell Death Signaling From Endoplasmic Reticulum Stress: Plant-Specific and Conserved Features. *Frontiers in Plant Science*, 13, 835738. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.835738>
- Sinclair, R., Rosquete, M. R., & Drakakaki, G. (2018). Post-Golgi Trafficking and Transport of Cell Wall Components. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1784. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01784>
- Sun, J., Tian, Z., Li, X., Li, S., Li, Z., Wang, J., Hu, Z., Chen, H., Guo, C., Xie, M., & Xu, R. (2022). Systematic analysis of the pectin methylesterase gene family in *Nicotiana tabacum* and reveal their multiple roles in plant development and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 13, 998841. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.998841>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant physiology* (4th ed). Sinauer Associates.

- Temple, H., Phyto, P., Yang, W., Lyczakowski, J. J., Echevarría-Poza, A., Yakunin, I., Parra-Rojas, J. P., Terrett, O. M., Saez-Aguayo, S., Dupree, R., Orellana, A., Hong, M., & Dupree, P. (2022). Golgi-localized putative S-adenosyl methionine transporters required for plant cell wall polysaccharide methylation. *Nature Plants*, 8(6), 656–669. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01156-4>
- Toribio, R., Mangano, S., Fernández-Bautista, N., Muñoz, A., & Castellano, M. M. (2020). HOP, a Co-chaperone Involved in Response to Stress in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 591940. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.591940>
- Usman, M. G., Rafii, M. Y., Martini, M. Y., Yusuff, O. A., Ismail, M. R., & Miah, G. (2017). Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(1), 26–39. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1340546>
- Vázquez-Lobo, A., Roujol, D., Zuñiga-Sánchez, E., Albenne, C., Piñero, D., Buen, A. G. de, & Jamet, E. (2012). The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein family: Phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides in vitro. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(2), 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.02.001>
- Wang, M., Zhu, X., Peng, G., Liu, M., Zhang, S., Chen, M., Liao, S., Wei, X., Xu, P., Tan, X., Li, F., Li, Z., Deng, L., Luo, Z., Zhu, L., Zhao, S., Jiang, D., Li, J., Liu, Z., ... Zhou, H. (2022). Methylesterification of cell-wall pectin controls the diurnal flower-opening times in rice. *Molecular Plant*, 15(6), 956–972. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.04.004>
- Wolf, S. (2022). Cell Wall Signaling in Plant Development and Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 73(1), 323–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-095312>
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Molecular Plant*, 2(5), 851–860. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp066>
- Wu, H.-C., Bulgakov, V. P., & Jinn, T.-L. (2018a). Pectin Methylesterases: Cell Wall Remodeling Proteins Are Required for Plant Response to Heat Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1612. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01612>
- Wu, H.-C., Bulgakov, V. P., & Jinn, T.-L. (2018b). Pectin Methylesterases: Cell Wall Remodeling Proteins Are Required for Plant Response to Heat Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1612. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01612>

- Wu, H.-C., Huang, Y.-C., Stracovsky, L., & Jinn, T.-L. (2017). Pectin methylesterase is required for guard cell function in response to heat. *Plant Signaling & Behavior*, *12*(6), e1338227.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1338227>
- Yeh, C.-H., Kaplinsky, N. J., Hu, C., & Charng, Y. (2012). Some like it hot, some like it warm: Phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Science*, *195*, 10–23.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.06.004>
- Yin, Y., Qin, K., Song, X., Zhang, Q., Zhou, Y., Xia, X., & Yu, J. (2018). BZR1 Transcription Factor Regulates Heat Stress Tolerance Through FERONIA Receptor-Like Kinase-Mediated Reactive Oxygen Species Signaling in Tomato. *Plant and Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy146>
- Yu, Y., Cui, L., Liu, X., Wang, Y., Song, C., Pak, U., Mayo, K. H., Sun, L., & Zhou, Y. (2022). Determining Methyl-Esterification Patterns in Plant-Derived Homogalacturonan Pectins. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 925050. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.925050>
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, *63*(1), 251–272. <https://doi.org/10.1111/jipb.13055>
- Zhang, L., Zhang, S., & Zheng, C. (2023). Growth or stress responses: TMK–FER balancing act. *Trends in Plant Science*, *28*(2), 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.10.007>
- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., & Jin, B. (2020). Plant Responses to Heat Stress: Physiology, Transcription, Noncoding RNAs, and Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 117.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010117>
- Zúñiga-Sánchez, E., & Gamboa-de, A. (2012). The Two DUF642 At5g11420 and At4g32460-Encoded Proteins Interact In Vitro with the AtPME3 Catalytic Domain. En J. Cai (Ed.), *Protein Interactions*. InTech. <https://doi.org/10.5772/37984>
- Zúñiga-Sánchez, E., & Gamboa-deBuen, A. (2012). The Two DUF642 At5g11420 and At4g32460-Encoded Proteins Interact In Vitro with the AtPME3 Catalytic Domain. En J. Cai (Ed.), *Protein Interactions*. InTech. <https://doi.org/10.5772/37984>
- Zúñiga-Sánchez, E., Soriano, D., Martínez-Barajas, E., Orozco-Segovia, A., & Gamboa-deBuen, A. (2014). BIIDX1, the At4g32460 DUF642 gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during Arabidopsis thalianaseed germination and plant development. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 338.
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0338-8>

