



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL CUAL LA AUSENCIA DE MPK3 O MPK6 AFECTA LA
ACTIVIDAD DE LA ATPasa de H^+ EN LA ACLIMATACIÓN AL FRÍO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ILIAN GIORDANO PONCE PINEDA

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. MARINA GAVILANES RUIZ

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. ÁNGEL ARTURO GUEVARA GARCÍA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Dra. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Dra. MARIANA SAUCEDO GARCÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE HIDALGO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

VOCAL: Dra. Berenice García Ponce de León

VOCAL: Dra. Aurora Lara Nuñez

VOCAL: Dr. Genaro Vázquez Victorio

SECRETARIO: Dra. Marina Macías Silva

Sitio en donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 101, Conjunto E, Departamento de Bioquímica
Facultad de Química, UNAM**



ASESOR:

Dra. Marina Gavilanes Ruíz



SUSTENTANTE:

M. en C. Ilian Giordano Ponce Pineda

RECONOCIMIENTOS

El M. en C. Ilian Giordano Ponce Pineda realizó esta tesis de Doctorado gracias a una beca de CONACYT (Registro No. 741285) y a una beca de la DGAPA, UNAM (PAPIIT IN222621).

Esta tesis se realizó gracias al financiamiento de los proyectos PAPIIT IN222621 e IN213124 (DGAPA, UNAM), CONACYT (CB-2014-01, 238368) y PAIP 50009115 (Facultad de Química, UNAM).

A los Drs. Edgar B. Cahoon y Rebecca B. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, USA), por el análisis esfingolipidómico de las muestras membranales.

Al Dr. Arturo Guevara García (Instituto de Biotecnología, UNAM), por donar las semillas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas *mpk3*, *mpk6* y *OvMPK6* y por su participación dentro del comité tutorial.

Al la Dra. Sobeida Sánchez Nieto (Facultad de Química, UNAM), por facilitar la instrumentación para el análisis de transcritos y por su participación dentro del comité tutorial.

Al la Dra. Mariana Saucedo García (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo), por su asesoría a lo largo de la parte experimental y la escritura de los artículos, así como por su participación dentro del comité tutorial.

A la Dra. Laura Carmona Salazar (Facultad de Química, UNAM) por el cultivo de plantas, la obtención de las vesículas de membrana plasmática y su ayuda en parte del análisis informático.

A la Dra. Dora Luz Cano Ramírez (University of Cambridge) por sus determinaciones de fluidez membranal.

A la Q. Laurel Fabila Ibarra (Facultad de Química, UNAM) por su apoyo técnico en el cultivo de las plantas usadas.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD
ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

**ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL CUAL LA AUSENCIA DE MPK3 O MPK6 AFECTA LA
ACTIVIDAD DE LA ATPasa de H^+ EN LA ACLIMATACIÓN AL FRÍO**

que presenté para obtener el grado de Doctorado es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Ilian Giordano Ponce Pineda

411016210

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1. El estrés en plantas por bajas temperaturas	5
1.1. El estrés en las plantas	5
1.2. Las bajas temperaturas en plantas	6
1.3. Percepción de las señales de frío en plantas	7
1.4. Transducción de señales de frío en plantas	8
1.4.1. Segundos Mensajeros	9
1.4.1.1. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	9
1.4.1.2. Ácido fosfatídico (PA).....	11
1.4.1.3. Óxido Nítrico (NO).....	11
1.4.1.4. Fitoesfingosina-1-fosfato.....	11
1.4.2. MAP cinasas	12
1.4.3. Regulón dependiente de CBFs	1
1.4.4. Regulón independiente de CBFs	3
2. La membrana plasmática	4
2.1. Lípidos de la membrana plasmática.....	6
2.1.1. Glicerolípidos	6
2.1.2. Esfingolípidos.....	8
2.1.2.1. Nomenclatura y estructura de los esfingolípidos.....	8
2.1.2.2. Biosíntesis y degradación de esfingolípidos.....	11
2.1.2.2.1. Síntesis y degradación de LCBs.....	13
2.1.2.2.2. Síntesis y degradación de ceramidas	15
2.1.2.2.3. Síntesis y degradación de esfingolípidos complejos	17
2.1.2.3. Funciones de los esfingolípidos en plantas.....	19
2.1.2.3.1. Glicosilinositolfosforilceramidas.....	20
2.1.2.3.2. Glucosilceramidas	20
2.1.2.3.3. Ceramidas e Hidroxiceramidas.....	21
2.1.2.3.4. Bases de cadena larga (LCBs)	23
2.1.3. Esteroles	26
2.2. La membrana plasmática en la respuesta al frío	26

3.	La ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática	27
3.1.	Las ATPasas tipo P	27
3.2.	La ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática de plantas	30
3.2.1.	Estructura de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática	33
3.2.2.	Catálisis de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática	36
3.2.3.	Papel fisiológico de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática	38
3.2.3.1.	Crecimiento celular y desarrollo de la planta	38
3.2.3.2.	Apertura estomática	39
3.2.3.3.	Nutrición celular	40
3.2.3.4.	Mantenimiento del pH intracelular	40
3.3.	La ATPasa de H ⁺ en la respuesta al frío	40
	HIPÓTESIS	42
	OBJETIVO GENERAL	42
	OBJETIVOS PARTICULARES	42
	MATERIALES Y MÉTODOS	43
1.	Material biológico	43
2.	Crecimiento de plantas	43
3.	Tratamientos térmicos de las plantas	44
3.1.	Reto de congelación	44
3.1.1.	Determinación de la fuga de electrolitos	44
3.2.	Determinación del porcentaje de sobrevivencia y de deterioro	45
4.	Análisis de la ultraestructura celular	46
5.	Aislamiento y purificación de fracciones subcelulares	46
5.1.	Aislamiento de la fracción citosólica	46
5.2.	Obtención de las fracciones microsomales	46
5.3.	Obtención de vesículas de membrana plasmática	46
5.4.	Determinación de la concentración proteica	47
6.	Determinación de la fluidez membranal	47
7.	Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa de H ⁺	48
7.1.	Ensayo de la hidrólisis de ATP	48
7.2.	Determinación del fosfato inorgánico	49
7.2.1.	Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa de H ⁺ a diferentes concentraciones de sustrato	49
8.	Inmunodetección de proteínas	50
8.1.	Separación de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS	50

8.2. Tinción de geles con azul de Coomassie.....	51
8.3. Secado de geles	51
8.4. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.....	51
8.5. Detección de proteínas por revelado en Western Blot	52
9. Determinación de la composición y cuantificación de esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática	52
10. Determinación de niveles de transcritos	52
10.1. Extracción de RNA	52
10.1.1. Evaluación de la integridad del RNA.....	53
10.2. Síntesis de cDNA.....	54
10.3. Diseño de cebadores	54
10.3.1. Evaluación de cebadores	56
10.3.2. Eficiencia de los cebadores	56
10.4. Análisis de los niveles de transcrito	56
11. Análisis estadístico	57
RESULTADOS.....	58
1. La participación de la MPK6 en la aclimatación al frío es necesaria para promover la sobrevivencia de Arabidopsis ante el congelamiento	58
2. La MPK6 contribuye a la regulación de la actividad de la ATPasa de H ⁺ durante la aclimatación al frío por medio de la modificación en la fluidez de la membrana plasmática	64
3. La MPK6 es un regulador potencial del metabolismo de esfingolípidos durante la aclimatación al frío	75
DISCUSIÓN	95
1. Las cinasas MPK3 y MPK6 pueden regular el contenido y la composición de los esfingolípidos de la membrana plasmática a través de un control transcripcional.....	95
2. La MPK6 regula la fluidez de la membrana plasmática a través de la modificación de su composición durante la aclimatación al frío	104
3. La fluidez de la membrana plasmática regula la actividad de la ATPasa de H ⁺ durante la aclimatación al frío.....	105
4. La MPK6 está involucrada en el mantenimiento de la estructura del cloroplasto durante la aclimatación al frío	111
5. La MPK6 es una enzima crucial en la aclimatación de la planta al frío y en su tolerancia al congelamiento.....	114
CONCLUSIONES	117
CONTRIBUCIONES.....	118
PERSPECTIVAS	120

ARTÍCULOS PUBLICADOS	121
BIBLIOGRAFÍA	124
APÉNDICES	156
Apéndice I.....	156
Apéndice II	156
Apéndice III.....	156
Apéndice IV	157
Apéndice V	157
Apéndice VI.....	157
Apéndice VII	158
Apéndice VIII.....	158
Apéndice IX	159

RESUMEN

Las plantas sufren daños irreversibles al exponerse a la congelación. Sin embargo, las especies de clima templado han evolucionado para tolerar las temperaturas bajo 0 °C desarrollando una aclimatación. Esta la adquieren naturalmente a través de una exposición temporal a temperaturas no congelantes durante la cual reprograman su metabolismo. Para ello, involucran vías moleculares de señalización que inciden en la expresión de genes específicos para producir cambios celulares que conducen a la sobrevivencia de la planta a la congelación. Entre ellos está la remodelación estructural y funcional de su membrana plasmática (MP). Este trabajo de tesis propuso investigar los cambios que experimenta la MP al remodelarse durante la aclimatación a 4 °C. Para ello, se usaron herramientas clásicas y avanzadas de Bioquímica, Biología Celular, Genética Molecular, Biofísica e Informática. Los resultados obtenidos describen cómo la señal de frío transducida por la MPK6 impacta dos blancos de la MP: la composición de esfingolípidos y la actividad de la ATPasa de H⁺. Usando plantas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre y knocked-out en los genes de las MAP cinasas MPK3 y MPK6, se encontró que la MPK6 es una proteína transductora crítica de la señal de frío que orquesta, como respuesta de tolerancia a la congelación, la expresión diferencial de 14 de 18 genes estudiados, que son responsables del metabolismo de esfingolípidos y que conducen a la modificación del esfingolipidoma de la MP principalmente a través de la regulación de su contenido de hidroxiceramidas (hCers) y glicosilinositolfosforilceramidas (GIPCs). Se determinó que estos cambios son consistentes con la disminución de la fluidez membranal y a su vez con el decremento del 30 % de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP. Además, se encontró que la MPK3 regula el contenido de glucosilceramidas y GIPCs en temperaturas normales de crecimiento. Los resultados descritos están en acuerdo con el análisis fenotípico de las mutantes que indica una hipersensibilidad de la mutante *mpk6* a la congelación, revelando que esta cinasa y todos los cambios membranales que desencadena gracias a su señalización son críticos para conceder una sobresaliente tolerancia a la congelación. Estos descubrimientos son relevantes para entender los mecanismos naturales de tolerancia a la congelación y así coadyuvar a generar estrategias tecnológicas de protección de cultivos y ecosistemas sometidos al rigor del cambio climático.

ABSTRACT

Plants suffer irreversible damage when exposed to freezing. However, temperate species have evolved an acclimation process to tolerate temperatures below 0 °C. They acquire this capacity through a temporary exposure to non-freezing temperatures, when they reprogram their metabolism. To accomplish this, plants count on molecular signaling pathways that lead to the expression of specific genes in order to produce cellular changes that end up in plant survival after a freezing episode. Among these changes, the structural and functional remodeling of the plasma membrane (PM) is necessary. This dissertation investigated the changes that the PM undergoes when attains acclimation by a 4 °C exposure. In order to study this, advanced tools from Biochemistry, Cellular Biology, Molecular Genetics, Biophysics and Bioinformatics were achieved. The results obtained describe how the cold signal transduced by MPK6 impacts two targets of PM: sphingolipid composition and the H⁺-ATPase activity. *Arabidopsis thaliana* wild-type plants and knocked-out mutants in the MAP kinase genes MPK3 or MPK6 were used. It was found that MPK6 is a critical transducer of the cold signal that orchestrates, as a tolerance response to freezing, the differential expression of 14 genes. These genes encoding enzymes of the sphingolipid metabolism, lead to the modification of the PM sphingolipidome via the regulation of its content of hydroxyceramides (hCers) and glycosilinositolphosphorylceramides (GIPCs). Such changes were consistent with the decrease in membrane fluidity and, in the same way, with the 30% decrease of the PM H⁺-ATPase activity. Furthermore, MPK3 was found to regulate the content of glucosylceramides and GIPCs at habitual temperatures of growth (22 °C) The results agree with the phenotypic analysis of these mutants, that indicate a freezing hypersensitivity of the MPK6 mutant. This reveals that MPK6, and all the membrane changes that this kinase contributes to trigger are critical for conferring an outstanding tolerance to freezing. These discoveries are relevant to understand the natural mechanisms of freezing tolerance and are useful fundamentals to generate technological strategies for crop and ecosystem protection against the environmental stressed conditions of the climate change.

ABREVIATURAS

AC Aclimatadas al frío

ACER Ceramidasa alcalina

AHA1-11 Isoformas 1 a 11 de la ATPasa de H⁺

ATP Adenosín Trifosfato

BSA Albúmina sérica bovina

BTP Bis-Tris-Propano

C Carbono

CBF C-Repeat Binding Factor

CCCP Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

Cer Ceramida

GCS Glucosilceramida sintasa

GIPC Glicosilinositolfosforilceramida

GlcCer Glucosilceramida

hCer Hidroxiceramida

HMI Hidrólisis con mezcla de inhibidores

HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia

HPLC/ESI-MS/MS HPLC fase reversa acoplada a espectrometría de masas con ionización por electro-aspersión

HQ Hidrólisis química

HT Hidrólisis total

HVO₄ Hidrólisis con vanadato

IPC Inositolfosforilceramida

IPCS1-3 Isoforma 1 a 3 de la inositolfosforilceramida sintasa

LCB Base de Cadena Larga

Cer-P Ceramida Fosforilada

COR Cold regulated

DNA Ácido desoxirribonucleico

FA Ácido graso

FAH1-2 Isoforma 1 a 2 de la hidroxilasa de FA de esfingolípidos.

FC Fracción citosólica

FC Fracción citosólica

FM Fracción microsomal

FM Fracciones microsomales

GCD3 Glucosilceramidasa

LCB-P Base de Cadena Larga Fosforilada

LCFA Ácidos grasos de cadena larga

LOH1-3 Isoformas 1- 3 de la ceramidas sintasa

MAPK Proteína cinasa activada por mitógenos

MH Medio de hidrólisis

MKKK MAP cinasa cinasa cinasa

MKK1-10 Isoformas 1 a 10 de las MAP cinasa cinasas de *A. thaliana*

MMF Modelo del Mosaico Fluido

MP Membrana plasmática

MPK1-20 Isoformas 1 a 20 de las MAP Cinasas de *A. thaliana*

NA No aclimatadas

NANODROP Espectrofotómetro de microvolumen

NCER1-3 Isoforma 1 a 3 de la ceramidasa neutra

PA Ácido fosfatídico

PCD Muerte celular programada

PEG Polietilenglicol

PHS-P Fitoesfingosina-1-P

Pi Fosfato

PIPES Ácido 1,4-Piperazindietansulfónico

PVDF Polifloruro de vinilideno

RE Retículo Endoplásmico

RNA Ácido ribonucleico

ROS Especies reactivas de Oxígeno

SBH1-2 Isoforma 1 a 2 de la hidroxilasa de la LCB.

SDS Dodecil sulfato de sodio

SLD1-2 Isoforma 1 a 2 de la desaturasa de la LCB.

SPT Serina Palmitoiltransferasa

VLCFA Ácidos grasos de cadena muy larga

VMP Vesículas de membrana plasmática

VMP Vesículas de MP

INTRODUCCIÓN

1. El estrés en plantas por bajas temperaturas

1.1. El estrés en las plantas

Las plantas son organismos continuamente afectados por diversos factores ambientales, los cuales influyen en su crecimiento, reproducción y sobrevivencia. La intensidad y la fluctuación de estos factores pueden generar estrés, el cual se define como la disrupción de la homeostasis celular que provoca una desestabilización interna y externa de las funciones celulares. Este estrés puede resultar en la estimulación del desarrollo celular y una posterior normalización de las funciones de la célula (eustrés) o en un daño irreparable que puede terminar en la muerte de la célula (distrés) [Lichtenthaler, 1998]. El estrés de las plantas puede dividirse en dos grandes categorías, dependiendo del factor que lo cause; el estrés biótico, el cual es causado por otros organismos como patógenos, parásitos, herbívoros y competidores, o el estrés abiótico, que es causado por factores físicos o químicos como la temperatura, la humedad, la luz, la disponibilidad de agua, de nutrientes o de CO₂ [Giri & Sharma, 2021]. La habilidad de percibir y responder a estos estreses dependerá de la susceptibilidad, la resistencia o inclusive la capacidad de evasión de la planta a dicho estrés, lo que conllevará a su sobrevivencia o muerte (Fig. 1) [Hüner & Hopkins, 2008].

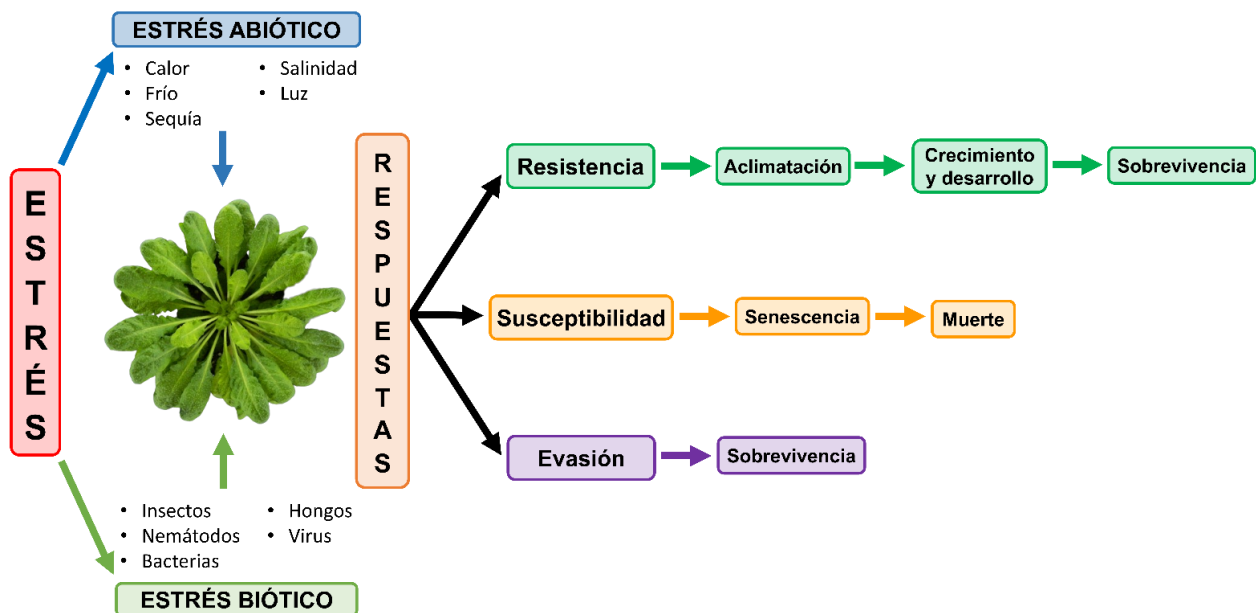


Figura 1. Estreses ambientales en el desarrollo y viabilidad de la planta. Se muestran las subdivisiones de los tipos de estrés en biótico y abiótico, además de las posibles respuestas de la planta que generan su sobrevivencia o su muerte.

Las condiciones climáticas actuales y sus cambios han generado una desregulación de las condiciones ambientales normales, lo que ha provocado un aumento en la frecuencia y la magnitud de la irrupción de algunos estreses abióticos en plantas, afectando su crecimiento y desarrollo. Se estima que el estrés abiótico causa aproximadamente el 70 % de la reducción del rendimiento de los cultivos a nivel mundial [Ansari et al, 2023].

1.2. Las bajas temperaturas en plantas

En el planeta Tierra existen diferentes ambientes naturales en los cuales la temperatura del aire a nivel del suelo puede fluctuar entre los -89.2°C y los 56.7°C [Kubecka, 2001; Turner et al, 2009]. Sin embargo, la mayor parte de las plantas viven óptimamente en rangos de temperatura entre los 10°C y los 30°C [Hüner & Hopkins, 2008]. Debido a estas limitaciones, las plantas han adquirido mecanismos para enfrentar los cambios de temperatura a lo largo del día, de las estaciones anuales y de su ciclo de vida, desplegando una gran plasticidad metabólica y fisiológica. Esta adaptación varía de acuerdo con la especie, la localización geográfica, los ciclos diurnos y estacionales e inclusive con la etapa de desarrollo de la planta [Körner, 2016].

Las bajas temperaturas provocan un estrés que afecta el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de las plantas. Dicho estrés puede ser clasificado como estrés por enfriamiento (cuando se produce a temperaturas entre 15°C y 0°C) y estrés por congelamiento (cuando se produce a temperaturas por debajo de 0°C) [Yadav, 2010; Miura & Furumoto, 2013]. La sensibilidad con la que la planta responda ante estos estreses dependerá de que tan rápido se produzca la fluctuación de la temperatura, más que por el tiempo de exposición a las bajas temperaturas, pero ambos factores, así como la intensidad de la temperatura, contribuyen a la respuesta final de la planta [Guy, 1990; Hinch & Zuther, 2014].

De acuerdo con Galiba y Tóth (2017), las plantas pueden dividirse en tres categorías dependiendo de su tolerancia a las bajas temperaturas:

- Susceptibles al enfriamiento: los daños en la planta se perciben a temperaturas menores a 12°C .
- Tolerantes al enfriamiento, pero susceptibles al congelamiento: la planta puede adaptarse a temperaturas bajas, pero presenta daños a partir de temperaturas menores a 0°C .

- Tolerantes al congelamiento: plantas capaces de adaptarse y sobrevivir a temperaturas muy por debajo de los 0 °C.

La mayoría de las plantas tropicales y subtropicales como el plátano (*Musa* spp.) y el inchi (*Plukenetia volubilis*), entre otras, son susceptibles al estrés por enfriamiento [Bugaud et al, 2015; Lei et al, 2014]. Sin embargo, las plantas herbáceas de climas templados han desarrollado mecanismos para aumentar su capacidad de soportar temperaturas congelantes, la cual se activa gradualmente tras una exposición a temperaturas bajas no congelantes [Thomashow, 1999]. Este proceso, conocido como aclimatación al frío, es una característica que involucra una reprogramación génica y metabólica con el fin de generar cambios celulares que permitan la sobrevivencia de la planta a la congelación [Chinnusamy et al., 2010; Winfield et al, 2010] tales como modificaciones en la estabilidad de las membranas [Raju et al, 2018] y del citoesqueleto [Wu et al, 2012], la acumulación y degradación de proteínas [Guy, 1990; Janmohammadi et al, 2015; Wang et al; 2019], la modificación en el contenido de osmolitos [Tarkowski & Van Den Ende, 2015] y cambios en la maquinaria fotosintética [Krol et al, 1999; Rapacz et al, 2008]. En el caso de *A. thaliana*, la máxima tolerancia a la congelación se obtiene después de siete días de aclimatación a 2 °C [Uemura et al, 1995].

1.3. Percepción de las señales de frío en plantas

Esclarecer el mecanismo por el cual las células perciben las señales de frío es importante para poder proponer la manera en que se pueden evitar los daños causados por las bajas temperaturas. En el caso de mamíferos, se sabe que es necesario activar los canales de iones TRP (*Transient Receptor Potential*) para desencadenar la entrada de Ca^{2+} y activar respuestas posteriores [Bautista et al, 2007; Buijs & McNaughton, 2020]. No obstante, a pesar de las investigaciones llevadas a cabo en los últimos 100 años, aún no se puede responder con certidumbre como es que las plantas perciben las bajas temperaturas [Knight & Knight, 2012; Jahed et al, 2023]. Sin embargo, los enfoques recientes han producido una gran cantidad de información relacionada con la secuencia de eventos que conducen a la percepción del frío, sugiriendo algunos posibles mecanismos.

La primera hipótesis sugiere la existencia de canales de Ca^{2+} con una función análoga a la de los TRP, pues en plantas no se han encontrado homólogos a este tipo de canales, aunque sí existe un rápido incremento de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico tras el tratamiento por frío en plantas [Knight et al, 1996]. En arroz (*Oryza sativa*) se encontró que la proteína COLD1 (*Chilling Tolerance Divergence 1*) actúa como un regulador de la subunidad 1α de la proteína G de arroz

(RGA1), mediando el flujo del Ca^{2+} intracelular y permitiendo la activación de los genes en respuesta a frío llamados *COR* (*Cold Regulated*) [Ma et al, 2015; Iqbal et al, 2022]. Se ha hipotetizado que la interacción COLD1-RGA1 genera un posible canal permeable al calcio, o al menos una parte de este, ya que el bloqueo de los canales de calcio con cloruro de lantano impidió la señalización corriente abajo en respuesta al frío [Luo et al, 2021].

Otra hipótesis ha propuesto que la rigidificación de la membrana plasmática debida a la disminución de la temperatura actúa como la señal primaria para la percepción del frío en plantas. Esta disminución de la fluidez sucede como respuesta inmediata a las bajas temperaturas debido a las propiedades fisicoquímicas de los lípidos que componen a la bicapa membranal [Cano-Ramirez et al, 2021]. Diferentes ensayos utilizando DMSO (dimetilsulfóxido, un rigidificador membranal) y BA (alcohol bencílico, un fluidificador membranal) demostraron que la expresión de los genes *COR BN115* y *COR15a* era inducida tras la rigidificación de la membrana a 25 °C y eran inhibidos por la fluidificación de la membrana a 4 °C [Orvar et al, 2000; Sangwan et al, 2001; Furuya et al, 2014]. Aunado a estos estudios, se encontró que el estrés por frío activaba a la diacilglicerol cinasa (DAGK), a lo que se asociaba una disminución de la fluidez de la membrana plasmática [Vaultier et al, 2006]. Adicionalmente, se encontró que plantas de *Arabidopsis* mutadas en un gen que codifica para la desaturasa de ácidos grasos 2 (*FAD2*) alteraban su fluidez membranal, su percepción y posteriormente su respuesta a las bajas temperaturas [Martinière et al, 2011].

Una hipótesis más reciente sugiere que el intercambio entre el estado activo (P_{Fr}) y el estado inactivo (P_R) del fitocromo B (*phyB*) podrían actuar como un termosensor en *Arabidopsis*, el cual se asocia directamente con los promotores de genes clave en la respuesta a los cambios de temperatura [Jung et al, 2016; Legris et al, 2016]. En arroz, se encontró que las mutantes *phyB* presentaban una menor fuga de electrolitos y una mayor integridad membranal ante el estrés por frío [He et al, 2016]. Más recientemente se encontró que la región del amino terminal de *phyB* es una región intrínsecamente desordenada, capaz de percibir los cambios de temperatura y promover la formación de cuerpos fotosensibles (*photobodies*) para almacenar el estado activo de la proteína [Chen et al, 2022].

1.4. Transducción de señales de frío en plantas

Como ya se había mencionado, las bajas temperaturas desencadenan un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico [Plieth et al, 1999]. Se han encontrado un gran número de

proteínas con el dominio mano-EF capaces de reconocer la señal de Ca^{2+} por bajas temperaturas y posteriormente inducir acciones en respuesta al estrés. Entre estas proteínas se han encontrado calmodulinas (CaM), proteínas tipo CaM (CML), proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), proteínas calcineurina tipo B (CBLs) y proteínas cinasas tipo receptor reguladas por Ca^{2+} /CaM (CRLKs). También se ha encontrado que existen otras proteínas como las proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) y las fosfolipasas, además de otros segundos mensajeros como las especies reactivas de oxígeno (ROS), el ácido fosfatídico (PA), el óxido nítrico (NO) y la fitoesfingosina-1-fosfato (PHS-P), están involucrados en la señalización por bajas temperaturas (Fig. 2) [Luan et al, 2002; Sanders et al, 2002].

En diversas especies de plantas se ha encontrado que existen dos rutas transcripcionales principales que son activadas en la respuesta a bajas temperaturas: la ruta dependiente de los factores de transcripción capaces de unirse al elemento de repetición C (CRT)/al elemento de respuesta a la deshidratación (DRE) conocidos como CBF/DREB y la ruta independiente de estos factores [Gilmour et al, 1998].

1.4.1. Segundos Mensajeros

1.4.1.1. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Durante el estrés por frío se produce un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden provocar daño oxidativo en diversas moléculas como peroxidación lipídica en las membranas celulares, desnaturalización proteica, oxidación de carbohidratos, cambios en la expresión génica e inclusive la muerte celular [Moller et al, 2009]. Sin embargo, además de estos efectos dañinos, a bajos niveles las ROS pueden actuar como moléculas señalizadoras generadas en respuesta a la percepción de diversos estreses [Devireddy et al, 2021]. En las plantas, la producción de ROS como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el ion superóxido (O_2^-), o el radical hidroxilo (OH^-) se lleva a cabo principalmente en las NADPH oxidasas localizadas en la membrana plasmática [Baxter et al, 2013].

En *Cynodon dactylon* se encontró un aumento de O_2^- durante el estrés por frío, probablemente debido a que la cadena transportadora de electrones fotosintética utiliza al oxígeno como un aceptor de electrones alternativo [Dreyer & Dietz, 2018]. Además, los niveles de H_2O_2 en plántulas de arroz aumentaban después de las primeras 1.5 h de exposición a 10 °C [Yun et al, 2010]. Un análisis metabolómico de diferentes variedades de arroz reveló la importancia de los ROS en la adaptación y la tolerancia al estrés por frío [Zhang et al, 2016]. Por otro lado, se encontró que la

sobreexpresión en arroz de un factor de transcripción de dedo de zinc C₂H₂ (OsZFP245) mejoró la tolerancia al estrés por frío de plántulas de arroz al regular los niveles de prolina y promover la eliminación de ROS [Huang et al, 2009].

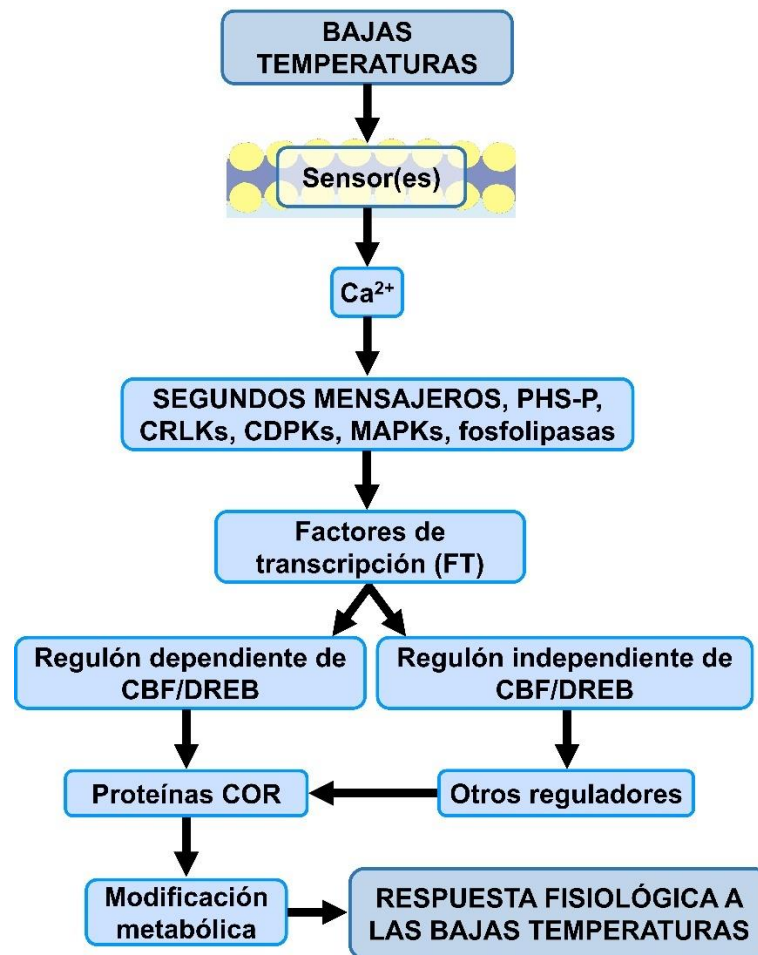


Figura 2. Esquema general de la detección y transducción de señales de las bajas temperaturas en plantas. El frío se percibe en la membrana plasmática por algún receptor, el cual lleva a un aumento citosólico de Ca²⁺ y posteriormente a la liberación de múltiples segundos mensajeros y a la activación de diversas cinasas con el objetivo de activar factores de transcripción que desencadenan en la respuesta de proteínas COR en respuesta a las bajas temperaturas percibidas. PHS-P (fitoesfingosina-1-fosfato), CRLKs (Ca²⁺/calmodulin-regulated Receptor-Like Kinases), CDPKs (Ca²⁺-Dependent Protein Kinases), MAPKs (Mitogen-activated protein kinases), CBF/DREB (C-Repeat Binding Factor/Dehydration-Responsive Element-Binding Protein), COR (Cold-Regulated). Regulón: conjunto completo de genes regulados corriente arriba o corriente abajo por el factor de transcripción. Este modelo se propone a partir de los datos disponibles en la literatura.

En *Arabidopsis* se encontró que la sobreexpresión del factor de transcripción ZAT12 (análogo a OsZFP245) disminuyó los niveles de expresión de los genes *CBFs* en la exposición a frío [Vogel et al, 2004]. También se observó que la producción de ROS por una NADPH-oxidasa de la membrana plasmática (RBOHD) inició una rápida señalización en toda la planta en respuesta al estrés por frío [Moller et al, 2009].

1.4.1.2. Ácido fosfatídico (PA)

El ácido fosfatídico (PA) es un segundo mensajero en las plantas que desempeña un papel muy importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas en diferentes condiciones de estrés [Yao & Xue, 2018]. Durante el estrés por bajas temperaturas, el PA aumenta por una mayor actividad de las fosfolipasas C y D (PLC y PLD) [Arisz et al, 2013]. Este incremento de PA altera la permeabilidad e integridad de la membrana plasmática, ya que puede actuar como una molécula con acción detergente. Sin embargo, la acción de PA es también señalizadora, pues es capaz de estimular la actividad de RBOHD para generar una mayor producción de ROS [Ruelland et al, 2015; Tan et al, 2018]. En arroz se encontró que PLD aumenta los niveles de PA para activar a la MPK6 en respuesta a frío y generar una tolerancia a la congelación [Huo et al, 2016].

1.4.1.3. Óxido Nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO) es un radical libre perteneciente a las especies reactivas de nitrógeno (RNS) [Corpas et al, 2021]. La función biológica del NO depende de su concentración intracelular, ya que en baja concentración actúa como molécula señalizadora, mientras que en altas concentraciones provoca estrés nitro-oxidativo, en un símil a lo que sucede con las ROS [Asgher et al, 2017]. En *Arabidopsis* se ha propuesto que la aclimatación al frío aumenta la concentración de NO para modular la síntesis de prolina, aminoácido necesario para la tolerancia a la congelación [Zhao et al, 2009]. También se encontró que la rápida acumulación de NO bajo estrés por frío inhibió la expresión de múltiples genes en respuesta a frío, además de regular negativamente la formación de fitoesfingosina-1-fosfato (PHS-P) y ceramida fosfato (Cer-P) [Cantrel et al, 2010].

1.4.1.4. Fitoesfingosina-1-fosfato

Se encontró que la fitoesfingosina-1-fosfato (PHS-P) funciona como molécula señalizadora en múltiples procesos. Se describió que la exposición a frío genera un incremento en la actividad de

la cinasa LCBK2 para aumentar la producción de PHS-P en cultivos de células en suspensión. Además, la planta mutante *lcbk1-1* no generó un aumento de PHS-P inducida por el frío [Dutilleul et al, 2012]. No obstante, actualmente no se conoce el efecto de este incremento de PHS-P durante la aclimatación al frío.

1.4.2. MAP cinasas

Dos de las modificaciones covalentes más frecuentes en las proteínas de las células eucarióticas como respuesta a eventos de señalización son la fosforilación y desfosforilación [Zhang et al, 2023]. Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas, MAPKs) son un grupo conservado de proteínas cinasas entre diferentes eucariotas [Nishihama et al, 1995]. Las cascadas de MAP cinasas son módulos de señalización muy importantes, que, junto con otros transductores, convierten estímulos ambientales en respuestas celulares por medio de eventos consecutivos de fosforilación. Estos activan efectores específicos para controlar la expresión génica y la función de algunas proteínas en respuesta a diferentes estreses [Tena et al, 2001; Mishra et al, 2006; Pitzschke, 2014; Zhang, 2018]. Un módulo de MAPKs consiste en una cascada de fosforilación que se inicia mediante una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK o MAP3K o MEKK) la cual fosforila y activa a una MAP cinasa cinasa (MAPKK o MAP2K o MEK) y, posteriormente esta cinasa fosforila y activa a una MAP cinasa (MAPK o MPK). Esas enzimas están involucradas en diversos procesos de la fisiología de las plantas, como la división celular, el crecimiento celular y el desarrollo de los tejidos, pero también en las respuestas a diversos estreses bióticos y abióticos (Fig. 3) [Ichimura et al, 2002; Rodríguez et al, 2007; Andreasson & Ellis, 2009; Pitzschke, 2015]. Una vez activa, la MAPK puede fosforilar a otras proteínas que contengan un motivo específico fosforeceptor serina/treonina-prolina y sitios de reconocimiento a los sustratos que fosforilan. Se sabe que estas proteínas regulan una amplia gama de blancos proteicos, que incluyen proteínas de la membrana plasmática, diversas enzimas metabólicas o factores de transcripción involucrados en la regulación de la transcripción de genes en respuesta al estrés percibido. Esta fosforilación induce cambios en características específicas de las proteínas, como su actividad, su estabilidad o su localización subcelular [Bigeard et al, 2014]. En *A. thaliana* se han reportado 20 MAPKs, 10 MAPKKs y 60 MAPKKKs [Ichimura & Hirt, 2002].

Varios estudios han encontrado que MPK3, MPK4 y MPK6 se activan como respuesta al estrés por frío en *Arabidopsis* [Ichimura et al, 2000; Teige et al, 2004; Dutilleul et al, 2012; Furuya et al, 2013; Li et al, 2017; Kim et al, 2017; Zhao et al, 2017]. Diversas líneas de investigación

sugirieron que la cascada MEKK1-MEK2-MPK4/MPK6 está involucrada en la respuesta de las plantas a las bajas temperaturas. Se ha encontrado que el receptor-cinasa regulado por calcio/calmodulina CRLK1 (Calcium/Calmodulin-Regulated Receptor-Like Kinase 1) interactúa con MEKK1 y activa a una cascada de MAPK en condiciones de bajas temperaturas [Yang et al, 2010]. La MEKK1 fosforilada posteriormente fosforila y activa a MEK2 [Furuya et al, 2013]. Una vez activado, MEK2 puede fosforilar y activar a MPK4 y/o MPK6 [Teige et al, 2004]. Otro estudio ha reportado que la MPK4 se activa cascada abajo de la rigidificación de la membrana plasmática y posteriormente la MPK4 activa indirectamente al gen *COR15a* en respuesta a las bajas temperaturas [Furuya et al, 2014]. Por otra parte, recientemente se encontró que la MPK3 y la MPK6 pueden fosforilar al factor de transcripción ICE1 en respuesta al frío, lo que lleva a su degradación [Li et al, 2017; Zhao et al, 2017]. No obstante, otro estudio reportó que la MPK6 también puede fosforilar al represor transcripcional MYB15, eliminando así la interacción de este represor con el promotor de los genes *CBFs* [Kim et al, 2017]. Además, se ha planteado la hipótesis de que la fitoesfingosina-1-fosfato (PHS-P) puede estar implicada en la activación de MPK6 tras un tiempo corto de exposición al frío [Dutilleul et al, 2012].

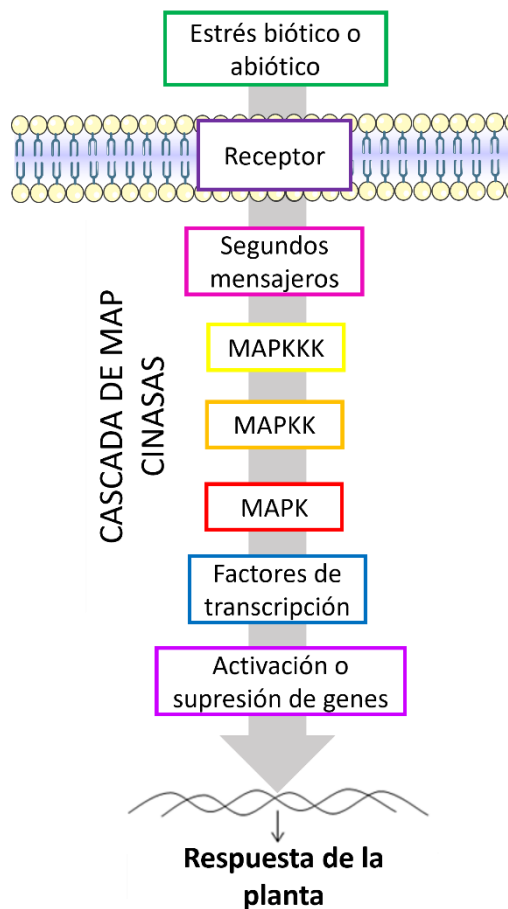


Figura 3. Esquema básico de una cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Se muestra la percepción del estrés por un receptor membranal, el cual puede activar a cinasas membranales o citosólicas para llegar a la producción de segundos mensajeros y la activación de diversas cinasas que llevan a la fosforilación y activación de la primera MAPKKK (MAP cinasa cinasa cinasa). Esta MAPKKK posteriormente fosforila y activa a la MAPKK (MAP cinasa cinasa), la cual fosforila y activa a la MAPK (MAP cinasa). La MAPK activa fosforila al factor de transcripción, el cual regula la expresión de genes en respuesta al estrés percibido.

1.4.3. Regulón dependiente de CBFs

Durante la exposición al frío, se activan varios mecanismos y rutas de señalización diferentes para preparar a la planta a las temperaturas congelantes, uno de los cuales es la vía de los genes *CBFs*. El tiempo de exposición necesario a las bajas temperaturas para mejorar la tolerancia al congelamiento varía entre las diferentes especies de plantas: algunas requieren solo 24 h, mientras que otras requieren al menos 72 h [Van Buer et al, 2016]. La transcripción de los genes *CBF* puede incrementarse tan solo 15 min después de la exposición al frío [Gilmour et al, 1998; Jaglo-Ottosen et al, 1998; Zarka et al, 2003]. La etapa de desarrollo de la planta también es importante en la eficacia de la aclimatación al frío, ya que se ha demostrado que las plántulas recién germinadas no son tan eficientes en aumentar su tolerancia al congelamiento en comparación con una planta más desarrollada que posee mecanismos de señalización más establecidos [Leuendorf et al, 2020]. Además, el hecho de que una planta sea anual (como *Arabidopsis*) o perenne (como la uva) altera su necesidad de aclimatación al frío, ya que las plantas anuales normalmente sólo viven durante un ciclo de crecimiento y no necesitan mecanismos para sobrevivir a múltiples inviernos [Wisniewski et al, 2015; Wisniewski et al, 2018]. Finalmente, los niveles de expresión de cada gen *CBF* pueden variar dependiendo del tejido y de la especie de planta [Liu et al, 2019]. Por ejemplo, en el tallo del álamo, únicamente se expresan *PtCBF1* y *PtCBF3* tras la exposición al frío, y no *PtCBF2* ni *PtCBF4* [Benedict et al, 2006].

El regulón dependiente de los genes *CBF* fue descubierto y estudiado inicialmente en la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, en la que una cascada transcripcional da como resultado la expresión de diferentes genes relacionados con el frío (*COR*), mismos que mejoran la tolerancia a la congelación de la planta a través de diversos mecanismos. Un ejemplo de estos mecanismos es el caso de la proteína COR15a, cuyo gen fue el primer gen *COR* relacionado con una mayor tolerancia a la congelación [Artus et al, 1996; Stockinger et al, 1997; Thomashow, 1999]. Actualmente se ha encontrado que esta proteína incrementa la estabilidad de la membrana del cloroplasto [Thalhammer & Hinch, 2014; Thalhammer et al, 2014]. Según el modelo básico actual del regulón dependiente de genes *CBF*, el factor de transcripción ICE1 (Inducer of CBF Expression 1) se activa mediante fosforilación a través de la proteína cinasa OST1 (Open Stomata 1), la cual es activada ante la señalización por frío. Posteriormente, ICE1 es capaz de activar la transcripción de los genes *CBF*, que a su vez se unen a elementos CRT/DRE en varios genes *COR* y dan como resultado su expresión (Fig. 13) [Ding et al, 2015]. La expresión de genes *COR* conduce a una

variedad de cambios dentro de la planta que promueven la tolerancia a la congelación, así como un retraso en el crecimiento de la planta [Jaglo-ottosen et al, 1998; Thomashow, 1999].

La tolerancia a la congelación se ve reforzada por muchos mecanismos diferentes, como la síntesis de azúcares y otros compuestos crioprotectores, además de la síntesis de diferentes proteínas chaperonas [Thomashow, 1999; Cook et al, 2004; Kaplan et al, 2004]. A temperatura ambiente, ICE1 es sustrato de la ligasa E3 HOS1 (High Expression of Osmotically Responsive Gene) y posteriormente se degrada a través del proteosoma 26S [Ishitani et al, 1998; Dong et al, 2006; Ding et al, 2015]. En condiciones de estrés por frío, la proteína fosfatasa tipo 2C EGR2 se separa de OST1, lo cual provoca la autofosforilación de OST1, por lo tanto, puede interferir con la degradación de ICE1 mediada por HOS1 [Ding et al, 2015; Ding et al, 2019]. ICE1 también puede ser sumoilado por la ligasa tipo E3 de SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) llamada SIZ1 (SAP and MIZ 1), la cual estabiliza a ICE1 [Miura et al, 2007], lo que permite su unión a los promotores de los genes *CBF* y su consiguiente transcripción (Fig. 4).

La regulación negativa de los genes *CBF* se logra a través del factor de transcripción MYB15, el cual se une a los sitios de reconocimiento MYB presentes en los promotores de los genes *CBF*, además de interactuar con ICE1, posiblemente como un control adicional para la regulación de la expresión de los CBFs [Agarwal et al, 2006]. También se encontró que MPK3 y MPK6 pueden fosforilar a ICE1, lo cual lleva a su degradación y una falta de transcripción de los genes *CBF* [Li et al, 2017; Zhao et al, 2017]. Sin embargo, Kim et al. (2017) comprobaron que MPK6 también puede fosforilar a MYB15 y esto disminuye su afinidad por el elemento MYB en los promotores de los genes *CBF* (Fig. 4). Se ha identificado que el regulón dependiente de los genes *CBF* y sus componentes clave, como ICE, *CBF* y *COR*, están altamente conservados en la mayoría de las plantas angiospermas, incluidas las plantas de interés comercial como arroz, cebada y uva [Dubouzet et al, 2003; Skinner et al, 2005; Xiao et al, 2006; Xiao et al, 2008; Hwarari et al, 2022].

La secuencia codificante de *CBF1* se aisló e identificó por primera vez en *A. thaliana* [Stockinger et al, 1997]. Desde entonces, se han identificado cinco homólogos más en *Arabidopsis*, siendo *CBF2* y *CBF3* también importantes en el regulón dependiente de genes *CBF* en respuesta a frío. Sin embargo, los otros genes *CBF* como *CBF4* están involucrados en la respuesta a otros tipos de estrés abiótico, como la sequía [Gilmour et al, 1998; Liu et al, 1998; Thomashow et al, 2001; Haake et al, 2002; Jia et al, 2016]. Sin embargo, también se ha demostrado que los genes *CBF* no son funcionalmente redundantes. Se descubrió que *CBF1* y *CBF3* actúan juntos para inducir la

transcripción de las proteínas COR, mientras que CBF2 regula negativamente a los otros CBFs [Novillo et al, 2007]. Además del frío, se ha encontrado que la expresión de los genes *CBF* también puede ser regulada por el fotoperiodo. Se encontró que la exposición al frío por la mañana mejora la expresión de los genes *CBF* en comparación con la exposición al frío durante la noche [Dong et al, 2011]. Aunque sus mecanismos de acción aún no se comprenden completamente, es evidente que CBF1, CBF2 y CBF3 son reguladores esenciales ante la tolerancia a la congelación en las plantas. Se ha encontrado que la inactivación de los tres genes *CBF* que responden a frío reduce en gran medida la tolerancia a la congelación en las plantas [Jia et al, 2016; Zhao et al, 2016; Park et al, 2018].

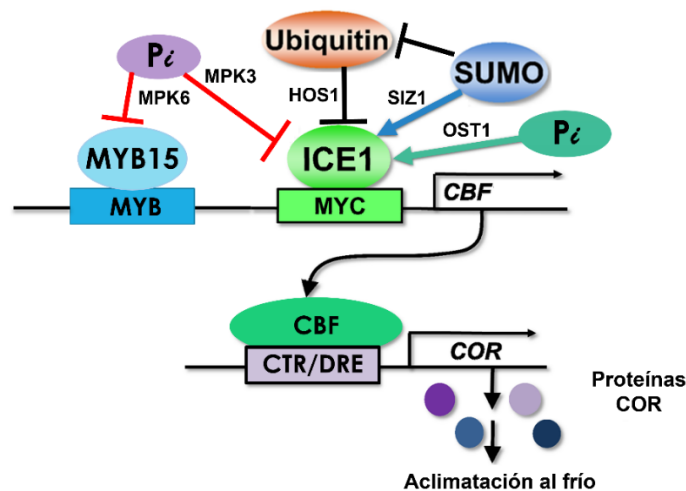


Figura 4. Diagrama que ilustra el modelo general del regulón dependiente de CBFs en *Arabidopsis thaliana*. ICE1 se une al promotor de los genes *CBFs* para inducir su expresión. CBF es un factor de transcripción que se une a los elementos CTR/DRE de los genes *COR* (genes regulados por el frío) para activar su expresión y permitir la aclimatación al frío. HOS1, una ligasa E3, ubiquitina a ICE1 y lo marca para su degradación vía el proteasoma. SIZ1, una ligasa SUMO E3, media la sumoilación de ICE1, lo que bloquea la ubiquitinación, estabilizando a ICE1. OST1, una proteína cinasa, fosforila a ICE1 y activa la cascada de transcripción CBF-COR, lo que lleva a la aclimatación al frío. MPK3/6, proteínas cinasas activadas por mitógenos, fosforilan a ICE1 y lo marcan para su degradación. MYB15, un represor transcripcional, se une al elemento MYB de los genes *CBF* para reprimir su transcripción. MPK6 fosforila a MYB15 y esto evita su interacción con el elemento MYB. Modificado de Miura y Furumoto (2013).

1.4.4. Regulón independiente de CBFs

Investigaciones recientes sobre los blancos de los genes *CBFs* han demostrado que aproximadamente 414 genes están regulados positivamente y 68 regulados negativamente por estos factores de transcripción [Zhao et al, 2016]. Este número es mucho menor al número total de genes expresados diferencialmente por la exposición a frío, lo cual probablemente supera los 10,000 genes [Hannah et al, 2005]. Esta comparación resalta el hecho de que el regulón

dependiente de *CBF* no es la única vía inducida durante la aclimatación al frío, que permite la preparación de la planta para sobrevivir ante las temperaturas congelantes.

Algunos ejemplos incluyen al factor de transcripción *ESK1* (*ESKIMO1*). Se encontró que las plantas mutantes *esk1* son constitutivamente tolerantes a la congelación [Xin & Browse, 1998] y mostraron una expresión alterada de múltiples genes implicados en la respuesta a diversos estreses abióticos que tienen poca relación con los genes inducidos por *CBFs*. Estos resultados sugieren que *ESK1* es un regulador negativo en la aclimatación al frío [Xin et al. 2007]. También se demostró que otro gen, *HOS9* (High Expression of Osmotically Responsive Gene 9), el cual codifica para un factor de transcripción expresado constitutivamente, regula genes en respuesta a frío que no son inducidos por *CBF* [Zhu et al, 2004]. Estos ejemplos resaltan el hecho de que existen varias rutas que regulan la respuesta al frío en plantas y, por tanto, la tolerancia a la congelación.

2. La membrana plasmática

Toda célula requiere una delimitación entre el citosol y el ambiente, asegurando al mismo tiempo la coordinación entre los estímulos externos y las respuestas internas. Esta labor es desempeñada por la membrana plasmática (MP), la cual no sólo funciona como una barrera física, sino que lleva a cabo y regula algunas de las funciones más críticas para la célula. Entre estas se incluyen el intercambio de iones y metabolitos entre la célula y su entorno y la percepción de señales extracelulares como elicitores, hormonas y cambios de pH. Las funciones anteriores se expresan en procesos celulares como la elongación, la diferenciación y la proliferación, la endocitosis y la secreción. Debido a la relevancia de estas funciones, la membrana plasmática de plantas ha sido un foco de estudio muy importante [Murphy et al, 2011; Falhof et al, 2016; Li et al, 2022].

En 1972, S. J. Singer y G. Nicolson desarrollaron un modelo de las membranas biológicas conocido como el Modelo del Mosaico Fluido (MMF), para describir la topología y la dinámica de las moléculas componentes de las membranas celulares. Una de las características más importantes del MMF es la fluidez de la bicapa lipídica. El concepto de fluidez describía a la bicapa como un líquido bidimensional en el que tanto los lípidos como las proteínas asociadas a la membrana pueden moverse lateralmente para permitir su función. Por tanto, la membrana se parece más a un fluido que a un sólido. El modelo de Singer-Nicolson también destacó la naturaleza de mosaico de los integrantes de las membranas biológicas, en la que los lípidos, las

proteínas y los carbohidratos conforman la membrana biológica de una forma aparentemente aleatoria en su distribución espacial y temporal [Singer & Nicolson, 1972].

El MMF ha sido desde entonces un pilar para la descripción general de la estructura de las membranas celulares. Sin embargo, cincuenta años después se han observado muchas estructuras lipídicas que no se distribuyen homogéneamente tanto en membranas naturales como en membranas modelo, por lo que el modelo de Singer-Nicolson ha sido actualizado. El campo de la biofísica de membranas ahora incluye evidencia experimental de la existencia de una mezcla compleja de diferentes especies de lípidos que se encuentran en las membranas biológicas y que producen una variedad de estructuras dinámicas, heterogéneas y segregadas lateralmente, que existen en escalas espaciales en el orden de los nanómetros y temporales que van desde microsegundos hasta minutos [Nicolson & Ferreira, 2023; Veatch et al, 2023].

Las investigaciones en lípidos membranales sugirieron que los lípidos podían segregarse lateralmente en las membranas bajo ciertas condiciones de composición y temperatura, y con esto formar dominios discretos lipídicos distintos [Shelby & Veatch, 2023]. En 1988, Simons y Van Meer propusieron un aspecto funcional para estos dominios especializados a los que llamaron balsas lipídicas [Simons & Van Meer, 1988]. Las balsas lipídicas se diferencian del resto de la membrana plasmática en que están más ordenadas y compactas, y en que se desplazan lateralmente de manera libre en la bicapa de la membrana. La distribución de lípidos en la bicapa lipídica no es aleatoria, como se había contemplado en el MMF, sino que se ha encontrado que las membranas biológicas poseen dos fases líquidas: la fase líquida ordenada (Lo) y la fase líquida desordenada (Ld). La fase Lo está enriquecida en esteroides y esfingolípidos, los cuales por su estructura química generan una organización ordenada, compacta y rígida. La fase Ld se compone principalmente por glicerofosfolípidos, la cual se encuentra menos ordenada que la fase Lo, con un empaquetamiento no muy compacto de moléculas lipídicas individuales que generan una alta fluidez. Las fases Lo y Ld coexisten en la bicapa lipídica bajo un cierto rango de temperaturas y dependiendo de la composición relativa de sus constituyentes [Levental et al, 2020; Suzuki & Kusumi, 2023].

En las membranas biológicas de plantas se ha encontrado una gran variabilidad de estas balsas lipídicas, las cuales difieren en sus tamaños y en sus componentes [Gronnier et al, 2018]. Estas estructuras se han clasificado según su tamaño, teniendo microdominios correspondientes a grandes conjuntos de lípidos y proteínas de tamaño mayor a 1 μm y nanodominios

submicrométricos (10 nm a 1 μ m) [Jaillais & Ott, 2019]. Recientemente se ha propuesto que estos nanodominios pueden optimizar el transporte de moléculas específicas por medio de la formación de complejos proteicos que permitan una cooperación local entre las proteínas transportadoras, si bien su funcionalidad está relacionada con múltiples aspectos derivados principalmente de la transducción de señales [Martinière & Zelazny, 2021].

2.1. Lípidos de la membrana plasmática

Los lípidos son los componentes básicos de las membranas biológicas, los cuales, gracias a su naturaleza parcialmente hidrofóbica, proporcionan una impermeabilidad esencial hacia todos los solutos polares y/o cargados, lo cual es resuelto por las proteínas transportadoras que generan una permeabilidad selectiva hacia estos solutos, posibilitando el intercambio y la comunicación intracelular con los organelos celulares e intercelularmente con las células vecinas [Record et al, 2014; Shinoda, 2016]. La formación de la barrera hidrofóbica además protege a las células y sus organelos del ambiente externo [Casares et al, 2019]. Los lípidos membranales también participan en varios procesos biológicos, funcionando como precursores hormonales y moléculas de señalización [Hou et al, 2016; Welte & Gould 2017].

Las tres categorías de lípidos más abundantes en la membrana plasmática de las plantas son los glicerolípidos, los esfingolípidos y los esteroides (Fig. 5). Todos son compuestos químicos anfipáticos y se originan a partir de un esqueleto de glicerol (glicerolípidos), un esqueleto de esfingosina (esfingolípidos) o un esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno (esteroides) [Furt et al, 2010].

2.1.1. Glicerolípidos

Los glicerolípidos son una categoría de moléculas estructuralmente heterogéneas que tienen al glicerol como columna vertebral. El glicerol central contiene tres átomos de carbono que están numerados estereo específicamente como sn-1, sn-2 y sn-3. Los glicerolípidos se pueden subdividir en glicerofosfolípidos y en gliceroglicolípidos, los cuales contienen un grupo fosfato o un carbohidrato unido a la posición sn-3 del esqueleto de glicerol, respectivamente, y que forman la cabeza polar de la molécula. La mayor parte de los glicerolípidos son glicerofosfolípidos, los cuales son anfipáticos y cuya función principal es la formación de bicapas lipídicas. El ácido fosfatídico (PA) es el glicerofosfolípido más simple y se forma después de la acilación del glicerol-3-fosfato [Testerink & Munnik, 2011]. El grupo fosfato en la posición sn-3 puede sufrir posteriores

esterificaciones con moléculas pequeñas que son alcoholes como colina, etanolamina, serina, inositol y glicerol, para generar las siguientes clases de glicerofosfolípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilglicerol (PG), respectivamente [Gibellini & Smith, 2010; Karki et al, 2019].

Los glicerofosfolípidos membranales contienen una región apolar formada por dos colas acílicas que son dos ácidos grasos esterificados en cada una de las posiciones sn-1 y sn-2 del glicerol. Estos ácidos grasos se caracterizan por longitudes de 16 a 26 átomos de Carbono (C), siendo las longitudes de 16 y 18 carbonos los más comunes. Estas cadenas acílicas se pueden encontrar saturadas o insaturadas, con uno o más dobles enlaces. La estereoquímica de estos dobles enlaces generalmente es *cis*, lo cual resulta en una torcedura de la cadena de 30 °C y, por tanto, generando un mayor desorden en la membrana celular, contribuyendo así a formar regiones Ld [Reszczyńska & Hanaka, 2020].

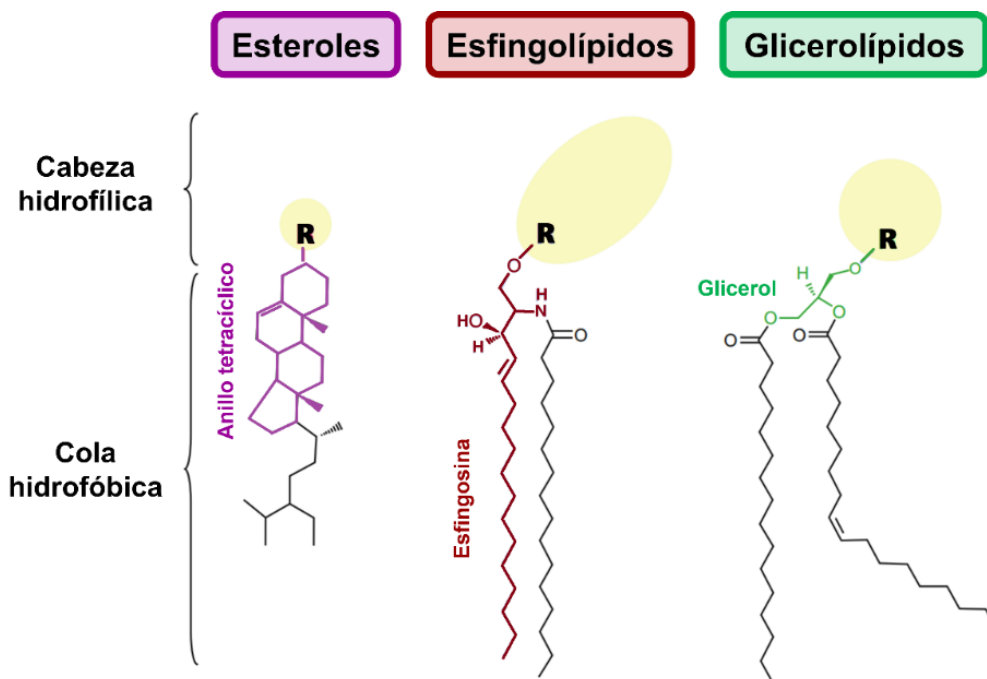


Figura 5. Estructuras generales de glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides. Las categorías de los lípidos reciben su nombre del esqueleto covalente que funciona como la estructura central: glicerol (verde) para glicerolípidos, esfingosina (guinda) para esfingolípidos y anillo tetracíclico (morado) para esteroides. Las clases de lípidos dentro de cada categoría de lípidos varían según los sustituyentes principales (R). Las especies de lípidos dentro de cada clase de lípidos se especifican de acuerdo con las modificaciones en sus ácidos grasos (glicerolípidos y esfingolípidos) o las modificaciones en su estructura central (esfingolípidos y esteroides).

2.1.2. Esfingolípidos

Existen alrededor de 500 especies diferentes de esfingolípidos descritas en animales y alrededor de 170 especies diferentes descritas en la planta modelo *Arabidopsis* [Futerman & Hannun, 2004; Markham & Jaworski, 2007]. En general, su metabolismo está ampliamente conservado en animales, levaduras y plantas [Haslam & Feussner, 2022]. Los esfingolípidos son componentes esenciales de las plantas, los cuales cumplen funciones estructurales y de señalización [Luttgeharm et al, 2016], constituyendo del 40 al 60 % de los lípidos presentes en la membrana plasmática de plantas [Sperling et al, 2005; Markham et al, 2013; Cacas et al, 2016; Carmona-Salazar et al, 2021].

2.1.2.1. Nomenclatura y estructura de los esfingolípidos

Los esfingolípidos son quizás los lípidos membranales con la estructura más compleja y diversa. Sin embargo, en todos se identifican dos regiones con polaridades diferentes: la apolar, integrada por dos cadenas acílicas, donde una es un ácido graso (FA) amidado al C₂ de la otra cadena acílica, la cual es la esfingosina, una base de cadena larga (LCB). Esta molécula en conjunto se conoce como ceramida, la cual compone la unidad básica hidrofóbica de los esfingolípidos [Cacas et al, 2016; Gronnier et al, 2016]. A esta estructura apolar se une la cabeza polar en el C₁ de la LCB y que está integrada por una glucosa o por un inositol fosfato, al cual se unen diferentes carbohidratos en número y estructura, configurando así a los esfingolípidos complejos [Chen et al, 2009; Gault et al, 2010; Pata et al, 2010].

La gran diversidad estructural de los esfingolípidos depende de las características de sus tres componentes (cabeza polar, LCB y FA), es decir, el número y estructura de los carbohidratos en la cabeza polar, y la longitud, saturación, hidroxilación y configuración estereoquímica de la LCB y del FA. En las plantas, las LCB más abundantes están compuestas por 18 átomos de carbono y pueden contener insaturaciones en las posiciones $\Delta 4$ y/o $\Delta 8$. El doble enlace $\Delta 4$ se encuentra solo en la configuración *trans*, mientras que el doble enlace $\Delta 8$ se puede encontrar en la configuración *cis* o *trans* (Fig. 6). Estas variaciones generan el esfingolipidoma, un conjunto integrado por una gran diversidad de isoformas estructurales de especies individuales de esfingolípidos [Ishikawa et al, 2016; Carmona-Salazar et al, 2021; Gömann et al, 2021].

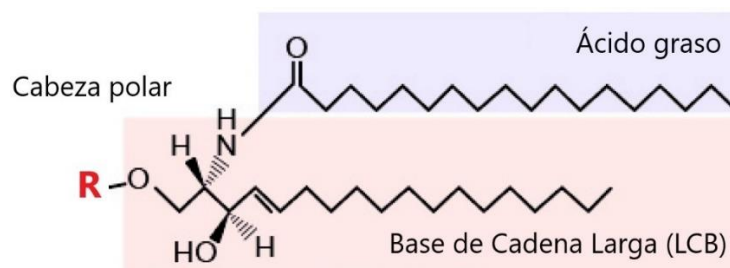


Figura 6. Estructura general de los esfingolípidos. Los esfingolípidos complejos están compuestos por una base de cadena larga (LCB), un ácido graso (FA) y una cabeza polar (R). La estructura del ácido graso es variable en longitud (entre 14 y 36 carbonos), grado de insaturación e hidroxilación. Las LCB con 18 átomos de carbono pueden estar hidroxiladas en las posiciones C₁, C₃ y C₄ y tener un doble enlace en las posiciones C₄ u C₈ con isomería configuracional (E) o (Z). Modificada de Quinville et al. (2021).

En células animales, la LCB más común es la 4-esfingenina, conocida como esfingosina, la cual tiene un doble enlace en la posición C₄ y fue la primera en ser aislada [Spiegel & Milsten, 2003]. En plantas y hongos, la LCB fitoesfinganina (4-hidroxisfinganina), con un grupo hidroxilo en la posición C₄, es la predominante [Markham & Jaworski, 2007; Shi et al, 2007]. Las LCBs o bases esfingoideas se pueden describir con una nomenclatura abreviada para poder facilitar su diferenciación y simplificar sus nombres. Por ejemplo, la dihidroxiesfingosina (o esfinganina) con 18 C y 1 doble enlace se denomina d18:1. La trihidroxiesfingosina (o fitoesfingosina) con 18 C y 0 dobles enlaces se denomina t18:0 [Chen et al, 2010; Merrill, 2011]. Además, también se pueden indicar con precisión las modificaciones en diferentes posiciones, por ejemplo, las insaturaciones *trans* en las posiciones C₄ o C₈ de la esfingosina d18:1 se pueden indicar como d18:1^{Δ4E} o d18:1^{Δ8E}, respectivamente (Fig. 7).

Las ceramidas también se denominan utilizando una nomenclatura abreviada especificando las características del par LCB-FA: hidroxilación, longitud de la cadena y número de dobles enlaces para cada una. Por ejemplo, la *N*-palmitoil-D-*eritro*-esfinganina se escribe como d18:0-16:0, lo que especifica que la molécula contiene una base esfingoidea dihidroxilada, de 18 C, saturada, con un ácido graso hexadecanoico (ácido palmítico) saturado (con cero insaturaciones). La diversidad de los esfingolípidos aumenta con la variedad de grupos principales que pueden unirse al grupo hidroxilo del C₁ de la LCB de la ceramida. Por ejemplo, tanto las bases esfingoideas libres como las ceramidas pueden ser fosforiladas en esta posición para obtener una base de cadena larga fosforilada (LCB-P) o una ceramida fosforilada (Cer-P). Otras modificaciones en la posición C₁ en las ceramidas también son posibles, incluidas la glicosilación, principalmente con glucosa o manosa, formando a las glucosilceramidas, GlcCers o la adición de glicosil-inositol-

fosfato dando lugar a las glicosilinositolfosforilceramidas, GIPCs (Fig. 7) [Lynch & Dunn, 2004; Pata et al, 2010; Michaelson et al, 2016].

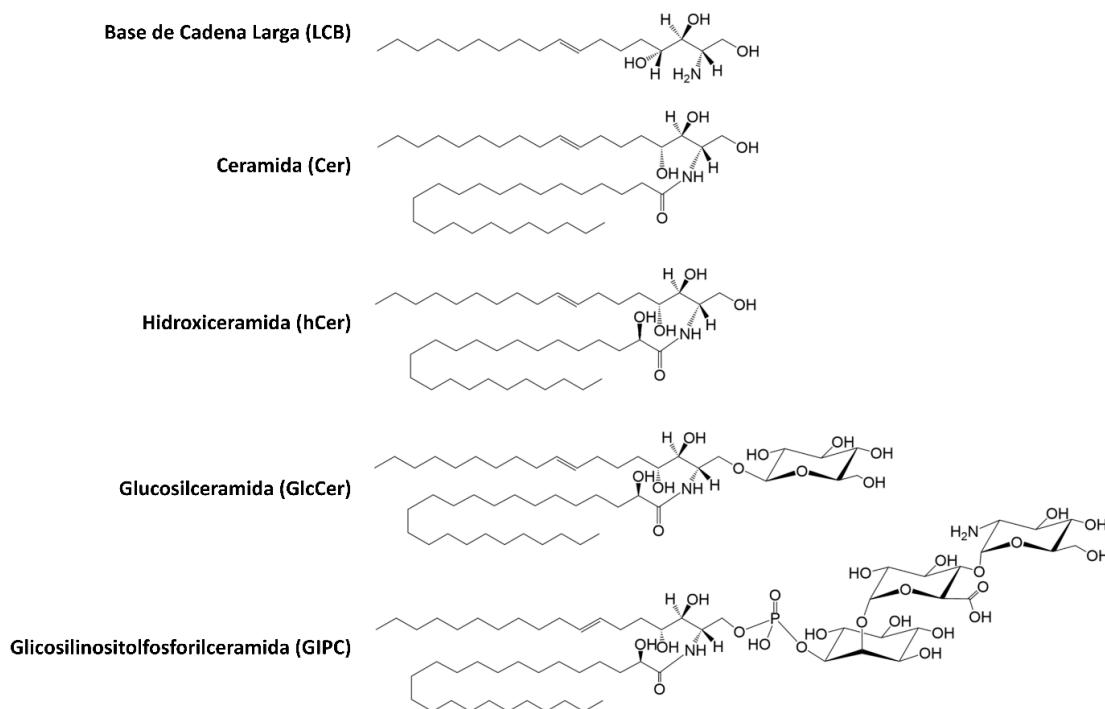


Figura 7. Estructura molecular de la base de cadena larga (LCB) y de las cuatro clases de esfingolípidos en plantas. Se ilustra una figura representativa de una LCB (t18:1^{Δ8E}), una ceramida (t18:1^{Δ8E}-24:0), una hidroxiceramida t18:1^{Δ8E}-h24:0), una glucosilceramida (t18:1^{Δ8E}-h24:0) y una glicosilinositolfosforilceramida, GluN-GluA-IPC (t18:1^{Δ8E}-h24:0). Modificada de Yu et al. (2023).

Las GIPCs se producen exclusivamente en plantas y hongos; sin embargo, se han observado otros esfingolípidos complejos como los gangliósidos y los globósidos en animales [Pata et al, 2010; Merrill, 2011]. Las combinaciones de las diferentes ornamentaciones químicas en las especies de LCB y FA de cadena larga (LCFA, con 14-18C) o de cadena muy larga (VLCFA, con 20-26C) y las diferentes cabezas polares crean una gran variedad de esfingolípidos en los organismos. Las especies de esfingolípidos también pueden variar ampliamente entre los grupos filogenéticos de las plantas, especialmente en lo que respecta a la LCB [Pata et al, 2010; Islam et al, 2012]. Las GIPCs se construyen principalmente a partir de una LCB t18:0 o t18:1 unida a un VLCFA con hasta 26 C. Además, existen distintos tipos de glicosilación los cuales dan lugar a diferencias estructurales de las GIPCs dentro de diversas especies de plantas. Se ha encontrado que el primer carbohidrato unido al IPC de las GIPCs de plantas es ácido glucorónico. A partir de este, el número de

carbohidratos puede variar desde una cadena de 2 hasta 7 monosacáridos unidos en cadena en la cabeza polar, conocidos como series A a F, respectivamente [Buré et al, 2011; Cacas et al, 2013]. En *A. thaliana*, la mayoría de las GIPCs pertenecen a la serie A, las cuales se encuentran enriquecidos en hojas y callos. Sin embargo, en el polen se han encontrado GIPCs de las series B y C [Fang et al, 2016; Cassim et al, 2021]. En las células vegetales, las GIPCs y las GlcCers están presentes en concentraciones mucho más altas en comparación con las ceramidas y las LCBs y representan la mayoría de los esfingolípidos presentes en las plantas [Cassim et al, 2020; Liu et al., 2021].

2.1.2.2. Biosíntesis y degradación de esfingolípidos

A pesar de la diversidad estructural y la función biológica de los esfingolípidos, su síntesis y degradación se rigen por vías anabólicas y catabólicas comunes. Los pasos principales en la biosíntesis y la degradación de las LCBs se conservan en gran medida en los animales, las levaduras y las plantas [Merrill, 2011; Hannun & Obeid, 2018; Haslam & Feussner, 2022]. La formación de las distintas clases de esfingolípidos y sus posteriores modificaciones dependen de un gran número de enzimas diferentes. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, muchas de estas enzimas ya han sido caracterizadas [Michaelson et al, 2016; Haslam & Feußner, 2022] (Fig. 8).

Los esfingolípidos se pueden formar a través de dos vías principales: la vía de rescate, en la que las ceramidas y las LCB producto del catabolismo de los esfingolípidos complejos se reutilizan dentro de la vía sintética, y la vía de síntesis de *novo* [Kitatani et al, 2008; Pata et al, 2010; Merrill, 2011; Luttgeharm et al, 2016]. Los primeros pasos de la biosíntesis de *novo* de los esfingolípidos, desde la creación de la primera LCB hasta la creación de la ceramida, ocurren en el retículo endoplásmico (RE). Posteriormente, las ceramidas pueden continuar en el RE para sintetizar GlcCers o se transportan al aparato de Golgi y sufren modificaciones adicionales para convertirse en GIPCs. En las siguientes secciones se describen los pasos específicos de la síntesis y de la degradación de los esfingolípidos (Fig. 8).

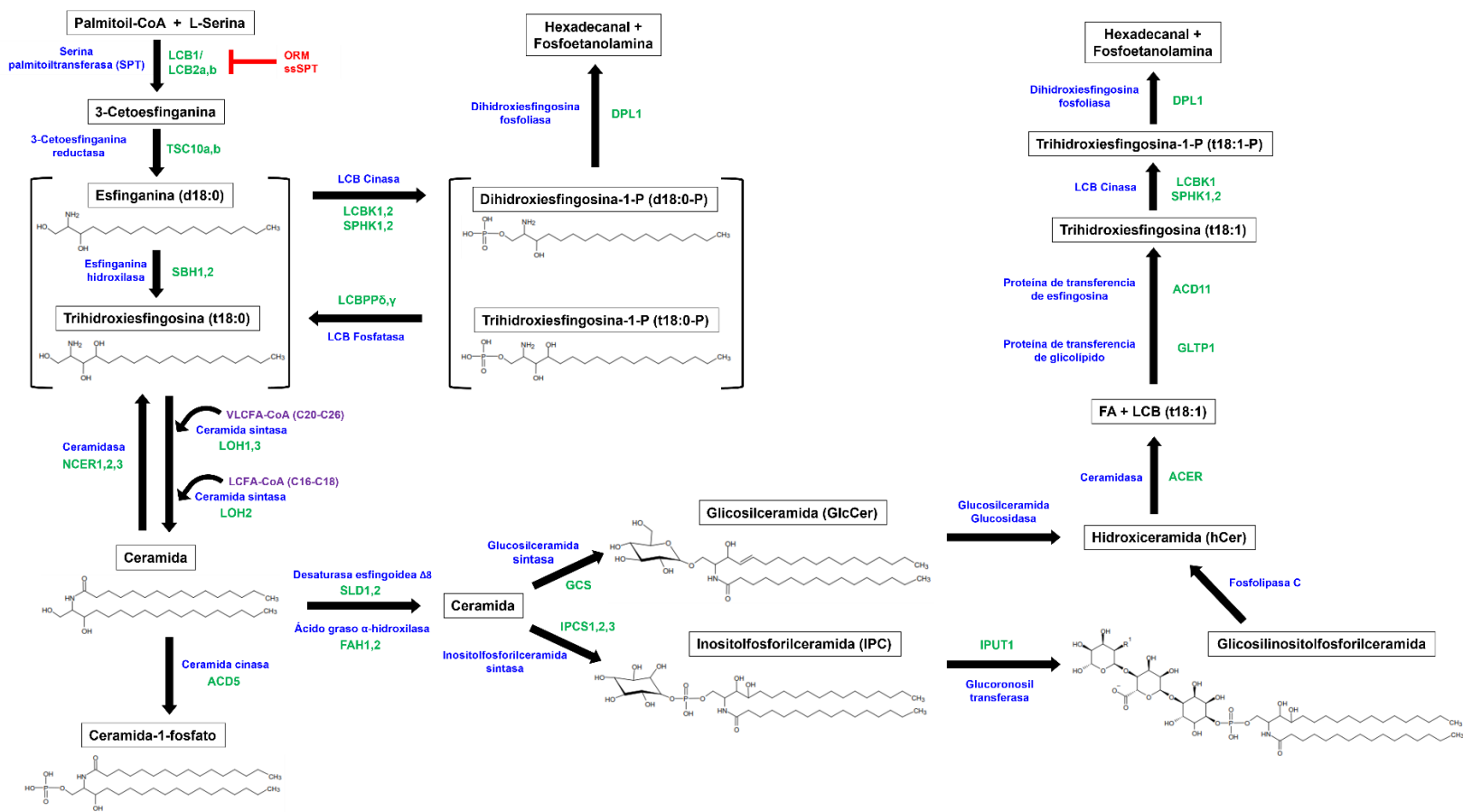


Figura 8. Síntesis y degradación de los esfingolípidos en plantas. La síntesis de *novoo* de los esfingolípidos comienza en el RE con la formación de las bases esfingoides libres (LCB) partiendo de la condensación de serina y palmitoil-CoA para crear 3-cetoesfingina, que es reducida para formar esfingina (d18:0). Las LCB pueden fosforilarse reversiblemente en la posición C₁ (LCB-P) y escindirse en hexadecanal y etanolamina fosfato yendo así a la vía de degradación o bien pueden convertirse en ceramidas mediante la *N*-acilación con un ácido graso (LCFA/VLCFA). La conversión de las ceramidas a glucosilceramidas (GlcCers) también tiene lugar en RE, mientras que la de las ceramidas a IPCs y GIPCs tiene lugar en el aparato de Golgi. Estas ornamentaciones covalentes ocurren en el C₁ de la LCB de la ceramida. Las hidroxiceramidas (hCers) pueden hidrolizarse en FA y LCB mediante ceramidasa. Las LCB se transfieren de regreso al RE y pueden ingresar al proceso de degradación o reutilizarse. Las principales moléculas de las vías se muestran encerradas en rectángulos. Los nombres de las enzimas que catalizan las diferentes reacciones están escritos en azul. Los genes de *A. thaliana* que codifican estas enzimas están escritos en verde. Las proteínas reguladoras del metabolismo de esfingolípidos se indican en rojo.

2.1.2.2.1. Síntesis y degradación de LCBs

El primer paso en la biosíntesis de esfingolípidos es la formación de la base esfingoidea básica 3-dihidroxiesfingosina (3-cetosfinganina) mediante condensación de *L*-serina y palmitoil-CoA. La 3-cetosfinganina se define como la primera LCB en la vía del metabolismo de esfingolípidos [Tafesse & Holthuis, 2010; Merrill, 2011]. Esta reacción es catalizada por la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) y es el paso limitante y el punto de control en la biosíntesis y homeostasis de los esfingolípidos (Fig. 8) [Hanada, 2003]. La SPT es un heterodímero compuesto por las subunidades LCB1 y LCB2, las cuales al juntarse forman el sitio activo de esta enzima, si bien la subunidad LCB2 existe en plantas en las versiones LCB2a y LCB2b. La SPT es una enzima esencial para la viabilidad celular, lo cual se demostró mediante el empleo de mutantes knock-out y knock-down de los genes que codifican para las subunidades LCB1 y LCB2, lo cual resultó en mutantes letales tanto en animales como en plantas. En el caso de *Arabidopsis*, estas mutantes de SPT produjeron la muerte del embrión y del gametofito masculino [Chen et al, 2006; Dietrich et al, 2008; Teng et al, 2008; Kimberlin et al, 2013]. Además de las subunidades LCB1 y LCB2, existen otras subunidades involucradas en la regulación de la SPT conocidas como subunidades pequeñas de la SPT (ssSPT), las cuales se encargan de estabilizar a la SPT y mejorar su actividad [Kimberlin et al, 2013; Kimberlin et al, 2016]. Por otro lado, las proteínas orosomucoides (ORM), que se conservan en animales, levaduras y plantas, regulan los niveles de esfingolípidos uniéndose a las subunidades de la SPT y actuando como efectores negativos de su actividad [González-Solís et al, 2020; Liu et al, 2023].

En el segundo paso de la biosíntesis, la enzima 3-cetoesfinganina reductasa cataliza la conversión de 3-cetosfinganina en dihidroxiesfingosina usando NADPH, esta es la LCB más simple que se encuentra en las plantas. Posteriormente se puede modificar la dihidroxiesfingosina mediante la adición de hidroxilaciones o insaturaciones. Las LCB dihidroxiladas (LCB d18:0) tienen dos grupos hidroxilo en los carbonos C₁ y C₃ (dihidroxiesfingosina), mientras que las LCB trihidroxiladas (LCB t18:0), las cuales son predominantes en las plantas, tienen un tercer grupo hidroxilo en el carbono C₄. Estas LCB trihidroxiladas se conocen como fitoesfingosinas (trihidroxiesfingosina). El tercer grupo hidroxilo es añadido por una esfinganina hidroxilasa (Fig. 8). En *Arabidopsis* existen dos genes que codifican para esta actividad llamados *Hidroxilasa de Base Esfingoidea* 1 y 2 (*SBH1* y *SBH2*, respectivamente) [Chen et al, 2008]. Las dobles mutantes *sbh1/sbh2* mostraron una falta de LCB trihidroxiladas y mostraron defectos significativos en su crecimiento. Además, estas plantas enanas no pudieron pasar a la etapa de reproducción y mostraron un

incremento en la expresión de genes asociados a la muerte celular [Chen et al, 2008]. En el musgo *Physcomitrium patens*, se encontró que la mutante knock-out de la hidroxilasa C-4 (*sh4*) generó defectos en su crecimiento al modificar la localización y abundancia de proteínas asociadas a la membrana plasmática [Gömann et al, 2021a].

Por otro lado, las LCBs también pueden ser insaturadas por la acción de desaturasas. La desaturasa esfingoidea $\Delta 8$ puede introducir un doble enlace *cis* o *trans* entre los carbonos C₈ y C₉ (posición $\Delta 8$) de las LCBs di o tri hidroxiladas (Fig. 8) [Sperling et al, 2001; Michaelson et al, 2009; Pata et al, 2010; Peer et al, 2010; Michaelson et al, 2016]. Se identificaron dos homólogos de esta enzima (SLD1 y SLD2) en *Arabidopsis* y se confirmó que eran $\Delta 8$ desaturasas mediante estudios en levaduras y en plantas [Sperling et al, 1998; Chen et al, 2012]. La desaturasa esfingoidea $\Delta 4$ puede introducir un doble enlace únicamente en la posición *trans* entre los carbonos C₄ y C₅ (posición $\Delta 4$) de las LCB dihidroxiladas, lo que da lugar a la esfingosina. La insaturación en la posición C₄ se produce casi exclusivamente en combinación con la insaturación en la posición C₈ en las LCB dihidroxiladas. Las LCB resultantes (d18:2) se encuentran principalmente en GlcCers y están ausentes en las GIPCs [Sperling et al, 2005; Markham et al, 2006; Markham & Jaworski 2007]. *Arabidopsis* únicamente contiene un gen que codifica para esta desaturasa (DES1-like).

Las LCBs también pueden ser fosforiladas por cinasas de LCBs (LCBKs) en el grupo hidroxilo del C₁ para formar la LCB-fosfato (LCB-P) (Fig. 8). Se han identificado cuatro cinasas de LCB en *A. thaliana* y reciben el nombre de sus homólogos en animales: LCBK1, LCBK2 (cinasa de LCB 1 y 2, respectivamente) y SPHK1 y SPHK2 (esfingosina cinasa 1 y 2, respectivamente). Se encontró que la fosforilación de las LCB d18:0 y t18:0 ocurre *in vitro* utilizando las enzimas LCBK1, SPHK1 y SPHK2 [Coursol et al, 2003; Coursol et al, 2005; Imai & Nishiura, 2005; Guo et al, 2011; Dutilleul et al, 2012]. Estas enzimas se expresan de manera diferencial dependiendo de la planta [Worrall et al, 2008; Guo et al, 2011; Qin et al, 2017]. Se ha demostrado que las LCB fosforiladas, esfingosina-1-P y fitoesfingosina-1-P actúan como segundos mensajeros implicados en la regulación de la turgencia de las células guarda promovidas por ácido abscísico (ABA). Además, la SPHK es activada en *A. thaliana* en respuesta a ABA y participa tanto en la inhibición de la apertura estomática como en la promoción del cierre estomático [Ng et al, 2001, Coursol et al, 2003; Coursol et al, 2005]. Los estomas de una mutante knock-down de SPHK1 (SPHK1-KD) resultaron tener menor sensibilidad a ABA comparada con las plantas wild type (wt), mientras que las plantas sobreexpresoras de SPHK1 exhibieron una mayor sensibilidad y promovieron la apertura

estomática inducida por la luz [Coursol et al, 2003; Coursol et al, 2005; Worrall et al, 2008]. Resultados similares se encontraron en mutantes de LCBK2, la exposición a bajas temperaturas desencadenó una producción rápida y transitoria de fitoesfingosina-1-P (PHS-P), lo cual necesitó de la LCBK2, pero no de las otras dos isoformas SPHK1 y LCBK1. Esta síntesis transitoria de PHS-P inducida por el frío se redujo al añadir inhibidores específicos de cinasas de LCB y se eliminó por completo en una mutante knock-out (*lcbk2*) de LCBK2. Además, esta mutante *lcbk2* presentó una desregulación de la proteína cinasa 6 activada por mitógenos (MPK6) [Dutilleul et al, 2012].

Las LCB-P pueden ser desfosforiladas utilizando una fosfatasa de LCB-P, o pueden ser degradadas mediante una liasa de LCB-P para formar un aldehído de 16 carbonos (hexadecanal) y fosfoetanolamina (Fig. 8). Nakagawa et al (2012) identificaron y caracterizaron el gen que codifica para la fosfatasa de LCB-P en *Arabidopsis*, la cual nombraron esfingo-fosfato fosfatasa 1 (SPP1). Las plantas mutantes con pérdida de función de SPP1 presentaron un incremento en los niveles de dihidroxiesfingosina-1-fosfato en comparación con las plantas wt, sugiriendo que SPP1 tiene un papel regulatorio de los niveles de LCB-Ps. Asimismo, los estomas de estas mutantes presentaron una mayor sensibilidad a ABA, sugiriendo que SPP1 participa en la respuesta a la señalización de ABA mediada por LCB-P [Nakagawa et al, 2012]. En el caso de las liasas de LCB-P, en *A. thaliana* únicamente se ha identificado una proteína conocida como dihidroxiesfingosina-1-fosfato liasa (DPL1) [Tsegaye et al, 2007; Nishikawa et al, 2008]. Se encontró que la mutante knock-out de DPL1 es más resistente al hongo necrotrófico *Botrytis cinérea*, pero más sensible a la bacteria hemibiotrófica *Pseudomonas syringae*, sugiriendo un papel en la respuesta que expresa muerte celular programada (PCD) [Magnin-Robert et al, 2015].

2.1.2.2.2. Síntesis y degradación de ceramidas

La ruta de biosíntesis de ceramidas en plantas no está muy conocida. Se puede llevar a cabo a través de dos caminos diferentes: las rutas dependientes de FA-CoA y las rutas dependientes de FA libres. En plantas, la ruta dependiente de FA-CoA es la principal vía a través de la cual se sintetizan las ceramidas. La formación de la ceramida se produce mediante la condensación de un FA-CoA con el grupo amino de la LCB (Fig. 8). Esta reacción está catalizada por una ceramida sintasa [Sperling & Heinz, 2003; Lynch & Dunn, 2004; Pata et al, 2010]. Los miembros de la familia de genes *LAG1* (Longevity Assurance Gene 1) codifican para las ceramidas sintasas y se encuentran presentes en todos los eucariontes [Winter & Ponting, 2002]. En *Arabidopsis*, la condensación de FA-CoA y la LCB está catalizada por tres isoformas de la ceramida sintasa

conocidas como LOH1, LOH2 y LOH3 (LAG Homolog 1, 2 y 3, respectivamente). Estas enzimas tienen afinidades distintas a sus sustratos: LOH1 y LOH3 preferentemente utilizan VLCFA y LCB trihidroxiladas, mientras que LOH2 utiliza LCFA y LCB dihidroxiladas [Luttgeharm et al, 2015]. La doble mutante *loh1 loh3* resultó ser letal debido a la falta de ceramidas con VLCFA y a la acumulación de LCB libres [Markham et al, 2011]. Las plantas mutantes knock-out de LOH1 presentaron un fenotipo de tamaño pequeño y con muerte celular espontánea, además de una mayor expresión del gen *PR-1* relacionado con patogénesis en condiciones crecimiento con fotoperiodo de día corto. Esta muerte celular espontánea podría desencadenarse debido a la acumulación de la LCB t18:0 o de ceramidas con LCFA [Ternes et al, 2011]. Al utilizar una planta sobreexpresora de LOH1 y LOH3 se encontró un aumento de biomasa y una mayor tasa de división celular promovida por una mayor síntesis de ceramidas con t18:0 y VLCFA. Por el contrario, la sobreexpresión de LOH2 resultó en plantas enanas que acumularon esfingolípidos con FA de 16 C y LCB dihidroxiladas [Luttgeharm et al, 2015].

Se conoce que algunas micotoxinas como las toxinas AAL producidas por *Alternaria alternata* f. *sp. lycopersici* y la toxina Fumonisina B₁ (FB₁) producida por *Fusarium verticillioides* presentan una estructura similar a la de las LCB e inhiben la actividad de las ceramida sintasas [Mirocha et al, 1992; Prue et al, 2008; Peer et al, 2010; Gutiérrez-Nájera et al, 2020]. De hecho, los efectos observados en los contenidos totales de ceramidas y LCBs de las mutantes knock-out de ceramidas sintasas pueden imitarse mediante el tratamiento con FB₁. Esta toxina inhibe la actividad de la ceramida sintasa y, por lo tanto, produce una fuerte acumulación de LCB libres y ceramidas conteniendo LCFA (C₁₆) [Merrill et al, 2001; Shi et al, 2007; Markham et al, 2011]. En las plantas, la FB₁ desencadena una PCD similar a la apoptosis [Saucedo-García et al, 2011; Luttgeharm et al, 2015; Wu et al, 2015]. Se han descrito otras toxinas, como la miriocina, que actúa como inhibidor de la SPT en el primer paso de la vía de síntesis de esfingolípidos [Wadsworth et al, 2013].

Así como ocurre con las LCB libres, las ceramidas también pueden fosforilarse en la posición C₁ de su LCB (Fig. 8). En *Arabidopsis*, una mutante de la enzima ceramida cinasa CERK, denominada *acd5* por muerte celular acelerada 5, acumuló mayor cantidad de ceramidas y mostró una PCD espontánea en sus últimas etapas del desarrollo. Además, las plantas *acd5* presentaron una mayor susceptibilidad a *Pseudomonas syringae* y a *Botrytis cinerea*, pero mayor resistencia a *Golovinomyces cichoracearum* [Greenberg et al, 2000; Liang et al, 2003; Wang et al, 2008; Bi et al,

2014]. Esta línea mutante también presentó una tasa reducida de germinación y una hipersensibilidad a frío y a ABA [Dutilleul et al, 2015]. La reacción inversa correspondiente a la desfosforilación del 1-fosfato de la ceramida aún no ha sido caracterizada y hasta el momento no se han descrito fosfatasas de ceramidas-P en plantas.

Las ceramidases son enzimas que descomponen las ceramidas hidrolizando su enlace *N*-acilo, dando como resultado esfingosina y un ácido graso libre. Se han identificado varias ceramidases, que muestran diferencias en su localización subcelular, su especificidad de sustrato y su pH óptimo. Con base en lo anterior, las ceramidases se han dividido en tres clases: ceramidases ácidas, neutras y alcalinas [Mao & Obeid, 2008; Michaelson et al, 2016]. Hasta el momento se conoce muy poco sobre estas ceramidases en plantas, para las cuales sólo se han identificado ceramidases neutras y alcalinas, pero no ceramidases ácidas. El genoma de *Arabidopsis* codifica para tres ceramidases neutras (NCER1, 2 y 3) y dos ceramidases alcalinas (ACER y TOD1); sin embargo, aún es necesario caracterizar sus funciones [Chen et al, 2015; Li et al, 2015; Wu et al, 2015; Zheng et al, 2018]. Se encontró que una mutante knock-out de ACER acumuló ceramidas y una ligera reducción de LCB libres, mientras que las mutantes *ncer1* presentaron únicamente una acumulación significativa de hidroxiceramidas y una ligera acumulación de LCB libres. Estos hallazgos sugieren que estas enzimas exhiben diferentes especificidades de sustrato [Wu et al, 2015; Li et al, 2015].

2.1.2.2.3. Síntesis y degradación de esfingolípidos complejos

Como se ha venido mencionando, las ceramidas pueden sufrir modificaciones adicionales y convertirse en esfingolípidos más complejos mediante la unión de una variedad de residuos de carbohidratos como grupos principales en su posición C₁. Estas ceramidas complejas se conocen como glicosfingolípidos. A diferencia de la síntesis de ceramidas, este proceso no tiene lugar exclusivamente en el RE, sino que también requiere el transporte de ceramidas al aparato de Golgi a través de la vía de secreción de la planta [Melser et al, 2010]. Hay dos clases de glicosfingolípidos en las plantas: las GlcCers y las GIPC. Las GIPCs se encuentran principalmente en plantas y hongos, mientras que las GlcCers se encuentran en otros organismos eucariontes. En las GlcCers, el grupo polar se compone de una única hexosa, la cual puede ser β -glucosa o β -manosa. Además de este grupo principal, el FA de las GlcCers vegetales suele estar hidroxilado [Lynch et al, 1992; Norberg et al, 1996; Sullards et al, 2000; Bohn et al, 2001]. La enzima responsable de catalizar la transferencia de la hexosa de la GDP-hexosa a la ceramida se conoce como

glucosilceramida sintasa (GCS) (Fig. 8). En *Arabidopsis*, plantas mutantes en GCS presentaron un fenotipo enano y solo fueron viables en la etapa temprana de la plántula, no obstante, no lograron desarrollarse adecuadamente [Msanne et al, 2015]. Lo mismo ocurrió en *Physcomitrium patens*, donde la mutante knock-out de su glucosilceramida sintasa (*gcs-1*) presentó graves defectos de crecimiento y desarrollo [Gömann et al, 2021b].

En las GIPCs, el grupo polar está compuesto por fosfoinositol con hasta siete hexosas o pentosas en *Arabidopsis* [Cacas et al, 2013]. El paso inicial de la síntesis de GIPCs es la formación de la inositolfosforilceramida (IPC), lo cual requiere la transferencia del grupo fosfoinositol del fosfatidilinositol a la ceramida, catalizada por una IPC sintasa (IPCS) (Fig. 8). En *Arabidopsis* se han descrito tres IPC sintasas (IPCS 1/2/3) [Mina et al, 2010] y pueden emplear tanto ceramidas como hidroxiceramidas como sustratos para la síntesis de IPC. La pérdida de función de IPCS2 provocó la acumulación de ácido salicílico y aumentó los niveles de transcrito del gen de resistencia *RPW8*, que activa la respuesta de hipersensibilidad (HR), evitando así la propagación de *Golovinomyces cichoracearum* durante la infección de la planta [Wang et al, 2008].

El siguiente paso de la síntesis de GIPC implica una mayor glicosilación del grupo principal de la IPCs, que varía dependiendo del tejido y de la especie de planta. En plantas monocotiledóneas, se han encontrado principalmente GIPCs que contienen tres monosacáridos unidos a la cabeza polar; sin embargo, en las eudicotiledóneas, las GIPCs que contenían dos monosacáridos fueron predominantes [Cacas et al, 2013]. El ácido glucurónico (GlcA) es uno de los glúcidos que se pueden encontrar en la cabeza polar de los GIPCs de las plantas. Se ha descrito que la inositol fosforilceramida-glucuronosil-transferasa (IPUT1) es la enzima que transfiere GlcA a las IPCs para obtener GIPCs. La sobreexpresión de IPUT1 dio como resultado la acumulación de GIPCs en la planta, mientras que las mutantes knock-out mostraron una acumulación de IPCs, Cers y GlcCers [Rennie et al, 2014].

Recientemente se ha reportado una glucosilceramidasa en *Arabidopsis* (GCD3), la cual es un homólogo de la que degrada glucosilcerebrósidos en humano. Se encontró que la GCD3 hidroliza preferencialmente GlcCers que contienen LCFA. Sin embargo, las mutantes con función nula de GCD3 no mostraron ningún fenotipo diferencial comparado con el de las plantas del tipo silvestre (wt) [Dai et al, 2020]. Además de las enzimas descritas y enumeradas aquí para la vía del metabolismo de los esfingolípidos en *A. thaliana* (Fig. 8), existen enzimas caracterizadas en otras plantas con funcionalidad homóloga [Berkey et al, 2012; Michaelson et al, 2016]. Como se

mencionó anteriormente, las ceramidas y los esfingolípidos complejos pueden variar mucho debido a las diferentes modificaciones posibles de los restos de LCBs y FAs, la adición de grupos principales y la variabilidad enzimática dentro de las diferentes especies de plantas.

2.1.2.3. Funciones de los esfingolípidos en plantas

Durante mucho tiempo y debido al desconocimiento de la abundancia y diversidad de los esfingolípidos en plantas, su papel en la fisiología vegetal fue ignorado. En la actualidad, se los reconoce como componentes abundantes y esenciales de la membrana plasmática y otras endomembranas de las células vegetales, incluidos el tonoplasto, el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi y el cloroplasto [Mongrand et al, 2004; Sperling et al, 2005; Bayer et al, 2014; Carmona-Salazar et al, 2021; Yang et al, 2024]. De la gran diversidad estructural de las especies individuales incluidas en cada una de las cuatro grandes clases de esfingolípidos, ya se han asignado funciones específicas a especies bien identificadas [Lynch et al, 2009; Liu et al, 2021]. Algunas de estas funciones pueden inferirse del fenotipo fisiológico y molecular de mutantes como los descritos en la sección anterior [Biosíntesis y degradación de esfingolípidos], de estudios hechos con la expresión heteróloga de proteínas recombinantes (por ejemplo, en levadura), o de experimentos *in vitro* que emplean esfingolípidos, y en general, de la combinación de estos tres enfoques [Morales-Cedillo et al, 2015; Haslam & Feußner, 2022], como se abordará más adelante.

Con respecto al contenido total de esfingolípidos en las plantas, existe una gran diferencia entre los esfingolípidos complejos (GlcCers y GIPCs) y las ceramidas simples (hCers y Cers). Los esfingolípidos complejos son abundantes y representan una fracción sustancial de los esfingolípidos totales, siendo alrededor de diez veces más abundantes que las ceramidas simples. Se ha encontrado que actúan como componentes esenciales de la membrana plasmática y otras membranas. Las LCBs como moléculas libres, se encuentran en concentraciones extremadamente bajas en las membranas, muy probablemente debido a su uso eficiente como precursores en la síntesis de esfingolípidos más complejos. Debido a lo anterior, el aumento transitorio en su concentración las hace actuar como segundos mensajeros en sistemas de transducción de señales en respuesta a diversos tipos de estrés, además del desarrollo celular [Luttgeharm et al, 2016; Cassim et al, 2020; Liu et al, 2021].

2.1.2.3.1. Glicosilinositolfosforilceramidas

Las glicosilinositolfosforilceramidas (GIPCs) son una clase de esfingolípidos que se sintetizan exclusivamente en plantas y hongos, pero no en animales. Se ha descubierto que las GIPCs están especialmente enriquecidas en la capa exterior de la membrana plasmática de las células. Se ha demostrado que ofrecen resistencia a los detergentes y ayudan a anclar a ciertas proteínas de las balsas lipídicas [Borner et al, 2005; Pata et al, 2010]. Se ha encontrado también que los VLCFAs que componen los GIPCs podrían contribuir a la interacción con otros lípidos, como los esteroides [Cacas et al, 2016], además de aumentar el grosor y la electronegatividad en membranas modelo y regulando las transiciones de fase durante los cambios de temperatura [Cassim et al, 2021]. Las mutantes de GONST1 (Golgi-Localized Nucleotide Sugar Transporter 1), las cuales son incapaces de proporcionar carbohidratos al lumen del Aparato de Golgi para la síntesis de GIPCs, presentaron un fenotipo enano y una respuesta de hipersensibilidad asociada con niveles elevados de ácido salicílico [Mortimer et al, 2013]. En *Arabidopsis*, se ha encontrado que las GIPCs son necesarias para la despolarización de la membrana inducida por el estrés salino [Jiang et al, 2019] y para el correcto reconocimiento planta-patógeno [Lenarčič et al, 2017; Mortimer & Scheller, 2020]. En conjunto, las observaciones derivadas de mutantes de IPCS2 e IPUT1 [Wang et al, 2008; Rennie et al, 2014], no sólo muestran el papel de las GIPCs como elementos estructurales esenciales en el desarrollo, sino que también tienen un papel potencial en la PCD de las plantas asociada con la defensa de patógenos de las plantas [Michaelson et al, 2016].

2.1.2.3.2. Glucosilceramidas

Las Glucosilceramidas (GlcCers) son lípidos membranales muy importantes en eucariotas. En las plantas, se encuentran en la membrana plasmática, los tonoplastos y en diversas vesículas, y representan entre el 6 y el 27 % del contenido total de lípidos [Warnecke & Heinz, 2003; Carmona-Salazar et al, 2021]. En estos organismos, las hexosas unidas al C₁ de la esfingosina de las GlcCers pueden ser β -glucosa o β -manosa, y su FA suele estar α -hidroxilado (α -OH) [Pata et al, 2010; Carmona-Salazar et al, 2021]. Se han descrito varias funciones de las GlcCers en plantas: como estabilizadores de la membrana, como reguladores de la permeabilidad y fluidez de la membrana, en la diferenciación celular y organogénesis, además están involucrados en la patogénesis [Warnecke & Heinz, 2003; Lynch & Dunn, 2004; Msanne et al, 2015; Dai et al, 2020]. Numerosos estudios han demostrado que las variaciones en la composición de las GlcCers tienen un impacto en la estabilidad de la membrana y, por tanto, en la adaptación al frío o la tolerancia a la

congelación. Se ha demostrado que las GlcCers que contienen VLCFA α -OH insaturados aumentan durante exposición a temperaturas bajas/congelantes en plantas resistentes al frío; sin embargo, se ha encontrado que las GlcCers que contienen FA α -OH saturados aumentan en plantas sensibles al frío [Degenkolbe et al, 2012; Takahashi et al, 2016; Huby et al, 2019]. Otros estudios han determinado que las GlcCers también están involucradas en la tolerancia a la sequía, ya que aumentaron su concentración en plantas adaptadas a la sequía [Warnecke & Heinz, 2003]. También aumentaron su contenido en la membrana plasmática de la planta *Ramonda serbica* bajo condiciones de estrés hídrico en comparación con las condiciones normales de crecimiento [Quartacci et al, 2001]. Además, se ha demostrado que las GlcCers están involucradas en la estabilidad de la membrana plasmática ayudando a reducir la permeabilidad de esta membrana a iones aluminio (Al^{3+}), el cual es altamente fitotóxico para el crecimiento de las plantas. En este caso, se observó un ligero aumento de las GlcCers de la membrana plasmática en una variedad de trigo resistente a Al, mientras que el contenido de las GlcCers se redujo en una variedad de trigo sensible a Al [Zhang et al, 2006]. Estos estudios comparativos establecieron una relación entre la abundancia de estas GlcCers y la adaptación de las plantas al estrés abiótico, pero no mostraron una evidencia directa de la función de las GlcCers. En este sentido, diversos experimentos con plantas mutantes carentes del gen GCS, indicaron que este tipo de esfingolípidos complejos son esenciales para la diferenciación de diversos tipos celulares y para la organogénesis, pero no para la viabilidad celular [Warnecke & Heinz 2003; Msanne et al, 2015]. Estas mutantes fueron viables y fértiles; sin embargo, presentaron defectos en el tráfico de proteínas. También se ha encontrado que una disminución de las GlcCers en hojas de tabaco incide en el transporte de proteínas solubles y de membrana a la superficie celular, las cuales quedan retenidas al inicio de la vía secretora de la planta, entre el RE y el aparato de Golgi [Melser et al, 2010]. Se ha propuesto que las GluCers junto con los GIPCs son capaces de establecer balsas lipídicas, interactuando también con esteroides y proteínas específicas [Quinn, 2014; Varela et al, 2016; Carmona-Salazar et al, 2021].

2.1.2.3.3. Ceramidas e Hidroxiceramidas

Las ceramidas (Cers) sin ninguna modificación en el C_1 constituyen la estructura básica sobre la que se construyen esfingolípidos más complejos. Sobre estas estructuras, cuando el C_2 del FA es hidroxilado, se forman las hidroxiceramidas (hCers). En *A. thaliana*, las LCB más comunes que se encuentran en las Cers son t18:0 y t18:1, mientras que el FA puede ser variable [Markham et al, 2006; Markham & Jaworski, 2007; Carmona-Salazar et al, 2021]. Evaluar la función de las Cers e

hCers es complejo ya que su alteración comúnmente tiene un impacto en toda la homeostasis de los esfingolípidos. Los cambios en los niveles de Cers e hCers interfieren directamente con la función de otras clases de esfingolípidos, como las LCB libres. Esto se puede observar particularmente en los fenotipos de mutantes de las ceramidas sintasas LOH1/2/3 y de las ceramidasas ACER y NCER1 (ver sección Síntesis y degradación de ceramidas). Varios estudios han demostrado que las Cers e hCers pueden desempeñar un papel en la respuesta estrés salino y oxidativo. De hecho, el nivel de Cers e hCers, así como el nivel de las LCB libres, aunque en menor medida, se alteran en respuesta a estos estreses abióticos [Li et al, 2015; Wu et al, 2015]. Además, también se ha reportado que las Cers e hCers con VLCFA insaturados pueden desempeñar un papel importante en la tolerancia a la hipoxia en *Arabidopsis* [Xie et al, 2015]. En este caso, el contenido de Cers e hCers aumentó significativamente en las plantas sumergidas en agua y mantenidas en la oscuridad. Sin embargo, al utilizar mutantes knock-out de las ceramidas sintasas LOH1/2/3 resultó en una mayor sensibilidad a estos tratamientos, lo cual se correlacionó con una disminución de ceramidas con VLCFA insaturados [Xie et al., 2015].

Otra función relevante de las Cers e hCers es su papel en la modulación de la PCD. En células animales se ha establecido una conexión entre la producción de estas especies de lípidos y la aparición de la PCD [Hannun & Obeid, 2018]. Se sabe que las plantas tienen una absorción exógena de Cers con FA cortos, los cuales inducen la muerte celular en cultivos celulares y protoplastos de *Arabidopsis*. Esto se encontró precedido por un aumento transitorio de calcio y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Al inhibir dicho aumento de calcio, se logró prevenir la muerte celular, mientras que la inhibición de la generación de ROS no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia. Estos hallazgos sugieren un papel de la señalización del calcio inducida por Cers en la PCD. Además, se logró una reducción parcial de la PCD mediante la adición de ceramidas fosforiladas (Cer-Ps), lo cual indica un papel específico de la fosforilación de las Cers en la modulación de la PCD [Liang et al, 2003; Townley et al, 2005].

Otra evidencia de la participación de Cers y Cer-Ps en la regulación de la PCD en plantas se encontró al caracterizar la mutante *acd5* y la mutante en la proteína de transferencia de esfingolípidos ACD11 (Accelerated Cell Death 11). Ambas mutantes fueron identificadas en estudios de *Arabidopsis* con PCD espontánea [Brodersen et al, 2002; Liang et al, 2003]. La pérdida de función de la ceramida cinasa ACD5 provocó la acumulación de ceramidas, la formación de ROS, la muerte celular y una disminución en la defensa contra patógenos [Bi et al, 2014]. Con

respecto a la mutante *acd11*, los experimentos *in vitro* demostraron una alta actividad de transporte de ceramida-1-fosfato a través de la membrana; sin embargo, otras clases de esfingolípidos (LCBs, GlcCers y GIPCs) no fueron transportadas. Además, se encontró que una alta acumulación de Cers se correlaciona con la muerte celular espontánea, la cual depende de la señalización por ácido salicílico [Simanshu et al, 2014].

2.1.2.3.4. Bases de cadena larga (LCBs)

En los mamíferos, las LCB libres representan menos del 1% del total de esfingolípidos presentes en los diversos tejidos [Alecú et al, 2017]. Existen varios estudios que revelan la función de las LCBs como reguladores relevantes en procesos celulares animales. La importancia del conocimiento sobre las LCBs en animales se refleja en su aplicación en el desarrollo de terapias. Por ejemplo, el ingrediente activo del medicamento Fingolimod es un análogo de esfingosina que se emplea como fármaco inmunomodulador para el tratamiento de la esclerosis múltiple [Brinkmann et al, 2010]. Se han estudiado las vías de señalización que involucran a la esfingosina y sus derivados, como la esfingosina-1-fosfato [Hannun & Obeid, 2018]. Se han descrito varias funciones para la esfingosina, incluida la apoptosis, la detención del ciclo celular y la diferenciación celular, mientras que para la esfingosina-1-fosfato se han descrito funciones como la estabilidad celular, la inflamación y la migración celular. Se han identificado cinco receptores de esfingosina-1-fosfato acoplados a proteína G como responsables de estas funciones cascada abajo en la ruta de señalización [Siehler & Manning, 2002]. Sin embargo, se ha caracterizado en menor medida la función de estas LCB como moléculas señalizadoras en plantas.

Al igual que en los animales, en las plantas, las LCBs y las LCB-Ps exhiben en su mayoría funciones antagónicas, como se infiere de los fenotipos de plantas mutantes en genes del metabolismo de las LCBs, como las cinasas SPHK1 y LCBK2 (ver sección Síntesis y degradación de LCBs). Se ha demostrado que las LCB-Ps desempeñan un papel en el cierre estomático dependiente de ABA. Las líneas mutantes knock-out de *sphk1* y las sobreexpresoras de SPHK1 mostraron una reducción y un aumento en la sensibilidad de sus estomas, respectivamente [Worrall et al, 2008]. En las mutantes knock-out, las cuales presentaron deshidratación debido a la apertura excesiva de los estomas, se produjo un cierre estomático tras un tratamiento directo con LCB-Ps [Ng et al, 2001; Coursol et al, 2005]. En las células guarda, las señales de LCB-Ps se transducen a través de la subunidad α de proteína G prototípica (GPA1), que a su vez regula los canales iónicos y el cierre de los estomas [Coursol et al, 2003; Coursol et al, 2005]. También se ha

encontrado que las LCB-Ps pueden desempeñar un papel en la respuesta de las plantas al frío. En las líneas mutantes deficientes en LCBK2 se encontró una acumulación transitoria de fitoesfingosina-1-fosfato en respuesta a frío, así como un aumento en el crecimiento de las raíces a temperaturas moderadamente bajas [Dutilleul et al, 2012].

Además, existen muchos estudios sobre la función de las LCBs en plantas que a menudo implican la adición exógena de bases esfingoideas y que han establecido una relación con la regulación de la PCD. Se ha demostrado que el tratamiento directo con LCBs provoca la PCD en hojas y cultivos celulares de *A. thaliana* y *N. tabacum* [Shi et al, 2007; Lachaud et al, 2010; Peer et al, 2011; Saucedo-García et al, 2011; Zheng et al, 2018], mientras que el tratamiento con LCB-Ps pareció inhibir o reducir la PCD [Shi et al, 2007]. Sin embargo, existen pruebas contradictorias sobre el papel de las LCB-Ps en la PCD. Por un lado, se observó un efecto inhibitorio sobre la PCD por parte de LCB-Ps en cultivos de células de *A. thaliana* en respuesta a estrés por calor [Alden et al, 2011], así como en plantas infectadas por *P. syringae* o *B. cinerea* [Magnin-Robert et al, 2015]. Por otro lado, se encontró que las LCB-Ps promovían la PCD inducida por criptogeína en células de tabaco y Arabidopsis. Por el contrario, el tratamiento con LCBs provocó la inhibición de la muerte celular [Coursol et al, 2015]. También se demostró un fuerte efecto inhibitorio de la LCB d18:0 en la muerte celular inducida por *P. syringae* [Magnin-Robert et al, 2015]. La teoría de un efecto antagonizante de las LCB-Ps sobre la PCD fue contrastada en un estudio reciente, donde la aplicación externa y los niveles *in vivo* de LCB-Ps no redujeron la muerte celular inducida por FB1 [Glenz et al, 2019].

También se ha demostrado que las bases esfingoideas regulan la respuesta de hipersensibilidad (HR), una reacción de muerte celular programada localizada. Por ejemplo, en Arabidopsis, tras la inoculación con una cepa avirulenta de *P. syringae*, los niveles de fitoesfingosina t18:0 aumentaron y permanecieron altos durante un período más largo en comparación con la inoculación con una cepa virulenta de este patógeno. El aumento de t18:0 probablemente sea el resultado de la síntesis *de novo* a partir de dihidroxiesfingosina (d18:0), la segunda LCB más abundante en plantas después de la t18:0. En la mutante knock-out de la hidroxilasa SBH1, se observó un aumento en los niveles de d18:0 en respuesta a la infección por *Pseudomonas*, mientras que los niveles de d18:0 no aumentaron en plantas wt. Esta falta de aumento puede indicar que t18:0 representa la LCB más relevante en la regulación de la HR [Peer et al, 2010]. Lo anterior contrasta con los resultados de Saucedo-García et al (2011), en los que la

LCB que más aumenta bajo la condición que induce una PCD fue la LCB d18:0. Otros hallazgos importantes sobre la participación de las LCBs en la regulación de la PCD en plantas provienen de estudios que utilizan inhibidores de la síntesis de ceramidas, como la FB1 y la toxina AAL. Estas toxinas, que inhiben varias ceramidas sintetasas de *Arabidopsis*, pueden inducir la activación de la HR, lo que eventualmente conduce a la muerte celular. La muerte celular inducida por FB1 o AAL se correlacionó con un mayor contenido de LCBs, las cuales aumentaron debido a la biosíntesis *de novo* y no por degradación [Asai et al, 2000; Shi et al, 2007]. Varias mutantes del metabolismo de esfingolípidos, como las mutantes de la SPT o de la LCB-P liasa DPL1, mostraron una mayor sensibilidad a FB1 [Spassieva et al, 2002; Tsegaye et al, 2007; Saucedo-García et al, 2011]. El papel regulador de las LCBs en la PCD es consecuencia de cambios en su metabolismo. Al utilizar FB1 en los experimentos, varios componentes de la ruta de señalización podrían asociarse con la muerte celular provocada por las LCBs. La PCD inducida por FB1 no solo depende de las vías de señalización de jasmonato, ácido salicílico y etileno, sino que también requiere la activación de cascadas MAPK [Asai et al, 2000; Saucedo-García et al, 2011; Igarashi et al, 2013; Saucedo-García et al, 2015]. En *Arabidopsis*, las proteínas de tipo orosomucoide ORM1 y ORM2 suprimen la actividad de la SPT y desempeñan un papel importante en la regulación de la homeostasis de los esfingolípidos y la PCD. Las plantas mutantes de estas proteínas mostraron una sensibilidad alterada a FB1 [Kimberlin et al, 2016].

La aplicación externa de LCBs desencadena un rápido aumento de la concentración de iones Ca^{2+} en el citosol y, posteriormente, en el núcleo. Más aún, en plantas de tabaco se demostró que la muerte celular provocada por la adición de la LCB d18:0 actúa como un inhibidor selectivo del influjo de calcio. En conjunto, parece que el aumento de calcio en el núcleo es necesario para desencadenar la PCD [Lachaud et al, 2010]. Además de la entrada de calcio, la muerte celular mediada por LCBs también induce un aumento de ROS y de monóxido de nitrógeno (NO). A diferencia del flujo de calcio, estos aumentos tienen lugar más tarde y no son necesarios para la muerte celular [Shi et al, 2007; Lachaud et al, 2010; Da Silva et al, 2011; Peer et al, 2011; Saucedo - García et al, 2011; Huby et al, 2020]. Los hallazgos resumidos en esta sección junto con los fenotipos de las mutantes en genes de las enzimas implicadas en el metabolismo de las LCBs mencionados anteriormente (ver sección Síntesis y degradación de LCB) resaltan la importancia de la proporción entre las formas fosforiladas y no fosforiladas de las LCB y de su función reguladora en la PCD y en la HR ante la infección por patógenos [Zeng & Yao, 2022].

2.1.3. Esteroles

Los esteroles constituyen la tercera categoría de lípidos presentes en la membrana plasmática. Las plantas cuentan con una mezcla de diferentes tipos de esteroles, a diferencia de los animales y las levaduras, que tienen predominantemente el colesterol y el ergosterol. En *Arabidopsis*, los esteroles más abundantes son sitosterol, estigmasterol, campesterol, brasicasterol, colesterol e isofucosterol [Wang et al, 2021; Furse et al, 2023]. Todos estos esteroles comparten un mismo anillo tetracíclico, el ciclopentanoperhidrofenantreno; sin embargo, se diferencian en las modificaciones adicionales en la cadena lateral y en los sistemas de cuatro anillos. Dichos esteroles pueden sufrir aún más modificaciones gracias al grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A, donde se pueden conjugar con ácidos grasos a través de un enlace éster para generar ésteres de esterol (SE), o con glucosa a través de un enlace glicosídico para generar esterilglicósidos (SG) y/o esterilglicósidos acilados (ASG) [Valitova et al, 2016; Kumar et al, 2021].

Se encuentra bien caracterizada la función de los esteroles como moduladores de la fluidez y de la permeabilidad en las membranas biológicas [Grunwald, 1971]. Las moléculas de SE son consideradas una forma de almacenamiento de esteroles y se acumulan en cuerpos lipídicos [Bouvier-Nave et al, 2010]; sin embargo, los SG y ASG se encuentran menos caracterizados. Se ha propuesto que diferentes esteroles junto con los SG y ASG se pueden asociar con las GluCers y las GIPCs para formar nanodominios [Roche et al, 2008; Ferrer et al, 2017; Shelby & Veatch, 2023].

2.2. La membrana plasmática en la respuesta al frío

Existe evidencia que sugiere que el daño sufrido durante la congelación se debe principalmente a la deshidratación inducida por la nucleación y el crecimiento del hielo extracelular. Esta deshidratación produce la retracción o incluso el colapso tanto de la membrana plasmática como de la pared celular [Wisniewski et al, 2008]. La alteración de la bicapa lipídica y la formación de estructuras de fase hexagonal invertida (HII) entre la membrana plasmática y la membrana cloroplástica genera lesiones en la membrana, dañando la integridad de las membranas celulares [Barrero-Sicilia et al, 2017].

Pero no sólo las bajas temperaturas dañan la funcionalidad de la membrana plasmática, sino también disminuyen su fluidez. Esta es una propiedad fisicoquímica conferida por los lípidos de la bicapa lipídica que se basa en sus transiciones de fase, mismas que dependen de la temperatura [Renne & Ernst, 2023]. Una adecuada fluidez membranal favorece la apropiada difusión de lípidos

y proteínas, así como su dinámica conformacional durante los procesos de transporte y de catálisis. Las bajas temperaturas, por lo tanto, promueven una rigidez membranal que no facilita el buen desempeño de estos procesos [Cano-Ramirez et al, 2021].

Por lo tanto, un paso clave durante la aclimatación al frío es la estabilización de las membranas para evitar daños por deshidratación y para favorecer una adecuada fluidez [Thomashow, 1999]. Lo anterior se puede alcanzar modificando la arquitectura membranal mediante alteraciones en la composición lipídica de la bicapa y de sus proteínas. A este proceso se le denomina remodelación membranal, y ha sido observada en diferentes especies de plantas, incluida *Arabidopsis* [Uemura et al. 2006; Miki et al, 2019]. En *Arachis hypogaea* expuesta a un estrés por frío se encontró que el nivel de ácidos grasos insaturados aumentó, mientras que los ácidos grasos saturados mostraron menores niveles [Zhang et al, 2019]. El aumento en las insaturaciones en las cadenas acílicas cambia la conformación de los lípidos membranales, promoviendo la formación de fases líquido-desordenadas y con ello, aumentando la fluidez. El incremento de especies insaturadas en la conformación *cis* de las cadenas de ácidos grasos y de bases de cadena larga ayuda a mantener la fluidez y la integridad de la membrana plasmática en condiciones de bajas temperaturas [Dong et al, 2016]. En *Boechera stricta* se encontró un aumento de triacilglicerol (TAG) tras su exposición a bajas temperaturas [Arisz et al, 2018]. Además, se encontró que las plantas sobreexpresoras de la isoforma delta de la fosfolipasa D (PLD delta) incrementaron la producción de ácido fosfatídico (PA) y una mayor resistencia al congelamiento [Li et al, 2004]. Esto indica que los niveles de TAG y PA son cruciales para la tolerancia a la congelación de las plantas [Tan et al, 2018; Rawat et al, 2020].

3. La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática

3.1. Las ATPasas tipo P

Las ATPasas tipo P son una gran familia de transportadores membranales primarios energizados por la hidrólisis de ATP (adenosín trifosfato), los cuales transportan diferentes cationes y pequeños fosfolípidos. A diferencia de otras clases de ATPasas (ATPasas tipo F, tipo V y tipo ABC), las ATPasas tipo P forman un estado intermediario fosforilado covalentemente durante su ciclo catalítico, de ahí su nombre [Pedersen & Carafoli, 1987]. Los primeros indicios de estas ATPasas se encontraron hace casi 70 años gracias a unos estudios realizados sobre los nervios de las patas del cangrejo (*Carcinus maenas*), los cuales generaban un aumento en la concentración de Na⁺ [Skou et al, 1957]. Estos estudios concluyeron que el potencial de membrana

era generado por ATPasas que transportaban Na^+ y K^+ , las cuales terminaron siendo identificadas como ATPasas Na^+/K^+ [Siebers et al, 1982]. Posteriormente, se identificaron otras ATPasas tipo P, como la ATPasa gástrica H^+/K^+ responsable de la acidificación del estómago en animales, la ATPasa de H^+ en plantas y levaduras que genera la fuerza protomotriz exportando protones hacia el apoplasto, la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico que desempeña un papel esencial durante la contracción de los músculos esqueléticos y diversas ATPasas de metales pesados presentes tanto en organismos procariontes como eucariontes [Arnou & Nissen, 2012].

Se han identificado 5 diferentes clases de ATPasas tipo P (I-V), las cuales son diferenciadas por el sustrato transportado (Tabla 1) [Axelsen et al, 1998]. La clase I se compone de las ATPasas filogenéticamente más antiguas y simples, las cuales se dividen en dos grandes subclases: IA y IB. La subclase IA se compone de ATPasas bacterianas y tiene como miembro más pequeño a la ATPasa KdpB, cuya secuencia es de únicamente 682 aminoácidos. Esta es únicamente una subunidad de la bomba KdpFABC, la cual está encargada de transportar iones K^+ [Altendorf et al, 1998; Sweet et al, 2021]. La subclase IB está encargada de la translocación de metales pesados (Cu^+ , Cu^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} y Ni^{2+}) para la adquisición de estos metales por diversas proteínas, así como para la detoxificación de iones [Rosen et al, 2002; Santos et al, 2023].

Tabla 1. Distribución entre organismos, especificidad, número de hélices transmembranales (HTM) y las principales funciones de las diferentes clases(I-V) y subclases de las ATPasas tipo P.

Clase	Subclase	Organismos	Especificidad	HTM	Función
I	A	Procariontes	K^+	7	Turgencia, homeostasis de pH
	B	Procariontes y eucariontes	Cu^+ , Ag^+ , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}	6-8	Detoxificación, brindar metales a proteínas
II	A	Procariontes y eucariontes	Ca^{2+} , Mn^{2+}	10	Señalización y homeostasis de Ca^{2+}
	B	Procariontes y eucariontes	Ca^{2+}	10	
	C	Procariontes y eucariontes	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{H}^+ - \text{K}^+$	10	Potencial de membrana, acidificación
	D	Eucariontes	Na^+	10	Contrarrestar shocks osmóticos y pH básico
III	A	Procariontes y eucariontes	H^+	10	Potencial de membrana; homeostasis de pH
	B	Procariontes	Mg^{2+}	10	Homeostasis de Mg^{2+}
IV	--	Eucariontes	Fosfolípidos	10-12	Formación de vesículas y asimetría membranar
V	--	Eucariontes	Mn^{2+}	10-12	Homeostasis de Mn^{2+} en RE

Las ATPasas tipo P de las clases II y III también se dividen en subclases (Fig. 9). La subclase IIA es responsable del transporte de calcio y es una de las clases más estudiadas debido a que uno de sus miembros es la ATPasa de Ca^+ del retículo sarco/endoplasmático (SERCA), la cual está involucrada en el mantenimiento del gradiente de concentración de Ca^{2+} que permite la

contracción muscular [Primeau et al, 2018], además de que fue la primera ATPasa en ser cristalizada y resuelta [Toyoshima et al, 2000]. Los miembros de la subclase IIB también están implicados en el transporte de Ca^{2+} ; sin embargo, pueden ser autoinhibidas debido a la presencia de un dominio de unión a calmodulina ubicado en el carboxilo terminal de la proteína [Huda et al, 2013]. Diversos estudios sugieren que estas ATPasas están involucradas en numerosas funciones en plantas como el mantenimiento de la homeostasis iónica, la apertura estomática, el gravitropismo de la raíz, el desarrollo del polen y la tolerancia a estreses bióticos y abióticos [Bossi et al, 2019]. La subclase IIC se conforma por las ATPasas Na^+/K^+ , las cuales desempeñan un papel esencial en el control del potencial de membrana en los mamíferos [Clausen et al, 2017]. En determinados tejidos como el riñón, la actividad de esta proteína consume hasta un 30% del ATP celular [Jørgensen et al, 2003]. Las ATPasas H^+/K^+ también pertenecen a esta misma subclase de ATPasas, de las cuales el ejemplo más conocido es el de la ATPasa H^+/K^+ gástrica [Shin et al, 2008]. Los miembros de la subclase IID corresponden a las ATPasas de Na^+ , las cuales están presentes en musgos, hongos y protozoarios, las cuales les confieren resistencia a los pH básicos y a las altas concentraciones de Na^+ [Fraile-Escanciano et al, 2009; Rodríguez-Navarro & Benito, 2010].

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática pertenece a las ATPasas tipo P de la subclase IIIA. Estas ATPasas son análogas a las ATPasas Na^+/K^+ de animales, con la diferencia de que el gradiente producido por estas proteínas es de protones. La actividad de estas ATPasas participa en el mantenimiento del potencial de membrana, la regulación del pH intracelular, la nutrición y el crecimiento celular [Falhof et al, 2016]. Además, estas proteínas se distinguen del resto de las ATPasas tipo P por su organización estructural, ya que cuentan con un dominio autoinhibitorio ubicado en su región carboxilo terminal [Wielandt et al, 2015]. Esta ATPasa se abordará con mayor detenimiento más adelante. Finalmente, las ATPasas de la subclase IIIB están involucradas en el transporte de Mg^{2+} en procariontes [Subramani et al, 2016].

citosólico de aproximadamente 7.5. El potencial de membrana generado, negativo dentro de la célula, varía entre -140 y -210 mV [Hirsch et al, 1998; Fuglsang et al, 2007]. Este gradiente es fundamental para asegurar numerosas funciones de la planta como la absorción de nutrientes por las raíces y su translocación a las partes aéreas, la regulación del pH intracelular, la expansión celular y la apertura de estomas [Palmgren & Harper, 1999; Michalak et al, 2022].

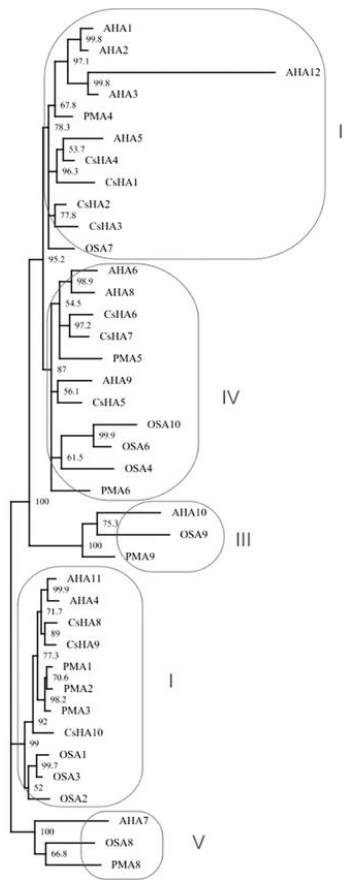


Figura 10. Árbol filogenético de las ATPasas de H⁺ de plantas. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las isoformas de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* (AHA1-12), *Oryza sativa* (OSA1-OSA10), *Nicotiana glauca* (PMA1-PMA9) y *Cucumis sativus* (CsHA1-CsHA10) se agrupó en cinco subfamilias (I-V). La escala de distancia representa la distancia evolutiva, expresada como el número de sustituciones por aminoácido. Obtenido de Wdowikowska y Klobus (2016).

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es una proteína monomérica transmembranal de entre 948 y 957 residuos de aminoácidos, según la isoforma, lo cual corresponde a un peso aproximado de 100 kDa. La presencia de las diferentes isoformas de las ATPasas de H⁺ se relaciona con una expresión diferencial específica de tejido de los diferentes isogenes presentes en la planta [Michelet & Boutry, 1995]. El número de isoformas varía dependiendo de la especie: existen 10 diferentes isoformas de la ATPasa de H⁺ en arroz [Baxter et al, 2003], 10 diferentes isogenes que codifican para la ATPasa de H⁺ en pepino (*Cucumis sativus*), 9 isogenes diferentes en tabaco [Oufattole et al, 2000], 5 isogenes diferentes en *Vicia faba* [Nakajima et al, 1995] y 4 isogenes en maíz [Sauti et al, 2003]. La secuenciación de *Arabidopsis thaliana* reveló la existencia de 12 diferentes isoformas de la ATPasa de H⁺ denominadas AHA (Arabidopsis H⁺-ATPases) (Fig. 10) [Palmgren, 2001].

Las secuencias de aminoácidos de las diferentes isoformas en *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana glauca*, *plumbaginifolia*, *Oryza sativa* y *Cucumis sativus* se compararon para construir un árbol filogenético [Wdowikowska & Kłobus, 2016]. Se identificaron 5 subfamilias con una distribución homogénea entre especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, lo cual corresponde con otros análisis (Fig. 10) [Arango et al, 2003; Jia et al, 2023]. Arango et al (2003) indicaron que las subfamilias I y II se conforman de genes expresados constitutivamente, mientras que los genes pertenecientes a las familias III, IV y V, los cuales presentan un nivel de expresión más bajo, podrían estar relacionados con una expresión específica de tejido.

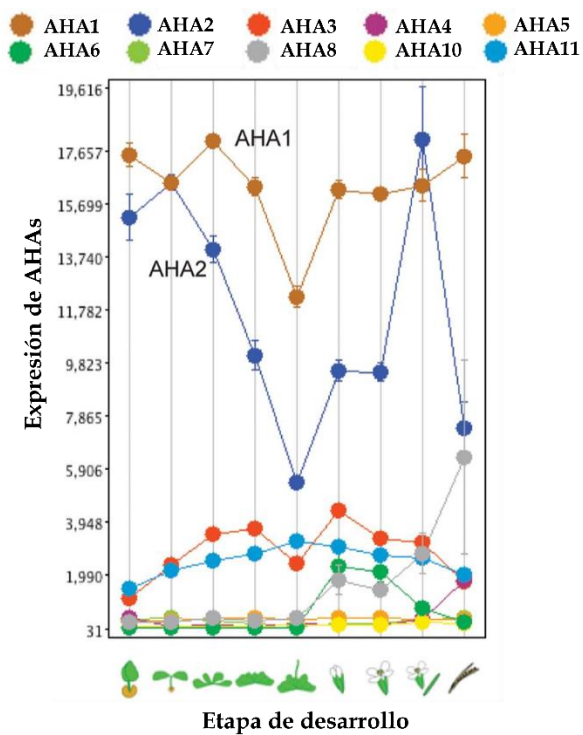


Figura 11. Nivel de expresión de 10 de las 11 isoformas de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* dependiendo de su etapa de desarrollo. El análisis se realizó con datos obtenidos en línea utilizando el programa Geneinvestigator. AHA1 y AHA2 son las isoformas que se expresan mayoritariamente en todos los tejidos. Modificado de Haruta et al (2010).

Un análisis transcriptómico en *A. thaliana* reveló que tanto AHA1 como AHA2, pertenecientes a la subclase II, se expresan constitutivamente en toda la planta. Además, la doble mutante *aha1/aha2* resultó ser embriogénica letal, lo cual indica el papel esencial y parcialmente redundante de estas dos isoformas durante el desarrollo embrionario [Haruta et al, 2010]. Entre los miembros de las subclases III a V, se analizaron los patrones de expresión de 5 AHAs utilizando el marcador GUS. Estos estudios revelaron una expresión específica de tejido de: AHA3 (fuertemente expresada en las células del floema), AHA4 (fuertemente expresada en la endodermis de la raíz) y AHA9 (específicamente expresada en las anteras) [Dewitt et al, 1991; Houlné & Boutry, 1994;

Dewitt & Sussman, 1995]. Sin embargo, en experimentos más recientes se encontró que además de AHA1 y AHA2, AHA3 y AHA11 eran expresadas constitutivamente en todos los tejidos [Haruta et al, 2010; Bose et al, 2014; Guo et al, 2020]. Por otro lado, se encontró que AHA5 y AHA10 se expresan muy pobremente en todos los tejidos [Haruta et al, 2010]. AHA8 parece ser específico para silicuas, AHA7 específico para las raíces laterales y AHA6 está mayoritariamente expresado en la flor (Fig. 11) [Haruta et al, 2010; Hoffmann et al, 2018]. Todos estos datos revelan la expresión génica de estas isoformas, pero no existen estudios comparativos entre su abundancia y su actividad catalítica. Lo anterior se debe a la baja abundancia de algunas isoformas, su carácter esencial y la purificación de las membranas. Palmgren y Christensen (1994) expresaron a las isoformas AHA1, AHA2 y AHA3 en levadura, y determinaron que las tres isoformas variaban en valores de K_M para ATP, H^+ , pH óptimo, K_i para vanadato y activación por lisofosfatidilcolina. Lo anterior sugiere que la diversidad de isoformas obedece a sus características funcionales de acuerdo con el entorno fisiológico en el que se encuentra.

3.2.1. Estructura de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática

Se han usado diferentes técnicas para obtener información sobre la estructura de proteínas membranales como la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. Inicialmente, la criomicroscopía electrónica, combinada con la tomografía, permitió visualizar la estructura de la ATPasa de H^+ de *Neurospora crassa* con una baja resolución (8 Å) [Auer et al, 1998]. Posteriormente, la cristalografía de rayos X mejoró el conocimiento de la organización estructural tridimensional de la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA) de conejo con una resolución de 2.6 Å [Toyoshima et al, 2000], poniendo de relieve la existencia de 4 dominios principales que resultan estar conservados en la mayoría de las ATPasas tipo P. La AHA2, isoforma 2 de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* fue cristalizada y analizada por difracción de rayos X con una resolución de 3.6 Å [Pedersen et al, 2007]. Este análisis estructural también permitió observar los 4 dominios, los cuales son el dominio de activación (A), el dominio de fosforilación (P), el dominio de unión a nucleótidos (N) y el dominio transmembranal (TM) (Fig. 12) [Morth et al, 2010]. Sin embargo, la región del carboxilo terminal de la enzima no apareció en la estructura, presumiblemente debido a una gran movilidad intrínseca.

El dominio activador es el dominio citoplasmático más pequeño, comprendiendo la región del amino terminal y una pequeña región entre los cruces M1 y M2. Su secuencia está altamente conservada y su estructura tridimensional es similar a la de todas las ATPasas tipo P. Este dominio contiene una secuencia motivo, TGES, cuyo residuo Glu184 está implicado en la funcionalidad

del dominio A como fosfatasa. Este residuo promueve la defosforilación del residuo catalítico Asp329 a través de una rotación del dominio A hacia el dominio P (Fig. 12).

El dominio de fosforilación contiene una secuencia distintiva, DKTGTLLT, conservada entre todas las ATPasas tipo P. Este dominio esférico contiene el residuo esencial Asp329, el cual debe fosforilarse durante la catálisis y posteriormente defosforilarse y es, por tanto, el responsable de la formación del intermediario covalente. Este dominio también contiene una lámina β muy conservada, que no participa en el mecanismo de la enzima, pero que es esencial para el plegamiento de la proteína (Fig. 12).

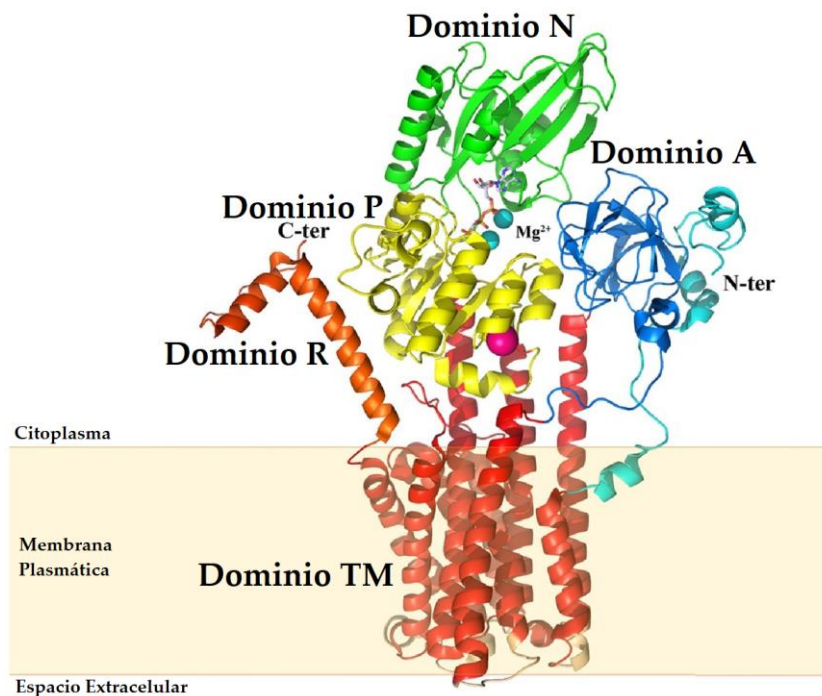


Figura 12. Estructura cristalográfica de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. Se muestra la forma activa de la isoforma 2 de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* con sus cinco dominios. Dominio de activación (A), dominio de fosforilación (P), dominio de unión a nucleótidos (N), dominio transmembranal (TM) y dominio regulatorio (R). Modificada de Miao et al. (2022).

A diferencia de los dominios A y P, el dominio de unión a nucleótidos varía en las ATPasas tipo P. Por ejemplo, este dominio es aproximadamente un 40% más corto en las ATPasas de H^+ en comparación con las ATPasas de Ca^{2+} . Este dominio contiene un motivo de unión a nucleótidos que incluye un residuo de Lys altamente conservado y necesario para la unión de la adenosina del ATP, mientras que el grupo trifosfato y el ion Mg^{2+} se extienden hacia el dominio P (Fig. 12).

Por último, el dominio TM, que se inserta en la membrana, consta de 10 hélices transmembranales nombradas de M1 a M10, las cuales contienen los sitios membranales de unión de iones para permitir el cruce de protones desde el citosol hacia el apoplasto. Este dominio tiene la homología de secuencia más baja entre las diferentes ATPasas tipo P (18%) (Fig. 12).

Aparte de los 4 dominios identificados en la estructura cristalográfica, existe un quinto dominio regulatorio (dominio R), el cual corresponde a una parte muy móvil de la región del carboxilo terminal que está ubicado en el citoplasma, que no pudo mantenerse durante la cristalización (Fig. 12). Este dominio contiene dos regiones inhibidoras R-I y R-II, además de múltiples residuos fosforilables. Es interesante observar que este dominio está formado por alrededor de cien residuos en las ATPasas de plantas en comparación con alrededor de cuarenta residuos en las ATPasas de levaduras y que hay poca o ninguna homología de secuencia entre estos dominios en estos dos organismos, lo que sugiere una evolución diferente [Duby et al, 2009]. Funcionalmente, este dominio es particularmente importante pues actúa como auto-inhibidor, ya que tiene la capacidad de bloquear la entrada de los iones H^+ a los sitios transmembranales de translocación, además de restringir la rotación del dominio A, necesario para la actividad de la enzima. En levadura, se ha demostrado que la fosforilación de los residuos Ser911 y Thr912 es necesaria para la activación dependiente de glucosa de la ATPasa de H^+ [Lecchi et al, 2005; Lecchi et al, 2007]. En el caso de las plantas, existe un residuo de treonina ubicado en la penúltima posición que se conserva en toda la subfamilia. La fosforilación de este residuo promueve la unión de una proteína reguladora de la familia 14-3-3 [Fuglsang et al, 1999; Svennelid et al, 1999; Maudoux et al, 2000]. Esta fosforilación tiene el efecto de alejar el dominio R (autoinhibitorio) del resto de la proteína citoplasmática, permitiendo así la liberación de los otros dominios para activar a la enzima. De hecho, los experimentos de mutagénesis dirigida al sitio en esta área muestran que la mayoría de las mutantes exhiben un incremento en la actividad de su bomba de protones [Morsomme et al, 1996]. Experimentos en *Arabidopsis* con una versión truncada de la región del carboxilo terminal de AHA2 presentaron un incremento en su tasa de crecimiento, pero una falta de control en la liberación de agua y una mayor susceptibilidad a infecciones por patógenos [Stéger et al, 2022]. Por tanto, este dominio R permite mantener un nivel bajo de actividad de esta enzima, lo cual probablemente está relacionado con un control negativo que permite que la enzima mantenga niveles moderados de actividad, previniendo un consumo excesivo del ATP celular necesario para el mantenimiento normal de las funciones demandantes de energía en la planta.

3.2.2. Catálisis de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática

El análisis de la estructura de diferentes miembros de la familia de las ATPasas tipo P ha permitido construir un modelo del ciclo catalítico llevado a cabo por estas enzimas [Kühlbrandt et al, 2004]. Se han definido dos estados enzimáticos conformacionales principales: un estado E1, de alta afinidad por el ion transportado, y un estado E2 de baja afinidad por este ion. Los cambios conformacionales de las ATPasas de tipo P involucrados en la transición del estado E1 al estado E2 ocurren a través de los intermediarios fosforilados E1-P y E2-P, los cuales se pueden describir gracias al ciclo Post-Albers (Fig. 12) [Albers et al, 1963; Post & Sen, 1965; Pedersen & Carafoli, 1987].

El ciclo catalítico comienza en el estado E1, donde el ion H^+ en el citoplasma se une con alta afinidad al dominio M. Esta unión provoca el reordenamiento de las hélices M1-M4 para obtener una correcta unión con el ion, además de provocar un cambio en la conformación del dominio P en el que un residuo de aspartato (Asp329 en AHA2) del motivo conservado Asp-Lys-Thr-Gly (DKTG) se vuelve accesible y listo para ser fosforilado gracias al ATP- Mg^{2+} proporcionado por el dominio N. El ion Mg^{2+} y la cadena lateral de Lys del motivo DKTG son necesarios para compensar las cargas negativas opuestas del fosfato y del ATP y la cadena lateral del Asp. Esto promueve la fosforilación del Asp y forma el estado intermediario aspartil-fosfoanhidro (E1-P) (Fig. 13) [Sørensen et al, 2004; Falhof et al, 2016].

La transferencia del fosfato y rompe el enlace del ATP mediada por los dominios P y N, dando como resultado un cambio conformacional en el dominio P que lleva a la enzima a pasar espontáneamente al estado E2-P. Esta transición es generada gracias al apartamiento del dominio N, dejando espacio para que el dominio A pueda interactuar con el dominio P fosforilado. La rotación del dominio A permite que la secuencia TGES se acerque al motivo DKTG fosforilado del dominio P con el fin de protegerlo de la hidrólisis y así permitir la disociación del ADP. El movimiento del dominio A bloquea el acceso de los iones al dominio M. La teoría hasta ahora aceptada sugiere que el sitio de unión del ion se sitúa en el centro del dominio transmembrana y que la afinidad por el ion se modificaría en función de la conformación de este dominio. Los movimientos en el dominio P también inducen cambios conformacionales en los dominios transmembranales M4 a M6, reduciendo en gran medida la afinidad del sitio de unión por el H^+ transportado, provocando así la expulsión del ion H^+ desde un sitio de menor afinidad hacia el apoplasto (Fig. 13) [Yatime et al, 2011; Wang et al, 2014; Hansen et al, 2021; Palmgren, 2023].

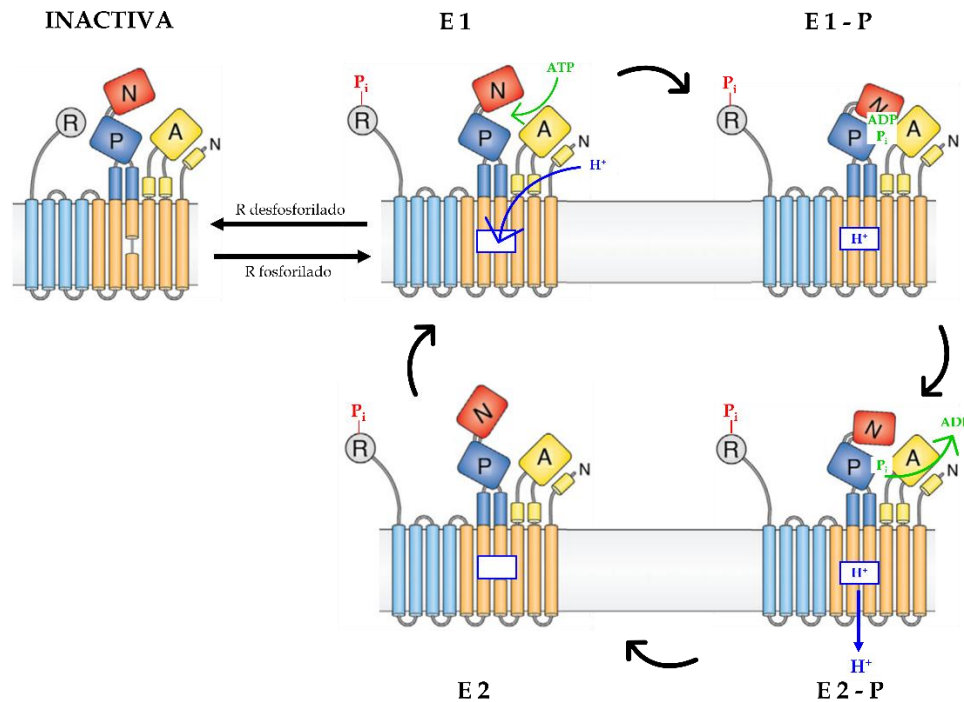


Figura 13. Ciclo catalítico de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas. Se muestra la estructura transmembranal de la ATPasa con sus dominios y la interconversión entre los estados E1/E1-P/E2-P/E2 de la ATPasa de H⁺. También se observa como el dominio R desfosforilado inactiva a la enzima por su interacción con los demás dominios. Modificado de Palmgren (2023).

Por tanto, el movimiento del ion H⁺ a través de la membrana plasmática ocurre simultáneamente en la transición entre los estados E1-P y E2-P. Posteriormente, las interacciones en el dominio M por la ausencia del ion H⁺ estimulan nuevamente el cierre de la vía de acceso apoplástica. Este cierre induce una ligera rotación del dominio A, la cual se acopla al Glu del motivo TGES, hidrolizando así el enlace anhídrido éster del fosfato con el residuo de Asp permitiendo que la enzima entre en el estado E2. Posteriormente, se libera el fosfato escindido y esto promueve una mayor rotación del dominio A, alejándose del dominio P. Finalmente, se disocia el Mg²⁺ y la bomba vuelve al estado E1. Entonces la enzima está lista para un nuevo ciclo (Fig. 13) [Farley, 2012; Focht et al, 2017].

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática únicamente puede transportar un ion H⁺ por cada ATP utilizado, no obstante, se ha planteado la existencia de un desacoplamiento parcial entre la hidrólisis del ATP y el transporte del ion H⁺. Es interesante observar que el dominio regulador R presente en la ATPasa de H⁺ también desempeña un papel en el ciclo catalítico al limitar los movimientos de las hélices transmembranales y bloquear el acceso del ion H⁺ al poro (Fig. 13) [Kühlbrandt et al, 2004; Janicka-Russak, 2011].

3.2.3. Papel fisiológico de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática

3.2.3.1. Crecimiento celular y desarrollo de la planta

Las ATPasas de H^+ de la membrana plasmática tienen un papel determinante en la expansión celular a través de la acidificación del apoplasto. De hecho, el alargamiento celular depende de la turgencia de la célula, la extensibilidad de la pared celular y la síntesis de nuevos componentes, determinando así el crecimiento y la forma de la planta. En plantas de papa se encontró que en la planta sobreexpresora de la ATPasa de H^+ 1 (PHA1), los tallos se alargaban más rápido y presentaban mayor número de hojas. Por el contrario, la inhibición de la actividad de PHA1 resultó en una reducción de la longitud del tallo [Stritzler et al, 2017]. Por otro lado, en *Arabidopsis* se encontró que una triple mutante con pérdida de función de AHA6, AHA8 y AHA9 redujo la fertilidad de la planta y afectó el correcto desarrollo de los tubos polínicos [Hoffmann et al, 2020].

Una teoría que clarifica esta regulación es conocida como la teoría del crecimiento ácido, la cual propone que, bajo el control de las auxinas, la síntesis de las ATPasas de H^+ serían las responsables de la acidificación del apoplasto. Esto daría como resultado la activación de enzimas sensibles al pH involucradas en la relajación de la pared celular y con esto una elongación de las células [Cosgrove, 1997; Hager et al, 2003]. Las auxinas son fitohormonas participantes en diversos procesos de crecimiento y desarrollo como embriogénesis y organogénesis. Estas hormonas controlan la transcripción de genes de la enzima, activando indirectamente a la ATPasa de H^+ , induciendo el transporte de protones en contra de su gradiente de concentración, acidificando el apoplasto. Al mismo tiempo, la activación de la ATPasa de H^+ provoca la hiperpolarización de la membrana plasmática, lo cual facilita la entrada de iones K^+ y promueve la absorción de agua, aumentando así la turgencia celular [Teale et al, 2006; Kutschera, 2007; Takahashi et al, 2012; Li et al, 2021]. Estudios en *Arabidopsis* demostraron que la aplicación de auxina en el hipocótilo de plántulas aumentaba la tasa de fosforilación de la Thr947 de AHA2, la cual estabiliza la unión de la proteína 14-3-3 y conlleva a la activación de la ATPasa de H^+ [Takahashi et al, 2012].

La activación de la ATPasa de H^+ mediada por auxinas es inducida a través de la interacción del receptor F-box de señalización de auxinas (AFB) con la proteína de respuesta inhibidora del transporte 1 (TIR1), de la expresión de la familia de genes Small Auxin Up mRNA (SAUR), de la subfamilia de proteínas fosfatasa C (PP2C-D) y de las cinasas transmembranales 1 y 4 (TMK1/TMK4) [Spartz et al, 2012; Spartz et al, 2014; Fendrych et al, 2016; Lin et al, 2021]. Se encontró que la expresión de los genes SAUR es rápidamente inducida por tratamientos de

auxinas en la planta, lo cual desencadena la traducción de múltiples proteínas SAUR [Spartz et al, 2014]. Adicionalmente, se estableció que SAUR9, -10, -19, -40 y -72 regulan negativamente a las PP2C-D, las cuales disminuyen la actividad de la ATPasa de H⁺ mediante la desfosforilación de la Thr947 [Fendrych et al, 2016].

Un estudio reciente encontró que tanto TMK1 como TMK4 son capaces de fosforilar directamente la Thr947 de la ATPasa de H⁺ en respuesta a auxinas. Esta fosforilación activa a la ATPasa de H⁺, lo cual lleva a la acidificación del apoplasto y, en consecuencia, la expansión de las células del hipocótilo [Lin et al, 2021]. En raíces se encontró que la activación de TKMs dependiente de auxinas también promueve la activación de la ATPasa de H⁺; sin embargo, esto lo realiza para contrarrestar la rápida alcalinización causada por la ruta TIR1/AFB [Hoffmann et al, 2018; Liu et al, 2020].

3.2.3.2. Apertura estomática

La regulación de la apertura y el cierre de los estomas es vital para la planta, ya que regula el intercambio gaseoso de diversas moléculas además de mantener la homeostasis de los procesos fotosintéticos. La apertura estomática es favorecida por la activación de la ATPasa de H⁺, lo que acidifica el apoplasto y produce una hiperpolarización de la membrana plasmática, en consecuencia, se genera la entrada masiva de iones K⁺ y de agua extracelular, produciendo la hinchazón de las células guarda y, por tanto, la apertura del poro estomático [Liu et al, 2009; Kim et al, 2010]. Se ha demostrado que la activación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en las células guarda es inducida por la señalización provocada por la luz azul.

Existen proteínas receptoras tipo cinasas que son capaces de autofosforilarse en respuesta a la percepción de la luz azul llamadas fototropinas 1 y 2 (phot1 y phot2). Esta fosforilación inicia una cascada de señalización que desencadena la apertura estomática [Christie, 2007; Shimazaki et al, 2007]. Una vez fosforiladas, las fototropinas fosforilan directamente a la proteína cinasa BLUS1 (Blue Light Signaling1) y esta posteriormente activa a la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1). La activación de esta fosfatasa lleva a la activación de una cascada de señalización que culmina con la fosforilación de la ATPasa de H⁺ en la penúltima Thr del carboxilo terminal por un mecanismo todavía desconocido, activando a la ATPasa de H⁺ [Takemiya et al, 2013]. Además, se encontró que la doble mutante *pp2c-d6/pp2c-d9* en dos isoformas de la fosfatasa presentaba un fenotipo de estomas abiertos en la oscuridad y una menor desfosforilación de AHA2 en las células guarda tras

su exposición a luz azul. Por el contrario, en las plantas sobreexpresoras de PP2C-D9, la apertura de los estomas se vio inhibida tras la exposición a luz azul [Akiyama et al, 2021].

3.2.3.3. Nutrición celular

Las plantas requieren captar del suelo múltiples iones y sales necesarios para su crecimiento y desarrollo. Estos elementos son absorbidos por las raíces y posteriormente son transportados a los diferentes órganos de la planta a través del sistema vascular [White & Brown, 2010]. La toma de estos iones es por transporte secundario, sujeto a la actividad de la bomba primaria de H^+ , y es facilitado por diferentes transportadores membranales. Un gran número de estos transportadores son simportadores de iones H^+ activados por la disminución del pH apoplástico, por lo que requieren de la fuerza protón-motriz que genera la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática [Palmgren, 2001].

Entre los nutrimentos absorbidos se encuentran el nitrógeno, del cual se conoce que se absorbe como nitrato (NO_3^-) a través del simportador NTR2 (Nitrate Transporter 2) $2H^+/NO_3^-$ [Muratore et al, 2021]. También se encontró que el transportador de amonio AMT1 funciona igual como un simportador de NH_4^+/H^+ [Ortiz-Ramírez et al, 2011]. Los transportadores de fosfato (PHT) también funcionan como simportadores de $2H^+/H_2PO_4^-$ o $4H^+/H_2PO_4^-$ y $3H^+/HPO_4^{2-}$ [Młodzińska & Zboińska, 2016; Yuan et al, 2017], así como los transportadores de azufre (SULTR) que transportan H^+/SO_4^{2-} [Takahashi et al, 2012].

3.2.3.4. Mantenimiento del pH intracelular

Como ya se había mencionado al principio de esta sección, el gradiente de pH transmembranal corresponde a un pH apoplástico en un rango de 5-6 y un pH citosólico en un rango de 7.1-7.5 [Sze & Chanroj, 2018]. El control de este pH se debe a la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. Esta enzima recibe parte de su sustrato de los procesos metabólicos que producen H^+ además de los eventos de transporte celular [Wegner & Shabala, 2019].

3.3. La ATPasa de H^+ en la respuesta al frío

Existe muy poco conocimiento sobre el efecto del estrés por bajas temperaturas en las proteínas de la membrana plasmática. En el caso de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, se han encontrado respuestas diversas dependiendo de la especie y del tiempo de exposición. Un estudio en raíces de chilacayote encontró que la actividad de la ATPasa de H^+ , la transcripción y la traducción de su gen aumentaba tras su exposición a 6 °C [Ahn et al, 1999]. En células en

suspensión de remolacha la actividad de esta enzima aumentaba y se formaba un mayor número de complejos de proteína 14-3-3 con la ATPasa de H⁺ después de su tratamiento a 0 °C [Chelysheva et al, 1999].

En las raíces de plantas de pepino se encontraron resultados contrastantes. Ahn et al. (2000) reportó que la actividad de la ATPasa de H⁺ aumentaba tras un día de tratamiento a 10 °C; sin embargo, posteriormente la actividad disminuyó hasta niveles de actividad menores a los encontrados sin tratamiento. Los niveles de transcritos de esta ATPasa presentaron el mismo comportamiento de la actividad; sin embargo, la cantidad de proteína disminuyó durante todo el tratamiento. Por otro lado, Janicka-Russak et al. (2011) reportaron que, bajo un tratamiento a 10 °C, la actividad de la ATPasa de H⁺ disminuyó en las raíces en los primeros 3 días, pero posteriormente la enzima recuperó sus niveles de actividad.

Entre las plantas resistentes a frío, en las hojas y raíces de camelina y colza se encontró un incremento en la actividad de la ATPasa de H⁺ tras un día de tratamiento a 2 °C; sin embargo, esta actividad disminuyó a medida que se prolongó el tratamiento. También se encontró que los niveles de fosforilación de la ATPasa aumentaron significativamente después de 3 días de tratamiento en frío [Kim et al, 2013]. En contraste, en las plántulas de cebada se encontró que los niveles de expresión de los genes de la ATPasa de H⁺ y su cantidad en la membrana aumentaron después de 25 días de tratamiento a 5 °C [Sadura et al, 2019]. En el caso de *A. thaliana* se tiene poco conocimiento sobre lo que ocurre con la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en condiciones de frío. Se encontró que la actividad de esta enzima presenta una fuerte inhibición tras las primeras 6 h de tratamiento a 4 °C; sin embargo, una exposición más prolongada a 4 °C provocó una inducción de la actividad. La expresión relativa de los genes *AHA1* y *AHA2* aumentó después de 12 h de tratamiento a 4 °C, al igual que las cantidades de la ATPasa de H⁺ y de la proteína 14-3-3 [Muzi et al, 2016]. Estos datos resaltan el hecho de que existen múltiples preguntas para dilucidar la respuesta y función de esta ATPasa de H⁺ frente a las condiciones de bajas temperaturas. Dada su importancia de ser la bomba primaria que influye en los procesos fisiológicos de la planta descritos anteriormente, resulta relevante la atención a su participación en el proceso de aclimatación al frío.

HIPÓTESIS

Las MAP cinasas MPK3 y/o MPK6 participan en la aclimatación al frío de *Arabidopsis thaliana* remodelando la composición de esfingolípidos de la membrana plasmática, modificando su fluidez membranal y afectando actividad de la ATPasa de H⁺ para así contribuir a su tolerancia a la congelación.

OBJETIVO GENERAL

Explorar los mecanismos de acción de MPK3 y/o MPK6 en el control de la actividad de la ATPasa de H⁺ y en la remodelación de la membrana plasmática en el proceso de aclimatación al frío que conduce a una tolerancia a la congelación en *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer la capacidad de las plantas a la aclimatación al frío por su respuesta fenotípica a temperaturas congelantes.
2. Conocer la respuesta de la ultraestructura celular a las condiciones de aclimatación al frío en la planta silvestre y las mutantes *mpk3* y *mpk6*.
3. Conocer la actividad de la ATPasa de H⁺ en los tres genotipos de plantas durante la aclimatación al frío.
4. Conocer los posibles mecanismos de regulación involucrados en la actividad de la ATPasa de H⁺ por efecto de la aclimatación al frío.
5. Conocer los cambios en la fluidez membranal y en la composición de esfingolípidos en las membranas plasmáticas por efecto de la aclimatación al frío.
6. Conocer los cambios en la fluidez de la membrana plasmática tras la exposición a las condiciones de aclimatación. Determinar la fluidez membranal en plantas de *Arabidopsis thaliana* de los genotipos wt, *mpk3* y *mpk6* en condiciones de no aclimatación y de aclimatación al frío.
7. Conocer el patrón de la expresión de los genes codificantes de enzimas del metabolismo de esfingolípidos como consecuencia de la exposición a la aclimatación de los genotipos wt, *mpk3* y *mpk6*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) del genotipo tipo silvestre (wt), de las líneas mutantes knock-out *mpk3* y *mpk6*, y de la línea sobreexpresora OvMPK6 (Tabla 2). Todas las líneas mutantes fueron donadas por el Dr. Ángel Arturo Guevara García del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Tabla 2. Material biológico.

Nombre	Genotipo	Fenotipo
Tipo silvestre (wt, Col-0)	Sin modificación	
<i>mpk3</i>	El gen codificante para la MPK3 se encuentra silenciado por un RNA de interferencia [Saucedo-García et al, 2011]	
<i>mpk6</i>	El gen codificante para la MPK6 se encuentra mutado por la inserción de un T-DNA [Alonso et al, 2003; Saucedo-García et al, 2011]	
OvMPK6	El gen codificante para la MPK6 se encuentra sobreexpresado [Guevara-García et al, no publicado]	

2. Crecimiento de plantas

Las semillas fueron germinadas en macetas que contenían sustrato humedecido con agua de la llave y compuesto de tres partes de Mix 4 Aggregate Plus (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.), una parte de Vermiculita Premium Grande (Sunshine, Sun Gro Horticulture; Canada Ltd.) y una parte de Agrolita Dica Mex (Dicalite de México S.A. de C.V.; Tlalnepantla, Edo. de México) y crecidas por cuatro semanas en un fotoperiodo corto (8 h/16 h luz/oscuridad), a una temperatura de 22 °C y con riego ligero con agua de la llave. Posteriormente, las plántulas

fueron transferidas individualmente a macetas con la mezcla de sustratos mencionada anteriormente. Todas las macetas utilizadas fueron previamente lavadas y remojadas con NaClO comercial al 30%, y posteriormente fueron enjuagadas con agua de la llave antes de ser usadas.

Para el crecimiento de las plántulas, las macetas se colocaron en charolas durante tres semanas y se cubrieron con domos transparentes para mantener la humedad. Se regaron con medio de Hoagland (Apéndice I) de 2 a 3 veces por semana. Las plantas adultas se crecieron en el invernadero con un fotoperiodo natural y aire acondicionado con temperatura mantenida a 22 ± 4 °C o bien en una cámara con el fotoperiodo corto a una temperatura de 22 ± 2 °C.

3. Tratamientos térmicos de las plantas

Las plantas de 10 a 12 semanas de edad se sometieron a tratamientos de No Aclimatación (NA) o de Aclimatación (AC). Las condiciones de NA consistieron en el mantenimiento de las plantas por una semana a 22 ± 2 °C (misma temperatura de cultivo de las plantas hasta el momento) en una cámara con un fotoperiodo corto. Para las condiciones de AC, las plantas se transfirieron a una cámara con una temperatura de 4 ± 2 °C con el mismo fotoperiodo. Al finalizar este periodo, las plantas NA o AC fueron cosechadas, pesadas, separadas, envueltas en papel aluminio y congeladas con N₂ líquido para ser almacenadas a - 70 °C. De aquí se tomaron posteriormente para hacer todas las determinaciones reportadas en la tesis. Excepcionalmente, cuando las plantas se sometieron al reto de congelación, se procedió a tratar las plantas como se describe en la sección siguiente.

3.1. Reto de congelación

Las plantas previamente tratadas en las condiciones de NA (22 °C) o de AC (4 °C) se sometieron a un reto de congelación para evaluar la efectividad del proceso de aclimatación. Las plantas se ingresaron en lotes de 6 macetas por vez a un congelador horizontal a - 15 °C por 80 min en oscuridad. Terminado este tiempo, las macetas se trasladaron a un refrigerador a 4 °C por 40 min aun en oscuridad y al final se regresaron a una cámara que se encontraba a 22 ± 2 °C con un fotoperiodo corto, en donde fueron monitoreadas por dos semanas. Se tomaron registros fotográficos previamente al reto de congelación, a la semana y a las dos semanas posteriores al reto de congelación.

3.1.1. Determinación de la fuga de electrolitos

La determinación de la fuga de solutos se realizó tomando 7 hojas de desarrollo intermedio (tamaño mediano) de las plantas recién sometidas al reto (- 15 °C por 80 min en oscuridad). Las

hojas se colocaron en un frasco de vidrio alto que contenía 80 ml de agua desionizada y la suspensión se enfrió a 4 °C por 40 min. Una vez enfriada, la suspensión se mantuvo en agitación controlada con ayuda de una barra magnética por 90 min, cuidando que la suspensión no se calentara. A continuación, se midió la conductancia de la suspensión producida por los electrolitos perdidos de las hojas y posteriormente ésta, conteniendo las hojas, se calentó hasta ebullición para obtener el valor total de electrolitos. La conductancia se midió 10 min después de que la suspensión fue hervida para ser considerada como el 100 % de la conductancia total.

3.2. Determinación del porcentaje de sobrevivencia y de deterioro

El porcentaje de sobrevivencia y el nivel de daño sufridos por el tratamiento de congelación se determinaron una y dos semanas posteriores al reto de congelación. El porcentaje de sobrevivencia al reto de congelación se calculó tomando como planta sobreviviente aquella que tenía al menos una hoja viva (hoja verde, no marchita) al tiempo de una o dos semanas.

El grado de deterioro por la congelación se evaluó de acuerdo con el nivel de daño, el cual se estimó asignando un valor numérico a la magnitud del detrimento físico visible en la parte aérea de la planta generado por el tratamiento de congelación (observable a la semana o a las dos semanas posteriores). El valor numérico se asignó de acuerdo con una escala de magnitud de deterioro con valores entre 0 y 5 en donde 0 representa a la planta que no presentó daño alguno y el 5 representa a la planta que no logró sobrevivir y que mostró una letalidad en la roseta (Tabla 3) [Saucedo-García et al, 2021].

Tabla 3. Escala de nivel de daño de las plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran figuras representativas correspondientes al grado de deterioro indicado con un número de las plantas posteriormente al reto de congelación. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Nikon COOLPIX L120.

Nivel de daño					
0	1	2	3	4	5
					

Tanto el porcentaje de sobrevivencia como el grado de deterioro fueron evaluados en todos los genotipos analizando al menos 6 réplicas biológicas independientes con 4 individuos cada una. Los valores fueron tratados estadísticamente.

4. Análisis de la ultraestructura celular

Las hojas de las plantas previamente tratadas se cortaron con una hoja nueva de bisturí en rectángulos de aproximadamente 3 x 5 mm evitando la nervadura, se fijaron en un buffer de fosfatos 100 mM (pH 7.2) y glutaraldehído al 3 % (v/v) a 4 °C, se deshidrataron y se embebieron en epon:óxido de propileno por 4 d. Posteriormente, se contrastaron secciones ultradelgadas (80 nm) con acetato de uranilo al 5 % y una solución de citrato de plomo, y se visualizaron con un microscopio electrónico Jeol 1200 EXII operado a 60 kV [Saucedo García et al, 2011].

5. Aislamiento y purificación de fracciones subcelulares

5.1. Aislamiento de la fracción citosólica

La fracción citosólica (FC) se obtuvo a partir de las hojas congeladas de acuerdo con Saucedo García et al. (2011). El tejido se trituró en un mortero frío, añadiendo constantemente N₂ líquido. Posteriormente, se añadió el buffer de homogenización (Apéndice II) en una relación 1:1 (p/v) y la mezcla se homogenizó durante 3 min con ayuda del homogenizador Tissue-Tearor modelo 958-370 en intervalos de 15 s. El homogenizado se filtró a través de 4 capas de gasa previamente humedecidas y posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó, se determinó su concentración proteica, se alicuotó, se congeló con N₂ líquido y se almacenó a - 70 °C hasta su uso posterior.

5.2. Obtención de las fracciones microsomales

Las fracciones microsomales (FM) se obtuvieron a partir de las hojas tratadas, cosechadas, pesadas y congeladas inmediatamente acorde a Briskin et al. (1986). Todos los pasos se llevan a cabo a 4 °C. Las hojas congeladas se transfirieron a un vaso de licuadora pre-enfriado, se les añadió buffer de homogenización (Apéndice III) en relación 1:3 (p:v) y se trituraron en intervalos de 5 s. El homogenizado se filtró mediante 4 capas de gasa previamente humedecidas y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm en una centrífuga Jouan MR1812 a 4 °C durante 10 min. A continuación, se obtuvo el sobrenadante y fue centrifugado a 11000 rpm en la misma centrífuga a 4 °C durante 15 min. Nuevamente se obtuvo el sobrenadante y este fue centrifugado a 45000 rpm en una ultracentrífuga Beckman Optima XL-100 K a 4 °C. El botón obtenido se resuspendió con buffer de ajuste de peso (Apéndice II) y la preparación membranal se almacenó a - 70 °C hasta su uso.

5.3. Obtención de vesículas de membrana plasmática

Las vesículas de membrana plasmática (VMP) se aislaron a partir de las FM utilizando un procedimiento de reparto en un sistema de fases de dos polímeros acuosos (polietilenglicol

(PEG)/dextrán) de acuerdo con Carmona Salazar et al. (2011). Las VMP se separaron del resto de las membranas celulares tomando en cuenta su carga de superficie y su reparto preferente hacia la fase superior (PEG). Se preparó una mezcla de fases con la fracción microsomal obtenida, polímeros acuosos y sales en concentraciones específicas (Apéndice IV). Esta mezcla se centrifugó a 1000 g durante 15 min manteniendo la temperatura a 4 °C, se recuperó la fase superior (PEG) y se mezcló con el doble de volumen de buffer de lavado (Apéndice III). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 100000 g durante 1.5 h a 4 °C. El botón obtenido se resuspendió con buffer de lavado (Apéndice III) y las VMP se almacenaron a - 70 °C para su uso posterior.

5.4. Determinación de la concentración proteica

La concentración de proteínas en la FM y en las VMP se determinó mediante el método de Lowry [Peterson, 1977], utilizando una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) y midiendo la absorbancia a 750 nm.

La concentración de proteínas en la FC se determinó mediante el ensayo de proteínas Bio-Rad, el cual se basa en el método de Bradford [Bradford, 1976], usando BSA como estándar.

6. Determinación de la fluidez membranal

La fluidez membranal se midió en las VMP obtenidas de hojas de plantas AC y NA. Se realizó un ensayo de polarización de la fluorescencia (PF), utilizando como sonda química el 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-p-tolueno-sulfonato (TMA-DPH) a una concentración de 1 mM disuelto en dimetilformamida (DMF) absoluta. Para iniciar la medición se ajustaron los polarizadores, se calibró el equipo y se ingresaron al programa las longitudes de onda de emisión (417 nm) y excitación (340 nm) del TMA-DPH [Kaiser & London, 1998]. Posteriormente se preparó la muestra en una celda de vidrio de 3 mL agregando: 300 µg de proteína membranal, 2 µL de TMA-DPH 1 mM y buffer de medición (sorbitol 620 mM, KH₂PO₄ 5 mM a pH 7.8, EDTA 0.1 mM) necesario para un volumen final de 2 mL. La celda se equilibró incubándose bajo agitación constante y a continuación la temperatura se fue ajustando dinámicamente con un dispositivo Peltier, iniciando las lecturas de PF a 5 °C y continuándose a 9, 15, 21 y 29 °C. Así, el equipo arroja los valores promedio de polarización y anisotropía para cada temperatura junto con su desviación estándar [Cano-Ramírez et al, 2021].

7. Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa de H⁺

7.1. Ensayo de la hidrólisis de ATP

La actividad enzimática de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se midió determinando el Pi derivado de la hidrólisis de ATP. Los tubos de ensayo y el recipiente con el medio de hidrólisis de ATP fueron lavados con detergente Extran diluido, sumergidos en H₂SO₄ por al menos 48 h y luego enjuagados exhaustivamente con agua desionizada. Al comenzar el ensayo, estos se conservaron en frío insertándolos en el hielo de una bandeja. La preparación del medio de hidrólisis se obtuvo mezclando los siguientes componentes a las concentraciones finales de: 250 mM de sacarosa/PIPES 20 mM ajustado a pH 6.5 con BTP, 7 μM CCCP, 0.015 % Brij 58 (v/v), 10 mM MgCl₂ y 10 mM de ATP a pH 6.5. Todas las soluciones y el medio de reacción se prepararon con H₂O grado HPLC (JT Baker® 4218-03). Se utilizaron cuatro condiciones en el ensayo para determinar: hidrólisis total (HT), hidrólisis química (HQ) e hidrólisis enzimática que comprende la hidrólisis con ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) y la hidrólisis con mezcla de inhibidores (HMI). En los últimos dos casos el medio se suplementó con Na₃VO₄ a una concentración final de 200 μM, o con la mezcla de inhibidores NaN₃, Na₂MoO₄ · H₂O y KNO₃ a las concentraciones finales de 2 mM, 2 mM y 50 mM, respectivamente. Los inhibidores NaN₃, KNO₃ y Na₂MoO₄ · H₂O se utilizaron para inhibir a la ATPasa mitocondrial, la ATPasa vacuolar y la fosfatasa ácida, respectivamente, las cuales son otras posibles fuentes de Pi. El volumen final en cada tubo fue de 150 μl [Sánchez-Nieto et al, 1997].

La reacción se inició adicionando al tubo de ensayo 2, 4 o 6 μg de proteína membranal, se agitó manualmente por unos segundos, incubándose por 20 min en una gradilla a 29 °C (en baño a temperatura constante). Este procedimiento se llevó a cabo para las condiciones HT, HVO₃ y HMI. En el caso de la condición de HQ, los tubos con medio de hidrólisis se colocaron directamente en la gradilla con las mismas condiciones.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, a cada tubo dentro del baño a 29 °C se le adicionaron directamente 150 μl de la solución A, inmediatamente después, los tubos se agitaron con un vórtex y se transfirieron a un baño de hielo [Sánchez-Nieto et al, 1997]. El Pi liberado en la hidrólisis de ATP se determinó de acuerdo con un método colorimétrico realizando una curva patrón de determinación de fosfato inorgánico paralelamente al ensayo de hidrólisis de ATP como se describe a continuación.

7.2. Determinación del fosfato inorgánico

Para realizar la curva patrón, primero se añadieron de 10 a 60 μl de solución estándar 1 mM de K_2PO_4 , hasta un volumen de 150 μl suplementando con agua grado HPLC (Burdick & Jackson®). Posteriormente, se añadieron 150 μl de la solución A (SDS 24 %) y 300 μl de la solución B/C (molibdato de amonio 2 % y ácido ascórbico 2 %, ambos preparados en HCl 1M, en relación 1:1 v/v). La mezcla se incubó de 3 a 7 min a temperatura ambiente y se añadieron 450 μl de reactivo E (citrato de sodio 2 %, metarsenito de sodio 2 % y de ácido acético 2 %, todo disuelto en agua grado HPLC). Se incubó por 20 min a temperatura ambiente para permitir el desarrollo y la estabilización del color y se leyó su absorbancia a 850 nm [González-Romo et al, 1992].

7.2.1. Determinación de la actividad enzimática de la ATPasa de H^+ a diferentes concentraciones de sustrato

En este caso se prepararon dos diferentes medios de hidrólisis, con y sin ATP/ Mg^{2+} . El primer medio de hidrólisis (MH-ATP/ Mg^{2+}) se preparó mezclando los siguientes componentes a concentraciones finales de: 250 mM de sacarosa/PIPES 20 mM ajustado a pH 6.5 con BTP, 7 μM CCCP, 0.015 % Brij 58 (v/v), 2 mM NaN_3 , 2 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 50 mM KNO_3 a pH 6.5. El segundo medio de hidrólisis (MH⁺ATP/ Mg^{2+}) se preparó igual que el anterior, pero añadiendo 12 mM de ATP y 12 mM de MgCl_2 [Sánchez-Nieto et al, 1997]. Se preparó medio de hidrólisis suficiente para el número de ensayos a realizar, tomando en cuenta que para cada concentración de sustrato se requiere realizar el ensayo de hidrólisis química respectivo. Se etiquetaron tubos de la A a la M y se llevaron a las concentraciones indicadas en la Tabla 4 añadiendo volúmenes diferentes de ambos medios.

Tabla 4. Composición del medio de reacción de hidrólisis de ATP y concentraciones finales de sustrato.

ATP/ Mg^{2+} (1:1)	TUBO	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
	mM	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2	4	6	8	10	12
MH sin ATP/ Mg^{2+}	μl	150	148.75	147.5	145	142.5	140	137.5	125	100	75	50	25	0
MH con ATP/ Mg^{2+}	μl	0	1.25	2.5	5	7.5	10	12.5	25	50	75	100	125	150

La reacción se inició con la adición de 4 μg de proteína total a cada tubo, se agitó manualmente por unos segundos y se incubó en un baño a 29 °C por 20 min. Para medir la hidrólisis química en cada condición, los tubos únicamente se agitaron y se colocaron en el mismo baño durante el mismo tiempo de reacción que el resto de los tubos.

Pasado el tiempo de incubación, a los tubos incubados en el baño de agua a 29 °C, se le adicionaron directamente 150 µl de la solución A, se agitaron en un vortex y se transfirieron a un baño de hielo. El Pi liberado se determinó de acuerdo con el protocolo de determinación de fosfato inorgánico. Paralelamente al ensayo de hidrólisis de ATP se realizó una curva patrón para cuantificar fosfato inorgánico.

8. Inmunodetección de proteínas

8.1. Separación de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

Las proteínas de las FC y las VMP fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS de acuerdo con el método descrito por Schagger y Von Jagow (1987). Primero se limpiaron los vidrios utilizados en la elaboración del gel con SDS 10% o alcohol, se colocaron las placas de vidrio del lado del separador y se montaron con cuidado en el soporte, comprobando ausencia de fugas con un poco de agua bidestilada. Se retiró el agua y se secó el interior con ayuda de papel filtro. Se preparó la mezcla del gel separador (Apéndice V), se vertió en el espacio entre las dos placas hasta el nivel deseado, colocándose un poco de SDS al 0.3 % sobre la mezcla para evitar la formación del menisco y se dejó polimerizar por 30 min a temperatura ambiente. Ya polimerizado se desechó el SDS, se enjuagó con agua destilada y se secó con papel filtro. Se preparó la mezcla del gel concentrador (Apéndice V), se vertió encima del gel separador y se colocó un peine de 10 o 15 pozos, introduciendo hasta dejar un espacio de 1 cm entre el gel separador y el final de los dientes del peine. Se dejó polimerizar por 1 h a temperatura ambiente, asegurándose que la mezcla del gel concentrador llegara hasta el borde de las placas. Una vez que el gel polimerizó, se retiró el peine cuidadosamente para no dañar los carriles y estos se limpiaron con ayuda de agua destilada. A continuación, se fijó el gel ensamblado en el soporte de la cámara de electroforesis y se colocó el buffer del cátodo (Apéndice V) en el interior llegando al borde de las placas de vidrio. Se cargó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de Bio-Rad en el pozo que se requería y enseguida se cargaron las muestras, cuidando que tuvieran cantidades iguales de proteína total y volúmenes similares. Acto seguido, se colocó el buffer del ánodo (Apéndice V) dentro de la cámara de electroforesis hasta cubrir la mitad de los tornillos inferiores y se le colocó la tapa cuidando de que coincidieran los extremos del cátodo y del ánodo. Finalmente, la cámara se conectó a la fuente de poder y se aplicaron 50 V por media hora (tiempo requerido para que las proteínas entren al gel separador) y posteriormente se aplicaron 90 V por 2 o 3 h. Una vez separadas las proteínas, el gel se recuperó y se tiñó con azul de Coomassie o se transfirió a una membrana de PVDF.

8.2. Tinción de geles con azul de Coomassie

Una vez separadas las proteínas por electroforesis, el gel se colocó en solución fijadora (Apéndice VI) asegurando una cobertura completa y se mantuvo en agitación constante por toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie (Apéndice VI) por 2 h con agitación constante a temperatura ambiente. Finalmente, el gel se colocó en solución desteñidora (Apéndice VI) manteniéndose en agitación constante hasta que las bandas de proteínas fueron evidentes. El gel se almacenó en agua destilada [Schagger y Von Jagow, 1987].

8.3. Secado de geles

Los geles teñidos se digitalizaron y posteriormente se secaron para preservarlos. Para ello, el gel se colocó sobre una hoja de papel absorbente 3M y se cubrió con papel celofán previamente humedecido, asegurándose de eliminar todas las burbujas. Finalmente, se colocó en el equipo GEL DRYER (modelo 583 Bio-Rad) durante 2 h a 80 °C.

8.4. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Una vez separadas electroforéticamente las proteínas, el gel se mantuvo en buffer de transferencia (Apéndice VII) durante 15 a 30 min, a temperatura ambiente y en agitación constante. Pasado ese tiempo, el gel se colocó en un casete de rejillas de plástico poniendo varias capas sucesivas: una capa de esponja, una hoja de papel filtro, el gel, una hoja de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), otra hoja de papel filtro y otra capa de esponja. Tanto el papel filtro como las esponjas fueron previamente humedecidas con buffer de transferencia y la membrana de PVDF fue primero humedecida con metanol y posteriormente con el mismo buffer de transferencia. El casete se colocó en la cámara de electrotransferencia conteniendo suficiente buffer de transferencia frío para cubrirlo, de tal manera que el gel quedara orientado hacia el cátodo y la membrana de PVDF hacia el ánodo. La electrotransferencia de las proteínas en el gel a la membrana se realizó a 36 volts por 120 min a temperatura ambiente o a 12 volts toda la noche a 4 °C. Una vez finalizada, la membrana de PVDF se enjuagó 5 veces con H₂O destilada, se le añadió 1 ml del primer reactivo del sistema Western Blot Signal Enhancer (Pierce®) y se dejó actuar por 2 min, posteriormente se volvió a enjuagar 5 veces con H₂O destilada y se añadió 1 ml del segundo reactivo del sistema Western Blot Signal Enhancer Pierce® dejándose actuar por 10 min, al terminar se realizaron 5 enjuagues más con H₂O destilada.

8.5. Detección de proteínas por revelado en Western Blot

La inmunodetección se realizó con el siguiente procedimiento:

- a) Bloqueo de la membrana: La membrana se colocó en solución bloqueadora (Apéndice VIII) por 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados, uno con TTBS (Apéndice VIII) en agitación rotatoria por 5 min y otro con TBS (Apéndice VIII) por 10 min.
- b) Exposición al primer anticuerpo (Apéndice VIII): La membrana se colocó en una bolsa que contenía el primer anticuerpo, donde se mantuvo durante toda la noche en agitación constante a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Se repitió la secuencia de lavados del paso de bloqueo.
- c) Exposición al segundo anticuerpo (Apéndice VIII): La membrana se colocó en una solución que contenía el segundo anticuerpo donde se incubó por 2 h en agitación constante a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados, tres con TTBS en agitación rotatoria por 10 min y uno con TBS por 10 min.
- d) Revelado de las bandas: Se añadió la mezcla para desarrollar color (Apéndice VIII) y en cuanto las bandas se hicieron visibles, se retiró la solución y se añadió agua bidestilada para detener la reacción.

9. Determinación de la composición y cuantificación de esfingolípidos de las vesículas de membrana plasmática

Las vesículas de membrana plasmática obtenidas previamente y mantenidas a -70 °C fueron liofilizadas, almacenadas brevemente y enviadas al laboratorio del Dr. Edgar Cahoon en Nebraska, Lincoln. Posteriormente, las muestras fueron procesadas para extracción, separación, identificación y cuantificación de esfingolípidos por cromatografía de alta resolución (HPLC) en fase reversa acoplada a espectrometría de masas en secuencia por ionización en electrospray (ESI-MS/MS), de acuerdo con el protocolo descrito por Markham y Jaworski (2007).

10. Determinación de niveles de transcritos

10.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó a partir de las hojas congeladas de acuerdo con Chomczynski y Sacchi (1987). El tejido se trituró en N₂ líquido con ayuda de un mortero hasta obtener un polvo muy fino. Una vez pulverizado, se agregó el TRIzol Reagent (Ambion) en una relación 1:1 (p:v) directamente en el mortero y se continuó moliendo hasta que el TRIzol se

descongeló. La mezcla se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 13000 g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf de 1.5 ml con ayuda de una micropipeta y se les agregaron 200 µl de una mezcla fría de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v:v:v). Los tubos se agitaron manualmente 15 veces y se centrifugaron nuevamente a 13000 g por 10 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 400 µl de CHCl₃ frío, se agitaron manualmente 15 veces y se volvieron a centrifugar por 5 min a 13000g a 4 °C. Nuevamente se recuperó la fase acuosa y se repitió el procedimiento con CHCl₃. Se volvió a recuperar la fase acuosa y se agregaron 200 µl de isopropanol frío. Posteriormente los tubos se agitaron con ayuda de un vortex durante 10 s, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13000 g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó invirtiendo el tubo y el botón se lavó con 1 ml de etanol 70% frío. Posteriormente los tubos se agitaron con vortex por 15 s y se centrifugaron a 13000 g por 5 min a 4 °C. El lavado con etanol se repitió una vez más. Finalmente, el botón se resuspendió en 40 µl de agua libre de nucleasas. El RNA obtenido se almacenó a -70 °C hasta su uso. La cuantificación de RNA se realizó utilizando un NANODROP 2000® (Thermo Scientific Inc.), evaluando la pureza del RNA y asegurando un índice de absorbancia $A_{260}/A_{280} = 2 \pm 0.1$ [Koetsier & Cantor, 2019].

10.1.1. Evaluación de la integridad del RNA

La integridad del RNA se comprobó en geles de agarosa desnaturalizantes. Se prepararon geles de agarosa con la siguiente composición: agarosa 2 %/ TAE pH 7.0 1x/ bromuro de etidio 0.5 µg/mL. Para ser aplicada al gel, la muestra del RNA se preparó mezclando 5 µL de colorante 6x (Blue/Orange Loading Dye), 1000 ng de RNA y el volumen necesario de agua DEPC para 30 µL, manteniéndose la mezcla en hielo hasta ser cargada al gel. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1x frío preparado con H₂O-DEPC (Apéndice IX) a 85 volts durante 45 min. La integridad del RNA se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta Benchtop UV o en el equipo ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Todos los ensayos posteriores se realizaron únicamente con el RNA con patrón de integridad de las bandas correspondientes a las subunidades 18S y 28S del RNA ribosomal (Fig. 14).

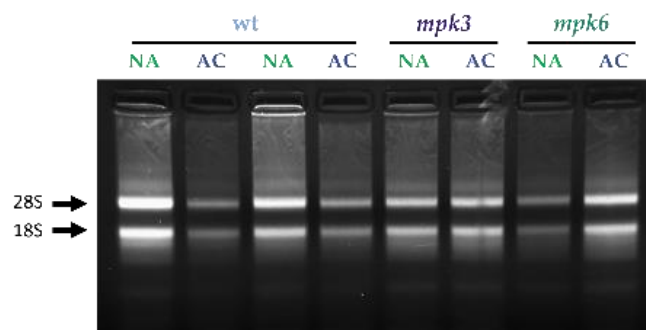


Figura 14. Integridad del RNA. Se muestra un gel de agarosa al 2 % representativo, cargado con RNA extraído de hojas de plantas aclimatadas (AC) y no aclimatadas (NA) de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde). Las dos bandas que se observan corresponden a las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal.

10.2. Síntesis de cDNA

A partir del RNA íntegro se realizó una reacción de retrotranscripción en la cual la transcriptasa reversa (RT) sintetiza DNA complementario (cDNA) a partir del RNA mensajero. La reacción para obtener el cDNA se efectuó en un tubo eppendorf estéril de 0.5 mL al cual se le agregaron: un volumen necesario para tener 8 µg de RNA, 8 µL de oligo dT (20 mM) y agua libre de nucleasas suficiente para obtener 80 µL finales. Todos los componentes se mezclaron manualmente y se centrifugaron en una mini centrífuga (Heathrow Scientific). Posteriormente, el RNA se desnaturizó a 70 °C por 5 min y después la mezcla se enfrió a 4 °C por 5 min. A continuación, al tubo se le añadieron: 32 µL de buffer IMPROM 5x (Promega), 19.2 µL de MgCl₂ (25 mM), 8 µL de dNTPs 10 mM, 8 µL de RT y 12.8 µL de agua libre de nucleasas. Los tubos se colocaron en el termociclador MiniPCR® y se sometieron a las siguientes condiciones: 5 min a 25 °C, 60 min a 42 °C, 15 min a 70 °C y al final se enfriaron a 4 °C. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

10.3. Diseño de cebadores

Para poder detectar con precisión los transcritos de los genes de interés se diseñaron los cebadores sentido y antisentido de los genes analizados (Tabla 5) utilizando el programa Primer3Plus [Untergasser et al, 2007] usando como templatado las secuencias codificantes de cada gen obtenidas de Ensembl Plants Home [Yates et al, 2021]. Posteriormente, se comprobó que cada par de cebadores no formara estructuras secundarias, homodímeros ni heterodímeros con la herramienta OligoAnalyzer™ Tool [Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT™), 2018]. Por último, se determinó la especificidad de los cebadores diseñados utilizando la herramienta Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) del National Center for Biotechnology

Information (NCBI). Todos los cebadores se diseñaron tomando en cuenta las recomendaciones reportadas por Kim et al. (2013).

Tabla 5. Cebadores diseñados para este trabajo.

Gen	Nombre	No. Acceso	Nombre clave	Secuencia	No. Bases	Tamaño del producto
<i>AHA1</i>	ATPase 1, plasma membrane-type	AT2G18960	qAHA1-FW	TCTCAGCGTTCATGGTTCTG	20	222
			qAHA1-RV	ACCTCACACCGAACTTGTC	20	
<i>AHA2</i>	ATPase 2, plasma membrane-type	AT4G30190	qAHA2-FW	TGCTCAAAGGACACTTCACG	20	173
			qAHA2-RV	GCTTCACGACTGATTCCACA	20	
<i>AHA3</i>	ATPase 3, plasma membrane-type	AT5G57350	qAHA3-FW	GAGGAGAGGGAAGCACAATG	20	155
			qAHA3-RV	CTAAGCCTTGCATCTCAGC	20	
<i>LOH1</i>	Ceramide synthase 1	AT3G25540.1	qLOH1-FW	TTGCTGCTGGATTCTACACG	20	198
			qLOH1-RV	TCCCAATTCAAGGAACACA	20	
<i>LOH2</i>	Ceramide synthase 2	AT3G19260.1	qLOH2-FW2	TCCACTTCTCCAACCAACC	20	220
			qLOH2-RV2	CACCGAACAACACAAGAAACC	21	
<i>LOH3</i>	Ceramide synthase 3	AT1G13580.1	qLOH3-FW	AGATGGGTTTGTGGAATCG	20	112
			qLOH3-RV	CGAATCGAAGGGAAGAACAC	20	
<i>SBH1</i>	Sphinganine C4-monooxygenase 1	AT1G69640	qSBH1-FW	TACTGTTGCTCCGATTGTGG	20	235
			qSBH1-RV	GGAAACTGTTGCGCTTTGT	20	
<i>SBH2</i>	Sphinganine C4-monooxygenase 2	AT1G14290.1	qSBH2-FW	AAGGGCGTTCTTCTCAACA	20	231
			qSBH2-RV	AAGGCGATGATGCTGAGAGT	20	
<i>SLD1</i>	Sphingoid long-chain base desaturase 1	AT3G61580	qSLD1-FW	GCGATTCAAGGCAAGGTCTA	20	163
			qSLD1-RV	GGTAACCGTGAAGAGATGG	20	
<i>SLD2</i>	Sphingoid long-chain base desaturase 2	AT2G46210.1	qSLD2-FW2	ACCAACACTGGACATTTTACCC	22	166
			qSLD2-RV2	GGAAGGAACGAGACTAAGAGAGG	23	
<i>FAH1</i>	Dihydroceramide fatty acyl 2-hydroxylase 1	AT2G34770.1	qFAH1-FW	GTGGGCAGTTCCTGTCTTT	20	232
			qFAH1-RV	GTCCATCGGTGCTTATGAT	20	
<i>FAH2</i>	Dihydroceramide fatty acyl 2-hydroxylase 2	AT4G20870.1	qFAH2-FW	AGGATTCAAGCGAAGCAAAA	20	105
			qFAH2-RV	CTCTGGGCGTAAGAGACTCG	20	
<i>GCS</i>	Glucosylceramide synthase	AT2G19880.1	qGCS-FW	GCGACTGGTGAAGAACATT	20	187
			qGCS-RV	GGAAAACAGCAACAGGAGGA	20	
<i>IPCS2</i>	Inositol-phosphorylceramide synthase 2	AT2G37940	qIPCS2-FW	CCTGATTTTCTCATCGACA	20	250
			qIPCS2-RV	TACTGGGAGCAACACAGCAG	20	
<i>ACER</i>	Alkaline phytoceramidase (aPHC)	AT4G22330.1	qACER-FW	TCTGTGACCGTGTCTTCTGC	20	155
			qACER-RV	TACCTTTGGGTTCCATCCAC	20	
<i>NCER2</i>	Neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase 2	AT2G38010.2	qNCER2-FW	GACTTTTGGATATTGCGGCTAC	22	127
			qNCER2-RV	TTTGATTGACAGAAGGCAGAGA	22	
<i>NCER3</i>	Neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase 3	AT5G58980.1	qNCER3-FW	AATGTGTTGGGAGCCTTCTG	20	170
			qNCER3-RV	AAAAGATCCGAGCCTTCTT	20	
<i>GCD3</i>	Non-lysosomal glucosylceramidase	AT4G10060.2	qGCD3-FW	GGAATGTCAACGGAAGGAAA	20	190
			qGCD3-RV	CTGGTGTCTGAAACGAGCAA	20	

10.3.1. Evaluación de cebadores

Una vez diseñados los cebadores, se ordenó su síntesis (CryoKING by Biologix®) y posteriormente se evaluó su correcta amplificación, su especificidad, y se verificó que no se formaran productos inespecíficos. Para este propósito, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa de manera cuantitativa (qPCR) en un termociclador Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems) utilizando cada uno de los pares de cebadores sintetizados. Para realizar la reacción se mezclaron 10 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 µL del cebador sentido (10 µM), 0.3 µL del cebador antisentido (10 µM), 2 µL de cDNA control y agua libre de nucleasas suficiente para aforar a 20 µL, utilizando una mezcla sin cDNA como control negativo de la amplificación. Se realizaron duplicados de cada reacción siguiendo las condiciones señaladas en la Tabla 6 y se seleccionaron los pares de cebadores que formaron un único pico de amplificación en la curva de disociación.

Tabla 6. Condiciones para qPCR señaladas por Applied Biosystems.

Fase	Espera		Cíclica (40 ciclos)		Curva de Disociación		
	Inicial	Activación de la polimerasa AmpliTaq Gold®	Desnaturalización	Alineamiento / Elongación			
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	60 °C	95 °C
Tiempo	2 min	10 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s
Volumen	20 µL						

10.3.2. Eficiencia de los cebadores

La eficiencia de amplificación para cada par de cebadores se calculó construyendo una curva de calibración utilizando los valores del ciclo de cuantificación (C_q) obtenido a partir de diferentes diluciones de cDNA (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), asegurando tener una pendiente de $-3.3 \pm 10 \%$, lo cual se refleja en una eficiencia de amplificación de $100 \% \pm 10 \%$ [Alemayehu et al, 2013]. Se obtuvo también el valor de la línea umbral dentro de la región lineal de la curva de amplificación, la cual nos indica el rango logarítmico-lineal detectable de la muestra durante la PCR. La eficiencia de la reacción se calculó utilizando la fórmula reportada por Pfaffl (2001):

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{m}\right)}$$

Donde E = eficiencia de amplificación y m = pendiente de la curva de calibración.

10.4. Análisis de los niveles de transcrito

La determinación de los niveles de transcrito presentes en los diferentes genotipos y condiciones se obtuvo realizando la reacción de qPCR tomando los cDNA previamente

sintetizados como templado y utilizando independientemente cada par de cebadores diseñados (Tabla 4). Se analizaron 4 réplicas biológicas independientes. Los C_q obtenidos se recalcularon ajustando directamente en el programa MicPCR v2.10.0 el nivel de la línea umbral obtenido en la curva de calibración para cada uno de los genes analizados. Se utilizaron los genes de β -tubulina, ubiquitina 4 y la subunidad A3 de la proteína fosfatasa 2A como genes de referencia. Los niveles de expresión relativa de los transcritos se calcularon de acuerdo con la fórmula descrita por Hellemans et al. (2007):

$$\text{Niveles de expresión relativa} = \frac{E_{\text{blanco}}^{\Delta Cq_{\text{blanco}}(\text{control-muestra})}}{\sqrt[f]{\prod_0^f E_{\text{referencia}}^{\Delta Cq_{\text{referencia}}(\text{control-muestra})}}}$$

Donde E_{blanco} = eficiencia de amplificación del gen blanco; $\Delta Cq_{\text{blanco}}$ = diferencia de C_q entre el control y la muestra tratada; $E_{\text{referencia}}$ = eficiencia de amplificación del gen de referencia; $\Delta Cq_{\text{referencia}}$ = diferencia de C_q del gen referencia entre el control y la muestra tratada.

11. Análisis estadístico

Cada experimento se realizó un mínimo de 4 veces con al menos 3 preparaciones membranales independientes. El número de réplicas técnicas fue variable y se indica en cada experimento. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa Excel 2021, con la función de promedio, error estándar y análisis de varianza de un factor que fue calculado para determinar diferencias significativas en 2 muestras, con un valor de $\alpha = 0.05$. El análisis global de la determinación de transcritos y de los esfingolípidos membranales se llevó a cabo en el programa MetaboAnalyst 5.0 con la función de análisis estadístico de un factor [Pang et al, 2021].

RESULTADOS

El trabajo realizado durante mi tesis de doctorado fue parte de un proyecto que estudia los aspectos moleculares que se llevan a cabo en *Arabidopsis thaliana* durante la aclimatación al frío. En el laboratorio se habían generado algunas evidencias y materiales que pude aprovechar. En conjunto con mis experimentos, mis resultados me permiten concluir, en términos generales, que tanto la MPK3 como la MPK6 participan positivamente en la respuesta a las bajas temperaturas de manera no redundante, y que MPK6 es crítica para que la planta tenga una preparación exitosa y sobreviva al congelamiento, a través de incidir en la remodelación lipídica y en la actividad de una enzima de la membrana plasmática. A continuación, se presentan los resultados que sustentan estos y otros hallazgos.

1. La participación de la MPK6 en la aclimatación al frío es necesaria para promover la sobrevivencia de *Arabidopsis* ante el congelamiento

Por estudios anteriores en el laboratorio, Cano-Ramírez [2014] había encontrado que plantas de *Arabidopsis thaliana* adultas de los genotipos tipo silvestre (wt), *mpk3* y *mpk6* crecidas a 22 °C no sobrevivían a la exposición a -18 °C. Sin embargo, si estas plantas se mantenían previamente a 4 °C por una semana, mejoraban su sobrevivencia hasta en un 80 % a excepción del genotipo *mpk6*, el cual mostraba una gran sensibilidad a la congelación aun a pesar de haberse expuesto a 4 °C.

Los resultados anteriores fueron corroborados y ampliados en las plantas de *A. thaliana* en los genotipos wt, *mpk3* (con pérdida de función de la cinasa MPK3 debido a un RNAi), *mpk6* (con pérdida de función de la cinasa MPK6 debido a un T-DNA) y ahora se usó el genotipo OvMPK6 (con sobreexpresión del gen codificante de MPK6). Para ello, las plantas se crecieron de 10 a 12 semanas a 22 °C y, posteriormente, se transfirieron por una semana a 4 °C (aclimatación, AC) o se mantuvieron a 22 °C (no aclimatación, NA).

Tras la semana en las condiciones NA o AC, se tomó un registro fotográfico de las plantas (Fig. 15). De inmediato, las plantas se sometieron a condiciones de congelación a -15 °C por 80 min en oscuridad. A continuación, las plantas se llevaron a descongelar a 4 °C por 40 min y de ahí se transfirieron a 22 °C por dos semanas para observar una potencial recuperación. Se realizó un registro fotográfico a la semana y a las dos semanas de este periodo para evaluar el éxito de la aclimatación a través de la recuperación de las plantas (Fig. 15).

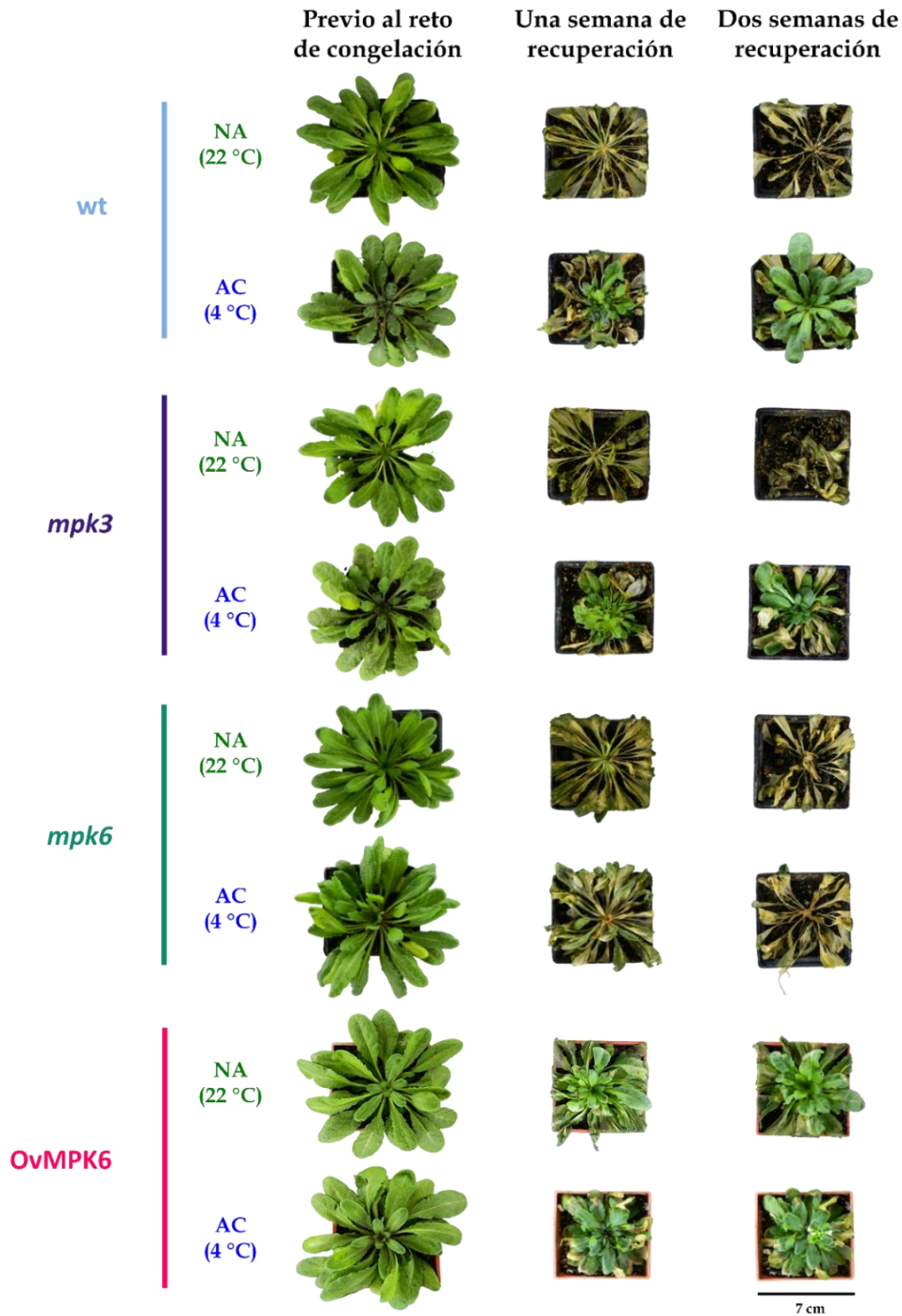


Figura 15. Efecto de la aclimatación y reto de congelación en los fenotipos de las plantas wt, *mpk3*, *mpk6* y OvMPK6. Se cultivaron plantas de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado), *mpk6* (verde) y OvMPK6 (rosa) a 22 °C durante 12 semanas y después se sometieron a un tratamiento de aclimatación (AC, 4 °C por una semana) o control (NA, 22 °C por una semana). Posteriormente, las plantas NA y AC se trasladaron a una cámara de congelación a -15 °C durante 80 min en condiciones de oscuridad (reto de congelación). Para la recuperación, todas las plantas se transfirieron a 4 °C en condiciones de oscuridad durante 80 min y posteriormente a 22 °C durante dos semanas. Se muestran las imágenes registradas previamente al reto de congelación, y a una y dos semanas de recuperación. Los fenotipos corresponden a una réplica representativa de quince individuos provenientes de cuatro réplicas biológicas independientes.

Los fenotipos mostraron que las plantas wt NA presentaron una baja resistencia al congelamiento, ya que únicamente el 20 % logró sobrevivir. Sin embargo, al ser aclimatadas, estas plantas mejoraron su sobrevivencia, ahora de 70 %, reanudando su crecimiento, mismo que fue seguido por las dos semanas posteriores al reto (Fig. 16A,B). Las plantas wt AC presentaron un mayor vigor y mejor recuperación comparados con las wt NA sobrevivientes (Fig. 16C). Estos resultados indicaron que la aclimatación proporcionó a las plantas capacidad de sobrevivencia y una mejor recuperación para afrontar las temperaturas congelantes.

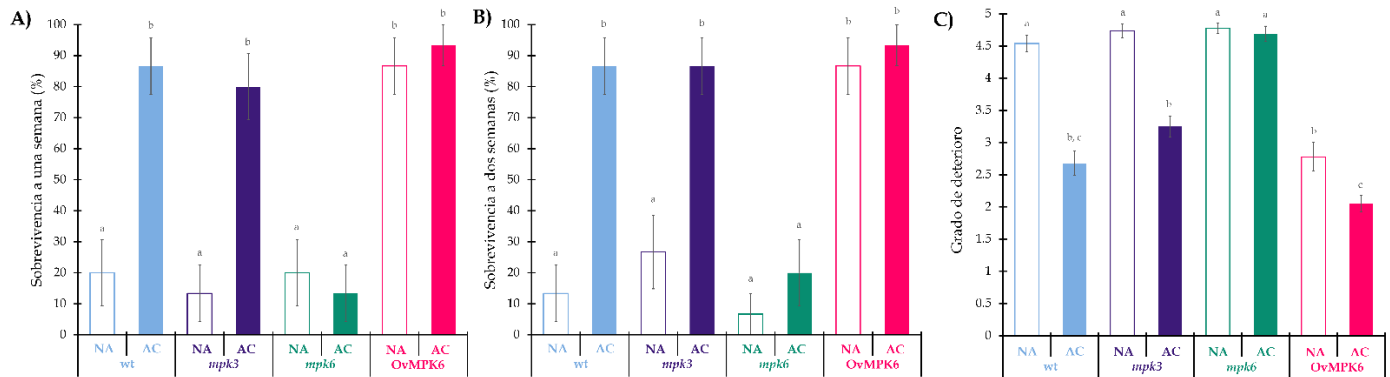


Figura 16. Efecto de la aclimatación al frío en los patrones de sobrevivencia a la congelación de las plantas wt, *mpk3*, *mpk6* y OvMPK6. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado), *mpk6* (verde) y OvMPK6 (rosa) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido) y posteriormente se trasladaron a una cámara de congelación a -15 °C durante 80 min en condiciones de oscuridad (reto de congelación). Para la recuperación, todas las plantas se movieron a 4 °C en condiciones de oscuridad durante 80 min y posteriormente a 22 °C durante dos semanas. **A)** Sobrevivencia de las plantas tras una semana de recuperación después del reto de congelación. **B)** Sobrevivencia de las mismas plantas tras dos semanas de recuperación después del reto de congelación. **C)** Grado de deterioro de las plantas tras dos semanas de aclimatación obtenido utilizando una escala de 0 a 5, donde 0 representa a la planta sana y 5 a la planta muerta (ver Materiales y Métodos). Se presentan los valores promedio de quince réplicas técnicas provenientes de cuatro réplicas biológicas independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Las plantas *mpk3* presentaron el mismo comportamiento de las plantas wt tanto NA como AC a la semana y a las dos semanas de recuperación (Fig. 16). En contraste, las plantas mutantes *mpk6* únicamente presentaron un 20 % de sobrevivencia al congelamiento indistintamente de su condición de NA o AC (Fig. 16A,B). Además de que su deterioro era significativamente mayor al de las plantas wt y *mpk3* aclimatadas (Fig. 16C). Por el contrario, las plantas sobreexpresoras de MPK6 mostraron una notable resistencia al congelamiento, ya que no requirieron de una previa aclimatación para tener una sobrevivencia de alrededor del 90 % (Fig. 16A,B). Si bien la aclimatación en estas plantas no mejoró su resistencia al congelamiento, sí ayudó a su

recuperación, puesto que las plantas OvMPK6 AC presentaron un menor grado de deterioro comparado con el control de NA (Fig. 16C).

Debido a que la sobrevivencia estaba muy comprometida en las plantas *mpk6* y con el propósito de evaluar los efectos de la aclimatación en la integridad membranal en las plantas retadas, se determinó la fuga de electrolitos en los genotipos *wt*, *mpk3* y *mpk6* en condiciones NA y AC [Cano-Ramirez, 2014]. Se encontró que la fuga de electrolitos fue de alrededor de un 70 % en las plantas *wt* y en las mutantes *mpk3* NA. Sin embargo, tras la aclimatación la fuga de electrolitos disminuyó aproximadamente un 10 % para ambos genotipos. Por otro lado, las plantas de la línea *mpk6* presentaron una fuga de electrolitos significativamente menor, alrededor de un 50 %, la cual no disminuyó tras la aclimatación (Fig. 17).

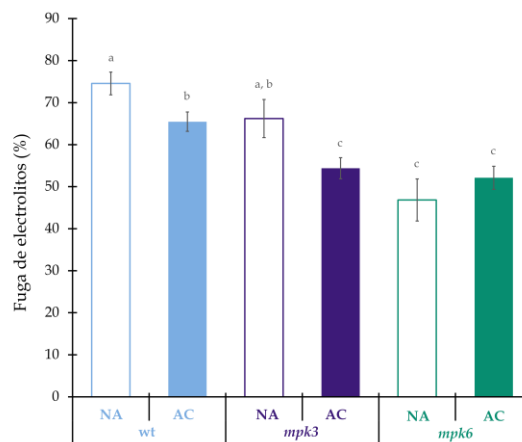


Figura 17. Efecto de la aclimatación al frío en la integridad membranal de las plantas *wt*, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos *wt* (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido) y posteriormente se trasladaron a una cámara de congelación a -15 °C durante 80 min en condiciones de oscuridad (reto de congelación). Posteriormente se determinó la fuga de electrolitos 90 min después del reto de congelación (ver Materiales y Métodos). Se presentan los valores promedio de seis réplicas técnicas provenientes de tres réplicas biológicas independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

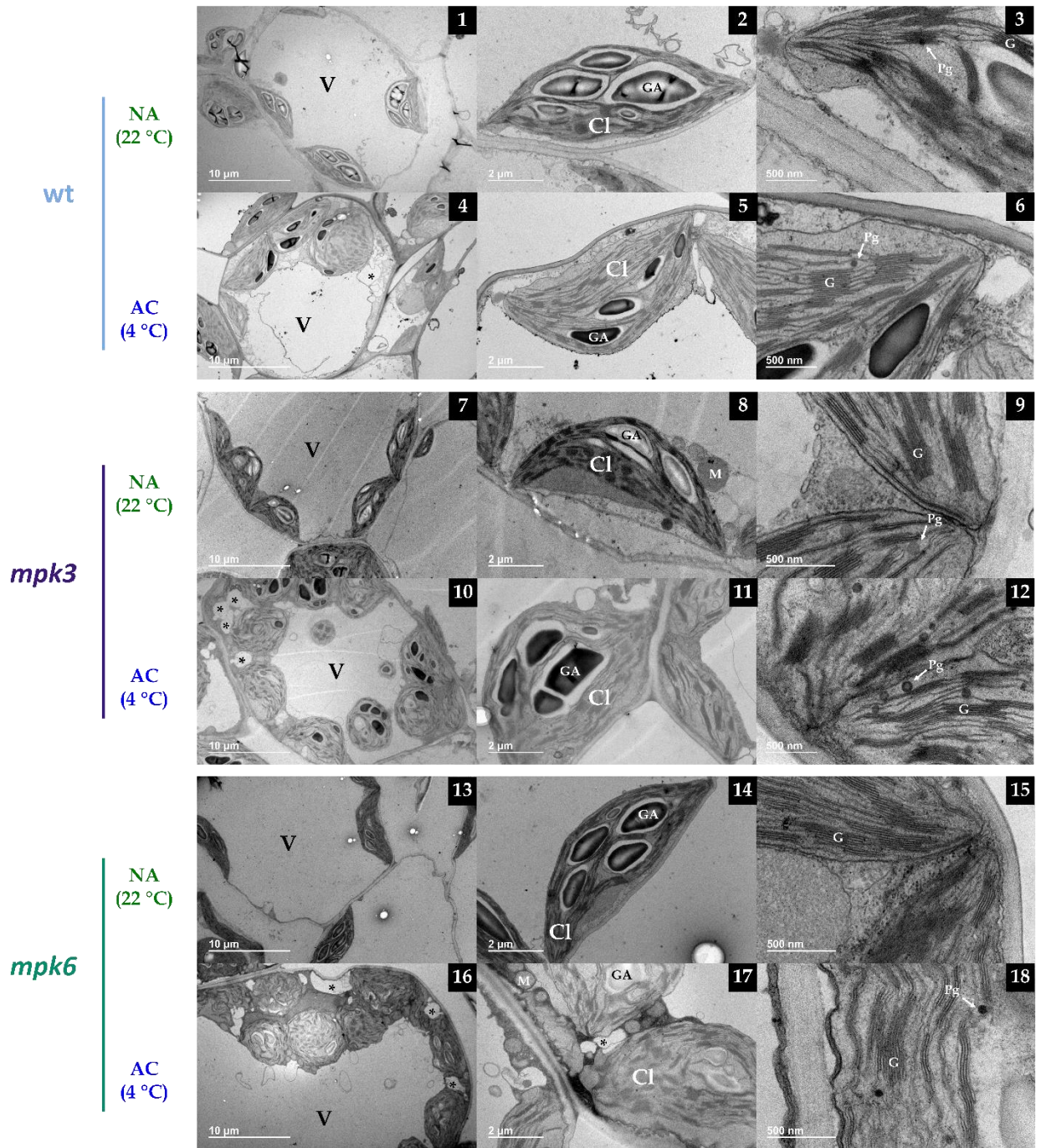


Figura 18. Efecto de la aclimatación al frío en la ultraestructura del cloroplasto de las plantas *wt*, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos *wt* (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana) o control (NA, 22 °C por una semana) y posteriormente se cosecharon las hojas y se visualizaron en un microscopio electrónico siguiendo los pasos descritos en Materiales y Métodos. Se muestran 3 paneles diferentes con acercamientos de 10 µm, 2 µm y 0.5 µm para cada caso. V, vacuola; CI, cloroplasto; GA, gránulo de almidón; M, mitocondria; G, grana; Pg, plastoglobulo. Los asteriscos muestran al citoplasma internalizado en la vacuola. Los fenotipos corresponden a una réplica representativa de doce individuos provenientes de tres réplicas biológicas independientes.

Ya que la mutante *mpk6* no mostró ninguna disminución en el porcentaje de fuga de electrolitos tras la aclimatación y con el antecedente del laboratorio de que las mutantes knock-out incapaces de expresar MPK4 [González-Córdova, 2019] y MPK6 [Saucedo-García, 2011] presentaron una modificación en la ultraestructura del cloroplasto en condiciones normales de crecimiento, se evaluaron los cambios de la estructura celular en los genotipos wt, *mpk3* y *mpk6* en condiciones NA y AC por medio de microscopía electrónica de transmisión (MET).

En la Fig. 18 se observa que las células de las plantas tipo silvestre NA presentaron la morfología típica de las células del mesófilo de las hojas, con una gran vacuola central con los organelos ubicados en la periferia de la célula (Fig. 18, paneles 1-3) y con cloroplastos de forma fusiforme típica y con gránulos de almidón íntegros (paneles 2 y 3). Además, se encontró que las membranas tilacoidales se presentaban en grana normales conectados por membranas tilacoidales lamelares (panel 3). El mismo fenotipo se encontró para las mutantes *mpk3* y *mpk6* NA (paneles 7-9, 13-15).

Por otro lado, en la misma Fig. 18 se muestra el efecto de la aclimatación en el que las células de las plantas wt AC mostraron cloroplastos con un ligero aumento de tamaño y pérdida fusiforme tendiendo a una forma esférica (panel 4). Igualmente, se encontró una internalización de algunos cloroplastos en la vacuola y algunas regiones de vacuolización del citosol. No obstante, las membranas tilacoidales mantuvieron su organización normal (paneles 4-6). Se encontraron los mismos efectos en las mutantes con ausencia de MPK3, además de que se observó una clara desorganización de las membranas tilacoidales (paneles 10-12). El efecto de la exposición por una semana a 4 °C resultó más crítico en las mutantes *mpk6*, pues prácticamente todos sus cloroplastos perdieron su arquitectura normal, generándose una esferificación y una gran desorganización del sistema tilacoidal (paneles 17 y 18). Adicionalmente, estos cloroplastos no presentaron la internalización en la vacuola observada en los otros genotipos (panel 16), lo cual sugiere que la MPK6 es necesaria para que se presente esta característica. Estos resultados han sido reportados y ampliados en cuanto a la funcionalidad fotosintética de estos cloroplastos en los tres genotipos [Saucedo-García et al, 2021]. En este artículo se describió que las hojas de las plantas de los tres genotipos, tanto NA como AC, presentaban parámetros fotosintéticos óptimos.

En conjunto, los resultados de esta sección indican el papel crítico que la MPK6 desempeña en el proceso de la aclimatación de la planta y en el que están involucrados la preservación de la integridad membranal y la internalización de cloroplastos dañados. Estos aspectos pueden ser

contribuyentes importantes a la resistencia de la planta al congelamiento, como se evidenció en los fenotipos de vigor y sobrevivencia.

2. La MPK6 contribuye a la regulación de la actividad de la ATPasa de H⁺ durante la aclimatación al frío por medio de la modificación en la fluidez de la membrana plasmática

En el laboratorio también se tenían antecedentes de que la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática disminuía tras las condiciones de aclimatación al frío en las plantas tipo silvestre, lo que no sucedía de la misma manera en las mutantes de MAP cinasas [Peña-Moral, 2015; Ponce-Pineda, 2018], por lo que se procedió a verificar y profundizar en estos resultados.

Para explorar el mecanismo subyacente a esta disminución de la actividad de la ATPasa de H⁺, se purificaron vesículas de membrana plasmática de plantas de los genotipos wt, *mpk3* y *mpk6* en ambas condiciones y se midió la liberación de Pi por hidrólisis total de ATP. Esta también se midió en presencia de los inhibidores NaN₃, Na₂MoO₄ y KNO₃, los cuales inhiben específicamente a la ATPasa mitocondrial, la fosfatasa ácida y la ATPasa vacuolar, respectivamente. En la Fig. 19 se puede observar que la actividad de la ATPasa de H⁺ en la planta wt NA fue de aproximadamente 110 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹, la cual disminuyó a 60 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹ tras la aclimatación, en concordancia con la disminución del 40 % reportado anteriormente [Peña-Moral, 2015; Ponce-Pineda, 2018]. En el caso del genotipo *mpk3* NA, la actividad de la ATPasa se encontró significativamente más alta comparada con la de la planta tipo silvestre, de alrededor de 150 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹. Esta actividad igualmente sufrió una disminución tras la aclimatación, la cual fue más pronunciada con respecto a la encontrada en la planta silvestre, llegando a un valor promedio de 55 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹ (Fig. 19). Esta disminución se tradujo en un decremento del 60 % de actividad, lo cual también coincide con lo obtenido anteriormente en el laboratorio [Peña-Moral, 2015; Ponce-Pineda, 2018].

Al analizar la actividad de la ATPasa en la línea *mpk6* encontramos una actividad aproximada de 110 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹ en las condiciones NA, la cual fue igual a la encontrada en la planta wt. No obstante, la actividad se mantuvo consistentemente en los mismos niveles tras la aclimatación, con un valor promedio de 95 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹ (Fig. 19) (y que no coincidió con los valores de *mpk6* AC obtenidos anteriormente en el laboratorio [Peña-Moral, 2015]). Estos resultados sugirieron que el proceso de aclimatación en el que la señalización por MPK6 estaba involucrada, incluía una regulación negativa de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

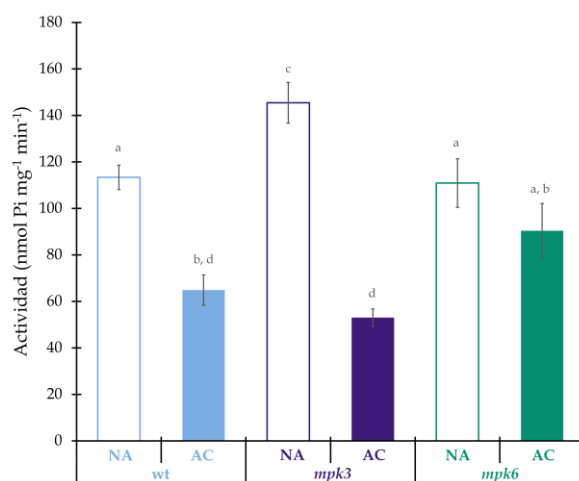


Figura 19. Efecto de la aclimatación al frío en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido) y posteriormente se obtuvieron vesículas de membrana plasmática (VMP). La hidrólisis de ATP se midió en las VMP a 10 mM de ATP-Mg en presencia de los inhibidores específicos (MI; NO₃⁻¹, N₃⁻¹ y MoO₄⁻²) de algunas posibles enzimas contaminantes. La actividad de la ATPasa de H⁺ se midió a 29 °C tras 20 min de reacción. Se presentan los valores promedio de seis réplicas técnicas provenientes de tres preparaciones membranales independientes ± EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Con el objetivo de entender la naturaleza de la disminución de la actividad enzimática presentada por la ATPasa de H⁺ tras la aclimatación y la ausencia de este efecto en la mutante carente de MPK6, se realizó un estudio cinético de la actividad de la ATPasa de H⁺ en vesículas de membrana plasmática obtenidas de las plantas de los tres genotipos bajo las condiciones NA y AC (Fig. 20).

Para las plantas wt NA se encontró que su actividad alcanzaba aproximadamente 120 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹ en las concentraciones más altas de sustrato evaluadas, la cual disminuyó tras ser aclimatada a valores cercanos a los 50 nmol Pi mg⁻¹ min⁻¹ (Fig. 20A). Estos datos concuerdan con las actividades obtenidas anteriormente (Fig. 19). En el caso de las mutantes carentes de MPK3 o MPK6 NA y AC, sus valores de actividad en las concentraciones más altas de sustrato evaluadas igualmente coincidieron con los valores de actividad encontrados previamente (Figs. 19; 20B,C).

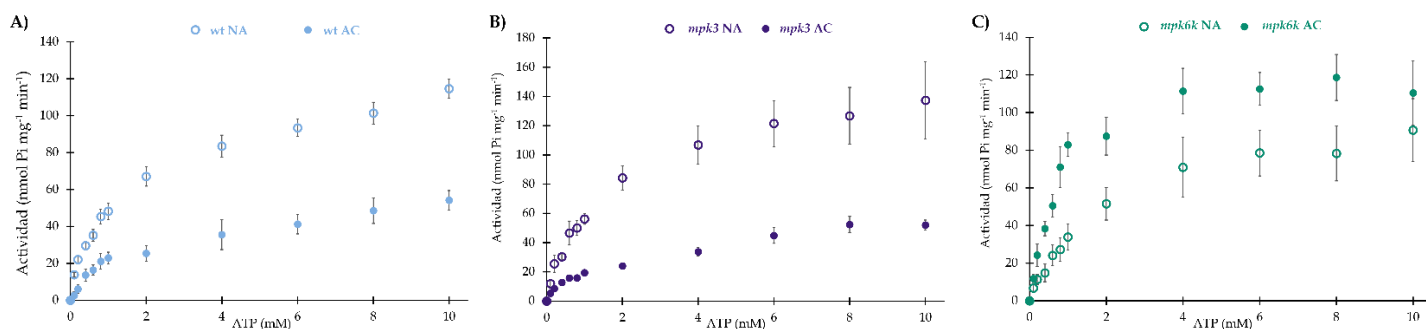


Figura 20. Efecto de la aclimatación al frío en el comportamiento cinético de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, círculos con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, círculos sin relleno sólido) y posteriormente se obtuvieron vesículas de membrana plasmática (VMP). La hidrólisis de ATP se midió en las VMP a doce diferentes concentraciones de ATP-Mg (entre 0.1 y 10 mM) en presencia de los inhibidores específicos (MI; NO₃⁻¹, N₃⁻¹ y MoO₄⁻²) de algunas posibles enzimas contaminantes. La actividad de la ATPasa de H⁺ se midió a 29 °C tras 20 min de reacción. Se presentan los valores promedio de cuatro réplicas técnicas provenientes de tres preparaciones membranales independientes ± EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0.

Las diferencias encontradas en las actividades enzimáticas de las vesículas membranales de las plantas de los tres genotipos NA y AC revelaban que la ATPasa de H⁺ podría ser diferente y un enfoque lógico para determinar posibles cambios era determinar su comportamiento cinético. Entonces, los datos experimentales obtenidos de la determinación de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato fueron sometidos a diferentes modelos cinéticos con el objetivo de analizar a cuál o cuáles de ellos se ajustaban. Lo anterior es muy valioso, ya que un buen ajuste sugiere características enzimáticas que ayudan a dilucidar un mecanismo específico detrás de la actividad enzimática. Los modelos a los que se ajustaron los datos experimentales fueron el de Michaelis-Menten, el de Hill, el de activación por sustrato (random), el de activación por sustrato (ordenada), el de inhibición por sustrato (incompetitiva) y el de isoenzimas, utilizando el programa SigmaPlot 12.0. Al comparar los valores de R², se encontró que los datos experimentales se ajustaban mejor a los modelos de Michaelis-Menten [Michaelis y Menten, 1913] y Hill [Hill, 1910]. Por lo tanto, con ellos se obtuvieron los valores de V_{max}, K_m y V_{max}/K_m del ajuste al modelo de Michaelis-Menten y los valores de V_{max}, K', V_{max}/K' y el número de Hill (n) del ajuste al modelo al modelo de Hill (Tabla 7).

Al analizar las constantes catalíticas del modelo michaeliano, se encontró que los valores de V_{max} fueron ligeramente más altos que los valores de actividad obtenidos en las curvas de actividad de todos los genotipos en condiciones NA y AC (Fig. 20). Este comportamiento es lógico, ya que el modelo de Michaelis-Menten calcula la V_{max} de la enzima a concentraciones saturantes

del sustrato, por lo que el valor tiende a aumentar muy ligeramente conforme se aumenta la concentración del sustrato hasta obtener un comportamiento asintótico. De la misma manera, los valores de $V_{\max}$ disminuyeron en los genotipos wt y *mpk3* tras la aclimatación como se observó en su actividad. Sin embargo, el valor de $V_{\max}$ en la mutante *mpk6* AC resultó ser 10 nmol Pi $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ más alto comparado con el valor de $V_{\max}$ obtenido en la *mpk6* NA. Estas diferencias de $V_{\max}$ encontradas entre los diferentes genotipos sugerían que existía una cantidad de enzima diferente en la membrana plasmática en tratamientos analizados.

Tabla 7. Efecto de la aclimatación al frío sobre las constantes catalíticas de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, círculos con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, círculos sin relleno sólido) y posteriormente se obtuvieron vesículas de membrana plasmática (VMP). La hidrólisis de ATP se midió en las VMP a doce diferentes concentraciones de ATP-Mg (entre 0.1 y 10 mM) en presencia de los inhibidores específicos (MI; NO_3^- , N_3^- y MoO_4^{2-}) de algunas posibles enzimas contaminantes. La actividad de la ATPasa de H^+ se midió a 29 °C tras 20 min de reacción. Se muestran las constantes cinéticas calculadas a partir de los valores de las gráficas de la Fig. 20, ajustándose al modelo cinético de Michaelis-Menten y al modelo cinético de Hill con el programa SigmaPlot 12.0. Se presentan los valores promedio de cuatro réplicas técnicas provenientes de tres preparaciones membranales independientes $\pm$ DE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021.

Parámetro cinético		wt		<i>mpk3</i>		<i>mpk6</i>	
		NA	AC	NA	AC	NA	AC
Michaelis Menten	$V_{\max}$ (nmol Pi $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	125.3 $\pm$ 2.8	59.43 $\pm$ 4.62	163.21 $\pm$ 11.81	61.79 $\pm$ 3.32	111.42 $\pm$ 10.76	122.79 $\pm$ 5.84
	K_m (mM)	1.55 $\pm$ 0.12	1.89 $\pm$ 0.47	1.81 $\pm$ 0.43	2.32 $\pm$ 0.38	2.36 $\pm$ 0.69	0.7 $\pm$ 0.13
	$V_{\max}/K_m$ (s^{-1})	1345.72 $\pm$ 400.2	524.64 $\pm$ 162.47	1502.13 $\pm$ 460.47	443.73 $\pm$ 145.67	785.54 $\pm$ 259.31	2934.81 $\pm$ 725.99
Hill	$V_{\max}$ (nmol Pi $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	217.78 $\pm$ 47.88	130.81 $\pm$ 151.8	226.15 $\pm$ 101.49	106.59 $\pm$ 50.97	126.48 $\pm$ 44.51	115.58 $\pm$ 6.43
	K' (mM)	9.05 $\pm$ 6.78	21.57 $\pm$ 79.99	4.79 $\pm$ 6.8	11.41 $\pm$ 16.68	3.34 $\pm$ 3.31	0.62 $\pm$ 0.1
	$V_{\max}/K'$ (s^{-1})	401.24 $\pm$ 117.79	101.09 $\pm$ 31.63	786.1 $\pm$ 248.85	155.7 $\pm$ 50.94	631.01 $\pm$ 224.11	3128.82 $\pm$ 1081.92
	n	0.58 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.22	0.69 $\pm$ 0.23	0.63 $\pm$ 0.14	0.86 $\pm$ 0.3	1.33 $\pm$ 0.3

Al analizar los valores de K_m se encontró un valor de 1.55 $\pm$ 0.12 mM para la planta wt NA, el cual no varió tras la aclimatación. En el caso de la mutante *mpk3* NA, se encontró un valor de K_m de 1.81 $\pm$ 0.43 mM, el cual resultó ser prácticamente igual al encontrado en la planta wt NA. No obstante, esta K_m tampoco varió tras la aclimatación. Por otro lado, en el caso de la mutante *mpk6* se encontró un valor de K_m de 2.36 $\pm$ 0.69 mM en condiciones NA, valor que disminuyó hasta 0.7 $\pm$ 0.13 mM tras la aclimatación. Esta disminución en la K_m implica un aumento significativo de la afinidad de esta ATPasa de H^+ por el ATP-Mg. Al comparar los valores de K' obtenidos con el modelo de Hill, los cuales son análogos a los valores de K_m obtenidos con el modelo michaeliano, se encontraron valores con grandes dispersiones que se tradujeron en altas desviaciones estándar en la mayoría de los genotipos y condiciones. Sin embargo, el valor de K' de la *mpk6* AC mostró

bajas desviaciones estándar, además de corresponder con el valor de K_m obtenido para *mpk6* AC (Tabla 7). Esto sugeriría que en la *mpk6* AC sí se ajustaba correctamente al modelo de Hill. Aun así, al analizar la n de Hill en la *mpk6* AC, se encontró un valor de 1.33 ± 0.3 , el cual al ser ligeramente mayor a 1 sugiere tanto una cooperatividad positiva como un comportamiento michaeliano. La diferencia encontrada en la K_m de la *mpk6* AC comparada con los demás genotipos sugeriría un contenido diferencial de las isoformas de la ATPasa de H^+ en la membrana plasmática de la mutante *mpk6* AC.

Con el objetivo de explorar la posibilidad de la presencia selectiva de alguna(s) isoforma(s) de la ATPasa de H^+ en la mutante *mpk6* AC, se realizó un análisis de las potenciales isoformas de la ATPasa de H^+ que pudieran estar presentes en los genotipos analizados. Para esto, se analizaron los niveles de los transcritos de las 3 isoformas de la ATPasa de H^+ mayormente expresadas en hojas [Alsterfjord et al, 2004; Muzi et al, 2016]. En la Fig. 21 se muestran los niveles de expresión de los genes que codifican para las isoformas AHA1, AHA2 y AHA3 de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en los genotipos wt, *mpk3* y *mpk6* NA y AC.

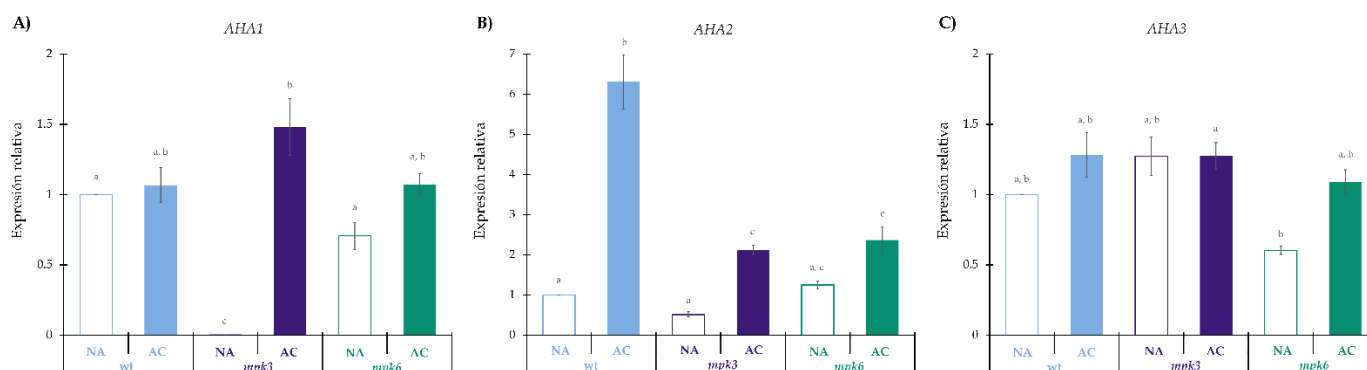


Figura 21. Efecto de la aclimatación al frío en los niveles de expresión 3 genes que codifican para las isoformas de la ATPasa de H^+ mayormente expresadas en hoja en las plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido) y posteriormente se extrajo el RNA total de las hojas. La expresión relativa de cada gen fue estimada por medio de RT-qPCR, usando como base de cálculo los niveles de expresión de las plantas wt NA fijados en 1.0. Los genes de β -tubulina, ubiquitina 4 y la subunidad A3 de la proteína fosfatasa 2A fueron utilizados como genes de referencia. Se muestra la expresión relativa de AHA1(A), AHA2(B) y AHA3(C). Se presentan los valores promedio de ocho réplicas técnicas provenientes de cuatro réplicas biológicas independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Los niveles de transcritos del gen *AHA1* no cambiaron tras la aclimatación en las plantas wt y *mpk6*, sin embargo, estos transcritos aumentaron 1.5 veces en el genotipo *mpk3* AC con respecto a

su control NA (Fig. 21A). En el caso del gen *AHA2*, la aclimatación aumentó 6 veces los niveles de transcrito comparados con la condición no aclimatada de la planta wt. El mismo comportamiento se encontró en las plantas incapaces de expresar a la MPK3. Sin embargo, no se encontró ningún cambio significativo al comparar los niveles de transcritos en los genotipos *mpk6* NA y AC (Fig. 21B). Para el gen *AHA3* no se encontró ninguna diferencia significativa al compararlo entre los genotipos ya fuera con o sin tratamiento de aclimatación (Fig. 21C).

Ya que los niveles de transcritos de las tres isoformas de la ATPasa de H⁺ mayormente expresadas en hojas no arrojaron datos contundentes que pudieran explicar los diferentes niveles de actividad de ATPasa obtenidos, se exploró la posibilidad de que existieran cantidades diferentes de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática entre los diferentes genotipos. Para esto, se realizó una inmunodetección de los niveles endógenos de esta enzima presentes en las vesículas de membrana plasmática utilizando un anticuerpo policlonal específico capaz de detectar las isoformas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 11 de esta ATPasa.

Primero, se realizó la separación de las proteínas de las vesículas de membrana plasmática extraídas de los genotipos utilizados tanto en condiciones aclimatadas como no aclimatadas en geles de SDS-PAGE, los cuales posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie. Una vez teñidos, se comparó la intensidad del patrón de bandas obtenidas de cada muestra cargada y, de ser necesario, se ajustó la concentración de proteínas para asegurar un cargado uniforme en todos los carriles (Fig. 22A).

Con la cantidad de proteína total cargada ya igualada en todos los carriles, esta se replicó y se transfirió a una membrana de PVDF, en la cual se realizó la inmunodetección de la ATPasa de H⁺ con un anticuerpo homólogo. En la Figura 22B se muestran seis réplicas de cuatro preparaciones membranales independientes, las cuales se trataron con el anticuerpo contra la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. En el extremo derecho de las membranas se señala la banda reactiva con masa molecular de aproximadamente 100 kDa, la cual corresponde a la masa reportada para todas las isoformas de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Al visualizar la intensidad de las bandas inmunodetectadas, se encontró que no existía un cambio entre las muestras AC y NA. Una estimación objetiva de los niveles de ATPasa en las vesículas de membrana plasmática se realizó mediante una densitometría de la intensidad de las

bandas (Fig. 22C) y posteriormente se hizo una normalización con el valor promedio de la banda wt NA (Fig. 22D).

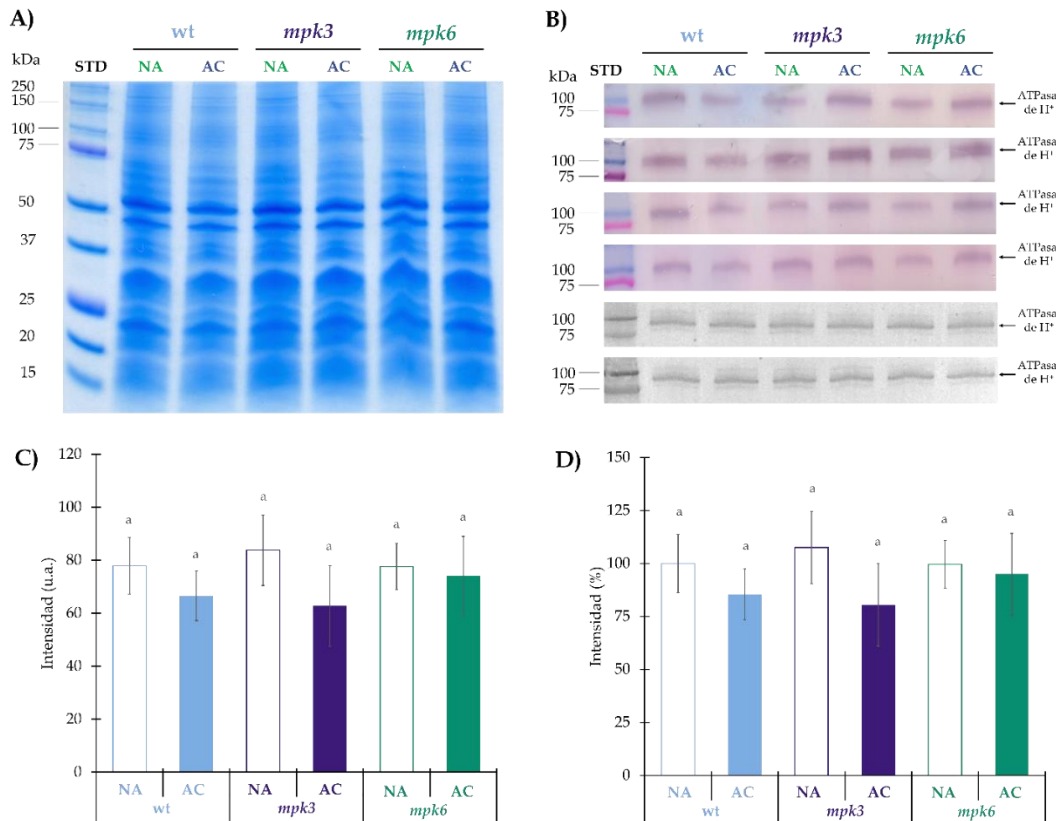


Figura 22. Efecto de la aclimatación al frío en la cantidad de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en plantas wt, mpk3 y mpk6. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), mpk3 (morado) y mpk6 (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido) y posteriormente se obtuvieron vesículas de membrana plasmática (VMP). **A)** La separación electroforética de las proteínas de VMP se realizó aplicando 15 mg de proteína a cada uno de los carriles y posteriormente tiñendo el gel con azul de Coomassie. Los carriles corresponden al estándar de peso molecular (STD) y a una preparación independiente de VMP de todos los genotipos y tratamientos analizados. A la izquierda se indican las masas moleculares aproximadas de las bandas del STD. **B)** La inmunodetección se realizó replicando el gel de (A) y transfiriéndolo a una membrana de PVDF la cual se expuso a un anticuerpo anti-ATPasa de H⁺. A la izquierda se indican las masas moleculares aproximadas de las bandas del STD y en el lado derecho se señala la banda reactiva correspondiente a la ATPasa de H⁺. **C)** Densitometría de la intensidad de las bandas indicadas en el inciso B. **D)** Densitometría de las bandas ilustradas en el inciso C, normalizada con respecto al valor promedio de intensidad de la banda wt NA. En todos los casos, la densidad de las bandas fue estimada virando todas las membranas a gris con el mismo valor de filtro. Se presentan los valores promedio de seis réplicas técnicas provenientes de cuatro preparaciones membranales independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Al analizar las densitometrías normalizadas no se encontró diferencia alguna en los niveles de ATPasa de las plantas de los tres diferentes genotipos, NA o AC, por lo que la diferencia de

actividades de ATPasa encontrada tras la aclimatación en los 3 genotipos no se pudo explicar por diferencias en la cantidad de la enzima detectada. Por lo tanto, se decidió analizar si existía una regulación postraduccional en la enzima.

Uno de los principales mecanismos de regulación de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática es a través de su interacción con proteínas 14-3-3 [Falhof et al, 2016]. Por lo tanto, quisimos analizar si la cantidad de la proteína 14-3-3 se encontraba modificada tras la aclimatación al frío y así posteriormente poder analizar una posible asociación a la regulación de la ATPasa en los 3 genotipos analizados. Ya que también se realizaría la inmunodetección de la proteína 14-3-3 en VMP, se utilizaron los mismos geles con la cantidad de proteína homogenizada (Fig. 23A).

De la misma manera que en el caso anterior, réplicas de geles cargados homogéneamente se transfirieron a membranas de PVDF para estimar los niveles de la proteína 14-3-3. Se utilizó un anticuerpo policlonal específico, pero capaz de detectar a las 12 isoformas de la proteína 14-3-3, encontrándose claramente 2 bandas reactivas que correspondieron a los pesos moleculares de 30 kDa y 36 kDa (Fig. 23B). Estas masas podrían corresponder a más de una de las isoformas de la proteína 14-3-3, por lo que se analizaron ambas bandas.

Se realizó un análisis densitométrico de las bandas inmunodetectadas de 30 kDa y 36 kDa, no obstante, no se encontró ningún cambio en la intensidad de las bandas entre los diferentes genotipos y tratamientos (Fig. 23C,E). Para realizar una estimación más precisa, también se realizó la normalización de las intensidades de las bandas de 30 kDa y 36 kDa con respecto al valor promedio de la banda wt NA de 30 kDa y 36 kDa, respectivamente. Sin embargo, no se encontró diferencia alguna en la cantidad de proteína 14-3-3 tanto para la banda de 36 kDa (Fig. 23D) como para la banda de 30 kDa (Fig. 23F).

Ya que los niveles de las proteínas 14-3-3 inmunodetectadas no variaron, sería necesario analizar los niveles de asociación de esta proteína con la ATPasa de H^+ para poder explicar las diferencias observadas en la actividad enzimática de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática encontrada en los 3 genotipos tras la aclimatación. Sin embargo, al no contar con las herramientas disponibles, se decidió analizar si existía otro mecanismo de regulación de esta enzima. Se ha descrito que otra forma de regulación de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática es a través de su ambiente membranal [Morales-Cedillo et al, 2015], por lo que se

decidió abordar esta posibilidad determinando la fluidez en las vesículas de membrana plasmática obtenidas de los tres genotipos tanto en condiciones control como de aclimatación al frío.

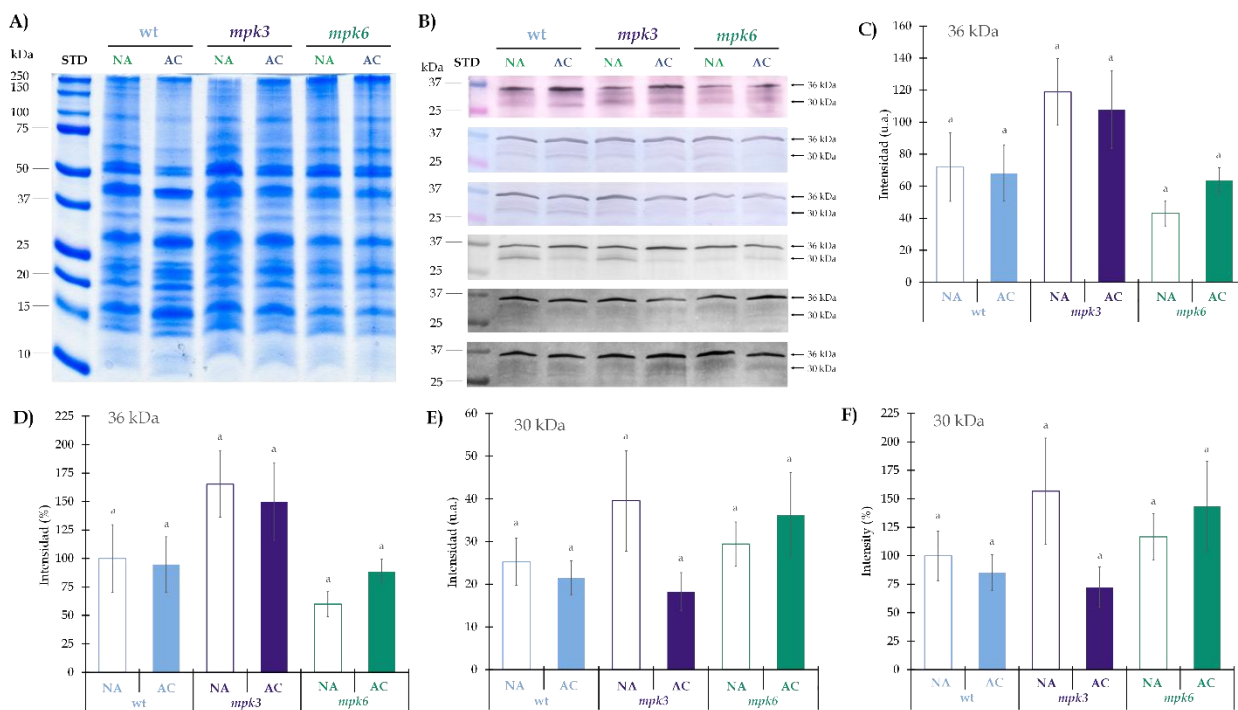


Figura 23. Efecto de la aclimatación al frío en la cantidad de la proteína 14-3-3 en plantas wt, mpk3 y mpk6. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), mpk3 (morado) y mpk6 (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido) y posteriormente se obtuvieron vesículas de membrana plasmática (VMP). **A)** La separación electroforética de las proteínas de VMP se realizó aplicando 20 mg de proteína a cada uno de los carriles y posteriormente tiñendo el gel con azul de Coomassie. Los carriles corresponden al estándar de peso molecular (STD) y a una preparación independiente de VMP de todos los genotipos y tratamientos analizados. A la izquierda se indican las masas moleculares aproximadas de las bandas del STD. **B)** La inmunodetección se realizó transfiriendo el gel de (A) a una membrana de PVDF. Posteriormente se aplicó un anticuerpo anti-14-3-3. A la izquierda se indican las masas moleculares aproximadas de las bandas del STD y en el lado derecho se señalan las bandas reactivas correspondientes a las proteínas 14-3-3. **C)** Densitometría de la banda de 36 kDa indicada en el inciso B. **D)** Densitometría del inciso C normalizada con el valor promedio de la intensidad de las bandas wt NA de 36 kDa. **E)** Densitometría de la banda de 30 kDa indicadas en el inciso B. **F)** Densitometría del inciso C normalizada con el valor promedio de las bandas wt NA de 30 kDa. En todos los casos, la densidad de las bandas fue estimada virando todas las membranas a gris con el mismo valor de filtro. Se presentan los valores promedio de seis réplicas técnicas provenientes de cuatro preparaciones membranales independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

La fluidez membranal se midió a las temperaturas de 5, 9, 15, 21 y 29 °C con ayuda de la sonda molecular fluorescente TMA-DPH (1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-p-toluenosulfonato), midiendo la polarización de su fluorescencia, donde un menor valor de polarización indica una mayor fluidez membranal. En la Fig. 24 se muestra la polarización de la fluorescencia de los genotipos *wt*, *mpk3* y *mpk6* con y sin tratamiento de aclimatación [Cano-Ramírez et al, 2021].

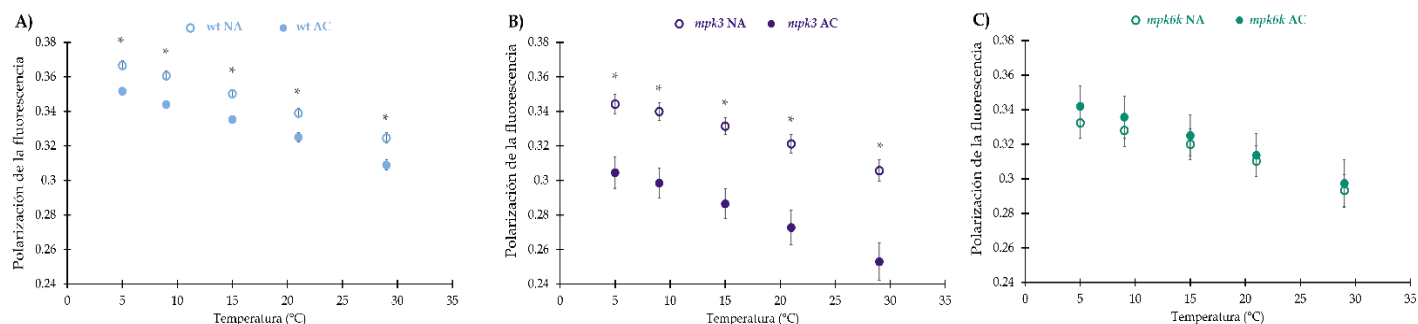


Figura 24. Efecto de la aclimatación al frío en la fluidez de la membrana plasmática de plantas *wt*, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos *wt* (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, círculos con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, círculos sin relleno sólido) y posteriormente se obtuvieron vesículas de membrana plasmática (VMP). La fluidez de la membrana se midió mediante polarización de fluorescencia (PF) de la sonda fluorescente 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-p-toluenosulfonato (TMA-DPH) en longitudes de onda de excitación y emisión de 340 nm/417 nm, respectivamente. Se añadieron 300 µg de proteína de VMP y se registró la polarización de fluorescencia en estado estacionario a los 5, 9, 15, 21 y 29 °C. Se presentan los valores promedio de 20 a 30 registros provenientes de dos preparaciones membranales independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con ayuda del programa MetaboAnalyst 5.0. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa entre los valores obtenidos a la misma temperatura ($\alpha = 0.05$).

Como se observa en la Fig. 24, se encontró que en las plantas *wt* AC hubo un incremento en la fluidez de la membrana plasmática tras una semana de aclimatación. En el caso de las mutantes carentes de MPK3 se encontró el mismo efecto; sin embargo, el aumento en la fluidez fue mayor. Por el contrario, la línea *mpk6* fue incapaz de hacer más fluida su membrana aún después de la semana de aclimatación (Fig. 24).

Con el propósito de poder comparar la fluidez membranal con la actividad de la ATPasa de H^+ , se seleccionó, en los diferentes genotipos, el valor de polarización de la fluorescencia a 29 °C, temperatura a la cual se mide la actividad de la ATPasa. Se encontró que la polarización de la fluorescencia disminuyó tras la aclimatación en la planta *wt*, patrón que se encontró con mayor intensidad en la mutante *mpk3*. Sin embargo, la polarización de la fluorescencia no se modificó en

la mutante *mpk6* tras la aclimatación, lo cual indica una ausencia de fluidificación de la membrana en esta mutante (Fig. 25).

Para ver si existía una relación entre la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática y los valores de polarización de la fluorescencia, se graficaron ambos parámetros (Fig. 25B). Se encontró una relación inversamente proporcional entre los valores de actividad de la enzima y la fluidez membranal, lo cual indica que mayor fluidez membranal regula negativamente la actividad de la ATPasa de H^+ .

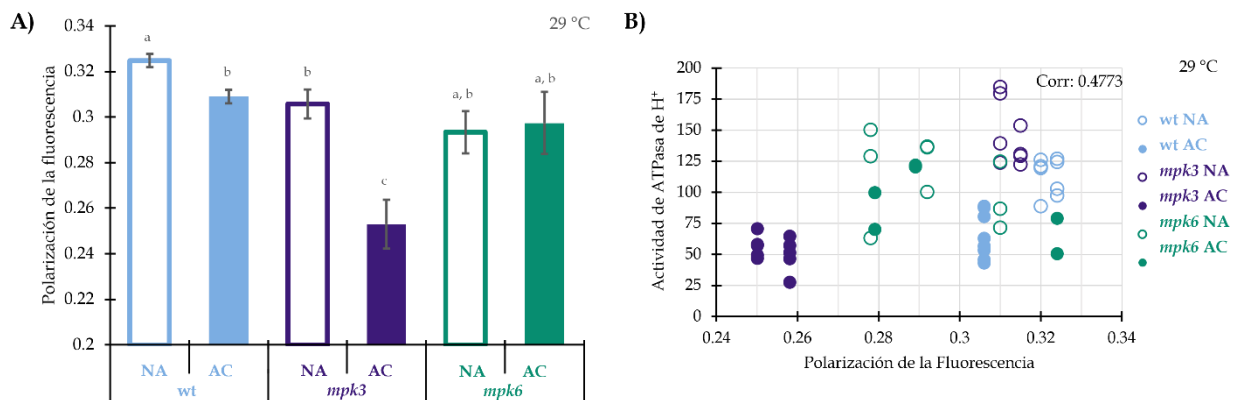


Figura 25. Efecto de la aclimatación al frío en la fluidez de la membrana plasmática a 29 °C en plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido) y posteriormente se obtuvieron vesículas de membrana plasmática (VMP). La fluidez de la membrana se midió mediante polarización de fluorescencia (PF) de la sonda fluorescente 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-p-tolueno-sulfonato (TMA-DPH) en longitudes de onda de excitación y emisión de 340 nm/417 nm, respectivamente. Se añadieron 300 μ g de proteína de VMP y se registró la polarización de fluorescencia en estado estacionario a 29 °C. **A)** Se presentan los valores promedio de 20 a 30 registros provenientes de dos preparaciones membranales independientes $\pm$ EE. **B)** El gráfico de correlación se calculó con los valores del panel (A) y la Fig. 19 utilizando el modelo de Pearson. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Los resultados de esta sección se resumen diciendo que se encontró que la MPK3 ejerce una regulación negativa de la actividad ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en condiciones NA y la MPK6 en condiciones AC. La afinidad de la ATPasa de H^+ por su sustrato parece ser en parte responsable del comportamiento de la actividad observado. Las plantas wt y *mpk3* AC presentaron las actividades de ATPasa de H^+ más bajas y la menor afinidad por su sustrato ($K_mATP = 1.89 \pm 0.47$ mM y 2.32 ± 0.38 mM, respectivamente) y, en consecuencia, una eficiencia

catalítica reducida. En concordancia, la actividad incrementada de la ATPasa de H^+ encontrada en la mutante *mpk6* AC presentó una mayor afinidad por su sustrato ($K_mATP = 0.7 \pm 0.13$ mM) y una mayor eficiencia catalítica. Esta misma mutante carente de MPK6 no pudo incrementar la fluidez de su membrana plasmática. Este podría ser el mecanismo por el cual la ATPasa de H^+ es regulada durante la aclimatación al frío, lo cual podría ser coordinado por la señalización llevada a cabo por la enzima MPK6.

3. La MPK6 es un regulador potencial del metabolismo de esfingolípidos durante la aclimatación al frío

Ya que la función principal de las cascadas de señalización dada por las MAP cinasas es regular la transcripción de diversos genes y dado que la fluidez membranal puede ser modificada por la composición de esfingolípidos, se exploró la posibilidad de que los efectos encontrados en las plantas mutantes carentes de MPK3 o MPK6 estuvieran relacionados con la transcripción de genes involucrados en la síntesis de esfingolípidos. Así, se procedió a la determinación de los niveles de transcripción de 14 genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de esfingolípidos y 4 genes que codifican para enzimas involucradas en su degradación. Esto se llevó a cabo en los tres genotipos estudiados, tanto en condiciones de NA como de AC usando la técnica de RT-qPCR y la expresión de tres genes de referencia.

En el caso de los genes involucrados en la síntesis de esfingolípidos, se analizaron los genes que codifican para las subunidades de la serina palmitoiltransferasa (*LCB1*, *LCB2a* y *LCB2b*), las tres isoformas de la ceramida sintasa (*LOH1*, *LOH2*, y *LOH3*), las dos isoformas de la hidroxilasa de la base de cadena larga (*SBH1* y *SBH2*), las dos isoformas de la desaturasa de la base de cadena larga (*SLD1* y *SLD2*), las dos isoformas de la hidroxilasa del ácido graso de los esfingolípidos (*FAH1* y *FAH2*), la glucosilceramida sintasa (*GCS*) y una de las isoformas de la inositolfosforilceramida sintasa (*IPCS2*). En la Figura 26 se muestra el análisis cuantitativo de la expresión relativa de los genes mencionados en los genotipos wt, *mpk3* y *mpk6* NA y AC.

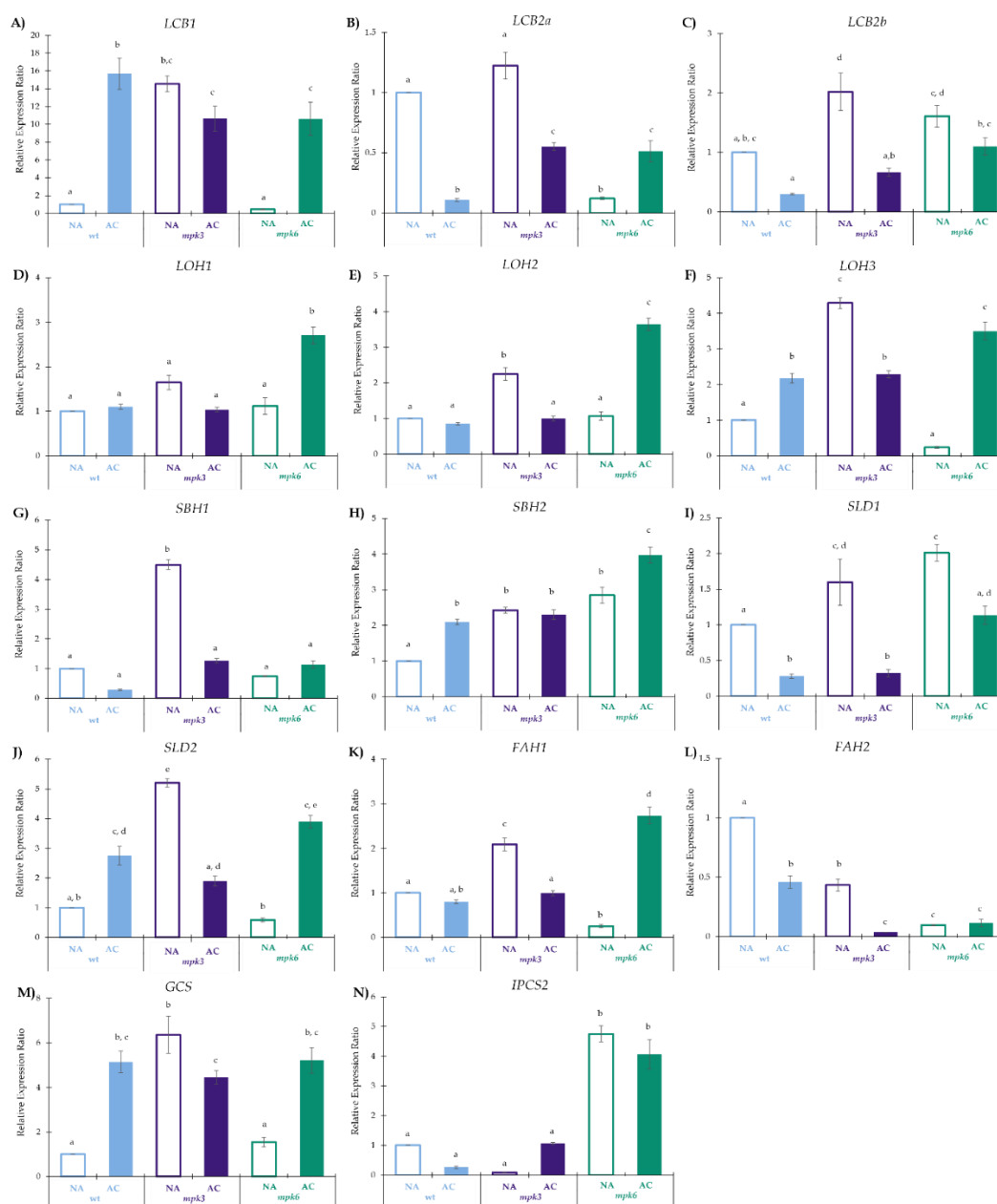


Figura 26. Efecto de la aclimatación al frío en los niveles de expresión de 14 genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de esfingolípidos en plantas *wt*, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos *wt* (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido). Se congelaron y posteriormente se extrajo el RNA total de las hojas. La expresión relativa de cada gen fue estimada por medio de RT-qPCR, usando como base de cálculo los niveles de expresión de las plantas *wt* NA fijados en 1.0. Los genes de β -tubulina, ubiquitina 4 y la subunidad A3 de la proteína fosfatasa 2A fueron utilizados como genes de referencia. Se muestra la expresión relativa de *LCB1*(A), *LCB2a*(B), *LCB2b*(C), *LOH1*(D), *LOH2*(E), *LOH3*(F), *SBH1*(G), *SBH2*(H), *SLD1*(I), *SLD2*(J), *FAH1*(K), *FAH2*(L), *GCS*(M) y *IPCS2*(N). Se presentan los valores promedio de ocho réplicas técnicas provenientes de cuatro réplicas biológicas independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Los niveles de transcritos del gen *LCB1* aumentaron 16 veces tras la aclimatación en las plantas wt. El mismo comportamiento se encontró en las plantas *mpk6*, aunque con un aumento de solo 10 veces. Sin embargo, la expresión de estos transcritos no presentó ningún cambio en el genotipo *mpk3* tras la aclimatación (Fig. 26A). En el caso del gen *LCB2a*, la aclimatación disminuyó cuatro quintas partes el nivel de los transcritos de la planta wt NA. Lo mismo ocurrió en las plantas *mpk3* tras ser aclimatadas, sin embargo, en el genotipo incapaz de expresar a la MPK6 se encontró que la aclimatación generó un aumento de poco más del doble de los niveles de transcritos comparados con su control NA (Fig. 26B). En cuanto al gen *LCB2b*, únicamente se encontró una disminución de un 60 % en los niveles de transcritos de la planta *mpk3* tras la aclimatación (Fig. 26C).

Al analizar los isogenes de las tres ceramidas sintasas existentes en *Arabidopsis*, se encontró que la aclimatación únicamente indujo un cambio en los niveles de *LOH1* en la mutante *mpk6* AC, aumentando poco más del doble (Fig. 26D). En el caso de *LOH2*, no se encontró cambio alguno en las plantas wt tras la aclimatación; sin embargo, se encontraron efectos inversos en las mutantes *mpk3* y *mpk6*: mientras que la aclimatación disminuyó a la mitad los niveles de transcritos de *LOH2* en la mutante *mpk3*, en la *mpk6* la aclimatación provocó un aumento de casi 4 veces en los niveles de transcrito (Fig. 26E). Para el gen *LOH3* se encontró que la aclimatación aumentó al doble los transcritos en la planta wt mientras que en la planta *mpk6* se encontró un aumento mayor, de hasta 6 veces, respecto a su control NA. No obstante, en la planta *mpk3* la aclimatación produjo una disminución de la mitad de los transcritos de su control NA (Fig. 26F).

El análisis de los genes que codifican para las dos hidroxilasas de la base de cadena larga mostró que los transcritos de *SBH1* únicamente cambiaron en la mutante carente de MPK3, en donde la aclimatación provocó una disminución de dos terceras partes de los niveles encontrados en su control NA (Fig. 26G). Por el contrario, los transcritos de *SBH2* no se modificaron en la mutante *mpk3* tras la aclimatación, mientras que estas condiciones provocaron un aumento de aproximadamente el doble en los genotipos wt y *mpk6* (Fig. 26H).

En el caso de las desaturasas de base de cadena larga, los transcritos de *SLD1* disminuyeron aproximadamente un 50 % en los tres genotipos tras la aclimatación (Fig. 26I), en tanto que los niveles de transcrito de *SLD2* aumentaron aproximadamente 3 veces tras la aclimatación en los genotipos wt y *mpk6* y disminuyeron a la mitad en la *mpk3* (Fig. 26J).

En cuanto a los transcritos de las hidroxilasas del ácido graso de los esfingolípidos, la *FAH1* tuvo el mismo comportamiento que los transcritos de *LOH2*, ya que la aclimatación disminuyó sus transcritos a la mitad en la mutante *mpk3* mientras que los aumentó 6 veces en la mutante *mpk6* (Fig. 26K). Para los transcritos de *FAH2*, únicamente se encontró una disminución de aproximadamente 50 % en los transcritos de los genotipos wt y *mpk3* tras la aclimatación (Fig. 26L).

Los transcritos que codifican para la glucosilceramida sintasa aumentaron cinco veces tras la aclimatación en las plantas wt y *mpk6*, mientras que disminuyeron ligeramente en la mutante *mpk3* (Fig. 26M). En el caso de los transcritos de *IPCS2*, no se encontraron cambios en ningún genotipo tras la aclimatación al compararlo con su control NA; sin embargo, la expresión relativa en la mutante *mpk6* fue 5 veces mayor que los de los genotipos wt y *mpk3* (Fig. 26N).

Con respecto a la degradación de esfingolípidos, en la literatura no se han descrito todas las reacciones involucradas. Los genes que se analizaron fueron los genes que codifican para la glucosilceramidasa 3 (*GCD3*), la ceramidasa ácida (*ACER*) y las dos isoformas de las ceramidases neutras (*NCER2* y *NCER3*). En la Fig. 27 se muestra la expresión relativa de estos genes en los genotipos wt, *mpk3* y *mpk6* NA y AC.

Al comparar los niveles de transcripción del gen *GCD3*, se encontró que la aclimatación disminuyó un 90 % sus niveles en la mutante *mpk3*, efecto que se replicó, pero con menor intensidad, en el genotipo *mpk6*, disminuyendo únicamente un 50 % (Fig. 27A). En el caso de los transcritos que codifican para las ceramidases, se encontró que la aclimatación disminuyó a la mitad los transcritos de *ACER* en el genotipo *mpk3* comparado con su control NA, mientras que en las plantas incapaces de expresar MPK6 la aclimatación aumentó ligeramente la transcripción de *ACER* (Fig. 27B).

Para las ceramidases neutras, se encontró que los transcritos de *NCER2* aumentaron tres veces tras la aclimatación en los genotipos wt y *mpk6*, sin embargo, la aclimatación condujo a una disminución de estos transcritos hasta una cuarta parte de su control NA en la mutante *mpk3* (Fig. 27C). En el caso de *NCER3* se encontró que la aclimatación únicamente disminuyó a la mitad sus transcritos en la *mpk3* (Fig. 27D).

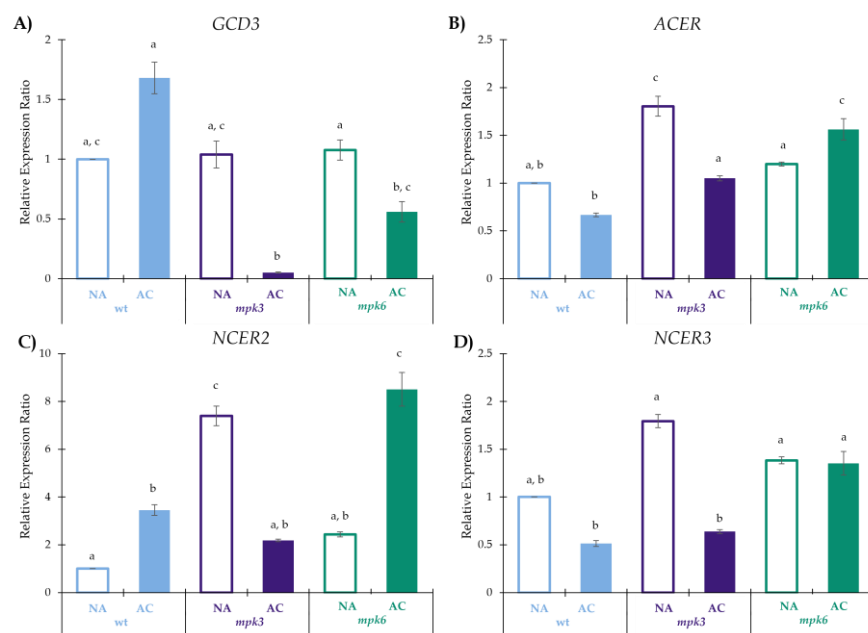


Figura 27. Efecto de la aclimatación al frío en los niveles de expresión de 4 genes que codifican para enzimas involucradas en la degradación de esfingolípidos en plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. Plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) se expusieron a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido). Se congelaron y posteriormente se extrajo el RNA total de las hojas. La expresión relativa de cada gen fue estimada por medio de RT-qPCR, usando como base de cálculo los niveles de expresión de las plantas wt NA fijados en 1.0. Los genes de β -tubulina, ubiquitina 4 y la subunidad A3 de la proteína fosfatasa 2A fueron utilizados como genes de referencia. Se muestra la expresión relativa de *GCD3*(A), *ACER*(B), *NCER2*(C) y *NCER3*(D). Se presentan los valores promedio de ocho réplicas técnicas provenientes de cuatro réplicas biológicas independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Hubiera resultado idóneo encontrar una asociación clara entre la variación de los niveles de transcritos analizados para las plantas *mpk3* o *mpk6* con los valores de especies de esfingolípidos producidos por las reacciones de biosíntesis o degradación. Esto no sucedió así, lo cual resulta muy lógico considerando la complejidad de los procesos biológicos involucrados. Por tanto, se acudió al análisis informático de estos conjuntos de resultados. Primeramente, los datos de la expresión relativa de estos 18 genes se sometieron a un análisis de componentes principales (PCA) con el fin de obtener más información sobre la similitud entre las réplicas experimentales para cada uno de los diferentes genotipos y de los tratamientos en función de sus niveles de expresión. El PCA es una herramienta descriptiva del análisis multivariado que permite reducir la dimensión de los datos tratando de conservar la mayoría de la información. Ya que los niveles de transcritos se encuentran relacionados entre el mismo genotipo y el mismo tratamiento, se buscó transformar

estos datos en un número menor de nuevas variables que preservara la información más importante del universo de datos, variables que se conocen como componentes principales. Estos componentes son una combinación lineal de las variables originales, siendo que el primer componente será ortogonal al segundo componente, y así consecutivamente, generando así variables independientes entre sí.

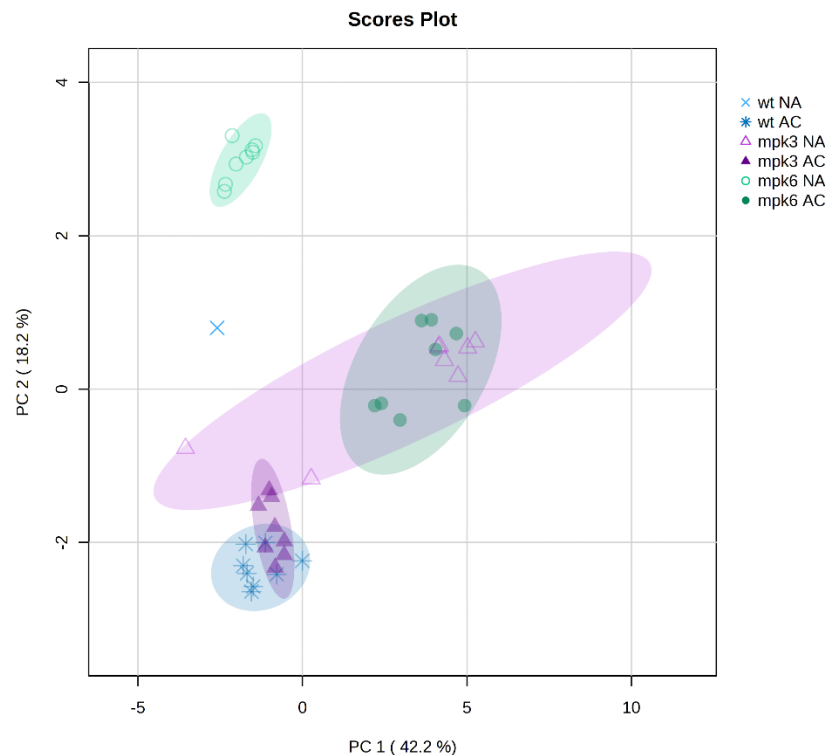


Figura 28. Análisis multivariado de componentes principales de los niveles de expresión de los genes involucrados en la biosíntesis y degradación de esfingolípidos en plantas *wt*, *mpk3* y *mpk6*. El PCA se realizó con los datos normalizados de las Fig. 26-27. Se presenta la agrupación de los valores de 8 réplicas técnicas provenientes de 4 réplicas biológicas para cada genotipo y tratamiento [wt NA (×, azul claro, los valores se encuentran superpuestos), wt AC (*, azul oscuro), *mpk3* NA (Δ, morado claro), *mpk3* AC (▲, morado oscuro), *mpk6* NA (○, verde claro) y *mpk6* AC (●, verde oscuro)]. PC 1, primer componente; PC 2, segundo componente. El PCA se construyó con el programa MetaboAnalyst 5.0.

El PCA obtenido (Fig. 28) muestra los dos primeros componentes principales, los cuales acumularon el 60.4 % de la varianza total de los datos. El primer componente (PC 1) explica el 42.2 % de la varianza observada en los datos mientras que el segundo (PC 2) explica el 18.2 %. Con base en lo anterior, la distribución de los niveles de expresión de los 18 genes con respecto a cada genotipo y a cada tratamiento reveló 6 diferentes agrupaciones. Cada agrupación reunió los valores de expresión de transcritos correspondientes a las diferentes réplicas técnicas de cada genotipo con su tratamiento control o aclimatado. De esta manera, se puede observar que, por

ejemplo, los valores de expresión de genes más diferentes a todos los demás son los de los transcritos de las réplicas wt NA, mientras que los de wt AC y *mpk3* AC son muy cercanos entre sí y diferentes a los de *mpk3* NA y *mpk6* AC, mismos que son similares entre sí. Esto revela, por un lado, que las réplicas experimentales son muy reproducibles según el genotipo y el tratamiento y lo más importante, que los genotipos y su exposición a la aclimatación producen diferencias claras y definidas en la expresión de los genes analizados.

Puesto que se encontraron agrupaciones específicas asociadas a cada una de las condiciones analizadas, para corroborar este resultado se procedió a realizar un análisis jerárquico de agrupaciones conocido como dendrograma. En este análisis, cada réplica comienza como una agrupación separada, ya que implícitamente integra la información de los 18 genes, y el algoritmo procede a comparar la información entre todas las demás réplicas. Esto, con el fin de ir formando conglomerados basados en sus similitudes, lo cual se representa de manera gráfica en forma de diagrama de árbol. En el eje horizontal se muestran las distancias de las relaciones de agrupación que existen entre las diferentes réplicas, las cuales son mostradas en el eje vertical. En la Fig. 29 se muestra el dendrograma de todas las réplicas técnicas de los niveles de expresión de los 18 genes por genotipo con o sin aclimatación. Se encontró que las réplicas se dividen en dos grandes grupos. En el primero se encuentran todas las muestras de *mpk6* AC con 6 de las 8 réplicas técnicas de la *mpk3* NA, mientras que el segundo se subdivide a su vez en dos grupos. En la primera subdivisión se encuentran todas las muestras de wt y *mpk6* NA, mientras que en la segunda subdivisión se encuentran las réplicas de wt y *mpk3* AC junto con las 2 réplicas técnicas restantes de la *mpk3* NA, las cuales provienen de la misma muestra biológica.

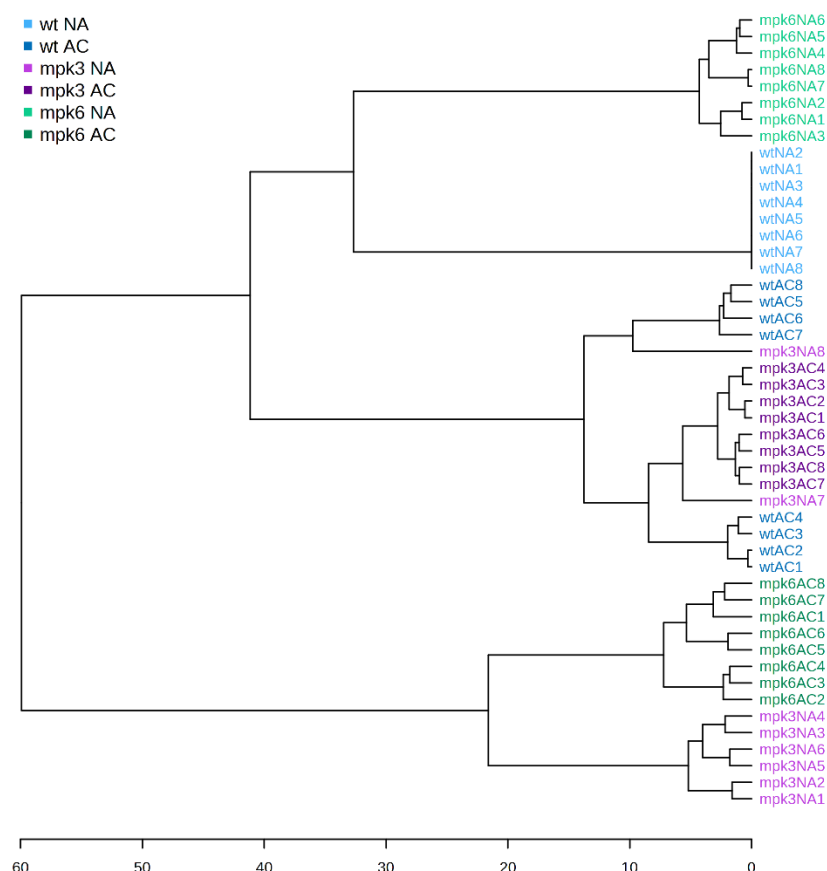


Figura 29. Análisis jerárquico de agrupaciones de por niveles de expresión de los genes involucrados en la biosíntesis y degradación de esfingolípidos en plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. El dendrograma se realizó con los datos normalizados de las Fig. 26-27. Se presentan los niveles de agrupación de los valores de 8 réplicas técnicas (expresadas con las letras del genotipo, tratamiento y el número de réplica, numeradas como 1-8) provenientes de 4 réplicas biológicas para cada genotipo y tratamiento [wt NA (azul claro), wt AC (azul oscuro), *mpk3* NA (morado claro), *mpk3* AC (morado oscuro), *mpk6* NA (verde claro) y *mpk6* AC (verde oscuro)]. El dendrograma se construyó con ayuda del programa MetaboAnalyst 5.0.

Debido a que en el dendrograma se encontraron en general 3 grandes subgrupos, se optó por aplicar un análisis de agrupación no jerárquica conocido como clúster de *K*-medias para corroborar esta información. Esta herramienta es diseñada para asignar un diferente número de muestras a un cierto número de grupos llamados clústeres, cuyas características se basan en un conjunto de variables cuantitativas. El principal objetivo de este análisis es maximizar la homogeneidad dentro de los clústeres, con el fin de encontrar las similitudes entre las diferentes réplicas de manera independiente. Si una muestra se encuentra más cercana al centroide de un clúster que de otro clúster, entonces la muestra se considera miembro del más cercano.

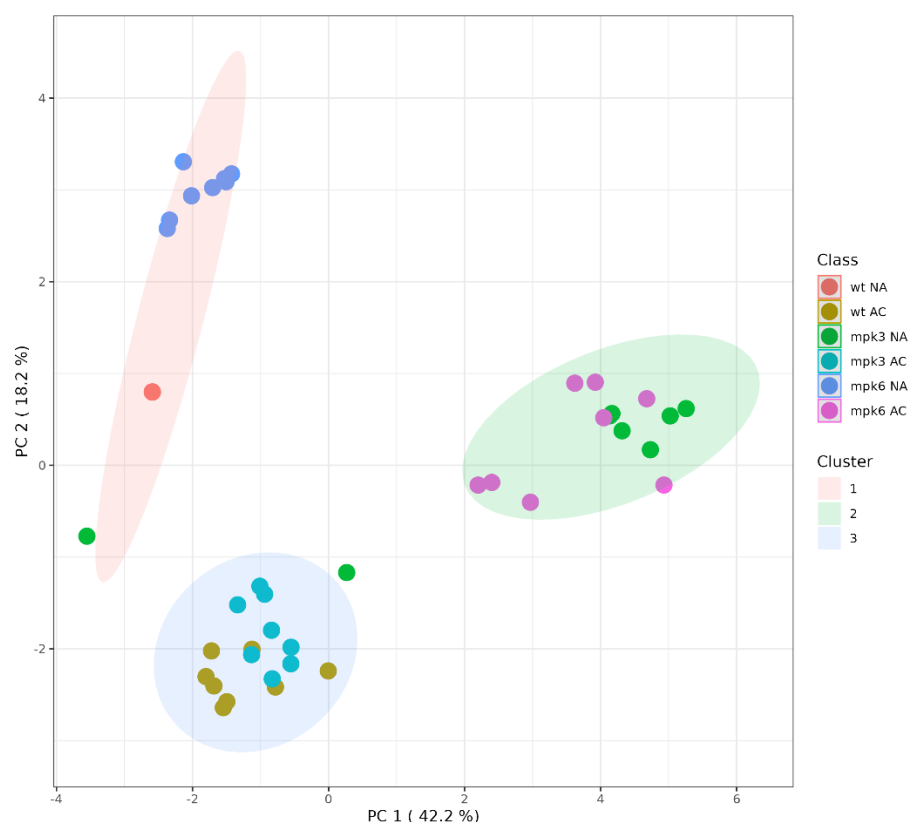


Figura 30. Análisis no jerárquico de agrupaciones de los niveles de expresión de los genes involucrados en la biosíntesis y degradación de esfingolípidos en plantas *wt*, *mpk3* y *mpk6*. El clúster de K-medias se realizó con los datos normalizados de las Fig. 26-27. Se presentan tres clústeres [clúster 1 (rosa), clúster 2 (cian) y clúster 3 (aguamarina)] independientes generados a partir de los valores de las 8 réplicas técnicas provenientes de 4 réplicas biológicas para cada genotipo y tratamiento [*wt* NA (rojo), *wt* AC (caqui), *mpk3* NA (verde), *mpk3* AC (verde azulado), *mpk6* NA (índigo) y *mpk6* AC (fucsia)]. PC 1, primer componente; PC 2, segundo componente. El clúster de K-medias se construyó con el programa MetaboAnalyst 5.0.

El clúster de K-medias arrojó que existen 3 diferentes clústeres en donde se agrupan la mayor parte de las muestras. En el primer clúster se encontraron todas las muestras de *wt* y *mpk6* NA, en el segundo clúster se identificaron todas las muestras de *mpk6* AC y 6 de las 8 réplicas técnicas de la *mpk3* NA, mientras que en el tercer clúster se detectaron todas las muestras de *wt* y *mpk3* AC. En particular, las réplicas técnicas de *mpk3* NA 7 y 8 se agruparon igual en el 3er clúster, si bien son los miembros más alejados del centroide del clúster (Fig. 30, Tabla 8).

Tabla 8. Clústeres generados a partir del análisis de clúster de K-medias de los niveles de expresión de los genes involucrados en la biosíntesis y degradación de esfingolípidos en plantas *wt*, *mpk3* y *mpk6*. Los clústeres se obtuvieron a partir de los datos presentados en la Fig. 30. Se muestran las 8 réplicas técnicas numeradas del 1 al 8 provenientes de 4 réplicas biológicas de los genotipos *wt* (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) en condiciones de no

aclimatación (NA, menor saturación) y de aclimatación (AC, mayor saturación). El clúster de *K*-medias se construyó con el programa MetaboAnalyst 5.0.

Cluster	Members
Cluster 1	wtNA1 , wtNA2 , wtNA3 , wtNA4 , wtNA5 , wtNA6 , wtNA7 , wtNA8 , mpk6NA1 , mpk6NA2 , mpk6NA3 , mpk6NA4 , mpk6NA5 , mpk6NA6 , mpk6NA7 , mpk6NA8
Cluster 2	mpk3NA1 , mpk3NA2 , mpk3NA3 , mpk3NA4 , mpk3NA5 , mpk3NA6 , mpk6AC1 , mpk6AC2 , mpk6AC3 , mpk6AC4 , mpk6AC5 , mpk6AC6 , mpk6AC7 , mpk6AC8
Cluster 3	wtAC1 , wtAC2 , wtAC3 , wtAC4 , wtAC5 , wtAC6 , wtAC7 , wtAC8 , mpk3NA7 , mpk3NA8 , mpk3AC1 , mpk3AC2 , mpk3AC3 , mpk3AC4 , mpk3AC5 , mpk3AC6 , mpk3AC7 , mpk3AC8

Con toda la información obtenida a partir del PCA, el dendrograma y el clúster de *K*-medias se decidió realizar un mapa de calor con la finalidad de que se reflejara la tendencia de aumento o disminución de cada uno de los transcritos analizados. En la Fig. 31 se muestra el mapa de calor de los niveles de transcripción de 14 genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de esfingolípidos y 4 genes que codifican para enzimas involucradas en la degradación de esfingolípidos.

Una mirada general en los colores del mapa de calor indicó que la expresión de la mayoría de los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis de esfingolípidos disminuyó tras la aclimatación al frío en las plantas wt; sin embargo, el gen que codifica para la subunidad LCB1 de la serina palmitoiltransferasa se incrementó significativamente. Los niveles de expresión de la mayoría de los genes fueron mucho mayores en las plantas *mpk3* NA al compararlos con las wt NA; sin embargo, la aclimatación también llevó a su disminución como en las plantas wt. Al analizar las plantas carentes de MPK6 se encontró que sus niveles de expresión eran similares a los de las plantas silvestres en condiciones sin aclimatación, no obstante, la mayoría de los transcritos de los genes que codifican para enzimas involucradas tanto en la biosíntesis como en la degradación de esfingolípidos aumentaron tras la aclimatación al frío en esta línea.

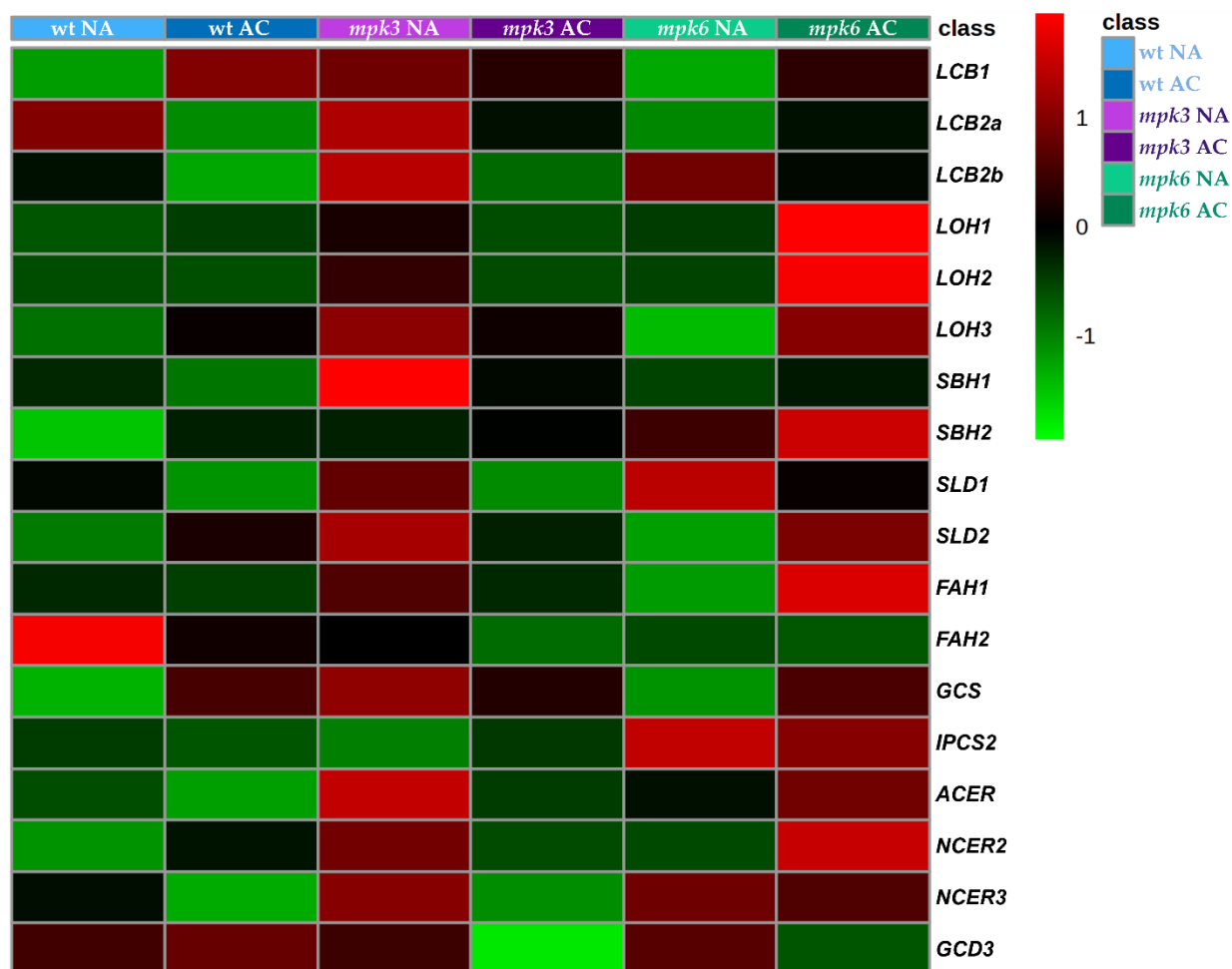


Figura 31. Efecto de la aclimatación al frío en la regulación de los genes involucrados en la biosíntesis y degradación de esfingolípidos en plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. La construcción del mapa de calor se generó con los datos reportados en las Fig. 26-27, mostrando los valores estandarizados a partir de la transcripción relativa. Se utilizó la agrupación jerárquica de los niveles de transcritos para agrupar perfiles similares usando el algoritmo euclidiano y el método de Ward. La escala de 1 a -1 representa el número de desviaciones estándar de la media. El color verde indica concentraciones más bajas que el promedio y el color rojo indica concentraciones más altas que el promedio. Se consideraron los valores promedio de las réplicas técnicas para cada genotipo y tratamiento [wt NA (azul claro), wt AC (azul oscuro), *mpk3* NA (morado claro), *mpk3* AC (morado oscuro), *mpk6* NA (verde claro) y *mpk6* AC (verde oscuro)]. Los cuatro últimos genes indicados en la columna de la derecha corresponden a genes codificantes de enzimas del catabolismo de esfingolípidos. Todos los genes arriba de estos pertenecen a enzimas del anabolismo de esfingolípidos. El mapa de calor fue construido con el programa MetaboAnalyst 5.0.

Los resultados revelaron que la aclimatación al frío modificaba de manera diferencial la expresión de genes codificantes de enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis y en la de degradación de esfingolípidos entre los genotipos analizados. De acuerdo con lo anterior, el paso lógico siguiente era determinar los productos de las enzimas codificadas por estos genes, por lo

cual se analizó la composición del esfingolipidoma de las vesículas de membrana plasmática (VMP) de las plantas de los tres genotipos expuestas a condiciones NA y AC.

Las determinaciones de esfingolípidos se llevaron a cabo usando un protocolo que permite su extracción selectiva, separación, identificación y cuantificación por medio de HPLC en fase reversa acoplada a ESI-MS/MS [Markham & Jaworski, 2007]. El estudio incluyó desde las clases de esfingolípidos hasta las especies individuales que las integran. Se realizó el análisis de las regiones hidrofóbicas de las cuatro clases de esfingolípidos clasificados de acuerdo con su grupo polar: glicosilinositolfosforilceramidas o GIPCs, glucosilceramidas o GlcCers, hidroxiceramidas o hCers y ceramidas o Cers. Este análisis comprendió tres réplicas independientes para cada genotipo y condición de aclimatación, identificándose 112 especies diferentes de esfingolípidos cuyas diferencias radicaban en el ácido graso y la LCB respectivas. Lo anterior significó un análisis de aproximadamente un total de 3000 valores de contenidos de estos dos componentes químicos, mismos que fueron procesados con herramientas informáticas que incluyeron las pruebas estadísticas inherentes al análisis.

En la Fig. 32A se muestra el contenido de esfingolípidos totales en las VMP en los genotipos *wt*, *mpk3* y *mpk6* NA y AC. Se encontró un contenido aproximado de 30 nmol de esfingolípidos/mg proteína en el genotipo *wt* NA, el cual no se modificó tras la aclimatación. El genotipo *mpk3* NA presentó 1.83 veces más esfingolípidos (alrededor de 55 nmol de esfingolípidos/mg proteína) con respecto a las plantas *wt* NA. Estos valores se conservaron tras la aclimatación en este genotipo mutante. Análogamente, en las plantas incapaces de expresar a la MPK6 se encontró un patrón semejante, ya que las plantas *mpk6* contuvieron 50 nmol de esfingolípidos/mg proteína, siendo 1.7 veces el contenido de la planta *wt*. Al igual que las plantas *wt* y *mpk3*, la aclimatación no modificó la cantidad total de esfingolípidos en el genotipo *mpk6*.

Debido a que los tres genotipos no presentaban los mismos contenidos totales de esfingolípidos, para hacer una comparación por clase por genotipo, cada total de esfingolípidos de cada genotipo se consideró como 100% y sobre éste se calculó el porcentaje respectivo de cada clase. Al calcular la distribución de las diferentes clases de esfingolípidos, se encontró que las GIPCs y las hCers eran las clases más abundantes y las que más cambiaban entre los diferentes genotipos (Fig. 32B). Se encontró que las GIPCs representaban el 65 % de los esfingolípidos totales en las membranas plasmáticas de la *wt* NA, distribución que se conservó tras su aclimatación. El genotipo *mpk3* NA presentó un aumento del por ciento mol respecto a la planta *wt*, con un 75 %

de los esfingolípidos totales, valor que igual se conservó tras la aclimatación. Por otro lado, se encontró que en la membrana plasmática de la planta *mpk6*, las GIPCs representaban el 70 % de los esfingolípidos totales, los cuales no cambiaron tras la aclimatación (Fig. 32B).

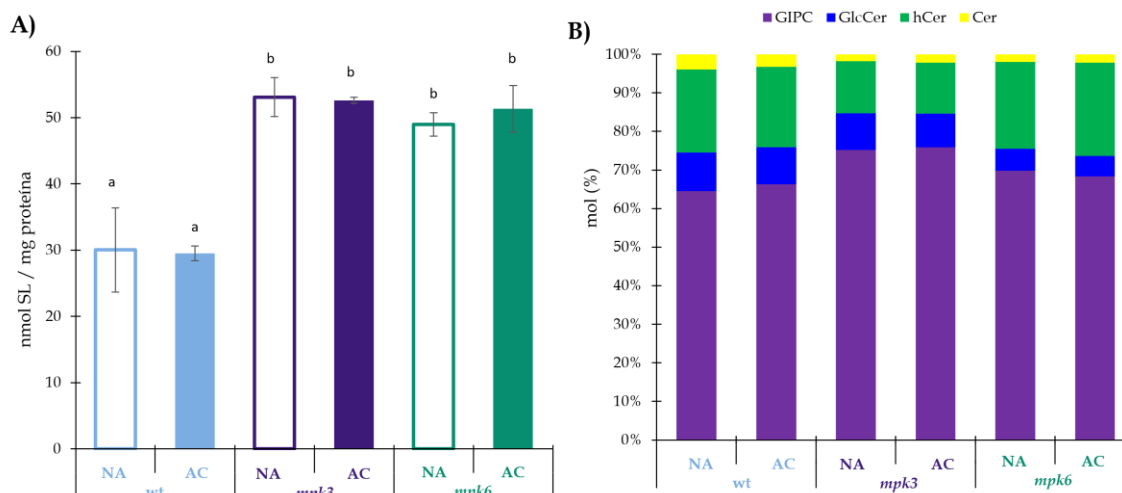


Figura 32. Efecto de la aclimatación al frío en el contenido total y por clases de esfingolípidos presentes en la membrana plasmática de plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. A, vesículas de membrana plasmática (VMP) extraídas de plantas de 12 semanas de edad de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) expuestas a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido), se utilizaron para determinar el contenido de esfingolípidos totales. Los esfingolípidos se extrajeron, separaron e identificaron por HPLC-ESI-MS/MS. B, distribución relativa de las clases de esfingolípidos presentes en las muestras de (A). Glicosilinositolfosforilceramidas (GIPCs, morado), Glucosilceramidas (GlcCers, azul), Hidroxiceramidas (hCers, verde) y Ceramidas (Cers, amarillo). Se presentan los valores promedio de tres réplicas técnicas provenientes de tres réplicas biológicas independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

La segunda clase más abundante fueron las hCers, las cuales representaron el 21.5 % de los esfingolípidos en las membranas plasmáticas de plantas wt NA. Este porcentaje se mantuvo tras la aclimatación. En el caso de las membranas plasmáticas de la *mpk3* NA, el porcentaje de las hCers disminuyó hasta un 13.5 % del total de sus esfingolípidos, e igualmente, este porcentaje se mantuvo tras su aclimatación. De manera interesante, las hCers de las membranas plasmáticas de las plantas *mpk6* NA aumentaron comparadas con las encontradas en las membranas wt NA, representando un valor del 23.5 %, el cual se mantuvo en esos rangos tras la aclimatación al frío (Fig. 32B).

En el caso de las GlcCers, estas únicamente representaron el 10 % de los esfingolípidos totales en las membranas plasmáticas de plantas wt NA, valor que se mantuvo igual tras la aclimatación. Para las GlcCers de las membranas de *mpk3* NA el valor fue muy similar al encontrado al de las wt NA, de 9.5 %. De la misma manera, este porcentaje se mantuvo tras la aclimatación. Nuevamente, las GlcCers de las membranas plasmáticas de plantas *mpk6* NA representaron la mitad de los valores encontrados para la wt NA, de únicamente el 5.5 % de los esfingolípidos totales. Este porcentaje se conservó también tras su aclimatación (Fig. 32B).

Las Cers únicamente representaron un 3.5 % del total de esfingolípidos en las membranas plasmáticas de las plantas wt NA, preservándose este valor tras la aclimatación. En el caso de las mutantes en MAP cinasas, el comportamiento de las Cers fue el mismo que el encontrado en las hCers. En la *mpk3* NA disminuyó casi a la mitad con respecto al porcentaje de la wt NA, hasta un 2 % y nuevamente este valor se mantuvo tras la aclimatación. Al igual que en las membranas plasmáticas de plantas *mpk3* NA, las Cers de las membranas de plantas *mpk6* NA representaron un 2 % de los esfingolípidos totales y su aclimatación no modificó esta porción (Fig. 32B).

De manera interesante, se pudo observar que la distribución del contenido de clases de acuerdo con sus valores en términos absolutos (Fig. 33A-D), no se comportó igual a la expresada en términos porcentuales (Fig. 32B). Al analizar las cantidades absolutas de GIPCs por genotipo (Fig. 33A), se encontró que representaron aproximadamente 20 nmol/mg proteína para las plantas wt NA, las cuales se mantuvieron tras la aclimatación. En el caso de las membranas provenientes de plantas *mpk3* NA, se encontró que las GIPCs representaban aproximadamente el doble del valor obtenido en las wt NA, valor que tampoco tuvo modificación tras la aclimatación. Las GIPCs de las membranas de plantas *mpk6* NA tuvieron los mismos valores que las *mpk3* NA, y tampoco se modificaron tras la aclimatación (Fig. 33A).

En el caso de las cantidades absolutas de GlcCers por genotipo (Fig. 33B) se encontraron 3 nmol/mg proteína en la planta wt NA, y esta cantidad se conservó tras la aclimatación. La mutante *mpk6* presentó las mismas cantidades de GlcCers que la wt en ambas condiciones, sin embargo, en el caso de *mpk3* NA se encontró un aumento de 1.7 veces de GlcCers (5 nmol/mg proteína) comparado con los otros genotipos. No obstante, esta cantidad igualmente se conservó tras la aclimatación de *mpk3* (Fig. 33B).

Por otra parte, en el caso de las cantidades absolutas de hCers por genotipo (Fig. 33C), esta resultó ser de 6 nmol/mg proteína para las plantas wt y *mpk3* tanto NA como AC. Sin embargo, la mutante carente de MPK6 NA presentó el doble de hCers comparada con los demás genotipos, obteniéndose 12 nmol/mg proteína. Esta cantidad también se mantuvo tras la aclimatación (Fig. 33C). Por último, la cantidad absoluta de Cers se mantuvo alrededor de 1 nmol/mg proteína en todos los genotipos bajo ambos tratamientos (Fig. 33D).

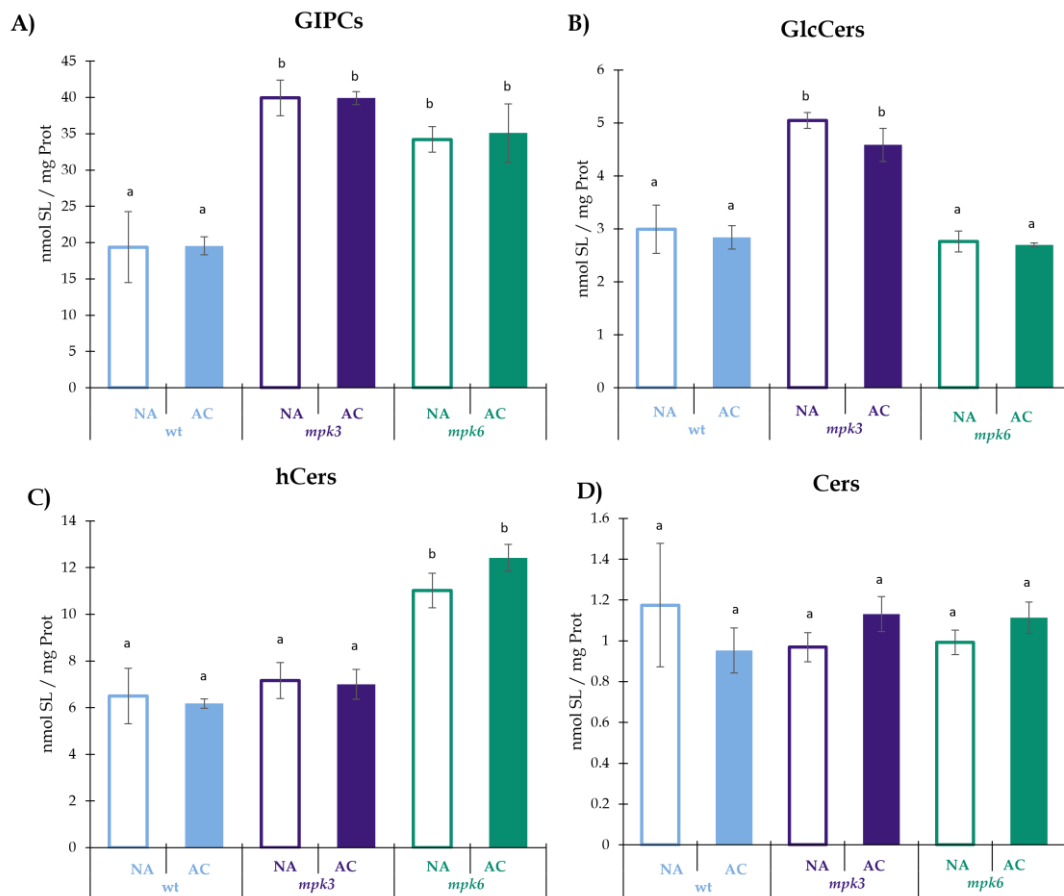


Figura 33. Efecto de la aclimatación al frío en la distribución de las clases de esfingolípidos presentes en la membrana plasmática de plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. La distribución de las clases de esfingolípidos se obtuvo a partir de los datos presentados en 32A para las plantas de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) expuestas a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido). Glicosilinositolfosforilceramidas (GIPCs, A), Glucosilceramidas (GlcCers, B), Hidroxiceramidas (hCers, C) y Ceramidas (Cers, D). Se presentan los valores promedio de tres réplicas técnicas provenientes de tres réplicas biológicas independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Las cuatro diferentes clases de esfingolípidos están integradas por especies individuales, cada una de estas conformada por un par específico ácido graso/LCB, de ahí que se analizó la composición de ácidos grasos y LCBs de las especies individuales de esfingolípidos que integraban cada clase. El propósito fue asociar esta información con las enzimas que producen estas especies químicas y extender así estos datos a los colectados en nuestros estudios de genes expresados tras la aclimatación en los diferentes genotipos. En el caso del ácido graso, se analizaron las modificaciones con respecto a su longitud, sus niveles de hidroxilación e insaturación. Una vez que se obtuvieron los valores de cada especie química, se determinaron tres relaciones: a) cocientes entre especies de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) y los ácidos grasos de cadena larga (LCFA); b) cociente entre ácidos grasos hidroxilados (hFA) y los ácidos grasos sin hidroxilación (cFA); c) cociente entre ácidos grasos saturados (FAsat) e insaturados (FAinsat).

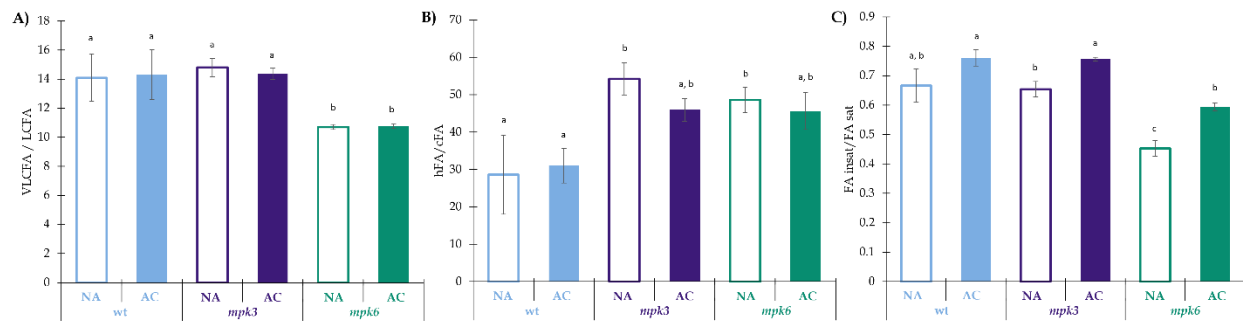


Figura 34. Efecto de la aclimatación al frío en modificaciones de ácidos grasos evaluadas como relaciones VLCFA/LCFA, hFA/cFA y FAinsat/FAsat de esfingolípidos totales presentes en la membrana plasmática de plantas wt, mpk3 y mpk6. Los cocientes de las modificaciones específicas de los ácidos grasos del contenido total de esfingolípidos se obtuvieron a partir de los datos presentados en 32A de los genotipos wt (azul), mpk3 (morado) y mpk6 (verde) expuestas a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido). A, proporción de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) a ácidos grasos de cadena larga (LCFA). B, proporción de ácidos grasos hidroxilados (hFA) a ácidos grasos sin hidroxilación (cFA). C, proporción de ácidos grasos insaturados (FA insat) a ácidos grasos saturados (FA sat). Se presentan los valores promedio de tres réplicas técnicas provenientes de tres réplicas biológicas independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

En cuanto a la relación VLCFA/LCFA (Fig 34A), en el caso de las plantas wt sin tratamiento de aclimatación, fue de aproximadamente 14. Esta relación se mantuvo tras la aclimatación. El mismo comportamiento en la relación VLCFA/LCFA se encontró en las membranas provenientes de las plantas mpk3 tanto NA como AC, no obstante, en las membranas mpk6 la relación

VLCFA/LCFA disminuyó hasta 11 en condiciones de NA. Esta relación no se modificó tras la aclimatación (Fig. 34A).

Por otro lado, la relación hFA/cFA (ácidos grasos hidroxilados sobre ácidos grasos sin hidroxilación) (Fig. 34B) resultó ser de alrededor de 29 en las VMP wt NA, misma que se mantuvo tras la aclimatación. En las plantas *mpk3* con y sin aclimatación se encontró una mayor relación, de aproximadamente 50. En el caso de las plantas *mpk6* NA y AC, el comportamiento fue el mismo que en las membranas de plantas *mpk3* (Fig. 34B). También se comparó la relación de ácidos grasos insaturados sobre ácidos grasos saturados (FAinsat/FAsat) (Fig. 34C), resultando un valor de cerca de 0.70 en la planta wt con y sin aclimatación. Esta relación disminuyó hasta 0.65 en las membranas *mpk3* NA, la cual aumentó hasta 0.76 tras la aclimatación. De la misma manera, en las membranas *mpk6* NA la relación resultó ser de 0.45 y aumentó a 0.6 en las membranas *mpk6* AC (Fig. 34C).

Aparte del ácido graso, la otra cadena acílica de la región hidrofóbica de los esfingolípidos es la LCB. Considerando que la LCB mayoritaria de los esfingolípidos en plantas es de una longitud de 18 carbonos, se analizaron los cocientes con respecto a sus modificaciones: a) la hidroxilación, o sea LCB trihidroxiladas (t18) sobre LCB dihidroxiladas (d18) y b) la insaturación, o sea LCB insaturadas (LCBinsat) sobre LCB saturadas (LCBsat).

En la Fig. 35A se presenta la relación de LCBs t18/LCBs d:18. Se encontró una relación de alrededor de 40 en las membranas wt NA, la cual no se modificó tras el tratamiento de aclimatación. En el caso de las plantas *mpk3* NA y AC, se encontró la misma relación que en las membranas de las plantas wt. De manera interesante, la relación LCB t18/LCB d18 en las membranas de plantas *mpk6* presentó valores mucho menores, de aproximadamente 15 en las membranas con y sin tratamiento de aclimatación.

En cuanto a la relación LCB insat/LCB sat, se encontró un valor aproximado de 12.5 en las plantas wt en ambas condiciones de tratamiento térmico. En el caso de *mpk3* NA, la relación disminuyó a 10.5 comparado con la wt, no obstante, esta relación aumentó a 13 tras la aclimatación. Las plantas *mpk6* presentaron el mismo comportamiento de las *mpk3*, en las NA una relación 8.5 y una relación de 12 al ser aclimatadas.

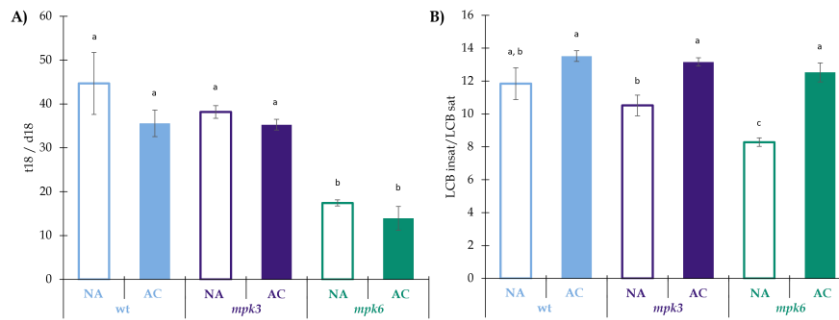


Figura 35. Efecto de la aclimatación al frío en modificaciones de bases de cadena larga evaluadas como relaciones LCB t18/LCB d18 y LCB insat/LCB sat de esfingolípidos totales presentes en la membrana plasmática de plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. Los cocientes de las modificaciones específicas de las bases de cadena larga del contenido total de esfingolípidos se obtuvieron a partir de los datos presentados en 32A de los genotipos wt (azul), *mpk3* (morado) y *mpk6* (verde) expuestas a condiciones de aclimatación (AC, 4 °C por una semana, barras con relleno sólido) o control (NA, 22 °C por una semana, barras sin relleno sólido). A, proporción de bases de cadena larga (LCB) trihidroxiladas (t18) a LCB dihidroxiladas (d18). B, proporción de LCB insaturadas (LCB insat) a LCB saturadas (LCB sat). Se presentan los valores promedio de tres réplicas técnicas provenientes de tres réplicas biológicas independientes $\pm$ EE. Los datos fueron graficados con el programa Excel 2021 y procesados estadísticamente aplicando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa MetaboAnalyst 5.0. Diferentes letras indican valores promedio significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Estos resultados ya indicaban que tanto la MPK3 como la MPK6 se encontraban involucradas, aunque de manera diferencial, en la regulación del metabolismo de esfingolípidos. Ya que no se encontró que la aclimatación produjera diferencias de esfingolípidos a nivel de clase en las plantas de los tres genotipos, quisimos hacer un análisis a nivel de las especies específicas dentro de cada clase. Para esto, se decidió realizar un mapa de calor con las 112 especies individuales de esfingolípidos encontrados (Fig. 36).

De manera general, se pudo apreciar que, con respecto al control de todos los genotipos y tratamientos, o sea las plantas wt NA, la abundancia de especies de esfingolípidos por clase aumentó diferencialmente según el genotipo y la aclimatación. Sólo las plantas wt AC disminuyeron clara y generalizadamente la abundancia de especies de esfingolípidos en las 4 clases.

Particularizando el análisis de especies por clase en el mapa de calor, aproximadamente 8 especies de Cers estaban enriquecidas en las plantas wt NA, mismas que disminuyeron tras la aclimatación, si bien 1 especie de hCer y 3 de GlcCers aparecieron en esta condición. En la mutante *mpk3* NA, la mayoría de las especies de esfingolípidos abundantes fueron GlcCers (aproximadamente 16) y 10 de GIPCs. Casi todas estas especies estuvieron decrementadas en las

plantas wt tanto NA como AC. La aclimatación en *mpk3* produjo un perfil muy parecido al del control (NA); sin embargo, sí hubo un recambio diferencial en algunas de las especies de esfingolípidos. Una abundancia de cerca de 6 especies de Cers, 1 de hCers, 6 de GlcCers y 4 GIPCs, observándose también claros bajos niveles de cerca de 8 especies de GlcCers. Con respecto a las plantas *mpk6* NA, hubo 5 especies abundantes de Cers y 6 muy poco abundantes; 12 hCers muy abundantes, 6 GlcCers de alta abundancia y cerca de 14 GIPCs muy abundantes. Comparativamente, la aclimatación produjo en las plantas *mpk6* un aumento de 6 Cers, una disminución de cerca de 13 hCers, un aumento de 6 GlcCers y una disminución de alrededor de 24 GlcCers; También 23 GIPCs disminuyeron y solo 3 aumentaron.

Es importante hacer notar que el análisis de abundancia de especies de esfingolípidos en los diferentes genotipos NA o AC es más bien cualitativo, pues los niveles de las especies están ajustados a un intervalo que los ubica en una escala de 2 a -2. Lo anterior proporciona una estimación comparativa de los niveles de especies por genotipo y tratamiento; sin embargo, no expresa los valores absolutos de cada una de las especies.

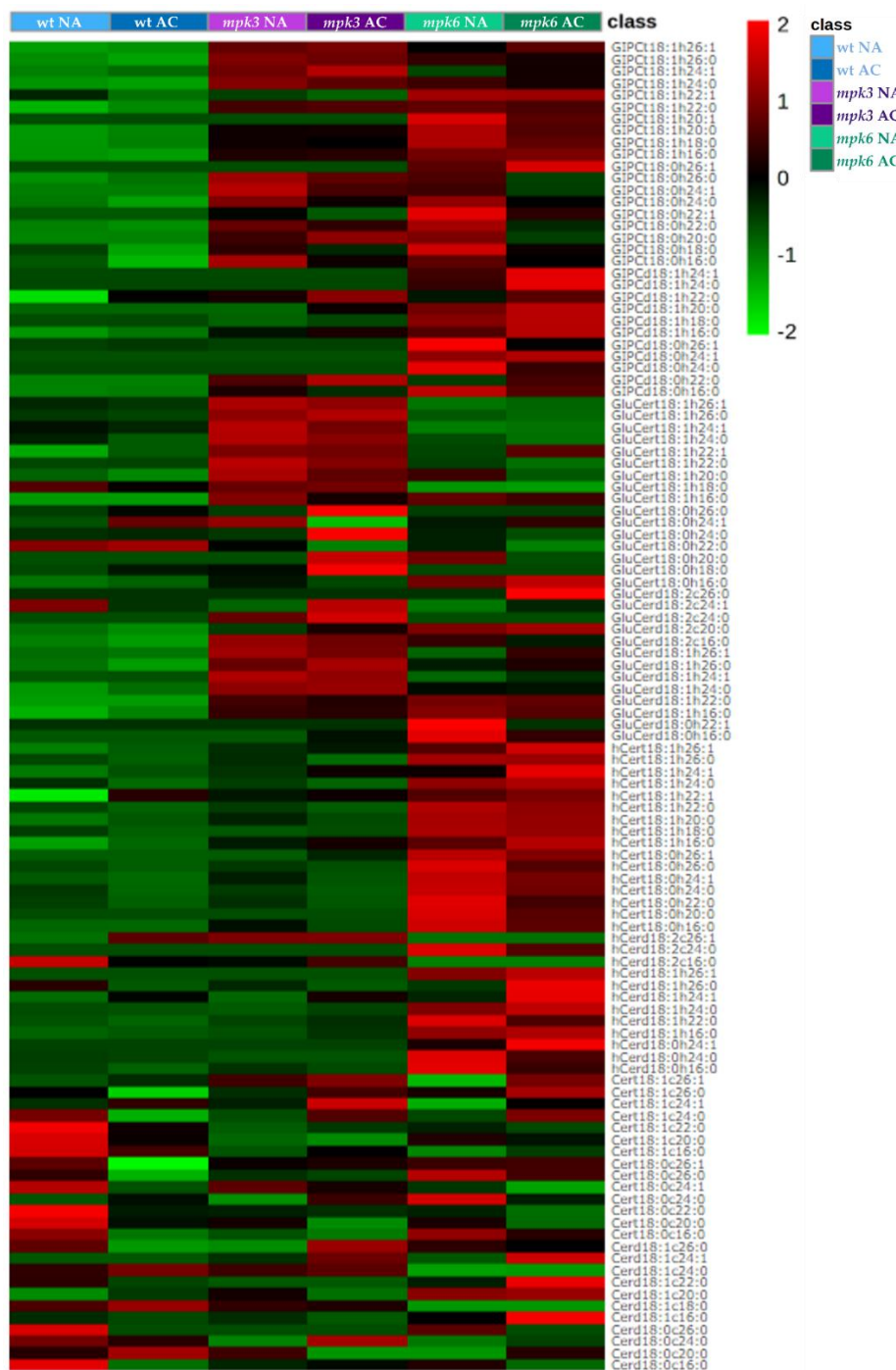


Figura 36. Efecto de la aclimatación al frío en el esfingolipidoma de la membrana plasmática de plantas wt, *mpk3* y *mpk6*. La construcción del mapa de calor se generó con los datos reportados en las Fig. 32. Se utilizó la agrupación jerárquica de las especies de esfingolípidos para agrupar perfiles similares usando el algoritmo euclidiano y el método de Ward. La escala de 2 a -2 representa el número de desviaciones estándar de la media. El color verde indica concentraciones más bajas que el promedio y el color rojo indica concentraciones más altas que el promedio. Se consideraron los valores de tres técnicas provenientes de tres réplicas biológicas [wt NA (azul claro), wt AC (azul oscuro), *mpk3* NA (morado claro), *mpk3* AC (morado oscuro), *mpk6* NA (verde claro) y *mpk6* AC (verde oscuro)]. El mapa de calor fue construido con el programa MetaboAnalyst 5.0.

DISCUSIÓN

El trabajo realizado durante este doctorado ha estudiado diferentes eventos moleculares que se llevan a cabo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, proporcionando evidencias experimentales de las respuestas celulares desencadenadas durante la aclimatación al frío gracias a la activación de cascadas de MAP cinasas que tienen a MPK3 y MPK6 como última MAP cinasa de la(s) cascada(s). Se encontró que por lo menos algunas de estas respuestas celulares tienen como blanco a la membrana plasmática, remodelando su estructura y función, reveladas aquí por un ajuste al contenido cualitativo y cuantitativo de sus esfingolípidos y por la modulación de la actividad de ATPasa de H⁺, la enzima maestra de esta membrana.

1. Las cinasas MPK3 y MPK6 pueden regular el contenido y la composición de los esfingolípidos de la membrana plasmática a través de un control transcripcional

Las cascadas de MAP cinasas son parte de diversos mecanismos de señalización presentes en todas las células eucariotas. Ellas desempeñan funciones esenciales en la transducción de señales implicadas en el desarrollo de la planta y de respuesta a diferentes estímulos ambientales por medio de eventos de fosforilación consecutivos que activan efectores específicos para controlar la expresión génica y la función de algunas proteínas [Tena et al, 2001; Rodríguez et al, 2007; Pitzschke, 2015; Jiang et al, 2022]. La mayor parte de la información disponible en el campo de la señalización por MAP cinasas se ha enfocado en tres aspectos: 1) Dilucidación de los programas de desarrollo o de respuesta a estrés en los que participan. 2) Identificación de los miembros que forman los módulos de la cascada. 3) Identificación de los blancos que son afectados por la última MAPK. Sin embargo, hay poca información sobre la identificación de las respuestas moleculares finales implementadas a partir de la acción de cascadas de MAP cinasas sobre genes o proteínas específicas.

Los datos experimentales en el presente trabajo describen que durante las condiciones control (exposición a 22 °C) en las mutantes carentes de MPK3 o MPK6 se presentó una expresión diferencial de 15 genes involucrados en las rutas de biosíntesis y degradación de los esfingolípidos (Fig. 26, 27). Asimismo, se encontraron diferentes contenidos y composiciones de esfingolípidos en las membranas plasmáticas de esas mutantes (Fig. 32, 33, 36). La modificación en la expresión de algunos genes de enzimas del metabolismo de esfingolípidos ha sido explorada muy recientemente en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, encontrándose que la activación constitutiva

de MKK9 (*MKK9^{DD}*) generaba cambios en la transcripción de genes de la vía de síntesis de esfingolípidos: un aumento en la expresión de los genes *LCB1*, *LCB2b* y *SBH1* y una disminución en la transcripción del gen *LCB2a* [Li et al, 2023]. El aumento de *LCB1* y *LCB2b* se vio parcialmente abolido en las dobles mutantes *MKK9^{DD}/mpk3* y *MKK9^{DD}/mpk6*, pero el aumento de *SBH1* se vio totalmente abolido en las mismas dobles mutantes, indicando así la participación de MPK3 y MPK6 en la regulación de la transcripción de *LCB1*, *LCB2b* y *SBH1* y la asociación de MKK9 corriente arriba [Li et al, 2023]. Debe recalcar que este hallazgo reciente sugiere que la señalización por MAPKs interviene en la expresión de los genes codificantes de la SPT, enzima clave que inicia la vía de síntesis de esfingolípidos. El hecho de que los tres genes codificantes de las subunidades de la SPT (que configuran dos versiones de la enzima: *LCB1/LCB2a* y *LCB1/LCB2b*) sean regulados unos positiva y otro negativamente indica que la regulación final del heterodímero puede estar sujeta a factores adicionales, como las proteínas ORM y las subunidades pequeñas de la SPT (ssSPT).

En nuestro estudio, en plantas crecidas en temperatura de 22 °C (control, NA), se produjo un aumento en los transcritos de 7 genes de enzimas biosintéticas de esfingolípidos: *LCB1*, *LOH2*, *LOH3*, *SBH1*, *SLD2*, *FAH1*, *GCS*, y 2 del catabolismo: *ACER* y *NCER2* en las plantas mutantes *mpk3*, pero no en las plantas *mpk6* (Fig. 26, 27).), indicando que MPK3 actúa como regulador negativo de la expresión de estos genes, lo cual, implica a su vez, que MPK3 no es redundante con MPK6. Más aún, los resultados del PCA, el dendrograma y el mapa de calor, revelan que los transcritos de las plantas wt y *mpk6* en condiciones control (NA) mostraban en general niveles similares entre sí y claramente diferentes a los encontrados en las plantas *mpk3* NA (Fig. 28, 29, 31). Al analizar el clúster de K-medias se encontró que todas las réplicas de wt NA y *mpk6* NA se agrupaban en un mismo clúster. Sin embargo, las réplicas de las plantas *mpk3* NA se agruparon en un clúster diferente (Fig. 30). Este análisis indica que el comportamiento de la planta NA carente de MPK3 es diferente al de las plantas wt y *mpk6* y, por lo tanto, que MPK3 tiene un papel regulador negativo en la expresión de 7 genes del metabolismo de esfingolípidos a temperatura de 22 °C, condición en la que MPK6 no es funcionalmente redundante. Estos resultados coinciden con la acción de MPK3 como claro regulador negativo en múltiples procesos tanto de desarrollo como de respuesta a diferentes tipos de estrés [Cho et al, 2008; Frey et al, 2014; Lee et al, 2018; Jiang et al, 2020; Sun & Zhang, 2022].

En el presente trabajo se encontró un aumento claro de los esfingolípidos en las membranas plasmáticas de las plantas *mpk3* NA (Fig. 32), específicamente en las clases GIPCs y GlcCers (Fig. 33A,B), lo cual coincide con el hecho de que esta mutante expresa un aumento en los transcritos de los genes *LCB1*, *LCB2b*, *LOH2*, *LOH3*, *SBH1*, *SBH2*, *SLD1*, *SLD2*, *FAH1* y *GCS* (Fig. 26A,C,E,F,G,H,I,J,K,M). Estos genes codifican para enzimas que catalizan la primera (*LCB1*, *LCB2b*) y tercera (*LOH2*, *LOH3*), reacciones de la ruta de síntesis de esfingolípidos, respectivamente. También las de modificación covalente de la LCB (*SBH1*, *SBH2*, *SLD1*, *SLD2*), la de hidroxilación del ácido graso (*FAH1*) y la de glucosilación de la porción polar de GlcCers (*GCS*) (ver Fig. 3). El incremento en la expresión de estos genes en la mutante *mpk3* NA implica que la MPK3 regula negativamente la síntesis de esfingolípidos en las plantas wt en condiciones control de temperatura y que lo hace a nivel transcripcional. Lo anterior contrasta con el hecho de que no hay información de una regulación transcripcional de las subunidades de la SPT en bases de datos de microarreglos [Kinberlin et al, 2013]. En el contexto del metabolismo, resulta particularmente crítico que tanto *LCB1* como *LCB2b* estén regulados negativamente, ya que codifican a las subunidades formadoras del heterodímero de la SPT, enzima que cataliza la reacción primera y regulatoria de la vía sintética de esfingolípidos. Además, al no existir un homólogo de *LCB1*, la ausencia de su expresión anularía la síntesis de estos lípidos [Chen et al, 2006]. Se puede proponer que 22 °C (óptima para *A. thaliana*), es una temperatura a la que una membrana tienen una fluidez adecuada, por lo que mantener una síntesis baja de esfingolípidos evitaría su rigidificación (asumiendo que estos lípidos tienen este efecto). De esta manera, la regulación negativa de MPK3 sobre la SPT resulta relevante para la membrana plasmática, uno de los destinos celulares más importantes de los esfingolípidos sintetizados *de novo* y cuya estructura y abundancia influyen en las propiedades de las bicapas lipídicas, como se describirá en un apartado posterior.

En la misma línea de razonamiento, en las plantas *mpk3* NA, el aumento de los transcritos *ACER* y *NCER2*, mismos que codifican para ceramidasa (ver Fig. 3), se podría explicar como un intento de la planta por regular sus niveles aumentados de esfingolípidos, ya que se ha demostrado que hay un incremento de GlcCers con ácidos grasos α -OH saturados en plantas sensibles al frío [Imai et al, 1995]. Estas consideraciones apoyan fuertemente el sentido del papel de MPK3 como regulador negativo de la expresión de los genes *LCB1*, *LCB2b*, *LOH2*, *LOH3*, *SBH1*, *SBH2*, *SLD1*, *SLD2*, *FAH1* y *GCS* (involucrados en la síntesis del metabolismo de esfingolípidos) a temperaturas normales de crecimiento (22 °C) de *Arabidopsis*.

En las plantas wt, el gen *NCER2* también estaría regulado negativamente para no alterar los niveles de esfingolípidos ya sintetizados, pues está descrito que los esfingolípidos son componentes fundamentales de membranas como la plasmática y la de la vacuola [Cacas et al, 2016; Carmona-Salazar et al, 2021]. En cuanto a las plantas wt expuestas a aclimatación al frío (4 °C, 7 d), este tratamiento produjo una disminución en la expresión de los genes *LCB2a*, *SLD1* y *FAH2*, y un aumento en la expresión de los genes *LCB1*, *LOH3*, *SBH2*, *SLD2* y *GCS* y *NCER2* (Fig. 26, 27). Según el análisis esfingolipídico, lo anterior estuvo acompañado por una modificación en la composición, más no en la cantidad de los esfingolípidos membranales (Fig. 32, 33). Sin embargo, en el mapa de calor de contenidos de esfingolípidos podemos observar una disminución muy clara de cerca de 13 especies de ceramidas que no se ve reflejada en el contenido total de esta clase (Fig. 33, 36). Al respecto, hay que tener en cuenta que la representación de las cantidades de especies esfingolipídicas en el mapa de calor es semicuantitativa, pues está ajustada a una escala de -2 a +2 (en este caso), por lo cual un incremento aparentemente muy grande puede corresponder en términos absolutos, a cantidades pequeñas con respecto al total de especies de ceramidas.

Revisando los diferentes transcriptomas de plantas de *A. thaliana* sometidas a bajas temperaturas se encontró una disminución de los niveles de transcritos de los genes *LCB2a*, *NCER2* y *NCER3*, y un aumento de los genes *SBH1*, *SLD1* y *ACER* tras las temperaturas bajas [Sharma et al, 2018]. Si bien hay concordancia entre los aumentos de genes codificantes de una subunidad de la SPT, una hidroxilasa y una desaturasa en ambos conjuntos de datos, hay expresiones opuestas entre genes de otra isoforma de la SPT y una ceramidasa. Estas diferencias pueden deberse a las accesiones de *A. thaliana* utilizadas, el tipo de mutantes, la edad de las plantas y las características de los tratamientos a bajas temperaturas (magnitud de la temperatura, tiempo de exposición) empleados en cada trabajo. A este respecto, se ha reportado que las plantas de *A. thaliana* tienen diferentes respuestas dependiendo de los tratamientos a bajas temperaturas utilizados [Leuendorf et al, 2020]. Aun así, la coincidencia en la disminución de los transcritos del gen *LCB2a* observada en ambas fuentes, indica una necesidad de regulación de la vía de síntesis de esfingolípidos no solo en la temperatura control, sino también a baja temperatura. En cuanto a los genes *FAH1*, *SBH2*, *ADS2* y *SLD1*, Nagano et al. (2014) encontraron que su expresión se incrementaba, pero tras 72 h de aclimatación a 4 °C en plantas de 3 semanas de edad, características que podrían explicar la diferencia encontrada por nosotros en la expresión de *FAH1* y *SLD1*.

Al igual que en las mutantes *mpk3*, nuestros datos mostraron que el esfingolipidoma proveniente de la planta carente de MPK6 NA presentaba un contenido de esfingolípidos de casi el doble al encontrado en las plantas wt NA, y que no se modificaba tras la aclimatación (Fig. 32). No obstante, se encontró un incremento de las clases GIPCs e hCers (Fig. 33). De este resultado se desprendió que en las plantas wt, la MPK6 también tenía un efecto negativo en la síntesis de esfingolípidos en la temperatura de 22 °C, pero que se volvía incapaz de regular el contenido total de esfingolípidos en las condiciones de aclimatación. Este resultado era consistente con el incremento observado en la transcripción de los genes *SBH2*, *SLD1* e *IPCS2* encontrados en las plantas *mpk6* NA (Fig. 26 H,I,N). Estos genes codifican para enzimas que catalizan las modificaciones covalentes de las LCBs (*SBH2*, *SLD1*) y la de la síntesis de inositolfosforilceramida (*IPCS2*) (ver Fig. 3).

De forma interesante, el patrón en *mpk6* contrastó con parte del efecto encontrado en las plantas mutantes *mpk3*, ya que, como se mencionó anteriormente, estas plantas presentaron un incremento en las GIPCs y GlcCers en la temperatura control de crecimiento (Fig. 33). Lo último sugería que mientras que en las plantas wt la MPK3 tenía un efecto regulador negativo de las síntesis de GlcCers, la MPK6 tenía un efecto regulador negativo en las síntesis de hCers o un efecto regulador positivo en la degradación de esfingolípidos complejos. Además, ambas MAPKs tienen un efecto negativo en la síntesis de GIPCs. Esta asignación de las capacidades de regulación de MPK3 y MPK6 son propuestas en términos del contenido de esfingolípidos, lo cual constituye un parámetro multifactorial, ya que depende de reacciones individuales integrantes de las vías metabólicas de síntesis y degradación operadas por múltiples enzimas.

Uno de los abordajes experimentales para evaluar de una manera más precisa el papel regulador de MPK3 y de MPK6 en la tolerancia a la congelación en términos del contenido de esfingolípidos membranales, fue la determinación de la expresión individual de genes críticos en las rutas de síntesis y degradación de esfingolípidos. Por ello se llevó a cabo la cuantificación de 18 genes codificantes de enzimas clave en el metabolismo de esfingolípidos, en los tres genotipos de plantas y en las condiciones de no aclimatación y de aclimatación al frío. Ya que este estudio dio un gran número de valores (864) correspondientes a los niveles de expresión de los 18 genes en los diferentes genotipos (wt, *mpk3* y *mpk6*) y sus dos tratamientos (NA o AC) (Fig. 26, 27), se procedió a hacer uso de análisis multivariados como herramientas estadísticas que permitieran el manejo de numerosos datos. Derivados de este procesamiento, tanto el PCA, como el

dendrograma y el mapa de calor mostraron que, de manera general, los transcritos de las plantas wt AC tuvieron niveles similares a los de la *mpk3* AC. Sin embargo, los transcritos de la mutante carente de MPK6 bajo aclimatación presentaron un comportamiento diferente. Debido a que se contaba con valores provenientes de 144 réplicas de 3 genotipos diferentes y 2 tratamientos diferentes, era importante establecer lo más confiablemente posible las similitudes y diferencias de la expresión de genes bajo los efectos de los tratamientos entre los tres genotipos, por lo cual se acudió al análisis de clúster de *K*-medias.

Al analizar el clúster de *K*-medias, otra herramienta que permite identificar de manera no jerárquica el parecido existente entre las múltiples réplicas biológicas y técnicas, se detectó lo mismo que lo observado previamente con el PCA, el dendrograma y el mapa de calor: wt AC y *mpk3* AC se agruparon en un mismo clúster mientras que *mpk6* AC se agrupó junto con *mpk3* NA (Fig. 30). Los niveles de transcritos de 12 genes diferentes aumentaron tanto en *mpk3* NA como en *mpk6* AC respecto a los observados en wt NA. Ya analizados en conjunto, los resultados indicaron que la regulación transcripcional varía dependiendo de la ausencia de MPK3 o MPK6 y del tratamiento térmico y entonces se procedió a hacer la comparación entre los mapas de calor de los niveles de transcritos y del contenido de esfingolípidos (Figs. 31, 36).

Se apreció que los niveles de transcritos en la planta wt tenían una baja variación tras la aclimatación, al igual que el contenido total de esfingolípidos, a excepción de las Cers, en las que se observó una disminución clara en la mayoría de las especies, pero no en la clase completa (Fig. 33). En el caso de la mutante *mpk3* NA, se encontró un aumento en la mayoría de los transcritos comparados con la planta wt NA, al igual que la mayoría de las especies de GIPCs y GlcCers. Sin embargo, tras la aclimatación, los niveles de la mayoría de los transcritos en la *mpk3* disminuyeron hasta casi los niveles de la wt AC, no así con las especies de esfingolípidos, donde no tuvieron grandes modificaciones a excepción de especies específicas como la GlcCer con LCB t18:0 y FA h24:1, la cual presentó una disminución muy clara (Fig. 31, 36). Por otro lado, en el caso de la mutante carente de MPK6 NA se observó un nivel de transcripción similar al encontrado en la wt NA; sin embargo, la mayoría de las especies de GIPCs e hCers se encontraron incrementadas comparadas con las wt NA. Al ser aclimatadas las plantas *mpk6*, sus transcritos aumentaron significativamente, al igual que algunas especies de GlcCers, hCers y Cers, mientras que las GIPCs se mantuvieron prácticamente iguales (Fig. 31, 36). Esto demuestra una correlación entre los niveles de transcritos y la cantidad de especies específicas de esfingolípidos encontradas en la

membrana plasmática. Sin embargo, no debe olvidarse que a esta correlación pueden contribuir otros mecanismos regulatorios situados celularmente entre la transcripción de los genes y el producto final del metabolismo de los esfingolípidos presentes en la membrana plasmática. Estos mecanismos incluyen posibles regulaciones postranscripcionales, traduccionales, postraduccionales (regulación covalente y alostérica de las enzimas del metabolismo de esfingolípidos, dependiente o independiente de hormonas) y rutas de tráfico de los esfingolípidos hasta la membrana plasmática.

Con respecto a la relación entre esfingolípidos y las MAP cinasas, estudios en *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus fumigatus* han reportado que existe una regulación del metabolismo de esfingolípidos a través de una vía de MAP cinasas [Yamaguchi et al, 2017; Fabri et al, 2019]. Recientemente se encontró en *Arabidopsis* que MPK6 es capaz de fosforilar a la subunidad LCB1 de la SPT en respuesta a patógenos [Li et al, 2023]. En *Arabidopsis*, se ha descrito que las MAP cinasas MPK3, MPK4 y MPK6 son activadas en respuesta al estímulo de bajas temperaturas y pueden fungir como reguladores positivos [Teige et al, 2004; Kim et al, 2017] o negativos [Li et al, 2017; Zhao et al, 2017] de la tolerancia a la congelación según la cinasa, la edad de la planta y la duración del tratamiento. Como los resultados anteriores indicaban un efecto de la MPK3 y MPK6 asociado a los contenidos de esfingolípidos de la membrana plasmática y contando con la enorme ventaja de determinar el conocimiento detallado de los esfingolipidomas de las membranas plasmáticas de las plantas wt y de las líneas carentes de MPK3 y MPK6, tanto no aclimatadas como aclimatadas al frío, nos dispusimos a escudriñar las características de las 114 especies diferentes de esfingolípidos identificados.

El análisis cuantitativo había revelado que la relación de LCB insaturadas/LCB saturadas en los esfingolípidos membranales de las plantas aclimatadas, con respecto a sus controles correspondientes, la aclimatación aumentaba 1.3 veces en *mpk3* y 1.5 veces en *mpk6*, no observándose cambios en las plantas wt (Fig. 35B). Este patrón de aumento de LCB insaturadas ya se había observado en avena, centeno y *Arabidopsis* bajo diversos tratamientos de aclimatación [Imai et al, 1997; Minami et al, 2008; Takahashi et al, 2016]. En el caso de la relación de LCB trihidroxiladas/LCB dihidroxiladas, no se encontró modificación tras la aclimatación en ninguno de los genotipos (Fig. 35A). No obstante, es importante señalar que la mutante *mpk6* presentó una relación de LCB trihidroxiladas/LCB dihidroxiladas sólo 0.4 veces el valor obtenido en los demás genotipos. Esta menor relación de LCB trihidroxiladas/LCB dihidroxiladas ya se había

encontrado en la mutante *sbh1-1* (incapaz de expresar la isoforma 1 de la hidroxilasa de LCBs, SBH1) [Cano-Ramirez et al, no publicado]. Aunque en la mutante *mpk6* no se encontró ninguna disminución de los niveles de transcritos de *SBH1* comparado con la planta wt, sí se encontró una mayor transcripción de la isoforma 2 (*SBH2*), la cual se ha reportado no ser tan activa como la SBH1 [Chen et al, 2008]. Este aumento de transcripción de *SBH2* y su menor actividad enzimática podrían explicar la diferencia observada en la mutante *mpk6*. Las implicaciones de los contenidos cuantitativos diferenciales de las especies esfingolípídicas que portan estos cambios químicos reflejan no solo la influencia de las MPK3 y MPK6 en una regulación del metabolismo de esfingolípidos, sino en las propiedades de la membrana, como se discute más adelante.

Al analizar los ácidos grasos de los esfingolípidos, la relación de FA insaturados/FA saturados mostró el mismo patrón que en las LCB insaturadas/LCB saturadas, es decir, la aclimatación produjo un aumento en la relación de 1.2 veces en *mpk3* y 1.3 veces en *mpk6*. Igualmente, tampoco se observó una modificación en esta relación en las plantas wt (Fig. 34A). El aumento en las insaturaciones en ácidos grasos es un efecto bien establecido en los lípidos membranales como estrategia para fluidificar la membrana plasmática [Dong et al, 2016; Barrero-Sicilia et al, 2017]. Chen et al (2012) ya habían observado que la insaturación de la BCL en la posición $\Delta 8$ era importante en la aclimatación a bajas temperaturas, pero en este trabajo de tesis, adicionalmente estamos encontrando que la insaturación de la cadena acílica de la LCB es relevante en la regulación de la fluidez de la membrana plasmática y que en esto hay una contribución de la MPK3 y MPK6 durante la señalización por frío. Sin embargo, la MPK3 y MPK6 no parecen afectar la relación de FA hidroxilados/FA no hidroxilados tras la aclimatación en ninguno de los genotipos. No obstante, resultó interesante que esta relación resultó 1.6 veces mayor en las mutantes *mpk3* y *mpk6* sin tratamiento, comparadas con la planta wt NA (Fig. 34B). Este aumento fue consistente con el aumento en los niveles de transcrito de *FAH1* encontrado en las plantas *mpk3*. Empero, no se encontró ningún aumento de estos transcritos en la *mpk6* (Fig. 26A), lo cual sugiere que existe algún mecanismo de regulación postranscripcional. Al comparar la relación de los VLCFA/LCFA, no se encontró ninguna modificación en los tres genotipos tras la aclimatación. Sin embargo, la relación fue constitutivamente menor en la mutante *mpk6*, representando únicamente el 0.71 de los otros genotipos (Fig. 34A). Esto último es consistente con la existencia en *Arabidopsis* de tres ceramidas sintetasas, LOH1 y LOH3, que tienen preferencia por los VLCFA y LOH2 que escoge LCFA [Markham et al, 2011].

En este punto es oportuno mencionar que los esfingolípidos, además de formar parte de las membranas, tienen funciones de señalización [Saucedo-García et al, 2015; Hannun & Obeid, 2018]. Está bien establecido que precursores o intermediarios metabólicos de esfingolípidos complejos como la esfingosina, la esfingosina-1-fosfato (S1P) y la ceramida-1-fosfato (C1P) son capaces de activar cascadas de MAP cinasas en diferentes células eucariontes [Carpio et al, 1999; Kozawa et al, 2000; Schmelzle et al, 2002; Van Brocklyn et al, 2002; Seitz et al, 2005; Tanigawa et al, 2012]. En plantas, se ha encontrado que el incremento de la LCB esfinganina (d18:0) lleva a la activación de MPK6, lo cual es necesario para activar la muerte celular programada (PCD) en la defensa contra patógenos [Saucedo-García et al, 2011; Saucedo-García et al, 2023]. Además, Dutilleul et al. (2012) encontraron que la fitoesfingosina-1-fosfato (PHS-P) es crítica en la respuesta a las bajas temperaturas, ya que su incremento controla la transcripción de diversos genes de respuesta a frío, además de inducir la activación de la MPK6 desde los primeros minutos de exposición a bajas temperaturas. Por lo cual, estas LCBs podrían provenir de la degradación de los esfingolípidos, lo cual es consistente con el aumento en la transcripción de *NCER2* tras la aclimatación en plantas *wt* y *mpk6*. Sin embargo, en la planta *mpk3* no se observó este efecto, lo cual indica la importancia de la activación de MPK3 como regulador de la señalización por LCB libres durante la aclimatación al frío. Se ha demostrado que, durante el estrés por frío, el inhibidor de Bax-1 (BI-1, supresor de muerte celular localizado en retículo endoplásmico) puede regular la actividad de las enzimas FAH1, FAH2, SLD1 y SBH2, modificando así la síntesis de esfingolípidos [Nagano et al, 2014]. Consistentemente, en mutantes knock-out de *BI-1* se encontró un aumento en la transcripción de *FAH1*, *FAH2*, *SLD1* y *SBH2*. Además, se encontró que los niveles de transcripción de *BI-1* presentaron un gran incremento tras 72 h de tratamiento a 4 °C [Nagano et al, 2014]. Bajo el mismo argumento, se encontró que en plantas sobreexpresoras de *BI-1* suprimían la activación de MPK6 dependiente del contenido de Ca²⁺ citosólico [Yue et al, 2012]. Esto podría explicar el incremento encontrado en la expresión de los genes *FAH1* y *SBH2* en las mutantes carentes de MPK6 tras la aclimatación al frío (Fig. 26H,K). Todos estos resultados sugieren fuertemente que tanto MPK3 como MPK6 están involucradas de manera diferencial en la regulación del metabolismo de esfingolípidos, probablemente fosforilando y/o interactuando con la subunidad LCB1 de la SPT en temperaturas normales y también actuando como reguladores negativos de la transcripción de algunos genes involucrados en el metabolismo de esfingolípidos en respuesta a las temperaturas de aclimatación. No puede descartarse que MPK3 y MPK6 estén implicadas en los mecanismos regulatorios de las proteínas ORM y de las subunidades pequeñas sobre la actividad de la SPT, posibilidad que no fue explorada en este trabajo.

2. La MPK6 regula la fluidez de la membrana plasmática a través de la modificación de su composición durante la aclimatación al frío

La membrana plasmática (MP) es una bicapa lipídica que separa la célula del entorno exterior, dándole identidad, autonomía en su organización y capacidad de interaccionar bidireccionalmente de manera específica con su entorno. Ya que la movilidad de las plantas es restringida, la supervivencia de las plantas bajo diferentes estreses bióticos y abióticos depende en gran medida de las respuestas dinámicas en las que participa la MP [Cassim et al, 2019; Cassim & Mongrand, 2019]. Se ha reportado que la composición lipídica de la MP influye en sus propiedades como la fluidez y la permeabilidad, además de que también modula las interacciones entre los componentes de la membrana y en las vías de señalización que parten de ella [Wang & Li, 2017; Raghunathan & Kenworthy, 2018; Cao, 2019; Cano-Ramirez et al, 2021].

En este estudio se encontró que las MPs de las plantas wt AC presentaban valores de fluidez mayores comparadas con los de las MPs de las plantas wt NA medidas a 5, 9, 15, 21 y 29 °C (Fig. 24A). El mismo comportamiento se observó al comparar las MPs de las plantas *mpk3* NA y AC, no obstante, el incremento en la fluidez membranal fue aún mayor en esta mutante (Fig. 24B). Por otra parte, no se encontró ninguna modificación del nivel de fluidez entre las membranas NA y AC de la mutante *mpk6*, aunque sí con respecto a las plantas wt (Fig. 24C). Se ha demostrado que las plantas aumentan los niveles de insaturación de las cadenas acílicas de sus diferentes lípidos membranales en condiciones de bajas temperaturas con el fin de aumentar la fluidez de la membrana plasmática [Guschina & Harwood, 2006; Tarazona et al, 2015; Barrero-Sicilia et al, 2017]. Nuestro estudio demostró que los niveles de insaturación de las LCB y de los ácidos grasos provenientes de los esfingolípidos membranales no se modificaron en la planta wt tras la aclimatación (Fig. 34C, 35B). No obstante, la disminución de la fluidez membranal observada se podría explicar por los niveles de insaturación presentes en los glicerolípidos, para los cuales se ha demostrado la insaturación de los ácidos grasos tras la aclimatación [Welti et al, 2002; Zheng et al, 2011; Raju et al, 2018]. El incremento observado en la fluidez de la MP de *mpk3* AC es consistente con el hecho de que en esta mutante sí se encontró un mayor número de insaturaciones tanto en los ácidos grasos como en las LCBs de sus esfingolípidos (Fig. 34C, 35B).

Por el otro lado, la falta de incremento en la fluidez en la MP de *mpk6* AC se podría deber a que, si bien presentaron un aumento en el número de insaturaciones en los ácidos grasos y en las LCB (Fig. 34C, 35B), estas membranas ya tenían desde antes de la aclimatación un mayor

contenido de esfingolípidos, el cual no disminuyó tras la aclimatación (Fig. 32). Estos resultados indican que los esfingolípidos contribuyen negativamente a la fluidez membranal y que pueden hacerlo a través de dos mecanismos, el primero, a través de un incremento de su contenido en la membrana y en casos más extremos, a través de mantener la saturación de sus LCBs y sus FAs. Sin embargo, es necesario ahondar en el análisis de especies o esfingolípidos que puedan contribuir también al decremento en la fluidez membranal. Por todo lo anterior, la regulación negativa de la MPK6 sobre el metabolismo de esfingolípidos a través de la transcripción de varios de sus genes es necesaria para incrementar la fluidez membranal durante la aclimatación al frío. Lo anterior es un proceso fundamental para conceder la observada tolerancia a la congelación en *Arabidopsis*, evidenciada por la hipersensibilidad a la congelación de la línea *mpk6*, según los fenotipos que fueron determinados en este trabajo (Fig. 15, 16).

3. La fluidez de la membrana plasmática regula la actividad de la ATPasa de H⁺ durante la aclimatación al frío

Una membrana funcional en cualquier escenario ya sea de normalidad o de estrés, es fundamental para la vida celular. La adecuada fisiología de la membrana está directamente relacionada con la estructuración de su bicapa lipídica y con las proteínas embebidas en ella. La ATPasa de H⁺ de la MP es considerada la enzima maestra de las membranas plasmáticas de plantas, ya que al bombear H⁺ del citosol al apoplasto a expensas de la energía de la hidrólisis de ATP, no sólo regula la actividad de los transportadores secundarios, sino que ella misma mantiene la diferencia de pH entre el citosol y el apoplasto, controlando así el alargamiento y nutrición celulares y la apertura de estomas [Auer et al, 1998; Palmgren y Harper, 1999]. Se ha demostrado que la actividad de esta enzima puede ser modificada por muchos factores, entre ellos las hormonas, el calcio, la luz, el ambiente lipídico y las señales derivadas de estreses bióticos y abióticos [Ligaba et al, 2004; Liu et al, 2009; Xue et al, 2016; Haruta et al, 2017; Jakubowska & Janicka, 2017; Ando & Kinoshita; 2018; Havshøi & Fuglsang, 2022].

El hecho de que la actividad de la ATPasa de H⁺ sea sensible a los lípidos que la rodean [Kasamo, 2003; Morales-Cedillo et al, 2015; Lapshin et al, 2021] y teniendo el resultado de que nuestras mutantes en *MPK3* y en *MPK6* presentaban claras modificaciones en la composición de esfingolípidos en condiciones de aclimatación, nos abocamos a estudiar a la ATPasa de H⁺ en nuestro modelo de aclimatación. Se había establecido, por una parte, que los esfingolípidos tenían influencia en la actividad de la ATPasa de H⁺ [Morales-Cedillo, 2012] y, por otra parte, que en las

plantas wt la actividad de la ATPasa de H^+ disminuía un 40 % tras ser aclimatadas, patrón que se replicaba con mayor intensidad en la mutante *mpk3*. No obstante, no se encontró disminución alguna tras la aclimatación en la mutante *mpk6* (Fig. 19) [Peña-Moral, 2015]. Muzi et al. (2016) encontró en las plantas wt un comportamiento similar, pero únicamente a tiempos cortos de estrés por frío (5 h), y posteriormente descubrió un aumento de la actividad hasta las 18 h, condiciones experimentales diferentes a las nuestras, pero que ponían en evidencia que esta enzima es particularmente sensible a las condiciones en que se lleva a cabo el proceso de aclimatación. La disminución de la actividad de la ATPasa de H^+ durante la aclimatación al frío podría ser debido a un mecanismo natural de la planta para salvaguardar el ATP que tiene disponible y utilizarlo en otros mecanismos que le permitan la sobrevivencia ante el frío y la congelación, lo cual explicaría la hipersensibilidad al congelamiento que tienen las plantas *mpk6*, las cuales son incapaces de disminuir la actividad de sus ATPasas de H^+ de la MP (Fig. 15, 19).

Con el propósito de entender las diferencias de actividad en la ATPasa de H^+ encontradas en las plantas de los tres genotipos, se llevó a cabo un estudio cinético. Ya que un estudio cinético contribuye a conocer a través de la catálisis de la enzima, sus características como velocidad, afinidad por el sustrato, cooperatividad, etc., por lo cual quisimos obtener más información sobre la naturaleza de los efectos de la ausencia de MPK3 y MPK6 y la aclimatación al frío analizando la actividad de la enzima. Realizamos el análisis utilizando múltiples modelos cinéticos, encontrando que el modelo al que mejor se ajustaban los datos era el de Michaelis-Menten (Tabla 7). De las constantes catalíticas obtenidas, la V_{max} aumentada en *mpk3* NA y *mpk6* AC reveló ser un contribuyente importante en el comportamiento de las actividades previamente observadas (Fig. 20, Tabla 7). Ya que la V_{max} es una constante catalítica asociada a la cantidad de enzima, estas diferencias sugerían que podría existir una correlación con la abundancia de esta enzima en la membrana plasmática de los diferentes genotipos y en los diferentes tratamientos, por lo que se estimó la cantidad total de esta enzima por medio de una inmunodetección. Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia entre la cantidad total de ATPasa de H^+ presente en las membranas (Fig. 22). Una explicación alternativa era que, aunque existiera la misma cantidad de enzima, esta podría estar constituida por diferentes isoformas o por la existencia de alguna combinación de las 11 diferentes isoformas reportadas para la ATPasa en Arabidopsis [Harper et al, 1989; Gaxiola et al, 2007]. Una diferencia adicional obtenida en los estudios cinéticos fue que la K_m obtenida en la *mpk6* AC era significativamente menor a las obtenidas para los demás genotipos y condiciones, lo cual sugería que existía una isoforma diferente en esta condición (Tabla 7). Por tanto, se decidió

analizar los niveles de transcripción de los genes *AHA1*, *AHA2* y *AHA3* de la ATPasa de H⁺, los cuales son los tres genes mayoritariamente expresados en hoja [Haruta et al, 2010]. En este estudio robusto, que incluyó tres genes de referencia, bajo las condiciones sin tratamiento (plantas NA), se encontró que la ausencia de MPK3 disminuía únicamente los niveles de expresión de *AHA1*, constituyéndose así la MPK3 como un regulador positivo de la expresión de este gen (Fig. 21). Pero en las condiciones de AC, MPK3 actuaba como regulador negativo de la expresión de *AHA1*. En el caso de *AHA2*, la exposición al frío aumentó sus niveles de expresión en todos los genotipos; sin embargo, la expresión fue significativamente menor en las mutantes, indicando que MPK3 y MPK6 inducen una mayor expresión de *AHA2* durante la aclimatación. Por otro lado, para *AHA3* no se encontró modificación alguna en sus niveles de expresión de todos los genotipos en ambas condiciones (Fig. 21). Estos resultados en conjunto son muy interesantes, pues revelan que la aclimatación al frío regula selectivamente la expresión de dos de los tres genes de las isoformas de la ATPasa de H⁺ más abundantes en hoja y que la MPK3 y la MPK6 participan de manera diferenciada en esta expresión, por lo que su efecto no es redundante. Se sabe que otras cinasas como las del tipo receptor cinasa rico en leucina (PSY1R), el receptor cinasa FERONIA (FER), el receptor cinasa FLS2, la proteína cinasa 5 tipo 2 supersensible a la sal (PKS5) y las cinasas transmembranales 1 y 4 (TKM1/TKM4) regulan a las AHAs [Fuglsang et al, 2007; Nühse et al, 2007; Fuglsang et al, 2014; Haruta et al, 2014; Lin et al, 2021]. Sin embargo, nuestro trabajo permite por primera vez el involucramiento de las MAP-cinasas en su regulación.

Dado que los niveles de transcripción de los genes homólogos de la ATPasa de H⁺ no correspondían con las diferencias de las constantes catalíticas encontradas para la enzima de los tres genotipos en condiciones control o de aclimatación, aún existía la posibilidad de una regulación postraducciona de la ATPasa de H⁺ mediante una fosforilación/desfosforilación de la enzima o mediante interacción con otras proteínas. Se analizaron los niveles de las proteínas 14-3-3 presentes en la MP, ya que se conoce que estas proteínas pueden interactuar con la ATPasa de H⁺ fosforilada con el fin de estabilizar la forma activa de esta enzima [Jahn et al, 1997]. Nuestros resultados de inmunodetección no mostraron diferencias en la abundancia de la proteína 14-3-3 entre los diferentes genotipos bajo ambas condiciones (Fig. 23). Sin embargo, debido a que el anticuerpo usado reconoce múltiples isoformas, es posible que haya escapado a nuestra detección alguna de las 13 que pudiera estar asociada a una regulación diferencial de la ATPasa de H⁺ bajo la aclimatación en alguno de los genotipos. Si bien tratamos de determinar los niveles de las isoformas de las proteínas 14-3-3, la alta identidad de sus secuencias no permitió diseñar los

oligonucleótidos necesarios. Aún así, sería necesario realizar un ensayo que nos permitiera detectar una interacción directa entre las proteínas 14-3-3 con la ATPasa de H^+ de la MP.

Recientemente se reportó que la ATPasa de H^+ podría ser fosforilada directamente por la MPK6 en *A. thaliana* y en manzana, en respuesta a estrés biótico y abiótico [Guo et al, 2020; Sun et al, 2023]. La ATPasa de H^+ tiene múltiples sitios de fosforilación, de los cuales, algunos activan y otros inhiben esta enzima [Falhof et al, 2015], por lo que la(s) fosforilación(es) mediada(s) por MPK6 podrían explicar la disminución de actividad observada tras la aclimatación al frío, y la ausencia de este efecto en la mutante *mpk6* (Fig. 19).

Ya que los niveles de proteína 14-3-3 tampoco lograron explicar las diferencias en la actividad de la ATPasa de H^+ , se exploró si esta pudiera estar asociada a cambios en la fluidez de las membranas plasmáticas de las plantas de los tres genotipos obtenidas en condiciones control y de aclimatación. Se encontró en las plantas wt que la fluidez aumentaba tras la aclimatación. El mismo efecto se encontró en las plantas *mpk3*, aunque la fluidificación fue mayor; sin embargo, en el genotipo *mpk6* no se presentó ninguna modificación en la fluidez membranal tras la aclimatación (Fig. 24). Al graficar la fluidez de las membranas a 29 °C y la actividad de la ATPasa de H^+ , se evidenció un hecho importante: una correlación inversa entre la magnitud de la fluidez membranal y la actividad de la ATPasa de H^+ (Fig. 25) [Ponce-Pineda et al, 2021]. De esta manera, quedaba claro que los efectos de la aclimatación, la actividad de la enzima, la presencia de MPK6 y la fluidez de la membrana plasmática estaban relacionados, lo cual condujo a profundizar en la sensibilidad de la actividad de la ATPasa de H^+ al ambiente lipídico, el cual es un factor fundamental que regula la fluidez membranal.

Ya que no sólo la cantidad, sino también la composición de esfingolípidos de la membrana plasmática modifican la fluidez membranal [Cano-Ramírez et al, 2021], se analizó la posibilidad de que la ATPasa de H^+ pudiera estar regulada por la modificación de su ambiente de esfingolípidos, los cuales son componentes principales de la membrana plasmática de las plantas y que además promueven una rigidez membranal [Sperling et al, 2005; Markham et al, 2013; Cacas et al, 2016; Cano-Ramírez et al, 2021]. Esta propuesta se había hecho ya en un trabajo del laboratorio previo, en el que mutantes en genes codificantes de las subunidades de la SPT mostraban diferencias en la actividad de la ATPasa de H^+ (Morales-Cedillo, 2012). En consonancia con esta propuesta, hay que mencionar que, en los últimos años, se ha desarrollado la hipótesis de que la membrana plasmática de plantas está estructurada de manera muy ordenada,

conformada por la coexistencia de fases líquido-desordenadas y líquido-ordenadas [Gronnier et al, 2017; Gronnier et al, 2018]. Las fases líquido-ordenadas, también llamadas nanodominios, se caracterizan por tener una magnitud de los nanómetros cuadrados, un empaquetamiento ordenado, compacto y rígido de lípidos [Mongrand et al, 2004; Cacas et al, 2012; Takahashi et al, 2016]. Se ha sugerido que algunas proteínas membranales tienen preferencia específica por estos nanodominios, las cuales pueden integrarse o excluirse de esta fase con el fin de favorecer un mayor número de interacciones proteína-proteína o lípido-proteína y con esto modificar su actividad. Una manera de estudiar estos nanodominios es utilizando preparaciones membranales resistentes a detergentes (DRM), en donde se ha encontrado un enriquecimiento de proteínas específicas asociadas a nanodominios [Sezgin et al, 2017]. Entre estas proteínas se ha encontrado a la ATPasa de H^+ , a las acuaporinas, al homólogo de la proteína sinaptotagmina (SYT1) y algunas proteínas relacionadas con la endocitosis [Minami et al, 2008; Takahashi et al, 2013; Szymanski et al, 2015].

Nuestros resultados mostraron que, tras la aclimatación al frío, la membrana plasmática sufrió un incremento en la fluidez en las plantas wt y *mpk3* (Fig. 19), lo cual podría deberse o bien a la disminución de esfingolípidos en el *bulk* o cuerpo de la membrana en el que estarían incluidas las fases desordenada y ordenada. En el último caso, esto correspondería a una disminución en la abundancia de estos nanodominios en la MP, lo cual está de acuerdo con la disminución en la recuperación de proteínas provenientes de DRM de plantas de *Arabidopsis* aclimatadas por 7 días a 2 °C comparada con la de DRM sin aclimatación [Minami et al, 2009]. En estos experimentos, se encontraron las isoformas AHA1, AHA2, AHA4, AHA5, AHA6, AHA7, AHA9, AHA10 y AHA11 de la ATPasa de H^+ en los DRM; sin embargo, su abundancia no cambió entre las DRM provenientes de plantas aclimatadas y no aclimatadas. En estos mismos experimentos se encontró un enriquecimiento de más del 90 % de la ATPasa de H^+ en los DRM comparado con los niveles de la ATPasa de H^+ encontrados en la MP de las que provenían esos DRM [Minami et al, 2009]. A partir de lo anterior, se podría inferir que la mayor parte de la ATPasa de H^+ identificada en nuestras membranas estaría mayoritariamente en estos nanodominios, lo cual también explicaría por qué su abundancia no cambia tras la aclimatación al frío (Fig. 22), sugiriendo que lo que modifica sus constantes cinéticas sería el contacto con los esfingolípidos adyacentes, mismos que están enriquecidos en los nanodominios.

En consonancia con lo anterior, se ha demostrado que la actividad de la ATPasa de H^+ se modifica dependiendo de su co-localización en estos nanodominios. Experimentos en cultivos celulares con citocalasina D, un potente inhibidor de la polimerización de actina, y orizalina, un agente despolimerizante de los microtúbulos del citoesqueleto, produjeron una disminución en el contenido de la ATPasa de H^+ en DRM extraídos de estas células y esta disminución provocó diferentes efectos en la actividad de la ATPasa de H^+ . El tratamiento con citocalasina D incrementó la actividad de la ATPasa de H^+ en los DRM. Por el contrario, el tratamiento con orizalina generó una disminución de la actividad de esta ATPasa en los DRM [Szymanski et al, 2015]. Esto sugiere dos explicaciones: o bien *per se* las proteínas que constituyen el citoesqueleto están involucradas en la modificación de la actividad de la ATPasa de H^+ , o bien, y es lo más probable, la formación de nanodominios, influenciada por las fibras del citoesqueleto, están alterando el reparto de la enzima entre estos dominios ordenados y la fase desordenada de la membrana plasmática. Lo último está apoyado por la propuesta, cada vez con más apoyo experimental, de la existencia de corrales membranales delimitados por elementos del citoesqueleto [Leitner et al, 2000; Jaqaman et al, 2012]. En apoyo a lo anterior, se ha demostrado que el citoesqueleto está involucrado en la percepción al frío y la tolerancia a la congelación [Ma & Liu, 2019].

En DRM extraídos de plantas de centeno aclimatadas a 2 °C por 4 semanas se encontró un incremento en el contenido de la ATPasa de H^+ comparado con las plantas sin aclimatar. Este incremento se relacionó con el incremento de los esteroides y la regulación del potencial de membrana y el pH intracelular durante la aclimatación al frío [Takahashi et al, 2013]. Además, en DRM extraídos de *Arabidopsis* se encontró un enriquecimiento de GIPCs, GlcCers y Cers [Borner et al, 2005; Carmona-Salazar et al, 2021]. El incremento de estas clases de esfingolípidos se mantuvo después de la aclimatación al frío [Minami et al, 2009; Takahashi et al, 2016]. En el laboratorio se encontró que algunas especies de GlcCers podrían inhibir la actividad de la ATPasa de H^+ , mientras que algunas especies de GIPCs podrían activarla [Morales-Cedillo, 2015]. Considerando lo anterior, la disminución de la actividad de la ATPasa de H^+ observada en las plantas wt tras la aclimatación al frío se podría deber a los cambios en especies específicas de GlcCers y GIPCs (Fig. 36). En el caso de la disminución de la actividad de la enzima en las plantas *mpk3* AC podría explicarse por una compensación entre GIPCs y GlcCers, ya que ambas clases se incrementaron (Fig. 33A,B), produciendo al final, el mismo efecto que en las plantas wt.

Las plantas carentes de MPK6 claramente no aumentaron la fluidez de sus membranas tras la aclimatación, lo cual podría deberse al aumento encontrado en su contenido de esfingolípidos (Fig. 32). Este incremento podría favorecer un mantenimiento de los nanodominios de la MP, los cuales contendrían a la mayor parte del contenido total de la ATPasa de H⁺ encontrada en la MP (Fig. 22) y que explicaría la conservación de la actividad de la ATPasa de H⁺ observada en *mpk6* tras la aclimatación al frío (Fig. 19). Además, el incremento en GIPCs pero no en GlcCers en las membranas aisladas de las plantas *mpk6* en ambas condiciones contribuiría al mantenimiento de la actividad de la ATPasa (Fig. 33).

Todos estos resultados sugieren fuertemente que la MPK6 actúa como regulador negativo de la biosíntesis de esfingolípidos durante la aclimatación al frío, lo cual limita el contenido y la composición de esfingolípidos en la membrana plasmática y con ello, un aumento en la fluidez membranal y/o la preponderancia de especies específicas de esfingolípidos que favorecen un estado de la ATPasa de H⁺ con menor actividad.

4. La MPK6 está involucrada en el mantenimiento de la estructura del cloroplasto durante la aclimatación al frío

La fotosíntesis, principal proceso productor de la energía para la célula, es usualmente afectado por los estreses ambientales [Deng et al, 2003; Gururani et al, 2015]. Por ello, el mantenimiento de la integridad del cloroplasto y su funcionamiento normal son críticos para asegurar la sobrevivencia de la planta. Se ha reportado que existen modificaciones en los índices fotosintéticos, así como en la ultraestructura del cloroplasto durante la exposición a bajas temperaturas [Kutík et al, 2004; Liu et al, 2018; Gan et al, 2019].

Las condiciones de aclimatación a bajas temperaturas reportadas en la literatura son diversas, cayendo, la mayoría de ellas, en el intervalo de 2 h a 3 días [Hiraki et al, 2023; Ma et al, 2023]. En nuestro caso, el tiempo es largo, de una semana a 4 °C y fue seleccionado a través de ensayos de prueba/error en los que se evaluó la capacidad de aclimatación por una exposición subsecuente a un reto de congelación. Esto fue evaluado por el desempeño desplegado durante un periodo de recuperación. Este análisis fue una característica distintiva de nuestro trabajo, ya que los efectos de las bajas temperaturas en las plantas son usualmente valorados solo por exposiciones cortas tras de las cuales no se hace un seguimiento temporal [Ding et al, 2019; Maryan et al, 2023]. Este protocolo de aclimatación nos permitió evaluar la resistencia a la congelación. Tras la aclimatación de una semana a 4 °C, se tomaron las muestras de las hojas que revelaron que la expresión de

genes de enzimas del metabolismo de esfingolípidos, la composición de esfingolípidos membranales y su fluidez, además de la actividad de ATPasa estaban alterados dependiendo de la ausencia de MPK3 o MPK6. Sin embargo, las plantas lucían saludables, con las hojas amaratas en algunas partes y ligeramente de menor tamaño que las controles mantenidas ese tiempo a 22 °C. Por ello era relevante observar la estructura de las células del mesófilo de las hojas, atendiendo en particular la de los cloroplastos. Su gran tamaño permite apreciar la compleja organización de sus tres membranas y detectar posibles cambios tras la aclimatación al frío. El análisis ultraestructural de los cortes de hojas de las plantas de los genotipos utilizados en ambos tratamientos por medio de microscopía electrónica de transmisión (MET) reveló que tanto MPK3 como MPK6 son primordiales en la conservación de la anatomía del cloroplasto durante la aclimatación al frío (Fig. 18). Nuestros resultados indicaron que tanto MPK3 como MPK6 participan en un proceso de autofagia que se desarrolla durante el proceso de aclimatación y que, hipotetizamos, estaría propiciando un recambio de las células/cloroplastos averiados que resultan como daño colateral del tratamiento a 4 °C. Específicamente, nuestros resultados indicaron que la MPK3 es importante para prevenir o al menos retrasar la autofagia de la célula, mientras que la MPK6 aparentemente es requerida para permitir la internalización de los cloroplastos en la vacuola, paso necesario en la clorofagia [Zhuang & Jiang, 2019; Saucedo-García et al, 2021]. Esto sería implementado a través de la acción de la cinasa MKK4, la cual se encontraría corriente arriba de la MPK3 o MPK6 y que contiene un péptido señal de importación al cloroplasto, en donde podría fosforilar/activar tanto a MPK3 como MPK6 con el fin de regular proteínas involucradas en la muerte celular [Samuel et al, 2008; Shao et al, 2020]. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado evidencia de una posible translocación de MPK3 o MPK6 al cloroplasto. Estos resultados contribuyen a fortalecer las exiguas evidencias que asocian a la autofagia como un proceso de auxilio en la exposición al frío [Wang et al, 2022]. Es importante destacar que la funcionalidad del cloroplasto no se vio comprometida a pesar de los cambios estructurales observados tanto en las condiciones control como de aclimatación en los cuatro genotipos. Lo anterior revela el grado de preservación funcional de los complejos fotosintéticos [Saucedo-García et al, 2021].

Los niveles de fosforilación de las proteínas tilacoidales modulan el reordenamiento de la red membranal y el apilamiento de los grana que son esenciales para la función fotosintética [Wunder et al, 2013]. Las mutantes carentes de función de las proteínas cinasas STN7 y STN8 incrementaron en el tamaño del grana, generado por una menor fosforilación de las proteínas tilacoidales

[Armbruster et al, 2013; Wunder et al, 2013]. Este efecto del mayor tamaño del grana se encontró tras la aclimatación en las plantas carentes de MPK3 y con mayor intensidad en las plantas carentes de MPK6, pero no en las wt AC (Fig. 18), sugiriendo un papel regulatorio de MPK3 y MPK6 en la remodelación de las membranas tilacoidales durante la aclimatación al frío. Quizás esto podría ser resultado de la presencia de la proteína COR15a, una proteína intrínsecamente desordenada cuya función hipotética es la de ser capaz de plegarse e internalizarse en el cloroplasto en respuesta a las bajas temperaturas. La introducción de COR15a y su anclaje en la membrana interna del cloroplasto le daría un efecto de protección muy útil a temperaturas bajo cero para evitar su ruptura [Thalhammer & Hinch, 2014] y quizás evitando su implicación en la formación de la fase hexagonal II, la cual conduce a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática durante la congelación. Se conoce que la transcripción del gen *COR15a* está regulado por los factores de transcripción CBF, los cuales a su vez se encuentran regulados por múltiples factores de transcripción [Wang & Hua, 2009]. Entre estos factores de transcripción se encuentran ICE1 y MYB15, los cuales se sabe que son fosforilados por MPK3 y/o MPK6 como respuesta a las bajas temperaturas [Kim et al, 2017; Li et al, 2017; Zhao et al, 2017].

Otra posible explicación de las modificaciones observadas en la estructura del cloroplasto durante la aclimatación al frío es la del mantenimiento del fototropismo. Se ha encontrado que las fototropinas responden a los cambios de temperatura, provocando que a 5 °C los cloroplastos se muevan hacia la periferia celular con el fin de evitar la luz, en un fenómeno denominado respuesta elusiva del frío o respuesta de posicionamiento al frío [Łabuz et al, 2015; Fujii et al, 2017; Fujii et al, 2020]. Estas fototropinas, aparte de localizarse en el cloroplasto, pueden estar en diferentes compartimentos celulares como el citosol, el aparato de Golgi o la membrana plasmática. En *Marchantia polymorpha* se encontró que estas fototropinas pueden localizarse en la membrana plasmática en respuesta a frío [Hirano et al, 2022], las cuales podrían inhibir la fosforilación de la ATPasa de H⁺ de la MP [Hohm et al, 2014], generando así la menor actividad observada de esta ATPasa (Fig. 19). La desregulación del metabolismo de esfingolípidos producida por MPK6 durante la aclimatación al frío también podría estar involucrada en la respuesta de los cloroplastos. Anteriormente ya se había sugerido que existían esfingolípidos en las membranas del cloroplasto; sin embargo, hasta este año se publicó un reporte al respecto [Poincelot, 1973; Yang et al, 2024]. No obstante, actualmente no existen datos suficientes para relacionar a los esfingolípidos del cloroplasto con su vacuolización en respuesta a frío.

5. La MPK6 es una enzima crucial en la aclimatación de la planta al frío y en su tolerancia al congelamiento

Las temperaturas frías y congelantes son condiciones ambientales naturales a las cuales se enfrentan constantemente las plantas. Estas temperaturas se generan ya sea por cambios diurnos/nocturnos o por fluctuaciones estacionales; sin embargo, la intensidad y duración de estas temperaturas se han incrementado debido al cambio climático global [Ansari et al, 2023]. El daño por frío se manifiesta con severidad cuando existe una caída rápida de la temperatura, no obstante, una disminución gradual de la temperatura puede favorecer en algunas plantas de clima templado la activación del proceso conocido de aclimatación al frío. Esta disminución gradual de la temperatura ambiental permite la ocurrencia gradual de múltiples eventos de señalización que conducen a adecuaciones metabólicas y de expresión génica que preparan a la planta para adquirir una tolerancia a temperaturas congelantes posteriores [Thomashow, 1999; Chinnusamy et al, 2010; Wani & Herath, 2018; Zhu et al, 2022].

Las evidencias experimentales recabadas y descritas en las secciones anteriores de esta discusión, nos mostraron que, durante el periodo de aclimatación, existe una activación de MPKs que produce múltiples modificaciones en la planta. Entre estas modificaciones se encuentran los cambios en la composición y contenido de los esfingolípidos en la membrana plasmática, la modificación de los niveles de transcripción de genes involucrados en el metabolismo de esfingolípidos, modificaciones en la fluidez membranal y en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, así como modificaciones en la integridad de los cloroplastos y su ordenamiento interno. Bajo este contexto, quisimos ver el impacto de esos cambios en la respuesta de las plantas de los tres genotipos a un reto de -15 °C por 80 min y así evaluar su tolerancia a la congelación. Se encontró que ninguno de los genotipos estudiados fue capaz de sobrevivir sin una previa aclimatación. Así, la aclimatación incrementó aproximadamente 70 % la sobrevivencia tanto de las plantas wt como de las plantas carentes de MPK3. No obstante, las plantas del genotipo *mpk6* mostraron una incapacidad de aclimatación eficaz, ya que se observó una sobrevivencia al congelamiento de tan solo un 20 %, aún después de la aclimatación (Fig. 15, 16). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en el laboratorio [Cano-Ramirez, 2014], apuntando ahora a MPK6 como un regulador positivo de la tolerancia a la congelación. Sin embargo, estos resultados no coinciden con algunos de los reportados en la literatura [Li et al, 2017; Zhao et al, 2017], ya que estos grupos encontraron que las plantas mutantes aclimatadas al frío *mpk3-1* (SALK_151594), *mpk3-2* (SALK_100651), *mpk6-3* (SALK_127507) y *mpk6-4*

(SALK_062471) mostraron una mayor sobrevivencia tras un reto de congelación. En estos reportes se encontró que tanto MPK3 como MPK6 son capaces de fosforilar al factor de transcripción ICE1 con el fin de turnarlo a degradación. ICE1 es necesario para activar la respuesta a las temperaturas congelantes, por lo que MPK3 y MPK6 funcionarían como reguladores negativos de la tolerancia a la congelación. No obstante, Kim et al (2017) encontró que la planta sobreexpresora de MYB15 (MYB15 OX) aclimatada aumentaba su sensibilidad ante la congelación, y esta sensibilidad aumentaba mucho más en la planta sobreexpresora de MYB15 incapaz de ser fosforilada (MYB15^{S168A} OX). En este estudio se demostró que MPK6 era la cinasa encargada de fosforilar al represor transcripcional MYB15 en la S168. Una vez fosforilado, MYB15 pierde afinidad por el promotor de CBF3, permitiendo su transcripción y con esto la activación de la respuesta a las temperaturas congelantes. Esto último, fortalecería el concepto del papel de MPK6 como regulador positivo de la tolerancia a la congelación.

Las discrepancias entre los resultados encontrados en la literatura y los nuestros podrían explicarse debido a que Li et al (2017) y Zhao et al (2017) utilizaron plántulas de 10 a 14 días de edad, Kim et al (2017) utilizaron plantas de 3 semanas de edad y nosotros utilizamos plantas adultas de 10 a 12 semanas de edad. Además, los tratamientos de aclimatación y congelamiento se realizaron a diferentes temperaturas y diferentes tiempos de exposición en las plántulas. Li et al (2017) aclimataron plántulas de 14 días de edad a 4 °C por 3 días y posteriormente iniciaron el tratamiento de congelación a 0 °C, disminuyendo 1 °C cada hora hasta alcanzar los - 8 °C, donde se mantuvieron a esta temperatura por otra hora más. Zhao et al (2017) aclimataron plántulas de 10 días de edad a 4 °C por 7 días y posteriormente iniciaron el tratamiento de congelación a 4 °C, disminuyendo 1 °C cada hora hasta alcanzar los - 7 °C, donde se mantuvieron 1 h y posteriormente regresaron a 4 °C aumentando la temperatura 2 °C cada hora. Kim et al (2017) aclimataron plantas de 3 semanas de edad a 4 °C por 1 h y posteriormente iniciaron el tratamiento de congelación a - 8 °C por 2 h. En comparación, nosotros trabajamos con plantas adultas de 10 a 12 semanas de edad, las cuales se aclimataron a 4 °C por una semana y posteriormente se inició el tratamiento de congelación a - 15 °C por 80 min. Al respecto, se ha demostrado que el efecto y la respuesta a diferentes estímulos ambientales depende de la edad de la planta y de la duración e intensidad del tratamiento térmico [Leuendorf et al, 2020].

También se evaluaron los efectos de la aclimatación a través de la determinación de la integridad membranal, misma que se estimó por medio de la medición de la fuga de electrolitos

posterior al reto de congelación. Se encontró que, tras la aclimatación, tanto las plantas wt como las mutantes *mpk3* disminuyeron su fuga de electrolitos, lo que no ocurrió en las plantas *mpk6*, en las que no se encontró modificación alguna en los niveles de fuga de electrolitos aun tras la aclimatación, lo cual concuerda con la ausencia en la modificación de la cantidad de esfingolípidos presentes en la membrana plasmática, la ausencia de fluidificación de esta membrana, la falta de modificación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática y por supuesto, con la ausencia de MPK6 (Fig. 17, 19, 24, 32).

En conjunto, esta tesis indica el papel crítico de la MPK6 como regulador positivo en el proceso de aclimatación al frío de la planta, el cual es fundamental para conceder una posterior resistencia al congelamiento. La importancia de esta enzima se da a través de un mecanismo que implica la activación de MPK6 en respuesta a frío, donde esta actúa como regulador transcripcional y postraducciona l de las enzimas involucradas en el metabolismo de esfingolípidos, lo cual modifica la cantidad y composición de los esfingolípidos presentes en la membrana plasmática y a su vez, hace más fluida la membrana plasmática disminuyendo la actividad de la ATPasa de H⁺. Además, la MPK6 también podría alterar la composición de esfingolípidos presentes en la membrana tilacoidal o modificar la transcripción de genes que codifican para algunas proteínas cloroplásticas, como COR15a, lo cual permitiría el recambio y mantenimiento de los cloroplastos de las células del mesófilo tras la aclimatación al frío.

CONCLUSIONES

1. La actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática está regulada negativamente por la fluidez membranal, la cual depende de la temperatura ambiental. En la aclimatación al frío, la actividad de la ATPasa de H^+ disminuye gracias a una respuesta de aumento en la fluidez membranal, promovido por una disminución en el contenido de esfingolípidos y del cual es responsable la MPK6.
2. Bajo condiciones óptimas de temperatura en *A. thaliana* (22 °C), la(s) cascada(s) de MAPKs que contiene(n) a MPK3 y/o MPK6 son mantenidas activas constitutivamente. Esta activación basal constitutiva puede conducir a la fosforilación de uno o más factores de transcripción dependiendo de la MAP cinasa. Lo anterior resulta en una regulación negativa sostenida de la expresión de genes codificantes de enzimas de las rutas de biosíntesis o degradación de esfingolípidos, preservando su nivel basal en la membrana plasmática y con ello, un nivel moderado de fluidez para favorecer un estado de alta actividad en la ATPasa de H^+ .
3. A temperaturas bajas (4 °C), que inducen la aclimatación, la señal de frío percibida por la célula (posiblemente en la membrana plasmática), es transmitida por uno o varios transductores que activa(n) cascada(s) de MAPKs, fosforilando y activando a la MPK6, que activa a algún factor de transcripción. Este inhibiría la expresión de genes codificantes de enzimas de la ruta de biosíntesis de los esfingolípidos, disminuyendo en general los niveles de las enzimas correspondientes y permitiendo la expresión de desaturasas. Se generaría así una menor cantidad de esfingolípidos en la membrana plasmática, conducente a una mayor fluidez membranal y a una modificación del ambiente lipídico de la ATPasa de H^+ , disminuyendo su actividad. Adicionalmente, la MPK6 contribuye al recambio de los cloroplastos dañados por la baja temperatura y a mantener la integridad del sistema tilacoidal.
4. A través de todos estos mecanismos de acción, la MPK6 resulta fundamental en el proceso de aclimatación que conduce a la tolerancia a la congelación como queda demostrado por la hipersensibilidad a bajas temperaturas de la mutante carente de MPK6 y la tolerancia de la mutante sobreexpresora.

CONTRIBUCIONES

La información experimental recabada nos permite establecer varios hallazgos importantes que no se han descrito en la literatura y que son contribuciones relevantes en varios campos de la biología molecular de las plantas:

- 1) La participación de MPK3 en:
 - a) La regulación de la actividad de la ATPasa de H^+ a temperaturas normales de crecimiento.
 - b) La regulación de la transcripción de los genes *LCB1*, *LOH2*, *LOH3*, *SBH1*, *SLD2*, *FAH1*, *GCS*, *ACER* y *NCER2*.
 - c) El mantenimiento de una mayor fluidez membranal ante temperaturas de aclimatación al frío.
- 2) La participación fundamental de la MPK6 en:
 - a) La regulación de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática a través del control del contenido de esfingolípidos y de la fluidez de la bicapa lipídica.
 - b) La regulación del metabolismo de esfingolípidos a través de un control transcripcional y probablemente postraducciona que se refleja en la composición de estos lípidos en la membrana plasmática.
 - c) La regulación de la fluidez de la membrana plasmática a través de la modulación de su contenido de esfingolípidos.
 - d) La preservación de la morfología e integridad de las membranas del cloroplasto y de su funcionalidad.
 - e) La tolerancia a la congelación con base en los parámetros anteriores.

Los resultados anteriores se resumen en el modelo de la Figura 37.

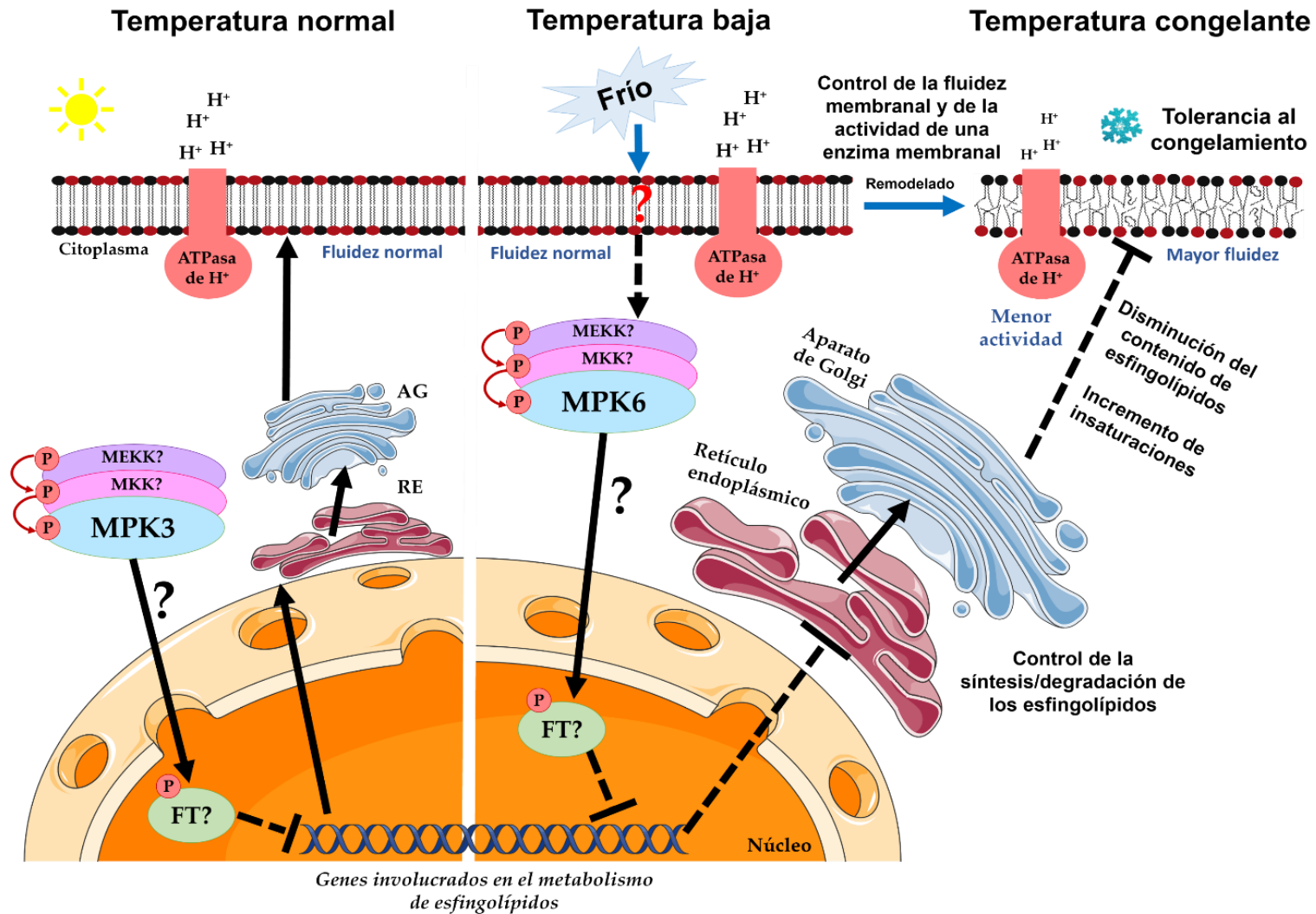


Figura 37. Modelo que considera a la MPK3 y MPK6 como componentes en la vía de transducción de señales que regula el nivel de esfingolípidos de la membrana plasmática a temperaturas normales de crecimiento (22 °C) y de aclimatación al frío (4°C). Estos niveles de esfingolípidos permiten regular la fluidez membranar y la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Todo propicia una aclimatación exitosa que asegura una sobrevivencia a temperaturas congelantes. FT, factor de transcripción; RE, retículo endoplásmico; AG, Aparato de Golgi.

PERSPECTIVAS

- I. Identificar las principales especies de esfingolípidos implicadas en la fluidificación de la membrana en la aclimatación al frío.
- II. Obtener el perfil de glicerofosfolípidos y esteroides durante condiciones NA y AC para evaluar su contribución a la fluidez de la membrana.
- III. Analizar las mutantes sobreexpresoras de MPK6 para obtener más información sobre el papel de MPK6 como cinasa clave durante la tolerancia a la congelación en condiciones de NA y AC.
- IV. Obtener un fosfoproteoma con el objetivo de identificar blancos directos de las MAP cinasas durante las condiciones NA y AC.
- V. Explorar las cinasas MPKKs corriente arriba de MPK3 y MPK6 utilizando mutantes knock-out de MPKKs.
- VI. Explorar condiciones adicionales de aclimatación y congelación en las que la MPK6 confiere tolerancia a la congelación.
- VII. Identificar a los factores de transcripción implicados en la regulación genética del metabolismo de los esfingolípidos.
- VIII. Determinar los estados y residuos de fosforilación de la ATPasa de H^+ por MPK6 a temperaturas normales y de aclimatación al frío.
- IX. Publicar toda la información derivada de esta tesis en un 3er artículo de investigación.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTÍCULO 1:

Ponce-Pineda, I. G., Carmona-Salazar, L., Saucedo-García, M., Cano-Ramírez, D. L., Morales-Cedillo, F., Peña-Moral, A., Guevara-García, Á. A., Sánchez-Nieto, S., & Gavilanes-Ruíz, M. (2021). MPK6 kinase regulates plasma membrane H⁺-ATPase activity in cold acclimation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6338. <https://doi.org/10.3390/ijms22126338>

ARTÍCULO 2:

Saucedo-García, M., González-Córdova, C. D., Ponce-Pineda, I. G., Cano-Ramírez, D. L., Romero-Colín, F. M., Arroyo-Pérez, E. E., King-Díaz, B., Zavafer, A., & Gavilanes-Ruíz, M. (2021). Effects of MPK3 and MPK6 kinases on the chloroplast architecture and function induced by cold acclimation in Arabidopsis. *Photosynthesis Research*, 149(1-2), 201-212. <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00852-0>



Article

MPK6 Kinase Regulates Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Cold Acclimation

Ilian Giordano Ponce-Pineda ¹, Laura Carmona-Salazar ¹, Mariana Saucedo-García ², Dora Cano-Ramírez ^{1,3}, Francisco Morales-Cedillo ¹, Araceli Peña-Moral ¹, Ángel Arturo Guevara-García ⁴, Sobeida Sánchez-Nieto ¹ and Marina Gavilanes-Ruiz ^{1,*}

- ¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; irongado_2405@comunidad.unam.mx (I.G.P.-P.); carmonal@comunidad.unam.mx (L.C.-S.); dlc55@cam.ac.uk (D.C.-R.); fran_0988@hotmail.com (F.M.-C.); apenam0300@hotmail.com (A.P.-M.); sobeida@unam.mx (S.S.-N.)
- ² Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Avenida Universidad Km. 1, Rancho Universitario, Tulancingo-Santiago Tulantepec, Tulancingo, Hidalgo 43600, Mexico; saucedo@uaeh.edu.mx
- ³ Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EA, UK
- ⁴ Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico; rturo.guevara@ibt.unam.mx
- * Correspondence: gavilan@unam.mx



Citation: Ponce-Pineda, I.G.; Carmona-Salazar, L.; Saucedo-García, M.; Cano-Ramírez, D.; Morales-Cedillo, F.; Peña-Moral, A.; Guevara-García, Á.A.; Sánchez-Nieto, S.; Gavilanes-Ruiz, M. MPK6 Kinase Regulates Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Cold Acclimation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6338. <https://doi.org/10.3390/ijms22126338>

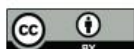
Academic Editor: Gian-Pietro Di Sansebastiano

Received: 16 May 2021

Accepted: 7 June 2021

Published: 13 June 2021

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



Copyright: © 2021 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: Cold and freezing stresses severely affect plant growth, development, and survival rate. Some plant species have evolved a process known as cold acclimation, in which plants exposed to temperatures above 0 °C trigger biochemical and physiological changes to survive freezing. During this response, several signaling events are mediated by transducers, such as mitogen activated protein kinase (MAPK) cascades. Plasma membrane H⁺-ATPase is a key enzyme for the plant cell life under regular and stress conditions. Using wild type and *mpk3* and *mpk6* knock out mutants in *Arabidopsis thaliana*, we explored the transcriptional, translational, and 14-3-3 protein regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity under the acclimation process. The kinetic analysis revealed a differential profiling of the H⁺-ATPase activity depending on the presence or absence of MPK3 or MPK6 under non-acclimated or acclimated conditions. Negative regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity was found to be exerted by MPK3 in non-acclimated conditions and by MPK6 in acclimated conditions, describing a novel form of regulation of this master ATPase. The MPK6 regulation involved changes in plasma membrane fluidity. Moreover, our results indicated that MPK6 is a critical regulator in the process of cold acclimation that leads to freezing tolerance and further survival.

Keywords: cold acclimation; freezing tolerance; H⁺-ATPase; mitogen activated protein kinases; MAPK; MPK3; MPK6; plasma membrane

1. Introduction

Plants are organisms that are constantly exposed to different biotic and abiotic stresses. To deal with these situations, plants have developed different mechanisms to quickly perceive changes in their environment and activate rapid and long-term adaptive/defense responses [1,2].

Cold is a major abiotic stress that affects plant growth, development, survival, and geographical distribution of the plants, and it is classified as chilling (temperatures between 0 °C and 15 °C) or freezing stress (temperatures below 0 °C) [3,4]. Throughout evolution, plants from temperate climates have evolved a sophisticated physiological adjustment called cold acclimation, in which freezing tolerance is acquired after gradual exposure to low, but non-freezing temperatures to achieve survival upon freezing conditions [5].



Effects of MPK3 and MPK6 kinases on the chloroplast architecture and function induced by cold acclimation in *Arabidopsis*

Mariana Saucedo-García¹ · Carla D. González-Córdova² · I. Giordano Ponce-Pineda² · Dora Cano-Ramírez^{2,3} · Fernanda M. Romero-Colín² · Erik E. Arroyo-Pérez² · Beatriz King-Díaz² · Alonso Zavafer^{4,5} · Marina Gavilanes-Ruiz²

Received: 31 January 2021 / Accepted: 21 May 2021 / Published online: 16 June 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Exposure to low, non-freezing temperatures develops freezing tolerance in many plant species. Such process is called cold acclimation. Molecular changes undergone during cold acclimation are orchestrated by signalling networks including MAP kinases. Structure and function of chloroplasts are affected by low temperatures. The aim of this work was to study how the MAP kinases MPK3 and MPK6 are involved in the chloroplast performance upon a long period of cold acclimation. We used *Arabidopsis thaliana* wild type and *mpk3* and *mpk6* mutants. Adult plants were acclimated during 7 days at 4 °C and then measurements of PSII performance and chloroplast ultrastructure were carried out. Only the *mpk6* acclimated plants showed a high freezing sensitivity. No differences in the PSII function were observed in the plants from the three genotypes exposed to non-acclimated or acclimated conditions. The acclimation of wild-type plants produced severe alterations in the ultrastructure of chloroplast and thylakoids, which was more accentuated in the *mpk* plants. However, only the *mpk6* mutant was unable to internalize the damaged chloroplasts into the vacuole. These results indicate that cold acclimation induces alterations in the chloroplast architecture leading to preserve an optimal performance of PSII. MPK3 and MPK6 are necessary to regulate these morphological changes, but besides, MPK6 is needed to the vacuolization of the damaged chloroplasts, suggesting a role in the chloroplast recycling during cold acclimation. The latter could be quite relevant, since it could explain why this mutant is the only one showing an extremely low freezing tolerance.

Keywords Chl *a* fluorescence · Chlorophagy · Cold acclimation · Freezing tolerance · MPK3 · MPK6

Abbreviations

AC Acclimated
Atg Autophagy-defective mutant
 CBF C-repeat binding factor

FB1 Fumonisin B1
 MAPK Mitogen-activated protein kinase
 MAPKK Mitogen-activated protein kinase kinase
 MAPKKK Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
 MKK2 Upstream MAPKK of MPK4/MPK6
 MPK3, MPK4 or MPK6 Mitogen-activated protein kinase 3, 4 or 6, respectively
 NA Non-acclimated
 PAMPs Pathogen-associated molecular patterns
 SEM Standard error of the mean
 TEM Transmission electron microscopy
 UV-B Ultraviolet B rays

✉ Marina Gavilanes-Ruiz
 gavilan@unam.mx

- ¹ Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo, Hidalgo, México
- ² Dpto. de Bioquímica, Conjunto E. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México City, México
- ³ Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB3 0LJ, UK
- ⁴ Research School of Biology, the Australian National University, Canberra, ACT 2600, Australia
- ⁵ Climate Change Cluster, University of Technology Sydney, Ultimo, NSW 2001, Australia

BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama, M., Sugimoto, H., Inoue, S., Takahashi, Y., Hayashi, M., Hayashi, Y., Mizutani, M., Ogawa, T., Kinoshita, D., Ando, E., Park, M., Gray, W. M., & Kinoshita, T. (2021). Type 2C protein phosphatase clade D family members dephosphorylate Guard cell plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 188(4), 2228-2240. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab571>
- Alemayehu, S., Feghali, K. C., Cowden, J., Komisar, J., Ockenhouse, C. F., & Kamau, E. (2013). Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malaria Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-277>
- Alexandersson, E., Saalbach, G., Larsson, C., & Kjellbom, P. (2004). Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant and Cell Physiology*, 45(11), 1543-1556. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch209>
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Ecker, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633), 653-657. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>
- Alsterfjord, M., Sehnke, P. C., Arkell, A., Larsson, H., Svennelid, F., Rosenquist, M., Ferl, R. J., Sommarin, M., & Larsson, C. (2004). Plasma membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 isoforms of arabidopsis leaves: Evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H⁺-ATPase interaction. *Plant and Cell Physiology*, 45(9), 1202-1210. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch136>
- Anderson, R. G. W., & Jacobson, K. (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*, 296(5574), 1821-1825. <https://doi.org/10.1126/science.1068886>
- Ando, E., & Kinoshita, T. (2018). Red Light-Induced phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, 178(2), 838-849. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00544>
- Ansari, M. W., Singh, A. K., & Tuteja, N. (2023). *Global climate change and plant stress management*. John Wiley & Sons.
- Artus, N. N., Uemura, M., Steponkus, P. L., Gilmour, S. J., Lin, C., & Thomashow, M. F. (1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15A gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 13404-13409. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13404>

- Barrero-Sicilia, C., Silvestre, S., Haslam, R. P., & Michaelson, L. V. (2017). Lipid remodelling: Unravelling the response to cold stress in *Arabidopsis* and its extremophile relative *Eutrema salsugineum*. *Plant Science*, 263, 194-200. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.07.017>
- Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., Jordt, S. E., & Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448(7150), 204-208. <https://doi.org/10.1038/nature05910>
- Baxter, A. J., Mittler, R., & Suzuki, N. (2013). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal Of Experimental Botany*, 65(5), 1229-1240. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>
- Benedict, C., Skinner, J. S., Meng, R., Chang, Y., Bhalerao, R. P., Hüner, N. P. A., Finn, C. E., Chen, T. H. H., & Hurry, V. (2006). The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant, Cell & Environment*, 29(7), 1259-1272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01505.x>
- Berkey, R., Bendigeri, D., & Xiao, S. (2012). Sphingolipids and plant defense/disease: The “death” connection and beyond. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00068>
- Bhatia, T., Cornelius, F., & Ipsen, J. H. (2016). Exploring the raft-hypothesis by probing planar bilayer patches of free-standing giant vesicles at nanoscale resolution, with and without Na, K-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(12), 3041-3049. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.09.001>
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N., MacAskill, A. F., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S., & Dupree, P. (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiology*, 137(1), 104-116. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053041>
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Lai, D., Xie, Y., Shen, W., & Shabala, S. (2014). Rapid regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, 115(3), 481-494. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu219>
- Bouvier-Navé, P., Berna, A., Noiriel, A., Compagnon, V., Carlsson, A. S., Banaś, A., Stymne, S., & Schaller, H. (2009). Involvement of the *PHOSPHOLIPID STEROL ACYLTRANSFERASE1* in plant sterol homeostasis and leaf senescence. *Plant Physiology*, 152(1), 107-119. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145672>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Briskin, D. P., Leonard, R. C. F., & Hodges, T. K. (1986). [51] Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles. *Methods in Enzymology*, 542-558. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48053-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48053-1)
- Brown, D. A. (1993). The tyrosine kinase connection: How GPI-anchored proteins activate T cells. *Current Opinion in Immunology*, 5(3), 349-354. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90052-t](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90052-t)
- Brown, D. A., & Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3), 533-544. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90189-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90189-j)
- Browse, J., Warwick, N. W. M., Somerville, C., & Slack, C. R. (1986). Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 235(1), 25-31. <https://doi.org/10.1042/bj2350025>
- Bugaud, C., Joannès-Dumec, C., Louisor, J., Tixier, P., & Salmon, F. (2015). Preharvest temperature affects chilling injury in dessert bananas during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2384-2390. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7354>
- Buijs, T., & McNaughton, P. A. (2020). The role of cold-sensitive ion channels in peripheral thermosensation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00262>
- Cacas, J., Buré, C., Grosjean, K., Gerbeau-Pissot, P., Lherminier, J., Rombouts, Y., Maes, E., Bossard, C., Gronnier, J., Furt, F., Fouillen, L., Germain, V., Bayer, E., Cluzet, S., Robert, F., Schmitter, J., Deleu, M., Lins, L., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2015). Revisiting plant plasma membrane lipids in tobacco: A focus on sphingolipids. *Plant Physiology*, 170(1), 367-384. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00564>
- Cacas, J., Furt, F., Guédard, M. L., Schmitter, J., Buré, C., Gerbeau-Pissot, P., Moreau, P., Bessoule, J., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2012). Lipids of plant membrane rafts. *Progress in Lipid Research*, 51(3), 272-299. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.04.001>
- Cano-Ramírez, D. L. (2014). *Contribución de los esfingolípidos a la fluidez de la membrana plasmática de Arabidopsis thaliana* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cano-Ramirez, D. L., Carmona-Salazar, L., Morales-Cedillo, F., Ramírez-Salcedo, J., Cahoon, E. B., & Gavilanes-Ruiz, M. (2021). Plasma membrane fluidity: an environment thermal detector in plants. *Cells*, 10(10), 2778. <https://doi.org/10.3390/cells10102778>
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W. M., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowski, A., & Baudouin, E. (2010). Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 189(2), 415-427. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03500.x>

- Cao, Y. (2019). *Advances in membrane proteins: Building, Signaling and Malfunction*. Springer Nature.
- Carmona Salazar, L. (2006). *Aislamiento y caracterización de membranas resistentes a detergente (DRM) en diferentes especies vegetales* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Carmona-Salazar, L., Cahoon, R. E., Gasca-Pineda, J., González-Solís, A., Vera-Estrella, R., Trevino, V., Cahoon, E. B., & Gavilanes-Ruiz, M. (2021). Plasma and vacuolar membrane sphingolipidomes: Composition and insights on the role of main molecular species. *Plant Physiology*, 186(1), 624-639. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab064>
- Carpio, L., Stephan, E. B., Kamer, A. R., & Dziak, R. (1999). Sphingolipids stimulate cell growth via MAP kinase activation in osteoblastic cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 61(5), 267-273. <https://doi.org/10.1054/plef.1999.0100>
- Casares, D., Escribá, P. V., & Rosselló, C. A. (2019). Membrane lipid composition: effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>
- Cassim, A. M., & Mongrand, S. (2019). Lipids light up in plant membranes. *Nature Plants*, 5(9), 913-914. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0494-9>
- Cassim, A. M., Gouguet, P., Gronnier, J., Laurent, N., Germain, V., Grison, M., Boutté, Y., Gerbeau-Pissot, P., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2019). Plant lipids: key players of plasma membrane organization and function. *Progress in Lipid Research*, 73, 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.11.002>
- Cassim, A. M., Grison, M., Ito, Y., Simon-Plas, F., Mongrand, S., & Boutté, Y. (2020). Sphingolipids in plants: a guidebook on their function in membrane architecture, cellular processes, and environmental or developmental responses. *FEBS Letters*, 594(22), 3719-3738. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13987>
- Cassim, A. M., Navon, Y., Gao, Y., Décossas, M., Fouillen, L., Grélard, A., Nagano, M., Lambert, O., Bahammou, D., Van Delft, P., Maneta-Peyret, L., Simon-Plas, F., Heux, L., Jean, B., Fragneto, G., Mortimer, J. C., Deleu, M., Lins, L., & Mongrand, S. (2021). Biophysical analysis of the plant-specific GIPC sphingolipids reveals multiple modes of membrane regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100602. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100602>
- Chamberlain, L. H. (2004). Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Letters*, 559(1-3), 1-5. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(04\)00050-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(04)00050-x)
- Chaudhuri, A., Bhattacharya, B., Gowrishankar, K., Mayor, S., & Rao, M. (2011). Spatiotemporal regulation of chemical reactions by active cytoskeletal remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(36), 14825-14830. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100007108>

- Chen, D., Lyu, M., Kou, X., Li, J., Yang, Z., Gao, L., Li, Y., Fan, L., Shi, H., & Zhong, S. (2022). Integration of light and temperature sensing by liquid-liquid phase separation of phytochrome b. *Molecular Cell*, 82(16), 3015-3029.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.026>
- Chen, M., Markham, J. E., Dietrich, C. R., Jaworski, J. G., & Cahoon, E. B. (2008). Sphingolipid Long-Chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(7), 1862-1878. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057851>
- Chen, Y., Liu, Y., Sullards, M. C., & Merrill, A. H. (2010). An introduction to sphingolipid metabolism and analysis by new technologies. *Neuromolecular Medicine*, 12(4), 306-319. <https://doi.org/10.1007/s12017-010-8132-8>
- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Sunkar, R. (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. En *Humana Press eBooks* (pp. 39-55). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_3
- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Sunkar, R. (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. En *Humana Press eBooks* (pp. 39-55). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_3
- Cho, S. K., Larue, C. T., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T., Zhang, S., & Walker, J. C. (2008). Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15629-15634. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805539105>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Christie, J. M. (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 21-45. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103951>
- Cook, D., Fowler, S., Fiehn, O., & Thomashow, M. F. (2004). A prominent role for the CBF Cold Response Pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42), 15243-15248. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406069101>
- Dai, G., Yin, J., Li, K., Chen, D., Liu, Z., Bi, F., Rong, C., & Yao, N. (2020). The Arabidopsis AtGCD3 protein is a glucosylceramidase that preferentially hydrolyzes long-acyl-chain glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 295(3), 717-728. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)49930-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)49930-3)
- Degenkolbe, T., Giavalisco, P., Zuther, E., Seiwert, B., Hinch, D. K., & Willmitzer, L. (2012). Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 72(6), 972-982. <https://doi.org/10.1111/tpj.12007>

- Devireddy, A. R., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Muchero, W., & Chen, J. (2021). Role of reactive oxygen species and hormones in plant responses to temperature changes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8843. <https://doi.org/10.3390/ijms22168843>
- Ding, Y., Li, H., Zhang, X., Xie, Q., Gong, Z., & Yang, S. (2015). OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 32(3), 278-289. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.023>
- Ding, Y., Lv, J., Shi, Y., Gao, J., Hua, J., Song, C., Gong, Z., & Yang, S. (2019). EGR 2 phosphatase regulates OST 1 kinase activity and freezing tolerance in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 38(1). <https://doi.org/10.15252/emj.201899819>
- Dong, C., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q., & Zhu, J. (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21), 8281-8286. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602874103>
- Dong, M. A., Farré, E. M., & Thomashow, M. F. (2011). CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulate expression of the C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 7241-7246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103741108>
- Dreyer, A., & Dietz, K. (2018). Reactive oxygen species and the redox-regulatory network in cold stress acclimation. *Antioxidants*, 7(11), 169. <https://doi.org/10.3390/antiox7110169>
- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OSDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33(4), 751-763. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01661.x>
- Dutilleul, C., Benhassaine-Kesri, G., Demandre, C., Rezé, N., Launay, A., Pelletier, S., Renou, J., Zachowski, A., Baudouin, E., & Guillas, I. (2012). Phytosphingosine-phosphate is a signal for ATMPK6 activation and arabidopsis response to chilling. *New Phytologist*, 194(1), 181-191. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04017.x>
- Ephritikhine, G., Ferro, M., & Rolland, N. (2004). Plant membrane proteomics. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(12), 943-962. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.11.004>
- Fabri, J. H. T. M., Godoy, N. L., Rocha, M. C., Munshi, M., Cocio, T. A., Von Zeska Kress, M. R., Fill, T. P., Da Cunha, A. F., Del Poeta, M., & Malavazi, I. (2019). The AGC kinase YPKA regulates sphingolipids biosynthesis and

- physically interacts with SAKA MAP kinase in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03347>
- Falhof, J., Pedersen, J. T., Fuglsang, A. T., & Palmgren, M. G. (2016). Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Molecular Plant*, 9(3), 323-337. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.11.002>
- Fang, L., Ishikawa, T., Rennie, E. A., Murawska, G. M., Lao, J., Yan, J., Tsai, A. Y., Baidoo, E. E. K., Xu, J., Keasling, J. D., Demura, T., Kawai-Yamada, M., Scheller, H. V., & Mortimer, J. C. (2016). Loss of inositol phosphorylceramide sphingolipid mannosylation induces plant immune responses and reduces cellulose content in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(12), 2991-3004. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00186>
- Farley, R. A. (2012). Active ion transport by ATP-driven ion pumps. En: *Elsevier eBooks* (pp. 167-177). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387738-3.00012-3>
- Fendrych, M., Leung, J., & Friml, J. (2016). TIR1/AFB-AUX/IAA AUXIn perception mediates rapid cell wall acidification and growth of arabidopsis hypocotyls. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/elife.19048>
- Ferrer, A., Altabella, T., Arró, M., & Boronat, A. (2017). Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progress in Lipid Research*, 67, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.06.002>
- Focht, D., Croll, T. I., Pedersen, B. P., & Nissen, P. (2017). Improved model of proton pump crystal structure obtained by interactive molecular dynamics flexible fitting expands the mechanistic model for proton translocation in P-Type ATPases. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00202>
- Frey, N. F. D., García, A. V. T., Bigeard, J., Zaag, R., Bueso, E., Garmier, M., Pateyron, S., De Tautzia-Moreau, M., Brunaud, V., Balzergue, S., Colcombet, J., Aubourg, S. P., Martin-Magniette, M., & Hirt, H. (2014). Functional analysis of Arabidopsis immune-related MAPKs uncovers a role for MPK3 as negative regulator of inducible defences. *Genome Biology.com (London. Print)*, 15(6), R87. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-6-r87>
- Friedrichson, T., & Kurzchalia, T. V. (1998). Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*, 394(6695), 802-805. <https://doi.org/10.1038/29570>
- Fromherz, P. (1988). Self-organization of the fluid mosaic of charged channel proteins in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(17), 6353-6357. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6353>
- Fuglsang, A. T., Guo, Y., Cuin, T. A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K. A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K. S., Palmgren, M. G., & Zhu, J. (2007). Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *The Plant Cell*, 19(5), 1617-1634. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035626>

- Fuglsang, A. T., Kristensen, A., Cuin, T. A., Schulze, W. X., Persson, J., Thuesen, K. H., Ytting, C. K., Oehlenschläger, C. B., Mahmood, K., Søndergaard, T. E., Shabala, S., & Palmgren, M. G. (2014). Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. *The Plant Journal*, 80(6), 951-964. <https://doi.org/10.1111/tpj.12680>
- Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., & Kusumi, A. (2002). Phospholipids undergo HOP diffusion in compartmentalized cell membrane. *Journal of Cell Biology*, 157(6), 1071-1082. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202050>
- Furse, S., Martel, C., Yusuf, A. A., Shearman, G. C., Koch, H., & Stevenson, P. C. (2023). Sterol composition in plants is specific to pollen, leaf, pollination and pollinator. *Phytochemistry*, 214, 113800. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113800>
- Furt, F., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2010). Lipids of the plant plasma membrane. En *Springer eBooks* (pp. 3-30). https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9_1
- Furuya, T., Matsuoka, D., & Nanmori, T. (2014). Membrane rigidification functions upstream of the MEKK1-MKK2-MPK4 cascade during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 588(11), 2025-2030. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.032>
- Futerman, A. H., & Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Reports*, 5(8), 777-782. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400208>
- Galiba, G., & Tóth, B. (2017). Cold stress. En *Elsevier eBooks* (pp. 1-7). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394807-6.00076-9>
- Gibellini, F., & Smith, T. (2010). The Kennedy pathway-*de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *Iubmb Life*, 62(6), spc1. <https://doi.org/10.1002/iub.354>
- Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M., & Thomashow, M. F. (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal*, 16(4), 433-442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00310.x>
- Giri, B., & Sharma, M. P. (2021). Plant Stress Biology: Strategies and Trends. Bhoopander Giri, Mahaveer Prasad Sharma Eds. Springer Nature.
- Gömann, J., Herrfurth, C., Zienkiewicz, A., Ischebeck, T., Haslam, T. M., Hornung, E., & Feußner, I. (2021). Sphingolipid long-chain base hydroxylation influences plant growth and callose deposition in *Physcomitrium patens*. *New Phytologist*, 231(1), 297-314. <https://doi.org/10.1111/nph.17345>

- Gömann, J., Herrfurth, C., Zienkiewicz, A., Ischebeck, T., Haslam, T. M., Hornung, E., & Feußner, I. (2021a). Sphingolipid long-chain base hydroxylation influences plant growth and callose deposition in *Physcomitrium patens*. *New Phytologist*, 231(1), 297–314. <https://doi.org/10.1111/nph.17345>
- Gömann, J., Herrfurth, C., Zienkiewicz, K., Haslam, T. M., & Feußner, I. (2021b). Sphingolipid $\Delta 4$ -desaturation is an important metabolic step for glycosylceramide formation in *Physcomitrium patens*. *Journal of Experimental Botany*, 72(15), 5569–5583. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab238>
- González-Córdova, C. D. (2019). *Actividad de la ATPasa de H⁺ de plantas mutantes en MPK4 aclimatadas al frío* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S., & Gavilanes-Ruiz, M. (1992). A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Analytical Biochemistry*, 200(2), 235–238. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90458-j](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90458-j)
- González-Solís, A., Han, G., Gan, L., Li, Y., Markham, J. E., Cahoon, R. E., Dunn, T. M., & Cahoon, E. B. (2020). Unregulated sphingolipid biosynthesis in gene-edited *Arabidopsis* ORM mutants results in nonviable seeds with strongly reduced oil content. *The Plant Cell*, 32(8), 2474–2490. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00015>
- Gorter, E., & Grendel, F. (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine*, 41(4), 439–443. <https://doi.org/10.1084/jem.41.4.439>
- Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., Vishwakarma, R. A., Rao, M., & Mayor, S. (2008). Nanoclusters of GPI-Anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell*, 135(6), 1085–1097. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.032>
- Gronnier, J., Gerbeau-Pissot, P., Germain, V., Mongrand, S., & Simon-Plas, F. (2018). Divide and rule: plant plasma membrane organization. *Trends In Plant Science*, 23(10), 899–917. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.07.007>
- Gronnier, J., Germain, V., Gouguet, P., Cacas, J., & Mongrand, S. (2016). GIPC: Glycosyl inositol phospho ceramides, the major sphingolipids on Earth. *Plant Signaling & Behavior*, 11(4), e1152438. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1152438>
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. *FEBS Letters*, 580(23), 5477–5483. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.066>
- Gutiérrez-Nájera, N., Saucedo-García, M., Noyola-Martínez, L., Vázquez-Vázquez, C., Palacios-Bahena, S., Carmona-Salazar, L., Plasencia, J., El-Hafidi, M., & Gavilanes-Ruiz, M. (2020). Sphingolipid effects on the plasma membrane produced by addition of fumonisin B1 to maize embryos. *Plants*, 9(2), 150. <https://doi.org/10.3390/plants9020150>

- Guy, C. L. (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41(1), 187-223. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.001155>
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J. L., Pineda, O., Thomashow, M. F., & Zhang, J. Z. (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 130(2), 639-648. <https://doi.org/10.1104/pp.006478>
- Hanada, K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1632(1-3), 16-30. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(03\)00059-3](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(03)00059-3)
- Hannah, M. A., Heyer, A. G., & Hinch, D. K. (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 1(2), e26. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010026>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2017). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 175-191. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>
- Hansen, S. B., Dyla, M., Neumann, C., Quistgaard, E., Andersen, J. L., Kjærgaard, M., & Nissen, P. (2021). The crystal structure of the Ca²⁺-ATPase 1 from *Listeria monocytogenes* reveals a pump primed for dephosphorylation. *Journal of Molecular Biology*, 433(16), 167015. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167015>
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., & Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *Journal of Cell Biology*, 141(4), 929-942. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.4.929>
- Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K. E., Minkoff, B. B., & Sussman, M. R. (2014). A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science*, 343(6169), 408-411. <https://doi.org/10.1126/science.1244454>
- Haruta, M., Tan, L. X., Bushey, D., Swanson, S. J., & Sussman, M. R. (2017). Environmental and genetic factors regulating localization of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 176(1), 364-377. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01126>
- Haslam, T. M., & Feußner, I. (2022). Diversity in sphingolipid metabolism across land plants. *Journal of Experimental Botany*, 73(9), 2785-2798. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab558>
- Havshøi, N. W., & Fuglsang, A. T. (2022). A critical review on natural compounds interacting with the plant plasma membrane H⁺-ATPase and their potential as biologicals in agriculture. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 268-286. <https://doi.org/10.1111/jipb.13221>
- Heaver, S. L., Johnson, E. L., & Ley, R. E. (2018). Sphingolipids in host-microbial interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.12.011>

- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology.com (London. Print)*, 8(2), R19. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Henderson, R. A., & Unwin, P. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257(5521), 28-32. <https://doi.org/10.1038/257028a0>
- Hincha, D. K., & Zuther, E. (2014). Introduction: Plant cold acclimation and freezing tolerance. En: *Methods in Molecular Biology* (pp. 1-6). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0844-8_1
- Hiraki, H., Matsushima, U., Uemura, M., & Kawamura, Y. (2023). Cold acclimation is affected by diurnal cycles and minute-scale random temperature fluctuations via calcium signals. *Frontiers In Plant Physiology*, 1. <https://doi.org/10.3389/fphgy.2023.1304255>
- Hoffmann, R., Olsen, L. I., Ezike, C. V., Pedersen, J. T., Manstretta, R., López-Marqués, R. L., & Palmgren, M. G. (2018). Roles of plasma membrane proton ATPases AHA2 and AHA7 in normal growth of roots and root hairs in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 166(3), 848-861. <https://doi.org/10.1111/ppl.12842>
- Hoffmann, R., Portes, M. T., Olsen, L. I., Damineli, D. S. C., Hayashi, M., Nunes, C. O., Pedersen, J. T., Lima, P. T., Campos, C., Feijó, J. A., & Palmgren, M. G. (2020). Plasma membrane H⁺-ATPases sustain pollen tube growth and fertilization. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16253-1>
- Hou, Q., Ufer, G., & Bartels, D. (2016). Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell and Environment*, 39(5), 1029-1048. <https://doi.org/10.1111/pce.12666>
- Huang, J., Sun, S., Xu, D., Yang, X., Bao, Y., Wang, Z., Tang, H., & Zhang, H. (2009). Increased tolerance of rice to cold, drought and oxidative stresses mediated by the overexpression of a gene that encodes the zinc finger protein ZFP245. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(3), 556-561. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.032>
- Huby, E., Napier, J. A., Baillieul, F., Michaelson, L. V., & Dhondt-Cordelier, S. (2019). Sphingolipids: towards an integrated view of metabolism during the plant stress response. *New Phytologist*, 225(2), 659-670. <https://doi.org/10.1111/nph.15997>
- Huby, E., Napier, J. A., Baillieul, F., Michaelson, L. V., & Dhondt-Cordelier, S. (2019). Sphingolipids: towards an integrated view of metabolism during the plant stress response. *New Phytologist*, 225(2), 659-670. <https://doi.org/10.1111/nph.15997>
- Hüner, N. P. A., & Hopkins, W. G. (2008). *Introduction to Plant Physiology* (4.^a ed.). Wiley.

- Huo, C., Zhang, B., Wang, H., Wang, F., Liu, M., Gao, Y., Zhang, W., Deng, Z., Sun, D., & Tang, W. (2016). Comparative study of early cold-regulated proteins by two-dimensional difference gel electrophoresis reveals a key role for phospholipase $\alpha 1$ in mediating cold acclimation signaling pathway in rice. *Molecular Cell Proteomics*, 15(4), 1397-1411. <https://doi.org/10.1074/mcp.m115.049759>
- Hwarari, D., Guan, Y., Ahmad, B., Movahedi, A., Tian, M., Hao, Z., Lu, Y., Chen, J., & Yang, L. (2022). ICE-CBF-COR signaling cascade and its regulation in plants responding to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1549. <https://doi.org/10.3390/ijms23031549>
- Imai, H., Ohnishi, M., Hotsubo, K., Kojima, M., & S, I. (1997). Sphingoid base composition of cerebroside from plant leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(2), 351-353. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.351>
- Integrated DNA Technologies, Inc. [IDT™]. (2018). *OligoAnalyzer™ Tool* [Software]. <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>
- Iqbal, Z., Memon, A., Ahmad, A., & Iqbal, M. P. (2022). Calcium mediated cold acclimation in plants: underlying signaling and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.855559>
- Ishikawa, T., Ito, Y., & Kawai-Yamada, M. (2016). Molecular characterization and targeted quantitative profiling of the sphingolipidome in rice. *The Plant Journal*, 88(4), 681-693. <https://doi.org/10.1111/tpj.13281>
- Ishitani, M., Xiong, L., Lee, H., Stevenson, B., & Zhu, J. K. (1998). HOS1, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(7), 1151-1161. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.7.1151>
- Islam, M. N., Jacquemot, M., Coursol, S., & Ng, C. (2011). Sphingosine in plants – more riddles from the sphinx? *New Phytologist*, 193(1), 51-57. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03963.x>
- Jacobson, K. A., & Dietrich, C. (1999). Looking at lipid rafts? *Trends in Cell Biology*, 9(3), 87-91. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(98\)01495-0](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01495-0)
- Jaglo-Ottosen, K. R., Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Schabenberger, O., & Thomashow, M. F. (1998). Arabidopsis CBF1 overexpression induces CORGenes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280(5360), 104-106. <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.104>
- Jahed, K. R., Saini, A. K., & Sherif, S. M. (2023). Coping with the cold: unveiling cryoprotectants, molecular signaling pathways, and strategies for cold stress resilience. *Frontiers In Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1246093>
- Jaillais, Y., & Ott, T. (2019). The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective. *Plant Physiology*, 182(4), 1682-1696. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01349>

- Jakubowska, D., & Janicka, M. (2017). The role of brassinosteroids in the regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase and NADPH oxidase under cadmium stress. *Plant Science*, 264, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.08.007>
- Janicka -Russak, M. (2011). Plant plasma membrane H⁺-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. En *InTech eBoo* Morth, J. P., Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Andersen, J. P., Vilsen, B., Palmgren, M. G., & Nissen, P. (2010). A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 60-70. <https://doi.org/10.1038/nrm3031>
- Janmohammadi, M., Zolla, L., & Rinalducci, S. (2015). Low temperature tolerance in plants: changes at the protein level. *Phytochemistry*, 117, 76-89. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.003>
- Jaqaman, K., & Grinstein, S. (2012). Regulation from within: the cytoskeleton in transmembrane signaling. *Trends in Cell Biology*, 22(10), 515-526. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.006>
- Jia, Y., Ding, Y., Shi, Y., Zhang, X., Gong, Z., & Yang, S. (2016). The CBFS triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in Arabidopsis. *New Phytologist*, 212(2), 345-353. <https://doi.org/10.1111/nph.14088>
- Jiang, X., Hoehenwarter, W., Scheel, D., & Lee, J. (2020). Phosphorylation of the CAMTA3 transcription factor triggers its destabilization and nuclear export. *Plant Physiology*, 184(2), 1056-1071. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00795>
- Jiang, Z., Zhou, X., Tao, M., Yuan, F., Liu, L., Wu, F., Wu, X., Xiang, Y., Niu, Y., Liu, F., Li, C., Rui, Y., Byeon, B., Xue, Y., Zhao, H., Wang, H., Crawford, B. M., Johnson, D. M., Hu, C., Pei, Z. (2019). Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca²⁺ influx. *Nature*, 572(7769), 341-346. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1449-z>
- Jones, J. B. (1981). Hydroponics: Its history and use in plant nutrition studies. *Journal of Plant Nutrition*, 5(8), 1003-1030. <https://doi.org/10.1080/01904168209363035>
- Jung, J., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A. K., Box, M. S., Charoensawan, V., Cortijo, S., Kumar, M., Grant, A., Locke, J. C., Schäfer, E., Jaeger, K. E., & Wigge, P. A. (2016). Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science*, 354(6314), 886-889. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6005>
- Kaiser, H., Orłowski, A., Róg, T., Nyholm, T. K., Chai, W., Feizi, T., Lingwood, D., Vattulainen, I., & Simons, K. (2011). Lateral sorting in model membranes by cholesterol-mediated hydrophobic matching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), 16628-16633. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103742108>

- Kaiser, R. D., & London, E. (1998). Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry*, 37(22), 8180-8190. <https://doi.org/10.1021/bi980064a>
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D., Zhao, W., Schiller, K., Gatzke, N., Sung, D. Y., & Guy, C. L. (2004). Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136(4), 4159-4168. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052142>
- Karki, N., Johnson, B. S., & Bates, P. D. (2019). Metabolically distinct pools of phosphatidylcholine are involved in trafficking of fatty acids out of and into the chloroplast for membrane production. *The Plant Cell*, tpc.00121.2019. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00121>
- Kim, J., Lim, J., & Lee, C. (2013). Quantitative Real-time PCR. Approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1358-1373. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010>
- Kim, T., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. (2010). Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 561-591. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112226>
- Kimberlin, A., Han, G., Luttgeharm, K. D., Chen, M., Cahoon, R. E., Stone, J. M., Markham, J. E., Dunn, T. M., & Cahoon, E. B. (2016). ORM expression alters sphingolipid homeostasis and differentially affects ceramide synthase activities. *Plant Physiology*, pp.00965.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00965>
- Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., & Hannun, Y. A. (2008). The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cellular Signalling*, 20(6), 1010-1018. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.006>
- Knight, H., Trewavas, A., & Knight, M. R. (1996). Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell*, 8(3), 489-503. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.3.489>
- Knight, M. R., & Knight, H. (2012). Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist*, 195(4), 737-751. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04239.x>
- Koetsier, G. K., & Cantor, E. C. (2019). A practical guide to analyzing nucleic acid concentration and purity with microvolume spectrophotometers. En: *New England Biolabs* (Technical Note).
- Korn, E. D. (1966). Structure of biological membranes. *Science*, 153(3743), 1491-1498. <https://doi.org/10.1126/science.153.3743.1491>

- Körner, C. (2016). Plant adaptation to cold climates. *F1000Research*, 5, 2769. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9107.1>
- Kozawa, O., Kawamura, H., Matsuno, H., & Uematsu, T. (2000). P38 MAP kinase is involved in the signalling of sphingosine in osteoblasts. *Cellular Signalling*, 12(7), 447-450. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(00\)00086-3](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(00)00086-3)
- Krol, M., Ivanov, A. G., Jansson, S., Kloppstech, K., & Huner, N. P. A. (1999). Greening under high light or cold temperature affects the level of xanthophyll-cycle pigments, early light-inducible proteins, and light-harvesting polypeptides in wild-type barley and the *Chlorina* F2 mutant 1. *Plant Physiology*, 120(1), 193-204. <https://doi.org/10.1104/pp.120.1.193>
- Kubecka, P. (2001). A possible world record maximum natural ground surface temperature. *Weather*, 56(7), 218-221. <https://doi.org/10.1002/j.1477-8696.2001.tb06577.x>
- Kumar, K. N., Gibbs, H. C., Yeh, A. T., & Griffing, L. R. (2021). The sterol trafficking pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.616631>
- Kusumi, A., Suzuki, K., Kasai, R. S., Ritchie, K., & Fujiwara, T. (2011). Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(11), 604-615. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.08.001>
- Laloi, M., Perret, A., Châtre, L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultier, M., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M., & Moreau, P. (2006). Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiology*, 143(1), 461-472. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091496>
- Lee, H., Jun, Y. S., Cha, O., & Sheen, J. (2018). Mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 are required for stem cell maintenance in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Plant Cell Reports*, 38(3), 311-319. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2367-5>
- Legris, M., Klose, C., Burgie, E., Rojas, C. C., Neme, M., Hiltbrunner, A., Wigge, P. A., Schäfer, E., Vierstra, R. D., & Casal, J. J. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science*, 354(6314), 897-900. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5656>
- Lei, Y., Zheng, Y., Kai-Jie, D., Duan, B., & Cai, Z. (2014). Different responses of Photosystem I and Photosystem II in three tropical oilseed crops exposed to chilling stress and subsequent recovery. *Trees-structure and Function*, 28(3), 923-933. <https://doi.org/10.1007/s00468-014-1007-0>
- Lenarčič, T., Albert, I., Böhm, H., Hodnik, V., Pirc, K., Zavec, A. B., Podobnik, M., Pahovnik, D., Žagar, E., Pruitt, R., Greimel, P., Yamaji-Hasegawa, A., Kobayashi, T., Zienkiewicz, A., Gömann, J., Mortimer, J. C., Fang, L.,

- Cassim, A. M., Deleu, M., Nürnberger, T. (2017). Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. *Science*, 358(6369), 1431-1434. <https://doi.org/10.1126/science.aan6874>
- Levental, I., Levental, K. R., & Heberle, F. A. (2020). Lipid Rafts: Controversies resolved, mysteries remain. *Trends in Cell Biology*, 30(5), 341-353. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.009>
- Li, J., Bi, F., Yin, J., Wu, J., Rong, C., Wu, J., & Yao, N. (2015). An Arabidopsis neutral ceramidase mutant *NCER1* accumulates hydroxyceramides and is sensitive to oxidative stress. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00460>
- Li, L., Verstraeten, I., Roosjen, M., Takahashi, K., Rodríguez, L., Merrin, J., Chen, J., Shabala, L., Smet, W., Ren, H. Y., Vanneste, S., Shabala, S., De Rybel, B., Weijers, D., Kinoshita, T., Gray, W. M., & Friml, J. (2021). Cell surface and intracellular auxin signalling for H⁺ fluxes in root growth. *Nature*, 599(7884), 273-277. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04037-6>
- Li, Y., Cao, H., Dong, T., Wang, X., Ma, L., Li, K., Lou, H., Song, C., & Ren, D. (2023). Phosphorylation of the LCB1 subunit of Arabidopsis serine palmitoyltransferase stimulates its activity and modulates sphingolipid biosynthesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 65(6), 1585-1601. <https://doi.org/10.1111/jipb.13461>
- Lichtenthaler, H. K. (1998). The stress concept in plants: An introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851(1 STRESS OF LIF), 187-198. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x>
- Ligaba, A., Yamaguchi, M., Shen, H., Sasaki, T., Yamamoto, Y., & Matsumoto, H. (2004). Phosphorus deficiency enhances plasma membrane H⁺-ATPase activity and citrate exudation in greater purple lupin (*Lupinus pilosus*). *Functional Plant Biology*, 31(11), 1075. <https://doi.org/10.1071/fp04091>
- Lin, W., Zhou, X., Tang, W., Takahashi, K., Pan, X., Dai, J., Ren, H. Y., Zhu, X., Pan, S., Zheng, H., Gray, W. M., Xu, T., Kinoshita, T., & Yang, Z. (2021). TMK-based cell-surface AUXIN signalling activates cell-wall acidification. *Nature*, 599(7884), 278-282. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03976-4>
- Liu, J., Chen, J., Xie, K., Tian, Y., Yan, A., Liu, J., Huang, Y., Wang, S., Zhu, Y., Chen, A., & Xu, G. (2020). A mycorrhiza-specific H⁺-ATPase is essential for arbuscule development and symbiotic phosphate and nitrogen uptake. *Plant, Cell & Environment*, 43(4), 1069-1083. <https://doi.org/10.1111/pce.13714>
- Liu, J., Elmore, J. M., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Staskawicz, B. J., & Coaker, G. (2009). RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLOS Biology*, 7(6), e1000139. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000139>

- Liu, N., Hou, L., Bao, J., Wang, L., & Chen, X. (2021). Sphingolipid metabolism, transport, and functions in plants: Recent progress and future perspectives. *Plant Communications*, 2(5), 100214. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100214>
- Liu, P., Xie, T., Wu, X., Han, G., Gupta, S. D., Zhang, Z., Yue, J., Dong, F., Gable, K., Niranjankumari, S., Li, W., Wang, L., Liu, W., Yao, R., Cahoon, E. B., Dunn, T. M., & Gong, X. (2023). Mechanism of sphingolipid homeostasis revealed by structural analysis of Arabidopsis SPT-ORM1 complex. *Science Advances*, 9(13). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg0728>
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(8), 1391-1406. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.8.1391>
- Lu, J., Xu, Y., Wang, J., Singer, S. D., & Chen, G. (2020). The role of triacylglycerol in plant stress response. *Plants*, 9(4), 472. <https://doi.org/10.3390/plants9040472>
- Luan, S., Kudla, J., Rodríguez-Concepción, M., Yalovsky, S., & Gruissem, W. (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S389-S400. <https://doi.org/10.1105/tpc.001115>
- Luo, W., Huan, Q., Xu, Y., Qian, W., Chong, K., & Zhang, J. (2021). Integrated global analysis reveals a vitamin E-vitamin K1 sub-network, downstream of COLD1, underlying rice chilling tolerance divergence. *Cell Reports*, 36(3), 109397. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109397>
- Luttgeharm, K. D., Kimberlin, A., & Cahoon, E. B. (2016). Plant sphingolipid metabolism and function. En: *Sub-cellular Biochemistry* (pp. 249-286). https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_11
- Lynch, D. V., & Dunn, T. M. (2004). An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist*, 161(3), 677-702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.00992.x>
- Ma, H., & Liu, M. (2019). The microtubule cytoskeleton acts as a sensor for stress response signaling in plants. *Molecular Biology Reports*, 46(5), 5603-5608. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04872-x>
- Ma, T., Wang, S., Sun, C., Tian, J., Guo, H., Cui, S., & Zhao, H. (2023). Arabidopsis LFR, a SWI/SNF complex component, interacts with ICE1 and activates ICE1 and CBF3 expression in cold acclimation. *Frontiers In Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1097158>

- Ma, Y., Dai, X., Xu, Y., Luo, W., Zheng, X., Zeng, D., Pan, Y., Lin, X., Liu, H., Zhang, D., Xiao, J., Guo, X., Xu, S., Niu, Y., Jin, J., Zhang, H., Xu, X., Li, L., Wang, W., Chong, K. (2015). COLD1 confers chilling tolerance in rice. *Cell*, 160(6), 1209-1221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.046>
- Manoharan, K., Chae, H. S., Myoung, J., Cho, S. H., Shin, S. H., Cho, B. H., & Lee, W. S. (2000). Synthesis of phosphatidylserine in carrot cells cultured under carbon-source starvation. *Plant and Cell Physiology*, 41(10), 1143-1148. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcd041>
- Markham, J. E., & Jaworski, J. G. (2007). Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(7), 1304-1314. <https://doi.org/10.1002/rcm.2962>
- Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B., & Jaworski, J. G. (2006). Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22684-22694. <https://doi.org/10.1074/jbc.m604050200>
- Markham, J. E., Lynch, D. V., Napier, J. A., Dunn, T. M., & Cahoon, E. B. (2013). Plant sphingolipids: function follows form. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 350-357. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.009>
- Markham, J. E., Molino, D., Gissot, L., Bellec, Y., Hématy, K., Marion, J., Belcram, K., Palauqui, J., Satiat-Jeunemaitre, B., & Faure, J. (2011). Sphingolipids containing very-long-chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(6), 2362-2378. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080473>
- Martinière, A., & Zelazny, E. (2021). Membrane nanodomains and transport functions in plant. *Plant Physiology*, 187(4), 1839-1855. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab312>
- Martinière, A., Shvedunova, M., Thomson, A., Evans, N. H., Penfield, S., Runions, J., & McWatters, H. G. (2011). Homeostasis of plasma membrane viscosity in fluctuating temperatures. *New Phytologist*, 192(2), 328-337. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03821.x>
- Merrill, A. H. (2011). Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chemical Reviews*, 111(10), 6387-6422. <https://doi.org/10.1021/cr2002917>
- Merrill, A. H., Stokes, T. H., Momin, A. A., Park, H., Portz, B. J., Kelly, S., Wang, E., Sullards, M. C., & Wang, M. D. (2009). Sphingolipidomics: A valuable tool for understanding the roles of sphingolipids in biology and disease. *Journal of Lipid Research*, 50, S97-S102. <https://doi.org/10.1194/jlr.r800073-jlr200>

- Michaelson, L. V., Napier, J. A., Molino, D., & Faure, J. (2016). Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1329-1335. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.04.003>
- Michalak, A., Wdowikowska, A., & Janicka, M. (2022). Plant plasma membrane proton pump: one protein with multiple functions. *Cells*, 11(24), 4052. <https://doi.org/10.3390/cells11244052>
- Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y., & Uemura, M. (2008). Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant and Cell Physiology*, 50(2), 341-359. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn202>
- Miura, K., & Furumoto, T. (2013). Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5312-5337. <https://doi.org/10.3390/ijms14035312>
- Miura, K., Jin, J. B., Lee, J., Yoo, C. Y., Stirm, V., Miura, T., Ashworth, E. N., Bressan, R. A., Yun, D., & Hasegawa, P. M. (2007). SIZ1-Mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(4), 1403-1414. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048397>
- Młodzińska, E., & Zboińska, M. (2016). Phosphate uptake and allocation – A closer look at *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01198>
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J., Hartmann, M., Bonneu, M., Simon-Plas, F., Lessire, R., & Bessoule, J. (2004). Lipid rafts in higher plant cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36277-36286. <https://doi.org/10.1074/jbc.m403440200>
- Morales-Cedillo, F., González-Solís, A., Gutiérrez-Angoa, L., Cano-Ramírez, D. L., & Gavilanes-Ruiz, M. (2015). Plant lipid environment and membrane enzymes: the case of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Reports*, 34(4), 617-629. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1735-z>
- Mortimer, J. C., & Scheller, H. V. (2020). Synthesis and function of complex sphingolipid glycosylation. *Trends in Plant Science*, 25(6), 522-524. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.007>
- Msanne, J., Chen, M., Luttgeharm, K. D., Bradley, A. M., Mays, E. S., Paper, J. M., Boyle, D. L., Cahoon, R. E., Schrick, K., & Cahoon, E. B. (2015). Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 84(1), 188-201. <https://doi.org/10.1111/tpj.13000>
- Msanne, J., Chen, M., Luttgeharm, K. D., Bradley, A. M., Mays, E. S., Paper, J. M., Boyle, D. L., Cahoon, R. E., Schrick, K., & Cahoon, E. B. (2015). Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 84(1), 188-201. <https://doi.org/10.1111/tpj.13000>

- Mueller, N. S., Wedlich-Söldner, R., & Spira, F. (2012). From mosaic to patchwork: matching lipids and proteins in membrane organization. *Molecular Membrane Biology*, 29(5), 186-196. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.687461>
- Muratore, C., Espen, L., & Prinsi, B. (2021). Nitrogen uptake in plants: the plasma membrane root transport systems from a physiological and proteomic perspective. *Plants*, 10(4), 681. <https://doi.org/10.3390/plants10040681>
- Murphy, A. S., Peer, W., & Schulz, B. (2011). *The Plant Plasma Membrane*. Springer. Berlin.
- Muzi, C., Camoni, L., Visconti, S., & Aducci, P. (2016). Cold stress affects H⁺-ATPase and phospholipase D activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 328-336. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.027>
- Muzi, C., Camoni, L., Visconti, S., & Aducci, P. (2016). Cold stress affects H⁺-ATPase and phospholipase D activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 328-336. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.027>
- Nagano, M., Ishikawa, T., Ogawa, Y., Iwabuchi, M., Nakasone, A., Shimamoto, K., Uchimiya, H., & Kawai-Yamada, M. (2014). *Arabidopsis* BAX inhibitor-1 promotes sphingolipid synthesis during cold stress by interacting with ceramide-modifying enzymes. *Planta*, 240(1), 77-89. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2065-7>
- Nicolson, G. L., & Ferreira, G. (2023). The Fluid-Mosaic model of cell membranes: A brief introduction, historical features, some general principles, and its adaptation to current information. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1865(4), 184135. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184135>
- Novillo, F., Medina, J., & Salinas, J. (2007). *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), 21002-21007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705639105>
- Nühse, T. S., Bottrill, A. R., Jones, A. M. E., & Peck, S. C. (2007). Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *The Plant Journal*, 51(5), 931-940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03192.x>
- Ortiz-Ramírez, C., Mora, S., Trejo, J. J. G., & Pantoja, O. (2011). PVAMT1;1, a highly selective ammonium transporter that functions as H⁺/NH₄⁺ symporter. *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31113-31122. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.261693>
- Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F., & Dhindsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant Journal*, 23(6), 785-794. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00845.x>
- Palmgren, M. G. (2001). Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 817-845. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.817>

- Palmgren, M. G. (2023). P-type ATPases: Many more enigmas left to solve. *Journal of Biological Chemistry*, 299(11), 105352. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105352>
- Palta, J. P., Whitaker, B. D., & Weiss, L. S. (1993). Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of solanum species. *Plant Physiology*, 103(3), 793-803. <https://doi.org/10.1104/pp.103.3.793>
- Park, S., Gilmour, S. J., Grumet, R., & Thomashow, M. F. (2018). CBF-dependent and CBF-independent regulatory pathways contribute to the differences in freezing tolerance and cold-regulated gene expression of two *Arabidopsis* ecotypes locally adapted to sites in Sweden and Italy. *PLOS ONE*, 13(12), e0207723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207723>
- Pata, M. O., Hannun, Y. A., & Ng, C. (2009). Plant sphingolipids: Decoding the enigma of the sphinx. *New Phytologist*, 185(3), 611-630. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03123.x>
- Peña-Moral, A. (2015). *Estudio comparativo de la actividad de ATPasa en plantas con diferente capacidad de aclimatación* [Tesis de Licenciatura]. Instituto Tecnológico de Milpa Alta.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e-445. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Plieth, C., Hansen, U., Knight, H., & Knight, M. R. (1999). Temperature sensing by plants: The primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant Journal*, 18(5), 491-497. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00471.x>
- Ponce-Pineda, I. G. (2018). *Caracterización de la actividad de la ATPasa de H⁺ en la línea mutante mpk3 en condiciones de aclimatación al frío* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Quinn, P. J. (2014). Sphingolipid symmetry governs membrane lipid raft structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(7), 1922-1930. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.02.021>
- Quinville, B. M., Deschenes, N. M., Ryckman, A. E., & Walia, J. S. (2021). A Comprehensive review: Sphingolipid metabolism and implications of disruption in sphingolipid homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5793. <https://doi.org/10.3390/ijms22115793>
- Raghunathan, K., & Kenworthy, A. K. (2018). Dynamic pattern generation in cell membranes: Current insights into membrane organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(10), 2018-2031. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.002>

- Raju, S. K. K., Barnes, A. C., Schnable, J. C., & Roston, R. (2018). Low-temperature tolerance in land plants: Are transcript and membrane responses conserved? *Plant Science*, 276, 73-86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.08.002>
- Raju, S. K. K., Barnes, A. C., Schnable, J. C., & Roston, R. (2018). Low-temperature tolerance in land plants: Are transcript and membrane responses conserved? *Plant Science*, 276, 73-86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.08.002>
- Rapacz, M., Wolanin, B., Hura, K., & Tyrka, M. (2008). The effects of cold acclimation on photosynthetic apparatus and the expression of COR14B in four genotypes of barley (*Hordeum vulgare*) Contrasting in their tolerance to freezing and high-light treatment in cold conditions. *Annals of Botany*, 101(5), 689-699. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn008>
- Rawat, N., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2020). Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same. *Physiologia Plantarum*, 171(4), 653-676. <https://doi.org/10.1111/ppl.13217>
- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., & Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiology. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular And Cell Biology Of Lipids*, 1841(1), 108-120. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.10.004>
- Renne, M. F., & Ernst, R. (2023). Membrane homeostasis beyond fluidity: control of membrane compressibility. *Trends In Biochemical Sciences*, 48(11), 963-977. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.08.004>
- Reszczyńska, E., & Hanaka, A. (2020). Lipids Composition in Plant Membranes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 78(4), 401-414. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00947-w>
- Roche, Y., Gerbeau-Pissot, P., Buhot, B., Thomas, D., Bonneau, L., Gresti, J., Mongrand, S., Perrier-Cornet, J., & Simon-Plas, F. (2008). Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *The FASEB Journal*, 22(11), 3980-3991. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111070>
- Sánchez-Nieto, S., García-Rubio, O., Pacheco-Moisés, F. P., Carballo, A. C., Rodríguez-Sotres, R., & Gavilanes-Ruiz, M. (1997). Purification of plasma membranes from dry maize embryos. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01832.x>
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S401-S417. <https://doi.org/10.1105/tpc.002899>
- Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., & Dhindsa, R. S. (2001). Cold-activation of *Brassica napus* BN115 Promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *Plant Journal*, 27(1), 1-12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01052.x>

- Saucedo García, M. (2011). *La muerte celular programada de Arabidopsis inducida por la FB1 requiere de la acumulación de bases de cadena larga y de la señalización mediada por la MPK6* [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Saucedo-García, M., González-Córdova, C. D., Ponce-Pineda, I. G., Cano-Ramírez, D., Romero-Colín, F. M., Arroyo-Pérez, E. E., King-Díaz, B., Zavafer, A., & Gavilanes-Ruiz, M. (2021). Effects of MPK3 and MPK6 kinases on the chloroplast architecture and function induced by cold acclimation in Arabidopsis. *Photosynthesis Research*, 149(1-2), 201-212. <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00852-0>
- Saucedo-García, M., González-Solís, A., Rodríguez-Mejía, P., Lozano-Rosas, G., De Jesús Olivera-Flores, T., Carmona-Salazar, L., Guevara-García, Á. A., Cahoon, E. B., & Gavilanes-Ruiz, M. (2023). Sphingolipid long-chain base signaling incompatible and non-compatible plant-pathogen interactions in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4384. <https://doi.org/10.3390/ijms24054384>
- Saucedo-García, M., Guevara-García, Á. A., González-Solís, A., Cruz-García, F., Vázquez-Santana, S., Markham, J. E., Lozano-Rosas, M. G., Dietrich, C. R., Ramos-Vega, M., Cahoon, E. B., & Gavilanes-Ruiz, M. (2011). MPK6, Sphinganine and the *LCB2A* gene from Serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in Arabidopsis. *New Phytologist*, 191(4), 943-957. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03727.x>
- Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research*, 42(3), 163-175. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(02\)00047-4](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00047-4)
- Schmelzle, T., Helliwell, S. B., & Hall, M. N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 22(5), 1329-1339. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.5.1329-1339.2002>
- Seitz, G., Yildirim, S., Boehmler, A. M., Kanz, L., & Möhle, R. (2005). Sphingosine 1-Phosphate (S1P) induces migration and ERK/MAP-Kinase-Dependent proliferation in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) due to expression of the G Protein-Coupled receptors S1P1/4. *Blood*, 106(11), 4996. <https://doi.org/10.1182/blood.v106.11.4996.4996>

- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), 361-374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
- Sharma, R., Singh, G., Bhattacharya, S., & Singh, A. (2018). Comparative transcriptome meta-analysis of *Arabidopsis thaliana* under drought and cold stress. *PLOS ONE*, 13(9), e0203266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203266>
- Shelby, S. A., & Veatch, S. L. (2023). the membrane phase transition gives rise to responsive plasma membrane structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 15(11), a041395. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041395>
- Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun, Y. A., & Zuo, J. (2007). Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in Arabidopsis. *Cell Research*, 17(12), 1030-1040. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.100>
- Shimazaki, K. I., Doi, M., Assmann, S. M., & Kinoshita, T. (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 219-247. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105434>
- Shinoda, W. (2016). Permeability across lipid membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(10), 2254-2265. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.032>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569-572. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Simons, K., & Van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17), 6197-6202. <https://doi.org/10.1021/bi00417a001>
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Skinner, J. S., J. V. Z., Szűcs, P., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Amundsen, K., Ej, S., Mf, T., Th, C., & Pm, H. (2005). Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Molecular Biology*, 59(4), 533-551. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2498-2>
- Sørensen, T., Møller, J., & Nissen, P. (2004). Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science*, 304(5677), 1672-1675. <https://doi.org/10.1126/science.1099366>
- Spartz, A., Lee, S. H., Wenger, J. P., González, N., Itoh, H., Inzé, D., Peer, W. A., Murphy, A. S., Overvoorde, P. J., & Gray, W. M. (2012). The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. *The Plant Journal*, 70(6), 978-990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2012.04946.x>

- Spartz, A., Ren, H. Y., Park, M. Y., Grandt, K. N., Lee, S. H., Murphy, A. S., Sussman, M. R., Overvoorde, P. J., & Gray, W. M. (2014). SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H⁺-ATPases to promote cell expansion in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(5), 2129-2142. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.126037>
- Spassieva, S. D., & Hille, J. (2003). Plant sphingolipids today - are they still enigmatic? *Plant Biology*, 5(2), 125-136. <https://doi.org/10.1055/s-2003-40726>
- Sperling, P., Franke, S., L  thje, S., & Heinz, E. (2005). Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(12), 1031-1038. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.10.004>
- Spiegel, S., & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5), 397-407. <https://doi.org/10.1038/nrm1103>
- St  ger, A., Hayashi, M., Lauritzen, E. W., Herburger, K., Shabala, L., Wang, C., Bendtsen, A. K., N  rrevang, A. F., Madriz-Orde  ana, K., Ren, S., Trinh, M. D. L., Thordal-Christensen, H., Fuglsang, A. T., Shabala, S.,   sterberg, J. T., & Palmgren, M. G. (2022). The evolution of plant proton pump regulation via the R domain may have facilitated plant terrestrialization. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04291-y>
- Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3), 1035-1040. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.1035>
- Stritzler, M., Garc  a, M. N. M., Schlesinger, M., Cortelezzi, J. I., & Capiati, D. A. (2017). The plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Solanum tuberosum* L. role of PHA1 in tuberization. *Journal of Experimental Botany*, 68(17), 4821-4837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx284>
- Sun, T., & Zhang, Y. (2022). MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO Reports*, 23(2). <https://doi.org/10.15252/embr.202153817>
- Suzuki, K., & Kusumi, A. (2023). Refinement of Singer-Nicolson fluid-mosaic model by microscopy imaging: lipid rafts and actin-induced membrane compartmentalization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1865(2), 184093. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184093>
- Sze, H., & Chanroj, S. (2018). Plant endomembrane dynamics: Studies of K⁺/H⁺ antiporters provide insights on the effects of pH and ion homeostasis. *Plant Physiology*, 177(3), 875-895. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00142>

- Szymanski, W. G., Zaubner, H., Erban, A., Górka, M., Wu, X., & Schulze, W. X. (2015b). Cytoskeletal components define protein location to membrane microdomains. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(9), 2493-2509. <https://doi.org/10.1074/mcp.m114.046904>
- Tafesse, F. G., & Holthuis, J. C. M. (2010). A brake on lipid synthesis. *Nature*, 463(7284), 1028-1029. <https://doi.org/10.1038/4631028a>
- Takahashi, D., Imai, H., Kawamura, Y., & Uemura, M. (2016). Lipid profiles of detergent resistant fractions of the plasma membrane in oat and rye in association with cold acclimation and freezing tolerance. *Cryobiology*, 72(2), 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.003>
- Takahashi, D., Kawamura, Y., & Uemura, M. (2013). Changes of detergent-resistant plasma membrane proteins in oat and rye during cold acclimation: association with differential freezing tolerance. *Journal Of Proteome Research*, 12(11), 4998-5011. <https://doi.org/10.1021/pr400750g>
- Takahashi, H., Büchner, P., Yoshimoto, N., Hawkesford, M. J., & Shiu, S. (2012). Evolutionary relationships and functional diversity of plant sulfate transporters. *Frontiers in Plant Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00119>
- Takahashi, K., Hayashi, K., & Kinoshita, T. (2012). AUXin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 159(2), 632-641. <https://doi.org/10.1104/pp.112.196428>
- Takemiya, A., Yamauchi, S., Yano, T., Ariyoshi, C., & Shimazaki, K. I. (2012). Identification of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 which mediates blue light signaling for stomatal opening. *Plant and Cell Physiology*, 54(1), 24-35. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs073>
- Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T., & Maeda, T. (2012). Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 32(14), 2861-2870. <https://doi.org/10.1128/mcb.06111-11>
- Tarazona, P., Feussner, K., & Feußner, I. (2015). An enhanced plant lipidomics method based on multiplexed liquid chromatography-mass spectrometry reveals additional insights into cold- and drought-induced membrane remodeling. *The Plant Journal*, 84(3), 621-633. <https://doi.org/10.1111/tpj.13013>
- Tarkowski, Ł. P., & Van Den Ende, W. (2015). Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00203>
- Teale, W., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). AUXIN in Action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847-859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>

- Teng, C., Dong, H., Shi, L., Deng, Y., Mu, J., Zhang, J., Yang, X., & Zuo, J. (2008). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme for de novo synthesis of sphingolipids, is essential for male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(3), 1322-1332. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113506>
- Testerink, C., & Munnik, T. (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(7), 2349-2361. <https://doi.org/10.1093/jxb/err079>
- Thalhammer, A., & Hinch, D. K. (2014). A mechanistic model of COR15 protein function in plant freezing tolerance: integration of structural and functional characteristics. *Plant Signaling & Behavior*, 9(12), e977722. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977722>
- Thalhammer, A., Bryant, G., Sulpice, R., & Hinch, D. K. (2014). Disordered cold regulated15 proteins protect chloroplast membranes during freezing through binding and folding, but do not stabilize chloroplast enzymes *in vivo*. *Plant Physiology*, 166(1), 190-201. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245399>
- Thomashow, M. F. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 571-599. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571>
- Thomashow, M. F. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 571-599. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571>
- Thomashow, M. F., Gilmour, S. J., Stockinger, E. J., Jaglo-Ottosen, K. R., & Zarka, D. G. (2001). Role of the Arabidopsis CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 112(2), 171-175. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120204.x>
- Turner, J., Anderson, P. S., Lachlan-Cope, T., Colwell, S., Phillips, T., Kirchaessner, A., Marshall, G. J., King, J. C., Bracegirdle, T. J., Vaughan, D. G., Lagun, V. E., & Orr, A. (2009). Record low surface air temperature at Vostok Station, Antarctica. *Journal of Geophysical Research*, 114(D24). <https://doi.org/10.1029/2009jd012104>
- Uemura, M., Joseph, R. A., & Steponkus, P. L. (1995). Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant Physiology*, 109(1), 15-30. <https://doi.org/10.1104/pp.109.1.15>
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W71-W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>

- Valitova, J. N., Sulkarnayeva, A. G., & Minibayeva, F. (2016). Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biokhimiya*, 81(8), 819-834. <https://doi.org/10.1134/s0006297916080046>
- Van Brocklyn, J. R., Letterle, C. A., Snyder, P. J., & Prior, T. W. (2002). Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through G1-coupled receptors: role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase B. *Cancer Letters*, 181(2), 195-204. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00050-2)
- Van Buer, J., Cvetković, J., & Baier, M. (2016). Cold regulation of plastid ascorbate peroxidases serves as a priming hub controlling ROS signaling in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0856-7>
- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112-124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Varela, A. R., Couto, A. S., Fedorov, A., Futerman, A. H., Prieto, M., & Silva, L. C. (2016). Glucosylceramide reorganizes cholesterol-containing domains in a fluid phospholipid membrane. *Biophysical Journal*, 110(3), 612-622. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.12.019>
- Vaultier, M., Cantrel, C., Vergnolle, C., Justin, A., Demandre, C., Benhassaine-Kesri, G., Çiçek, D., Zachowski, A., & Ruelland, E. (2006). Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. *FEBS Letters*, 580(17), 4218-4223. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.083>
- Veatch, S. L., Rogers, N., Decker, A. M., & Shelby, S. A. (2023). The plasma membrane as an adaptable fluid mosaic. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1865(3), 184114. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184114>
- Vereb, G., Szöllösi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L. G., Mátyus, L., Ta, W., & Damjanovich, S. (2003). Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8053-8058. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332550100>
- Vogel, J. T., Zarka, D. G., Van Buskirk, H. A., Fowler, S., & Thomashow, M. F. (2004). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 41(2), 195-211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2004.02288.x>
- Wang, D., Lv, H., Xia, G., & Wang, M. (2012). Does diacylglycerol serve as a signaling molecule in plants? *Plant Signaling & Behavior*, 7(4), 472-475. <https://doi.org/10.4161/psb.19644>

- Wang, K., Sitsel, O., Meloni, G., Autzen, H. E., Andersson, M., Klymchuk, T., Nielsen, A. M., Rees, D. C., Nissen, P., & Gourdon, P. (2014). Structure and mechanism of Zn²⁺-transporting P-type ATPases. *Nature*, 514(7523), 518-522. <https://doi.org/10.1038/nature13618>
- Wang, M., Li, P., Ma, Y., Nie, X., Grebe, M., & Men, S. (2021). Membrane sterol composition in *Arabidopsis thaliana* affects root elongation via auxin biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 437. <https://doi.org/10.3390/ijms22010437>
- Wang, S.; Hu, W.; Liu, F. Autophagy in the lifetime of plants: from seed to seed. (2022). *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 11410. <https://doi.org/10.3390/ijms231911410>.
- Wang, X., Ding, Y., Li, Z., Shi, Y., Wang, J., Hua, J., Gong, Z., Zhou, J., & Yang, S. (2019). PUB25 and PUB26 promote plant freezing tolerance by degrading the cold signaling negative regulator MYB15. *Developmental Cell*, 51(2), 222-235.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.08.008>
- Wang, Y., & Hua, J. (2009). A moderate decrease in temperature induces COR15a expression through the CBF signaling cascade and enhances freezing tolerance. *The Plant Journal*, 60(2), 340-349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2009.03959.x>
- Wani, S. H., & Herath, V. (2018). *Cold tolerance in plants: Physiological, Molecular and Genetic Perspectives*. Springer.
- Warnecke, D., & Heinz, E. (2003). Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(5), 919-941. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2243-4>
- Wegner, L. H., & Shabala, S. (2019). Biochemical pH clamp: the forgotten resource in membrane bioenergetics. *New Phytologist*, 225(1), 37-47. <https://doi.org/10.1111/nph.16094>
- Welte, M. A., & Gould, A. P. (2017). Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(10), 1260-1272. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.006>
- Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H., Rajashekar, C. B., Williams, T. D., & Wang, X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31994-32002. <https://doi.org/10.1074/jbc.m205375200>
- White, P. J., & Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105(7), 1073-1080. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>
- Winfield, M., Lu, C., Wilson, I., Coghill, J. A., & Edwards, K. J. (2010). Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 8(7), 749-771. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00536.x>

- Wisniewski, M., Fuller, M. P., Palta, J. P., Carter, J., & Arora, R. (2004). Ice nucleation, propagation, and deep supercooling in woody plants. *Journal of Crop Improvement*, 10(1-2), 5-16. https://doi.org/10.1300/j411v10n01_02
- Wisniewski, M., Nassuth, A., & Arora, R. (2018). Cold hardiness in trees: A mini-review. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01394>
- Wisniewski, M., Norelli, J. L., & Artlip, T. S. (2015). Overexpression of a peach CBF gene in apple: A model for understanding the integration of growth, dormancy, and cold hardiness in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00085>
- Wu, J., Jin, C., Qu, H., Tao, S., Xu, G., Wu, H., & Zhang, S. (2012). Low temperature inhibits pollen viability by alteration of actin cytoskeleton and regulation of pollen plasma membrane ion channels in *Pyrus pyrifolia*. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.12.021>
- Wu, J., Li, J., Liu, Z., Yin, J., Chang, Z., Rong, C., Wu, J., Bi, F., & Yao, N. (2015). The Arabidopsis ceramidase ATACER functions in disease resistance and salt tolerance. *The Plant Journal*, 81(5), 767-780. <https://doi.org/10.1111/tpj.12769>
- Xiao, H., Siddiqua, M., Braybrook, S. A., & Nassuth, A. (2006). Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant Cell Environ*, 29(7), 1410-1421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01524.x>
- Xiao, H., Tattersall, E. A. R., Siddiqua, M., Cramer, G. R., & Nassuth, A. (2008). CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant, Cell & Environment*, 31(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01741.x>
- Xie, L., Yu, L., Chen, Q., Wang, F., Huang, L., Xia, F., Zhu, T., Wu, J., Yin, J., Liao, B., Yao, N., Shu, W., & Xiao, S. (2014). Arabidopsis acyl-CoA-binding protein ACP3 participates in plant response to hypoxia by modulating very-long-chain fatty acid metabolism. *The Plant Journal*, 81(1), 53-67. <https://doi.org/10.1111/tpj.12692>
- Xin, Z., & Browse, J. (1998). Eskimo1 mutants of arabidopsis are constitutively freezing-tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7799-7804. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7799>
- Xin, Z., Mandaokar, A., Chen, J., & Browse, J. (2007). Arabidopsis ESK1 encodes a novel regulator of freezing tolerance. *The Plant Journal*, 49(5), 786-799. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2006.02994.x>
- Xue, F., Liu, W., Zeng, F., Chen, Z., Zhang, G., & Wu, F. (2016). K⁺ uptake, H⁺-ATPase pumping activity and Ca²⁺ efflux mechanism are involved in drought tolerance of barley. *Environmental and Experimental Botany*, 129, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.11.006>

- Yadav, S. K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(3), 515-527. <https://doi.org/10.1051/agro/2009050>
- Yamaguchi, Y., Katsuki, Y., Tanaka, S., Kawaguchi, R., Denda, H., Ikeda, T., Funato, K., & Tani, M. (2017). Protective role of the HOG pathway against the growth defect caused by impaired biosynthesis of complex sphingolipids in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 107(3), 363-386. <https://doi.org/10.1111/mmi.13886>
- Yang, C., Wang, L., Li, Y., Lin, J., Chen, D., & Yao, N. (2024). Arabidopsis leaf chloroplasts have a specific sphingolipidome. *Plants*, 13(2), 299. <https://doi.org/10.3390/plants13020299>
- Yates, A. D., Allen, J., Amode, R. M., Azov, A. G., Barba, M., Becerra, A., Bhai, J., Campbell, L. I., Martinez, M. C., Chakiachvili, M., Chougule, K., Christensen, M., Contreras-Moreira, B., Cuzick, A., Da Rin Fioretto, L., Davis, P. A., De Silva, N., Diamantakis, S., Dyer, S., Flicek, P. (2021). ENSEMBL Genomes 2022: An expanding genome resource for non-vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D996-D1003. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1007>
- Yatime, L., Laursen, M., Morth, J. P., Esmann, M., Nissen, P., & Fedosova, N. U. (2011). Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. *Journal of Structural Biology*, 174(2), 296-306. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.12.004>
- Yu, D., Boughton, B. A., Rupasinghe, T., Hill, C. B., Herrfurth, C., Scholz, P., Feußner, I., & Roessner, U. (2023). Discovery of novel neutral glycosphingolipids in cereal crops: rapid profiling using reversed-phased HPLC-ESI-QqTOF with parallel reaction monitoring. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49981-7>
- Yuan, W., Zhang, J., Song, T., Xu, F., Lin, S., Xu, W., Li, Q., Zhu, Y., & Liang, J. (2017). Arabidopsis plasma membrane H⁺-ATPase genes AHA2 and AHA7 have distinct and overlapping roles in the modulation of root tip H⁺ efflux in response to low-phosphorus stress. *Journal of Experimental Botany*, 68(7), 1731-1741. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx040>
- Yue, H., Nie, S., & Xing, D. (2012). Over-expression of Arabidopsis Bax inhibitor-1 delays methyl jasmonate-induced leaf senescence by suppressing the activation of MAP kinase 6. *Journal Of Experimental Botany*, 63(12), 4463-4474. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers122>
- Yun, K., Park, M. R., Mohanty, B., Herath, V., Xu, F., Mauleon, R., Wijaya, E., Bajic, V. B., Bruskiwich, R., & De Los Reyes, B. G. (2010). Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of Japonica rice to chilling stress. *BMC Plant Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-16>

- Zarka, D. G., Vogel, J. T., Cook, D., & Thomashow, M. F. (2003). Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology*, 133(2), 910-918. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027169>
- Zeng, H., & Yao, N. (2022). Sphingolipids in plant immunity. *Phytopathology Research*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s42483-022-00125-1>
- Zhang, J., Luo, W., Zhao, Y., Xu, Y., Song, S., & Chong, K. (2016). Comparative metabolomic analysis reveals a reactive oxygen species-dominated dynamic model underlying chilling environment adaptation and tolerance in rice. *New Phytologist*, 211(4), 1295-1310. <https://doi.org/10.1111/nph.14011>
- Zhang, W. J., Zhou, Y., Zhang, Y., Su, Y., & Xu, T. (2023). Protein phosphorylation: a molecular switch in plant signaling. *Cell Reports*, 42(7), 112729. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112729>
- Zhao, C., Zhang, Z., Xie, S., Si, T., Li, Y., & Zhu, J. (2016). Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 171(4), 2744-2759. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00533>
- Zheng, G., Tian, B., Zhang, F., Tao, F., & Li, W. (2011). Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. *Plant, Cell & Environment*, 34(9), 1431-1442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02341.x>
- Zheng, P., Wu, J., Liu, H., Zeng, H., Huang, L., Liu, Z., Xiao, S., & Yao, N. (2018). Loss of alkaline ceramidase inhibits autophagy in Arabidopsis and plays an important role during environmental stress response. *Plant, Cell & Environment*, 41(4), 837-849. <https://doi.org/10.1111/pce.13148>
- Zhu, J., Shi, H., Lee, B., Damsz, B., Cheng, S., Stirm, V., Zhu, J. K., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. (2004). An Arabidopsis homeodomain transcription factor gene, *HOS9*, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9873-9878. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403166101>
- Zhuang X, Jiang L (2019) Chloroplast degradation: Multiple routes into the vacuole. *Front Plant Sci* 10:359. doi: 10.3389/fpls.2019.00359

APÉNDICES

Apéndice I

Composición del medio de Hoagland [Jones, 1982].

Tabla 9. Composición química de los macronutrientes y micronutrientes en el medio de Hoagland.

MICRONUTRIENTES		MACRONUTRIENTES	
REACTIVOS	mM	REACTIVOS	mM
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.009	KNO ₃	6
H ₃ BO ₃	0.046	Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	4
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.0008	NH ₄ H ₂ PO ₄	1
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.0003	MgSO ₄ •7H ₂ O	2
H ₂ MoO ₄ •H ₂ O	0.0001		

- El medio de Hoagland se compone de las soluciones de macronutrientes-micronutrientes (1:1) y Fe-EDTA (0.00005 %).
- Las soluciones de micronutrientes y macronutrientes se preparan independientemente disueltos en agua bidestilada y en el orden indicado en la Tabla 9.
- El pH del medio se ajusta con NaOH 3 M a 5.2 - 5.5.

Apéndice II

Tabla 9. Composición química de las soluciones utilizadas para la obtención de fracción citosólica.

BUFFER	COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN
De homogenización	Sorbitol 250 mM, HEPES/BTP 50 mM, pH 7.8, NaF 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 1 mM, Na ₃ VO ₄ 1 mM, PMSF 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 40 µg/ml

Apéndice III

Tabla 10. Composición química de las soluciones utilizadas para la obtención de fracción microsomal y vesículas de membrana plasmática.

BUFFER	COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN
De homogenización	Sorbitol 620 mM, HEPES/BTP 50 mM, pH 7.8, β-mercaptoetanol 15 mM, ácido ascórbico 5 mM, EDTA 3 mM, DTT 1 mM, KCl 1 mM, PVP 0.6 %, BSA 0.2 % y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 1.6 µg/ml
De resuspensión del botón microsomal o de ajuste de peso	Sorbitol 620 mM, K ₂ HPO ₄ 5 mM, pH 7.8, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 1.6 µg/ml
De lavado	Sorbitol 350 mM, HEPES/BTP 2 mM, pH 7.8, DTT 1 mM, KCl 1 mM y cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) 1.6 µg/ml

Apéndice IV

Tabla 11. Composición de la mezcla de fases para la obtención de MP en reparto de fases de 4 g de peso.

Cantidad de proteína microsomal	10 mg
Dextrán T500 20 %	6.2 %
Polietilenglicol (PEG) 40 %	6.2 %
Sorbitol	620 mM
KH ₂ PO ₄ 200 mM, pH 7.8	5 mM
DTT 300 mM	1 mM
EDTA 100 mM	0.1 mM
Número de repartos	U1

Apéndice V

Tabla 12. Preparación de gel SDS-PAGE (1.0 mm de grosor).

Soluciones y/o reactivos	Gel separador (μl)	Gel concentrador (μl)
Acrilamida-bis acrilamida (10 - 0.3 %)	1631.9	264.25
Amortiguador del gel (3 M Tris- 0.3 % SDS), pH 8.9	1631.9	495.5
Glicerol	660.16	-
Agua grado HPLC	990.98	1221.15
Persulfato de amonio (10 %)	16.5	16.5
TEMED	1.65	1.65

Amortiguadores para electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS.

- A. Amortiguador del cátodo.
 - a. 0.1 M tris (Trizma Base)
 - b. 0.1 M tricina
 - c. 0.1 % SDS
- B. Amortiguador del ánodo.
 - a. 0.2 M tris (Trizma Base)
 - b. Ajustar pH 8.9 con HCl 1 M

Apéndice VI

Soluciones para tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.

- A. Solución fijadora/desteñidora.
 - a. 50 % metanol
 - b. 10 % ácido acético
- B. Solución de tinción con azul de Coomassie
 - a. 1.5 g azul de Coomassie
 - b. 375 mL metanol
 - c. 200 mL ácido acético
 - d. 950 mL agua destilada

Apéndice VII

Soluciones y condiciones para la inmunodetección en membranas de PVDF.

- A. Solución amortiguadora de transferencia para réplica en Western.
 - a. 15 mL de una solución 1 M de amortiguador de fosfatos a pH 6.8 (se prepara tomando 7.5 ml de 1 M de Na_2HPO_4 y 7.5 mL de 1 M de NaH_2PO_4)
 - b. 200 mL de metanol reactivo analítico
 - c. 5 mL de solución SDS al 10 %

Aforar todo lo anterior a 1 L con agua bidestilada
- B. Solución amortiguadora a pH 7.5 (Tris-solución salina, TBS)
 - a. 2.4 g/L Trizma base
 - b. 8.8 g/L de NaCl

Ajustar a pH de 7.5
- C. Solución amortiguadora TBS con Tween 20 (TTBS)
 - a. 900 mL TBS
 - b. 100 mL Tween 20 al 0.1 % v/v

Apéndice VIII

Tabla 13. Condiciones para incubación y revelado de membranas.

Anticuerpo	Solución Bloqueadora	Primer anticuerpo y condiciones de incubación	Solución del segundo anticuerpo* y condiciones de incubación
ATPasa de H^+ de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Agrisera)	2 % de leche descremada <i>Svelty</i> en TBS (30 mL)	3 μl de anticuerpo ATPasa de H^+ en 0.06 g leche descremada <i>Svelty</i> / 3 mL TBS durante toda la noche	4 μl de anticuerpo fosfatasa alcalina en 0.2 g leche descremada <i>Svelty</i> / 10 mL TTBS por 2 h
14-3-3 de <i>Arabidopsis</i> (Agrisera)	2 % de leche descremada <i>Svelty</i> en TTBS	3 μl de anticuerpo 14-3-3 en 0.06 g leche descremada <i>Svelty</i> / 3 mL TTBS durante toda la noche	4 μl de anticuerpo fosfatasa alcalina en 0.2 g leche descremada <i>Svelty</i> / 10 mL TTBS por 2 h

*Fosfatasa alcalina del proveedor *Millipore*® a una dilución 1:2500 (4 μl en 10 mL de TTBS)

- A. Solución patrón de NBT para desarrollar color
 - a. 30 mg NBT en 1 mL de dimetilformamida al 70 %
- B. Solución patrón de BCIP para desarrollar color
 - a. 15 mg BCIP en 1 mL de dimetilformamida
- C. Mezcla para desarrollar color
 - a. Se prepara justo antes de usarla

50 μL NBT y 50 μL BCIP en 10 mL TBS pH 9.5.

Apéndice IX

A. Solución del buffer TAE 1X.

- a. Tris-acetato 0.04 M
- b. EDTA 1 mM
- c. Agua DEPC
Ajustar a pH de 8.0

B. Agua DEPC

- a. 0.1 % DEPC
- b. Agua destilada

La solución se incuba 24 h y posteriormente se esteriliza en autoclave.