

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas (UNL) y Doctor Scientiae en Fisiologia Vegetal (UFV)

Interacciones entre la función mitocondrial y vías de señalización reguladoras del crecimiento en plantas

Lic. Florencia P. Coronel

Directores de Tesis: Dr. Daniel Gonzalez (UNL),
Prof. Wagner L. Araújo (UFV)
Co-directora de Tesis: Dra. Elina Welchen (UNL)

Laboratorio de Biología Molecular. Instituto de Agrobiotecnología del Litoral. CONICET – Universidad Nacional del Litoral
Departamento de Biología Vegetal – Universidade Federal de Viçosa

*Esta tesis está dedicada a mi abuela Elena,
mi persona favorita en el mundo entero.*

Quienes la conocen dirán que es un ángel,

Te amo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme la oportunidad de formarme durante mi carrera de grado (Facultad de Humanidades y Ciencias), como durante mi doctorado (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas), y permitirme ser parte del cuerpo docente en estos últimos años. Me considero hija de la educación pública, que tendrá mi respeto siempre, y reafirmo mi compromiso con la defensa de la EDUCACIÓN PÚBLICA, GRATUITA Y DE CALIDAD, incluso en estos tiempos donde estas instituciones han sido profundamente desvalorizadas.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL), por brindarme el espacio para realizar esta tesis. Particularmente a su directora, la Dra. Raquel Chan, por su apoyo a mi trabajo y a mi persona, incluso cuando las injusticias se hicieron presentes.

A la *Universidade Federal de Viçosa* (MG, Brasil), particularmente al *Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal*, por darme la oportunidad de ser parte de su institución.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por el financiamiento que hizo posible que esta tesis se lleve a cabo. Al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) y a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) por haber financiado parte de los análisis realizados en Brasil.

A mis directores, Daniel y Elina. No tengo más que palabras de agradecimiento y admiración para ustedes. Gracias por la paciencia, la guía y la confianza. Todo lo que aprendí a lo largo de estos 5 años se lo debo a ustedes.

A los Profesores Wagner y Adriano, por acompañarme en esta última etapa, mostrándome un mundo nuevo que logró cautivarme.

A mi familia, no habría llegado hasta acá sin su apoyo.

A mis amigos, mi segunda familia. Ojalá se hablara más de cómo los amigos son capaces de acompañar, apoyar y festejar los logros como si fueran propios. Curaron mi corazón. Los amo.

A mis compañeros del LBM, a los de los primeros años, que me ayudaron a dar mis primeros pasos en este mundo nuevo de la biotecnología, y siguen presentes hasta el día de hoy, y a los que se sumaron después. Gracias por las risas, la música, la compañía en el caos del día a día, los adagios para descomprimir y los almuerzos de 15 minutos. Más que mis compañeros, mis amigos.

A toda la gente de la *Unidade de Crescimento de Plantas* (UCP) en Viçosa, por apoyarme en todas mis locuras, y sumarse a mi trabajo con responsabilidad y compromiso. Ustedes forman parte fundamental de esta tesis.

A mi estudiante, Valentina, por el compromiso en el trabajo, el compañerismo y la responsabilidad que demostrás todos los días. Gracias por permitirme guiarte, espero que hayas disfrutado tanto de este camino como yo.

Finalmente, a todas las personas que me acompañaron, que me brindaron su ayuda, su consejo, una mano en los mil y un experimentos o un abrazo en momentos de estrés. Soy quien soy gracias a todas las personas que me sostienen.

Gracias!

APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

El presente trabajo de tesis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular (LBM) del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL) - Universidad Nacional del Litoral - CONICET. Los resultados obtenidos dieron lugar a la siguiente publicación científica en revista internacional con referato estricto:

Coronel, F. P., Gras, D. E., Canal, M. V., Roldan, F., Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2025). Cytochrome c levels link mitochondrial function to plant growth and stress responses through changes in SnRK1 pathway activity. *The Plant Journal*, 121(2), e17215. <https://doi.org/10.1111/tpj.17215>

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS	4
ÍNDICE	5
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	8
RESUMEN	10
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
RESUMO	12
1. INTRODUCCION GENERAL	15
1.1 LA MITOCONDRIA COMO FUENTE DE ENERGÍA EN LAS PLANTAS	16
1.2 EL CITOCROMO C	19
1.3 EL ROL DE LAS HORMONAS EN EL CRECIMIENTO Y LAS RESPUESTAS A ESTRÉS	20
1.4 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN TOR Y SNRK1	22
1.5 EL PROCESO DE AUTOFAGIA	25
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIALES Y METODOS	31
3.1 CEPAS BACTERIANAS	31
3.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS DE E. COLI CON ADN PLASMÍDICO	31
3.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>A. TUMEFACIENS</i> CON ADN PLASMÍDICO	32
3.4 MINI-PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	32
3.5 TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS	32
3.6 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE PLANTAS POR CTAB.	33
3.7 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)	33
3.8 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.	34
3.9 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-QPCR)	34
4 CAPITULO 1	37
4.1 INTRODUCCION	37
4.2 OBJETIVOS	40
4.3 MATERIALES Y METODOS	41

4.3.2	AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE ARN	42
4.3.3	ANÁLISIS DE RNASEQ	42
4.3.4	ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	43
4.3.5	EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y AMINOÁCIDOS LIBRES	43
4.3.6	MEDICIÓN DE ROS	44
4.3.7	DETECCIÓN DE ESTRUCTURAS TIPO AUTOFAGOSOMAS	44
4.3.8	MEDICIÓN DE ATP, ADP, AMP Y ADENILATOS TOTALES	44
4.4	RESULTADOS	45
4.4.1	LA DEFICIENCIA DE CYTc DESENCADENA LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA AL ESTRÉS Y ALTERA LAS RESPUESTAS DE CRECIMIENTO AL MANITOL.	45
4.4.2	LA DEFICIENCIA DE CYTc NO ACTIVA LA MRR CANÓNICA	48
4.4.3	LA DEFICIENCIA DE CYTc ACTIVA LA VÍA DEPENDIENTE DE SNRK1.	52
4.4.4	EL CYTc AFECTA EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS A TRAVÉS DE CAMBIOS EN LOS NIVELES DE LA ACTIVIDAD DE SNRK1	54
4.4.5	LA MENOR SENSIBILIDAD AL MANITOL DE LAS PLANTAS DEFICIENTES EN CYTc SE DEBE A LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DEPENDIENTE DE SNRK1	60
4.4.6	LA DEFICIENCIA DE CYTc AFECTA LA ACTIVIDAD DE LA VÍA TOR A TRAVÉS DE SNRK1	62
4.4.7	LA DEFICIENCIA DE CYTc AFECTA LA ACTIVIDAD DE LA VÍA SNRK1 A TRAVÉS DE SEÑALES ENERGÉTICAS	63
4.5	DISCUSION	64
4.6	CONCLUSIONES	69
5	CAPITULO 2	71
5.1	INTRODUCCIÓN	71
5.2	OBJETIVOS	75
5.3	MATERIALES Y METODOS	76
5.3.1	CONDICIONES DE CRECIMIENTO	76
5.3.1.1	Oscuridad extendida	76
5.3.1.2	Estrés térmico	76
5.3.2	EFICIENCIA CUÁNTICA MÁXIMA DEL PSII (FV/FM)	78
5.3.3	EXTRACCIÓN DE MATERIAL PARA ANÁLISIS METABÓLICOS	78
5.3.4	RT-QPCR	79
5.3.5	ANÁLISIS DE ESTRUCTURAS TIPO AUTOFAGOSOMAS	79
5.3.6	ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	80
5.4	RESULTADOS	80
5.4.1	OSCURIDAD EXTENDIDA	80
5.4.1.1	Las plantas deficientes en CYTc presentan una menor susceptibilidad frente a períodos prolongados de oscuridad.	80
5.4.1.2	Las plantas deficientes en CYTc muestran una respuesta diferencial a la oscuridad prolongada acompañada por un mayor consumo de almidón.	83
5.4.1.3	La mayor tolerancia de las plantas deficientes en CYTc podría estar relacionada con la utilización de aminoácidos como fuente alternativa de energía.	84
5.4.2	ESTRÉS TÉRMICO	87
5.4.2.1	La deficiencia de CYTc está relacionada con una mayor tolerancia al estrés térmico	87

5.4.2.2	Las plantas deficientes en CYTc presentan mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos luego de la fase de recuperación al calor	89
5.4.2.3	Las plantas deficientes en CYTc responden a los tratamientos térmicos aumentando el contenido de azúcares solubles.	91
5.4.2.4	Las mutantes deficientes en CYTc responden al estrés térmico con cambios en el contenido de aminoácidos asociados al proceso de autofagia	92
5.4.2.5	El tratamiento con GA3 altera la actividad de SnRK1 durante la respuesta al estrés térmico en plantas deficientes en CYTc.	95
5.5	DISCUSION	97
5.5.1	RESPUESTAS ADAPTATIVAS	97
5.5.2	RESPUESTAS RÁPIDAS	100
5.6	CONCLUSIONES	105
6	CAPITULO 3	107
6.1	INTRODUCCION	107
6.2	OBJETIVOS	109
6.3	MATERIALES Y METODOS	110
6.3.1	GENERACIÓN DE LÍNEAS CYTC-1A TRANSFORMANTES ESTABLES CON LAS CONSTRUCCIONES PCYCB1;1::CYTC-1 Y PSUC2::CYTC-1	110
6.3.2	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS GENOTIPOS BAJO ESTUDIO.	111
6.3.3	TINCIÓN DE GUS	111
6.3.4	ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	112
6.4	RESULTADOS	112
6.4.1	LA EXPRESIÓN TEJIDO-ESPECÍFICA DE CYTC-1 ES CAPAZ DE RECUPERAR EL CRECIMIENTO DE LAS ROSETAS Y EL TIEMPO DE FLORACIÓN EN PLANTAS DEFICIENTES EN ESTE GEN.	112
6.4.2	LA EXPRESIÓN TEJIDO-ESPECÍFICA DE CYTC-1 SE VINCULA CON DISTINTOS PATRONES DE RECUPERACIÓN DEL CRECIMIENTO RADICULAR EN MUTANTES CYTC-1A.	114
6.5	DISCUSION	116
6.6	CONCLUSIONES	118
7	CONCLUSIONES GENERALES	120
	BIBLIOGRAFÍA	122

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μM: micromolar	GA: giberelinas
AA: antimicina	GA ₃ : ácido giberélico
ABA: ácido abscísico	GAPC: gliceraldehido 3-fosfato
Ac: acetilación	GFP: <i>Green Fluorescent Protein</i>
ADN: ácido desoxirribonucleico	GLDH: L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa
ADP: adenosín difosfato	GO: ontología génica
AEC: adenilatos totales	GUS: β-glucuronidasa
AMP: adenosín monofosfato	h: horas
AOX: oxidasa alternativa	H ₂ DCFDA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetate
ARN: ácido ribonucleico	HC1: ácido clorhídrico
ATG: <i>AUTOPHAGY-RELATED</i> genes	HPLC: <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
ATP: adenosín trifosfato	IgG: inmunoglobulina G
BL: brasinólido	kD: kilodalton
BR: brasinosteroides	L: litro
BRZ: brasinazole	LB: medio Luria–Bertani
cm: centímetro	L-Gal: L-galactono-1,4-lactona
CoQ: coenzima Q/ubiquinona	LST8: <i>Lethal with Sec Thirteen 8</i>
CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio	ME: membrana externa
CYTc: citocromo c	mETC: <i>mitochondrial Electron Transport Chain</i>
DAS: días después de la siembra	MF: massa fresca
deshidrogenasa	Mg; miligramo/s
DLDH: D-lactato deshidrogenasa	MgCl ₂ : cloruro de magnesio
DNF: 2,4-dinitrofenol	MI: membrana interna
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	MIA40: Mitochondrial Import and Assembly protein 40
ERV1: sulfhidrilo oxidasa	ml: mililitro/s
F1: Filial 1	MM: matriz mitocondrial
FADH ₂ : flavín adenín dinucleótido reducido	mm: milímetro
FLZ: <i>FCS-Like Zinc finger</i>	
g: gramo	

mM: milimolar	PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo
MRR: respuesta retrógrada mitocondrial	PSII: fotosistema 2
MS: masa seca	RAPTOR: <i>Regulatory Associated Protein of TOR</i>
MS: medio Murashige y Skoog	ROS: especies reactivas del oxígeno
n.d.: no detectado	rpm: revoluciones por minuto
n.s.: no significativo	RPS6: <i>ribosomal protein S6</i>
N: nitración	RT-qPCR: <i>real time quantitative PCR</i>
NaCl: cloruro de sodio	S6K: <i>ribosomal protein S6 kinase</i>
NAD(P) nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	SAM: meristema apical del tallo
NADH nicotinamida adenina dinucleótido	SDS: dodecilsulfato de sodio
NBT: nitroblue tetrazolium	SnRK1: SNF1-Related Kinase 1
NDA1/NDA2: NADH deshidrogenasas alternativas internas	T6P: a trehalosa-6-fosfato
NDB1/NDB2: NADH deshidrogenasas alternativas externas	TAE: tampón Tris–acetato–EDTA
NH ₄ H ₂ PO ₄ : fosfato monoamónico	TAP46: <i>TOR-Associated Protein of 46 kDa</i>
nm: nanómetros	Taq: <i>Thermus Aquaticus</i>
nM: nanomolar	TBS: tampón <i>Tris-buffered saline</i>
O ₂ : oxígeno molecular	TCA: ácido tricarbóxico
OM: oligomicina	TE: tampon Tris–EDTA
OXPPOS: fosforilación oxidativa	TIM: <i>Translocase of the Inner Mitochondrial membrane</i>
p/v: peso en volumen	TOM: <i>Translocase of the Outer Mitochondrial membrane</i>
P: fosforilación	TOR: <i>Target of Rapamycin</i>
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida	Tris: tris(hidroximetil)-aminometano
PCD: <i>Programmed Cell Death</i>	UV: ultravioleta
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa	WT: <i>wild type</i>
P _i : fosfato inorgánico	X-Gluc: 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucurónido
	μL microlitro/s

RESUMEN

RESUMEN

Las plantas, como organismos sésiles, deben ajustar su crecimiento y metabolismo a las condiciones del ambiente en el que habitan. Es decir, bajo condiciones óptimas, sus recursos son destinados principalmente al crecimiento y desarrollo, mientras que, bajo condiciones de estrés, las plantas restringen el crecimiento y activan una reprogramación metabólica para mantener la homeostasis energética y promover la supervivencia. Las mitocondrias desempeñan un rol central en estos ajustes al integrar la actividad respiratoria con el estado energético celular. El citocromo *c* (CYTc), un componente de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, media la transferencia de electrones entre los complejos III y IV, acoplado a la síntesis de ATP. En este contexto, las plantas deficientes en CYTc presentan raíces más cortas, rosetas más pequeñas y un crecimiento retrasado, probablemente debido a alteraciones en la actividad de las vías reguladoras del crecimiento asociado a la disponibilidad energética.

En esta tesis, investigamos el rol de CYTc como regulador que vincula la producción de energía mitocondrial, la reprogramación metabólica y las vías de señalización que controlan el crecimiento vegetal y las respuestas a estrés. Nuestros resultados muestran que la disminución de los niveles de CYTc conduce a una activación de la vía de *SNF1-related protein kinase 1* (SnRK1), evidenciada por un aumento en la fosforilación de SnRK1 y la inducción de genes blancos de la vía, como *DIN6* y *SEN5*. Esta activación se asocia con ajustes metabólicos específicos, incluyendo una mayor acumulación de aminoácidos libres asociada a un aumento del proceso de autofagia, lo que sugiere su movilización como fuentes alternativas de energía bajo condiciones de deficiencia mitocondrial. En concordancia con estos resultados, las plantas deficientes en CYTc presentan una mayor tolerancia a condiciones de estrés en comparación con plantas silvestres (*WT*). Bajo oscuridad extendida, este aumento de la tolerancia se asocia con una utilización más eficiente de las reservas de almidón y una disponibilidad sostenida de aminoácidos, mientras que, bajo estrés térmico, el aumento de azúcares solubles podría contribuir a la aclimatación de estas mutantes al estrés. Adicionalmente, nuestros resultados muestran que la señalización hormonal modula este estado metabólico, ya que el tratamiento con giberelinas atenúa las alteraciones observadas en las plantas deficientes en CYTc, provocando una disminución del proceso de autofagia y cambios en la acumulación de metabolitos.

Además, estudiamos de qué manera la actividad mitocondrial influye en el desarrollo radicular. El crecimiento de la raíz depende de la coordinación entre la división, la diferenciación y la elongación celular, que ocurren en diferentes zonas de la raíz. Nuestros resultados muestran que la alteración en la expresión de CYTc afecta tanto el tamaño del meristema y el número de células meristemáticas como el tamaño de la zona de elongación y el tamaño de las células maduras. Notoriamente, la expresión específica de CYTc en células en proliferación es capaz de recuperar el crecimiento de la zona meristemática, mientras que la expresión en tejidos vasculares recupera principalmente el crecimiento de las células en la zona de elongación. En conjunto, nuestros resultados identifican a CYTc como un regulador central que vincula el metabolismo energético, la reprogramación metabólica y el crecimiento en condiciones normales y durante la aclimatación de las plantas al estrés. En un sentido más general, nuestros resultados establecen mecanismos de señalización mediante los cuales los cambios en la actividad mitocondrial modulan el crecimiento y las respuestas al estrés en plantas.

ABSTRACT

As sessile organisms, plants must adjust growth and metabolism to environmental conditions. Under optimal growth conditions, energy and resources are primarily allocated to growth and development, whereas under stress, plants limit growth and activate metabolic reprogramming to maintain energy homeostasis and promote survival. Mitochondria play a central role in these adjustments by integrating respiratory activity with cellular energy status. Cytochrome *c* (CYTc), a component of the mitochondrial electron transport chain, mediates electron transfer between Complexes III and IV and is essential for efficient ATP production. CYTc-deficient plants have shorter roots, smaller rosettes and delayed growth, probably due to changes in the activity of growth regulatory pathways related to energy availability.

In this thesis, we investigated the role of CYTc as a regulatory component linking energy production, metabolic reprogramming, and signaling pathways that control plant growth and stress responses. Our results show that decreased CYTc levels lead to constitutive activation of the SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1) pathway, as evidenced by increased SnRK1 phosphorylation and induction of SnRK1 target genes such as *DIN6* and *SEN5*. This activation is associated with specific metabolic adjustments, including increased accumulation of free amino acids linked to higher levels of autophagy, suggesting their mobilization as alternative energy source under mitochondrial deficiency. Consistently, CYTc-deficient plants display enhanced

tolerance to stress conditions compared to wild-type (WT) plants. Under extended darkness, this higher tolerance is associated with a more efficient utilization of starch reserves and sustained amino acid availability, whereas under heat stress, increased soluble sugar may contribute to stress acclimation. In addition, hormonal signaling modulates this metabolic state, since gibberellin treatment attenuates the stress-tolerant phenotype of CYTc-deficient plants, accompanied by reduced autophagy and altered metabolite accumulation.

Additionally, we addressed how mitochondrial activity influences root development. Root growth depends on the coordination of cell division, differentiation, and elongation that take place in different root zones. We show that altered CYTc expression affects meristem size and meristematic cell number, as well as the size of the elongation zone and of mature root cells. Interestingly, CYTc expression specifically in proliferating cells restores the growth of the meristematic zone, while expression in the vasculature recovers cell growth mainly in the elongation zone. Together, our findings identify CYTc as a central regulator linking energy metabolism, metabolic reprogramming, and growth control under normal conditions and during stress acclimation in plants. In a broad sense, our results reveal signalling mechanisms involved in transducing changes in mitochondrial activity into growth and stress responses in plants.

RESUMO

Devido à sua natureza séssil, as plantas ajustam o crescimento e o metabolismo às condições ambientais. Em condições ótimas, a energia e os recursos são prioritariamente direcionados ao crescimento e promovem uma reprogramação metabólica para manter a homeostase energética e favorecer a sobrevivência. As mitocôndrias desempenham um papel central nesses ajustes ao integrar a atividade respiratória com o estado energético celular. O citocromo c (CYTc), um componente da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, medeia a transferência de elétrons entre os complexos III e IV e é essencial para a produção eficiente de ATP. Plantas deficientes em CYTc apresentam raízes mais curtas, rosetas menores e crescimento retardado, provavelmente devido a alterações na atividade de vias reguladoras do crescimento associadas à disponibilidade energética. Nesta tese, investigamos o papel do CYTc como regulador que conecta a produção de energia, a reprogramação metabólica e as vias de sinalização que controlam o crescimento vegetal em respostas aos estresses. Nossos resultados demonstram que a redução dos níveis de CYTc leva à ativação constitutiva da via da proteína quinase relacionada à SNF1 (SnRK1), evidenciada pelo

aumento da fosforilação de SnRK1 e pela indução de genes-alvo como *DIN6* e *SEN5*. Essa ativação está associada a ajustes metabólicos específicos, incluindo maior acúmulo de aminoácidos livres, relacionado ao aumento da autofagia, sugerindo sua mobilização como fontes alternativas de energia em condições de deficiência mitocondrial. De forma consistente, plantas deficientes em CYTc apresentam maior tolerância ao estresse quando comparadas às plantas do tipo selvagem (*WT*). Sob escuridão prolongada, essa maior tolerância está associada a uma utilização mais eficiente das reservas de amido e à manutenção da disponibilidade de aminoácidos; sob estresse térmico, o aumento de açúcares solúveis pode contribuir para a aclimação. Além disso, a sinalização hormonal modula esse estado metabólico, uma vez que o tratamento com giberelinas atenua o fenótipo tolerante ao estresse das plantas deficientes em CYTc, acompanhado por redução da autofagia e alterações no acúmulo de metabólitos.

Adicionalmente, abordamos como a atividade mitocondrial influencia o desenvolvimento radicular. O crescimento da raiz depende da coordenação entre divisão celular, diferenciação e alongamento, processos que ocorrem em diferentes zonas da raiz. Demonstramos que a alteração na expressão de CYTc afeta o tamanho do meristema e o número de células meristemáticas, bem como o tamanho da zona de alongamento e das células maduras da raiz. Notavelmente, a expressão de CYTc especificamente em células proliferativas restaura o crescimento da zona meristemática, enquanto sua expressão no tecido vascular recupera principalmente o crescimento celular na zona de alongamento. Em conjunto, nossos resultados identificam o CYTc como um regulador central que conecta o metabolismo energético, a reprogramação metabólica e o controle do crescimento tanto em condições normais quanto durante a aclimação ao estresse. De forma mais ampla, nossos achados revelam mecanismos de sinalização envolvidos na transdução de alterações na atividade mitocondrial em respostas de crescimento e estresse em plantas.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCION GENERAL

Debido a su incapacidad para desplazarse, las plantas han desarrollado mecanismos integrados de percepción y respuesta que les permiten adaptarse a condiciones adversas, tales como cambios extremos de temperatura, falta de agua, salinidad, radiación lumínica excesiva o combinaciones de estos factores, conocidos colectivamente como estrés abiótico (Jin et al., 2024; Zhang et al., 2022, 2023). En situaciones donde se predice que el cambio climático aumentará la frecuencia e intensidad de las combinaciones de estrés abiótico, entender los mecanismos moleculares y fisiológicos mediante los cuales las plantas perciben y responden a estos tipos de estrés es esencial para diseñar estrategias biotecnológicas que mejoren la tolerancia de las plantas bajo condiciones desfavorables, así como la eficiencia en el uso de sus recursos (Zandalinas et al., 2022; Zhang et al., 2025).

El uso de *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo ha sido fundamental para desentrañar los mecanismos moleculares y genéticos detrás de estas respuestas adaptativas. En este contexto, *A. thaliana* es una planta herbácea anual con un ciclo de vida relativamente corto, es decir, puede completar desde germinación hasta producción de semillas en aproximadamente 6 - 8 semanas bajo condiciones controladas (Figura 1a), lo que permite analizar múltiples generaciones en un tiempo experimental reducido. Entre sus principales ventajas como organismo modelo podemos destacar, además de su ciclo de vida corto, que es capaz de autopolinizarse generando una gran cantidad de descendencia, que posee su genoma secuenciado, e incluso se han desarrollado una gran cantidad de herramientas genéticas que han permitido avances en el campo de la fisiología, el metabolismo, el desarrollo vegetal, la genética y la epigenética (Koorneef & Meinke, 2010; Krämer, 2015). Además, su crecimiento compacto y su capacidad de desarrollarse en medios simples hacen posible cultivar grandes poblaciones en espacios pequeños y con recursos mínimos, facilitando estudios genéticos, fisiológicos y de respuesta a estrés (Woodward & Bartel, 2018; Yaschenko et al., 2025).

En *Arabidopsis*, exposiciones a estrés térmico, hídrico o estreses combinados de calor y sequía provocan cambios tales como aumentos transitorios de azúcares solubles y aminoácidos, y alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos (Xu et al., 2022). Incluso, estudios metabolómicos han identificado respuestas comunes y específicas de diferentes tipos de estrés abiótico, donde vías como la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y el metabolismo de aminoácidos se modifican en respuesta a frío, calor, déficit hídrico y alta intensidad lumínica. Además, numerosas investigaciones destacan que estos cambios no solo representan adaptaciones

inmediatas, sino que pueden persistir y modular la tolerancia en generaciones posteriores en el caso de estrés sostenido en el tiempo (Zhang et al., 2022), demostrando que la reconfiguración del metabolismo central es una característica esencial de la respuesta al estrés abiótico en plantas (Xu & Fu, 2022; Zandalinas et al., 2022).

1.1 La mitocondria como fuente de energía en las plantas

Para abordar las fluctuaciones ambientales que pueden comprometer su crecimiento y supervivencia, las plantas deben ser capaces de ajustar el uso y la distribución de los recursos energéticos, especialmente bajo situaciones de estrés. En este sentido, la mitocondria constituye un componente clave de esta regulación, ya que integra el metabolismo del carbono con la producción de energía y participa activamente en la respuesta celular frente a condiciones adversas (Barreto et al., 2022; Welchen et al., 2021).

Las mitocondrias son organelas semiautónomas, delimitadas por una doble capa fosfolipídica compuesta por una membrana externa permeable a pequeñas moléculas y una interna altamente especializada, que define un espacio intermembrana y una matriz central (Figura 1b). La membrana interna presenta numerosos pliegues denominados crestas, que permiten una mayor superficie de contacto con el espacio intermembrana (Kühlbrandt, 2015) y se caracteriza por una elevada proporción de proteínas de transporte que permiten el pasaje selectivo de moléculas pequeñas. Además, la membrana interna presenta cardiolipina, un fosfolípido esencial para el mantenimiento de la estructura y la función mitocondrial, así como su respuesta a condiciones de estrés (Pan et al., 2014; Wang et al., 2024). La matriz mitocondrial contiene enzimas, sustratos, cofactores e iones inorgánicos, así como una maquinaria genética propia compuesta por ADN, ARN y ribosomas. Sin embargo, como resultado de la transferencia de genes al núcleo durante la evolución, la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas por el genoma nuclear y son importadas a la organela mediante un conjunto de componentes de importación mitocondrial como los complejos TOM y SAM en la membrana externa, y TIM en la membrana interna (Endo & Wiedemann, 2025; Møller et al., 2021).

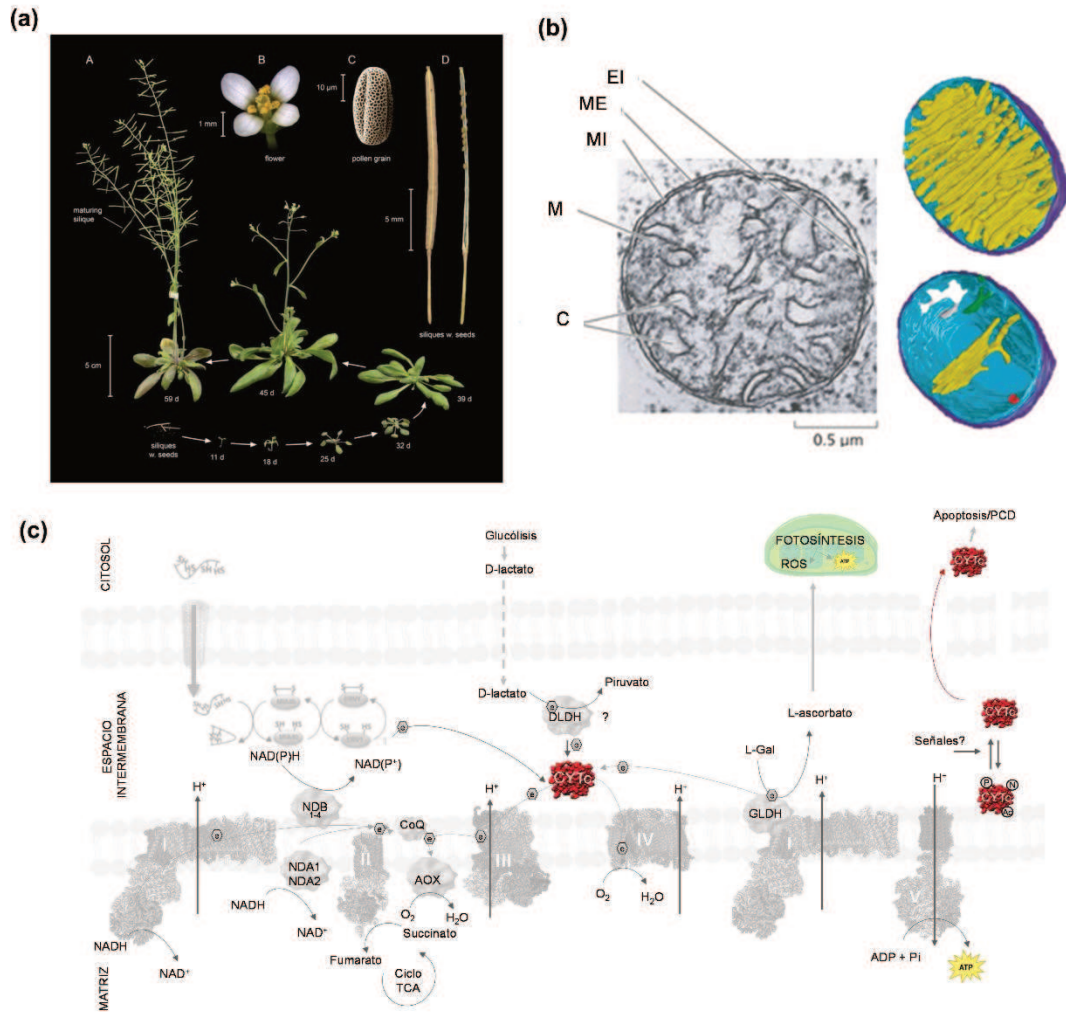


FIGURA 1. La mitocondria como fuente de energía. (a) Imagen descriptiva de *Arabidopsis thaliana*, adaptada de Kramer, (2015), en diferentes etapas de su ciclo de vida. (b) Estructura mitocondrial, adaptada de Moller et al., (2021). A la izquierda, micrografía electrónica de una mitocondria de una célula del mesófilo de haba (*Vicia faba*). En la imagen podemos observar el espacio intermembrana (EI), la membrana externa (ME), la membrana interna (MI), la matriz (M) y las crestas mitocondriales (C). A la derecha, modelos tridimensionales obtenidos mediante tomografía electrónica a partir de tomogramas 3D segmentados de una mitocondria de cerebelo de pollo. Arriba se muestran las crestas mitocondriales en amarillo, la membrana interna en celeste y la membrana externa en azul oscuro. Abajo, membrana externa, membrana interna y cuatro crestas representativas en distintos colores. (c) Esquema representativo de los complejos enzimáticos, proteínas y moléculas que participan en la OXPHOS. Abreviaturas: I-V, Complejos involucrados en el transporte de electrones y la síntesis de ATP; CYTc: citocromo c; CoQ, coenzima Q/ubiquinona; NDA1/NDA2, NADH deshidrogenasas alternativas internas; NDB1/NDB2, NADH deshidrogenasas alternativas externas; ERV1, sulfhidrilo oxidasa; DLDH, D-lactato deshidrogenasa; GLDH, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa; L-Gal, L-galactono-1,4-lactona; AOX, oxidasa alternativa; MIA40, del inglés *Mitochondrial Import and Assembly protein 40*; PCD, del inglés *Programmed Cell Death*; ROS, especies reactivas del oxígeno; ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosín difosfato; Pi, grupo fosfato inorgánico; P, fosforilación; N, nitración; Ac, acetilación. Imagen adaptada de Welchen & Gonzalez, (2016).

Desde el punto de vista funcional, la mitocondria es el principal sitio de oxidación de compuestos carbonados y de síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa

(OXPHOS). En la matriz mitocondrial, el piruvato generado por la glucólisis y los productos del metabolismo de ácidos grasos son convertidos en acetil-CoA, que luego es oxidado a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Este proceso genera dióxido de carbono y equivalentes de reducción, como NADH y FADH₂, que alimentan la cadena de transporte de electrones mitocondrial (mETC), localizada en la membrana interna (Møller et al., 2021). La mETC vegetal está compuesta por una vía conservada, integrada por los complejos NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), citocromo c reductasa (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV), junto con transportadores móviles como la ubiquinona y el citocromo c (Kühlbrandt, 2015). El flujo de electrones a través de estos complejos se acopla al bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico que es utilizado por la ATP sintasa (complejo V) para la síntesis de ATP (Figura 1c) (Møller et al., 2021). Este sistema constituye la principal fuente de energía para los procesos celulares.

Un rasgo distintivo de las mitocondrias vegetales es la presencia de rutas alternativas de transporte de electrones, es decir, además de los complejos de la cadena de transporte de electrones descritos anteriormente, las plantas poseen deshidrogenasas alternativas de NAD(P)H y la oxidasa alternativa (AOX), que permiten dirigir el flujo de electrones desde la oxidación de NAD(P)H y hacia la reducción del oxígeno a agua sin acoplar este proceso al bombeo de protones (Rasmusson et al., 2004; Vanlerberghe, 2013). Particularmente, la vía de AOX cumple un papel relevante durante situaciones de estrés abiótico, ya que bajo condiciones que alteran el equilibrio metabólico, energético o redox, como el estrés térmico, hídrico u oxidativo, la vía respiratoria clásica puede saturarse o volverse ineficiente. En este contexto, AOX previene la sobrerreducción de la cadena respiratoria, disminuye la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y contribuye al mantenimiento de la homeostasis metabólica y redox celular (Feng et al., 2013; Saha et al., 2016; Vanlerberghe, 2013). De este modo, aunque la respiración alternativa implique una menor eficiencia energética, resulta esencial para la supervivencia y adaptación de las plantas frente a condiciones ambientales desfavorables. En conjunto, estas características posicionan a la mitocondria vegetal no solo como una importante fuente de energía en las plantas, sino como un componente central en la integración metabólica y en la respuesta adaptativa al estrés abiótico.

1.2 El citocromo c

El citocromo c (CYTc) es una pequeña hemoproteína hidrofílica (~12,5 kDa) localizada en el espacio intermembrana mitocondrial, donde cumple un rol central en la respiración celular al mediar la transferencia de electrones entre el complejo III y el complejo IV de la cadena de transporte de electrones (Figura 1c). Además de esta función canónica, CYTc participa en múltiples procesos celulares, incluyendo el mantenimiento de la estabilidad y actividad de los complejos respiratorios, el metabolismo redox y, en plantas, participa en rutas metabólicas específicas como la síntesis de ascorbato (actuando como intermediario de la L-galactonolactona deshidrogenasa) y la detoxificación de compuestos reactivos como el metilgloxal, lo que posiciona al CYTc como un nodo integrador entre la respiración mitocondrial, el metabolismo y el crecimiento vegetal (Szarka et al., 2013; Welchen & Gonzalez, 2016).

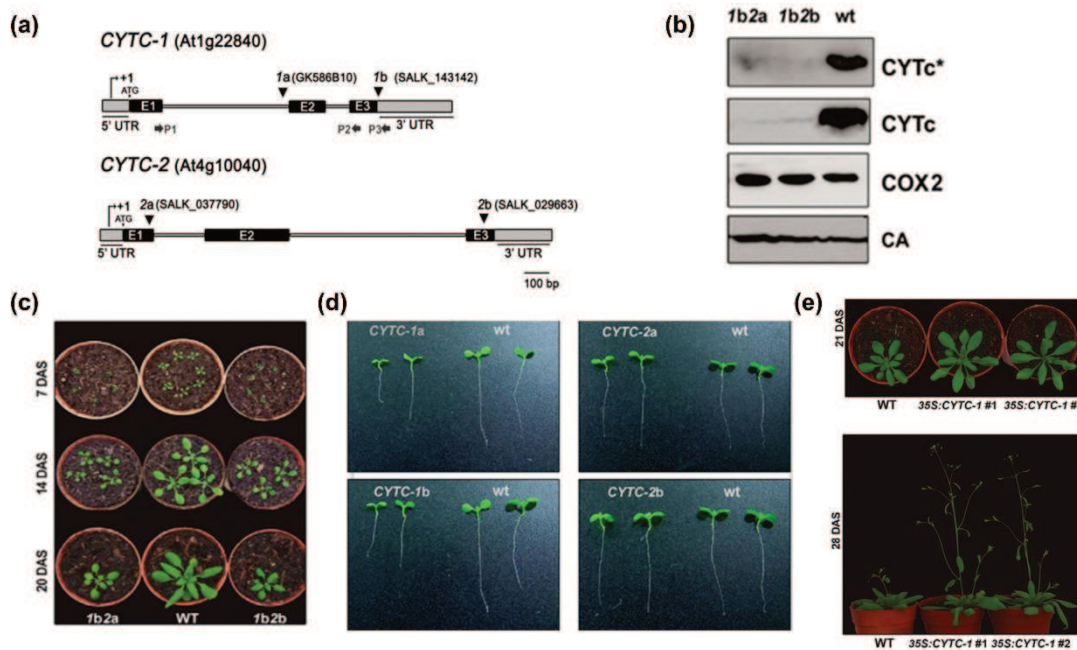


FIGURA 2. El citocromo c. (a) Representación esquemática de los genes *CYTC-1* y *CYTC-2*, que codifican CYTc en *A. thaliana*, indicando los sitios de inserción de T-DNA (puntas de flecha) en las líneas mutantes usadas en este trabajo. Los rectángulos indican exones y las líneas intrones. P1, P2 y P3 corresponden a los cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR. Imagen adaptada de Welchen et al. (2012). (b) Análisis por *Western blot* de plantas *WT* y mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*, donde se observan los niveles de proteína CYTc en extractos proteicos de hojas y flores (*). Se utilizaron anticuerpos contra COX2 y anhidrasa carbónica gamma (CA) como controles de carga. La imagen fue adaptada de Welchen et al. (2012). (c-e) Fenotipos de plantas mutantes en *CYTC-1* y *CYTC-2*, y de sobreexpresantes de *CYTC-1*. Los fenotipos de plantas *WT* y mutantes dobles de 28 días de edad cultivadas en macetas se observan en (c); la longitud de raíz en plántulas *WT* y mutantes simples *cytc-1a*, *cytc-1b*, *cytc-2a* y *cytc-2b* de 10 días de edad cultivadas en placas se observa en (d); el fenotipo de plantas *WT* y dos líneas independientes *35S::CYTC-1* se observa en (e). DAS: días después de la siembra. Las imágenes fueron adaptadas de los trabajos de Welchen et al. (2012) y Racca et al., (2018).

En *Arabidopsis*, CYTc está codificado por dos genes, *CYTC-1* (At1g22840) y *CYTC-2* (At4g10040), originados a partir de una duplicación reciente del genoma y que conservan una estructura génica similar. No obstante, ambos genes presentan una divergencia funcional parcial asociada a diferencias en sus regiones promotoras y patrones de expresión. *CYTC-1* se expresa preferentemente en tejidos meristemáticos y zonas de alta proliferación celular, mientras que *CYTC-2* muestra una expresión predominante en tejidos vasculares (Welchen & Gonzalez, 2005). Para estudiar su función, en trabajos previos se identificaron mutantes insercionales por T-DNA (Figura 2a): dos líneas para *CYTC-1* (una nula, *cytc-1a*, y una de expresión reducida, *cytc-1b*) y dos mutantes nulas para *CYTC-2* (*cytc-2a* y *cytc-2b*). La obtención de mutantes dobles permitió evidenciar que la pérdida completa de ambos genes resulta letal a nivel embrionario, mientras que líneas dobles de mutantes *cytc-2* con la mutante *cytc-1a* (Figura 2b), con niveles significativamente reducidos de CYTc, son viables (Welchen et al., 2012).

Desde el punto de vista fenotípico, las mutantes simples *cytc-1* presentan un retraso moderado en el crecimiento y el desarrollo, evidenciado por una menor área de roseta, una reducción en la elongación radicular y un retraso en la transición al estadio reproductivo, mientras que las mutantes *cytc-2* no muestran alteraciones detectables respecto a plantas silvestres. En contraste, las mutantes dobles *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* exhiben fenotipos aún más severos que las mutantes simples *cytc-1* (Figura 2c-d), acompañados por una disminución de la actividad respiratoria mitocondrial, menor estabilidad y actividad del complejo IV y alteraciones metabólicas como la acumulación de almidón y azúcares solubles, así como una homeostasis hormonal alterada (Racca et al., 2018, 2022). De manera complementaria, plantas que sobreexpresan *CYTC-1* muestran un aumento en la tasa de crecimiento y una aceleración del desarrollo en comparación con plantas *WT* (Figura 2e) (Racca et al., 2018). En conjunto, estos antecedentes indican que, si bien ambos genes presentan redundancia funcional suficiente para sostener la viabilidad, *CYTC-1* cumple un rol predominante en la regulación del crecimiento y el desarrollo vegetal.

1.3 El rol de las hormonas en el crecimiento y las respuestas a estrés

Las hormonas vegetales cumplen un rol importante en la percepción y la transducción de señales frente al estrés abiótico y coordinan complejas redes de señalización que permiten ajustar respuestas fisiológicas y genéticas según la

naturaleza y severidad del estrés. Por ejemplo, el ácido abscísico (ABA) constituye el principal regulador hormonal de las respuestas de las plantas frente a estrés abiótico (Figura 3a), en particular sequía, salinidad y temperaturas extremas, condiciones que generan una acumulación de esta hormona (Sah et al., 2016). La percepción de ABA ocurre mediante los receptores PYR/PYL/RCAR, que inhiben a las fosfatasa PP2C, permitiendo la activación de la quinasa SnRK2. Esta quinasa fosforila factores de transcripción como ABF/AREB, los cuales regulan directamente la expresión de genes de respuesta a estrés, incluyendo *RD29A/B*, *RAB18*, *DREB2A*, *LEA* y genes asociados a protección celular (Jung et al., 2020; Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2013). Además de la regulación transcripcional, se ha demostrado que un aumento de ABA induce una reprogramación metabólica, promoviendo la acumulación de azúcares solubles y prolina, mientras restringe procesos anabólicos asociados al crecimiento (Han et al., 2023; Li et al., 2019; Zhu & Assmann, 2017).

En contraste, las giberelinas (GA) son hormonas promotoras del crecimiento que regulan procesos como la elongación celular, la transición vegetativa-reproductiva y el desarrollo de órganos (Figura 3b). Su biosíntesis ocurre principalmente en tejidos jóvenes y en expansión, involucrando pasos localizados en plastidios, retículo endoplásmico y citosol (Sun, 2008). La señalización de GA se basa en la percepción por el receptor GID1, que en presencia de GA forma un complejo con las proteínas DELLA, promoviendo su degradación vía proteasoma. Estas proteínas actúan como represores centrales del crecimiento, interfiriendo con factores de transcripción asociados a expansión celular, al metabolismo y a la división. Bajo condiciones favorables, la degradación de DELLA libera estos programas de crecimiento (Murase et al., 2008; Ritonga et al., 2023; Wang & Deng, 2011). Sin embargo, ante estrés abiótico, la biosíntesis de GA disminuye y/o se estabilizan las proteínas DELLA, lo que conduce a una restricción activa del crecimiento (Castro-Camba et al., 2022; Colebrook et al., 2014). Este mecanismo permite priorizar la supervivencia, reducir la demanda energética y redirigir recursos hacia respuestas adaptativas. Además, las proteínas DELLA funcionan como nodos de integración hormonal y metabólica, interactuando con factores de ABA, auxinas y brasinosteroides, y participando en la regulación del metabolismo del carbono y del nitrógeno (Gilroy & Breen, 2022; Martins et al., 2018).

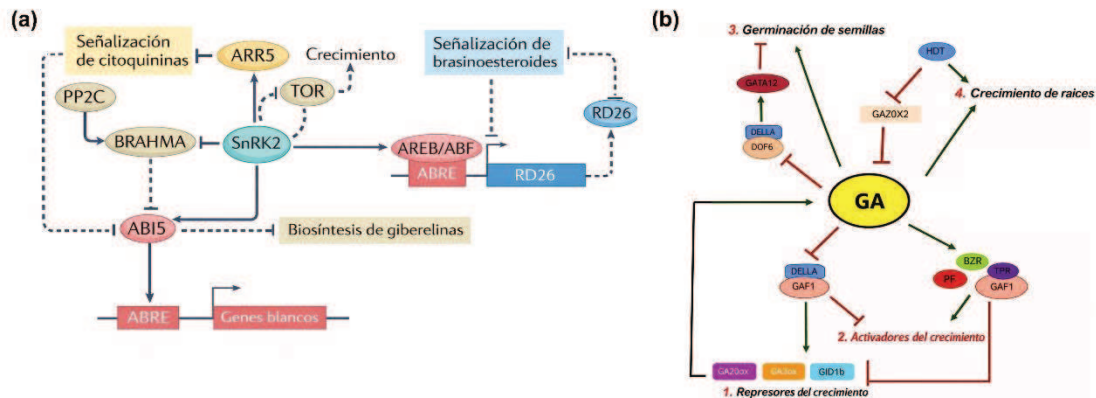


FIGURA 3. Hormonas, crecimiento y respuesta a estrés. (a) Interacción entre la vía de ácido abscísico (ABA) y otras vías de señalización hormonal, adaptado de Waadt et al., (2022). Durante las respuestas mediadas por ABA, las quinasas SnRK2 fosforilan factores de transcripción tales como AREBs/ABFs y ABI5, activando la expresión de genes dependientes de ABA. La señalización de ABA interactúa con otras vías hormonales, ya que reprime la señalización de brasinoesteroides a través de RD26, modula la biosíntesis de giberelinas mediante ABI5 y se integra con la señalización de citoquininas a través de reguladores tipo ARR. En condiciones no estresantes, TOR promueve el crecimiento al inhibir respuestas dependientes de ABA, mientras que bajo estrés, SnRK2 inhibe TOR, conduciendo a la represión del crecimiento y la inducción de la vía de ABA. Las líneas discontinuas indican interacciones indirectas. (b) Funciones de las giberelinas (GA) en el control del crecimiento vegetal, adaptado de (Martins et al., 2018). Niveles elevados de GA promueven la degradación de las proteínas DELLA, las cuales actúan como inhibidores del crecimiento, favoreciendo así la elongación celular, el crecimiento vegetativo y la germinación de semillas. En raíces, las GA estimulan el crecimiento de forma directa o indirecta a través de HDT, que induce el aumento de los niveles de GA. Las flechas negras indican activación y las líneas rojas terminadas en barra indican inhibición.

1.4 Vías de señalización TOR y SnRK1

Las vías de señalización TOR (*Target of Rapamycin*) y SnRK1 (*SNF1-Related Kinase 1*) constituyen dos nodos centrales en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Ambas rutas están evolutivamente conservadas y presentan homología funcional con mTOR/AMPK en mamíferos y TOR/SNF1 en levaduras, aunque en plantas han adquirido particularidades asociadas a la fotosíntesis, la plasticidad del crecimiento y la integración de señales sistémicas (Crozet et al., 2014; Margalha et al., 2019; Shi et al., 2018). En conjunto, las vías de TOR y SnRK1 coordinan el balance entre procesos anabólicos y catabólicos, permitiendo a la planta ajustar su crecimiento a la disponibilidad de recursos y a las condiciones de estrés.

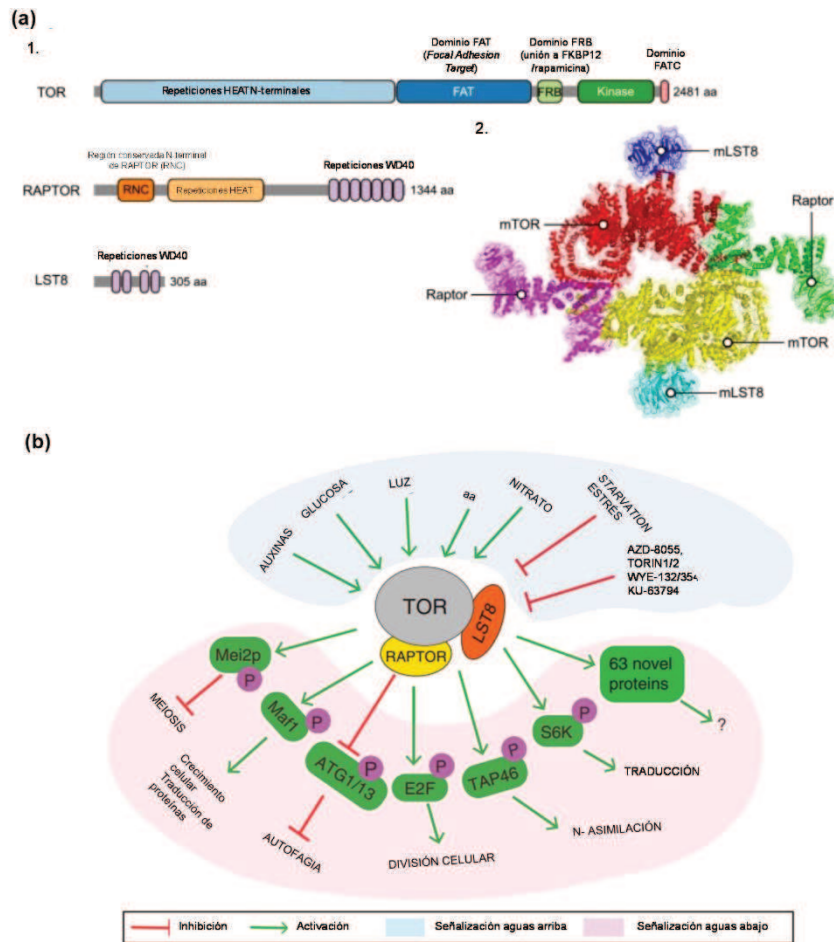


FIGURA 4. TOR (Target of Rapamycin). (a) Características estructurales del complejo TORC1 de *A. thaliana*. Se muestran las subunidades TOR (*UniProt: Q9FR53*), RAPTOR (*UniProt: Q93YQ1*) y LST8 (*UniProt: Q9LV27*) (1), junto con la organización espacial de las mismas (2). Los rectángulos grises representan las secuencias proteicas completas, mientras que los rectángulos o elipses coloreados indican dominios funcionales. (b) Red de señalización mediada por TOR en plantas. La quinasa TOR integra múltiples señales y depende de RAPTOR y LST8 para fosforilar distintos efectores, incluyendo S6K, TAP46, E2F, ATG1/13, Maf1 y Mei2p, regulando así el metabolismo celular, el crecimiento y la autofagia. AZD-8055, TORIN1/2, WYE-132/354 y KU-63794 corresponden a inhibidores farmacológicos. P indica eventos de fosforilación. Las figuras (a) y (b) fueron adaptadas de los trabajos de Feng et al. (2025) y Zhao & Wang (2020), respectivamente.

Por un lado, TOR forma parte del complejo TORC1, compuesto por TOR, RAPTOR y LST8, y actúa como un regulador positivo del crecimiento bajo condiciones energéticas favorables (Figura 4a). La activación de TOR promueve la biosíntesis proteica, la progresión del ciclo celular y la expansión celular, particularmente en tejidos meristemáticos (Barrada et al., 2019; Zhao & Wang, 2020). Mutantes parciales en RAPTOR presentan un marcado retraso en el crecimiento, reducción del tamaño de la roseta, alteraciones en la actividad meristemática y defectos en la progresión del ciclo celular, así como alteraciones en el balance hormonal y metabólico, lo que refleja la importancia de TOR en la promoción de procesos anabólicos (Anderson et al., 2005;

Salem et al., 2018). Adicionalmente, TOR estimula la biosíntesis proteica y la expansión celular mediante la activación de quinasas como S6K y la regulación de la traducción (Zhao & Wang, 2020). En contraste con sistemas animales o fúngicos, la actividad de TOR en plantas está fuertemente acoplada a la disponibilidad de carbono derivado de la fotosíntesis (Song et al., 2021), lo que permite un control fino del crecimiento en función del estado energético (Figura 4b).

Por el contrario, SnRK1 actúa como un sensor de carbono y déficit energético, funcionando como el principal regulador adaptativo bajo condiciones de estrés o limitación de recursos (Figura 5). Esta quinasa está compuesta por una subunidad catalítica α y subunidades reguladoras β y $\beta\gamma$. La subunidad catalítica está codificada por tres genes parálogos en *Arabidopsis*, *KIN10*, *KIN11* y *KIN12*, siendo *KIN10* la isoforma dominante, *KIN11* dependiente del tejido/condición y *KIN12* considerado por algunos autores como un pseudogen (Baena-González et al., 2007; Feng et al., 2025) (Figura 5a). Trabajos previos han reportado que las mutantes con reducción de la actividad de SnRK1 (mutantes simples en *KIN10*) muestran una deficiencia en el crecimiento de hipocótilos bajo condiciones de deficiencia de carbono, así como una regulación del crecimiento de las raíces asociada a una reprogramación hormonal y metabólica (Retzer et al., 2025; Simon et al., 2018b). En este contexto, utilizando mutantes de pérdida de función de la subunidad SnRK1 α *sesquiala2*, homocigotas para *KIN10* y heterocigotas para *KIN11* y que presentan fenotipos más fuertes que las mutantes simples debido a la redundancia entre los genes *KIN10* y *KIN11*, se demostró que esta la vía de SnRK1 contribuye a la homeostasis de sacarosa dependiente de las fluctuaciones en los niveles de T6P a lo largo del día (Belda-Palazón et al., 2020; Peixoto et al., 2021).

En contraposición, la sobreexpresión de la subunidad catalítica *KIN10*, o en menor medida la de *KIN11*, conduce a un marcado retraso en el crecimiento, una reducción del tamaño de la roseta y una transición tardía a la fase reproductiva. A nivel molecular, las líneas sobreexpresantes muestran una inducción de genes asociados a la degradación de aminoácidos, almidón y lípidos, junto con una represión de genes involucrados en la biosíntesis de proteínas y genes relacionados con rutas mitocondriales, como el ciclo TCA (Baena-González et al., 2007). Además, se ha demostrado que SnRK1 regula negativamente el metabolismo de fenilpropanoides en respuesta a la disponibilidad de carbono (Wang et al., 2021). En resumen, la activación de SnRK1 conduce a la represión de procesos anabólicos asociados al crecimiento y la inducción de programas transcripcionales que favorecen la movilización de reservas, la conservación de energía y la tolerancia al estrés (Figura 5b).

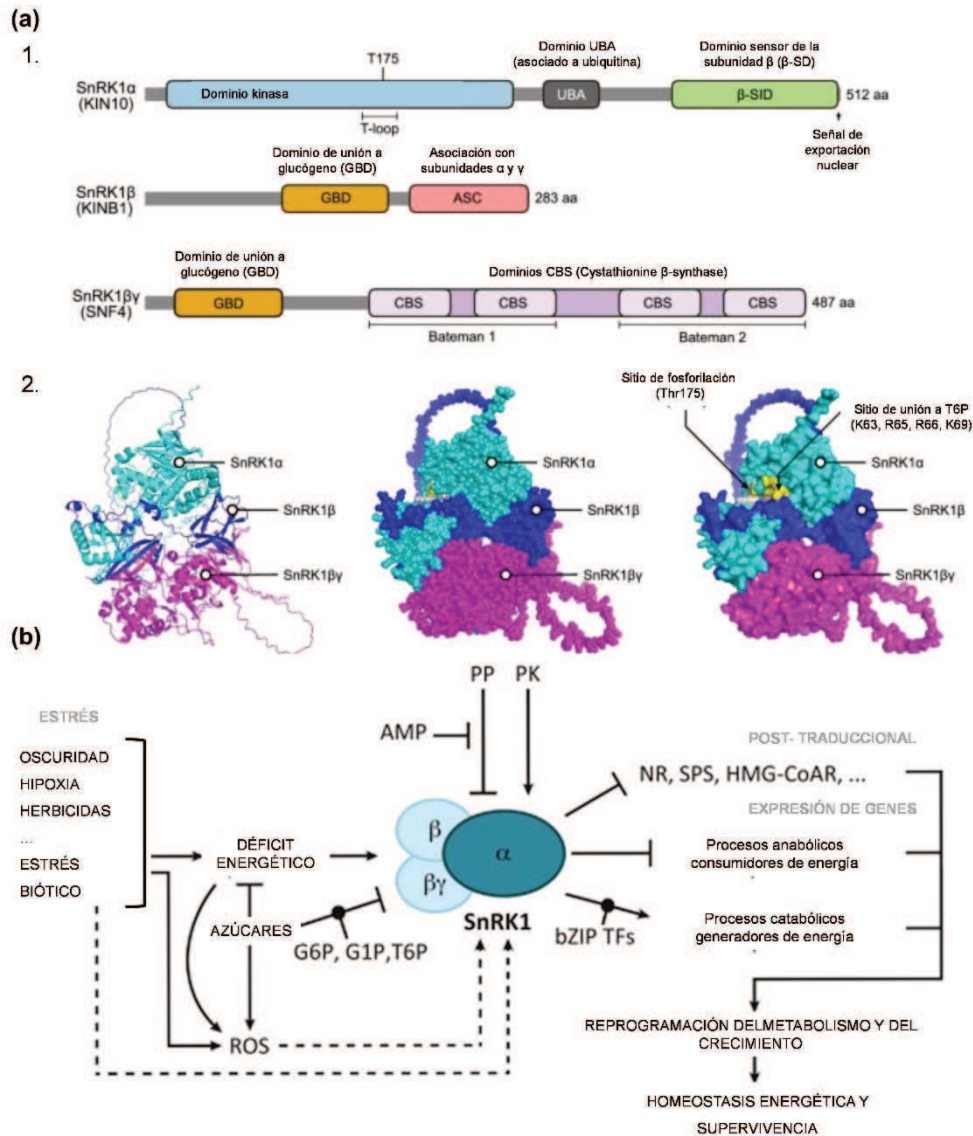


Figura 5. SnRK1 (SNF1-Related Kinase 1). (a) Organización estructural del complejo heterotrimérico SnRK1 en *Arabidopsis thaliana*, compuesto por las subunidades SnRK1 α (KIN10), SnRK1 β (KINB1) y SnRK1 $\beta\gamma$ (SNF4). Los bloques grises representan las proteínas completas y las regiones coloreadas indican dominios funcionales conservados (1). Modelos estructurales del complejo SnRK1, generados por predicción estructural, donde se destacan el T-loop con el residuo conservado T175 y los sitios de unión a trehalosa-6-fosfato (T6P) en la subunidad α (2). (b) Esquema de la vía de señalización de SnRK1. El complejo SnRK1 se activa bajo condiciones de depleción energética y estrés, promoviendo la homeostasis metabólica mediante la regulación postraduccional de enzimas claves y la reprogramación transcripcional. Su actividad es modulada por fosforilación, azúcares fosfato (G6P, G1P y T6P) y señales redox. Las figuras (a) y (b) fueron adaptadas de Feng et al. (2025) y Hulsmans et al. (2016), respectivamente.

1.5 El proceso de autofagia

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas que permite la degradación controlada y el reciclado de macromoléculas y orgánulos celulares, desempeñando un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis

metabólica. En plantas, la autofagia resulta particularmente relevante ante condiciones de estrés abiótico como estrés oxidativo, salinidad, sequía, frío y calor, entre otras, donde la disponibilidad de energía y nutrientes se ve comprometida y el crecimiento debe ajustarse a favor de la supervivencia. A través de este mecanismo, las células vegetales pueden reciclar componentes internos para sostener funciones metabólicas esenciales y mitigar el daño celular inducido por condiciones ambientales desfavorables (Chen et al., 2021; Magen et al., 2022). El proceso autofágico se inicia con la formación del fagóforo, una estructura membranosa que se expande progresivamente para encapsular porciones del citoplasma o componentes celulares específicos. La nucleación y elongación del fagóforo dependen de un conjunto de proteínas codificadas por los genes *AUTOPHAGY-RELATED (ATG)*, altamente conservados en plantas. Entre ellos, el complejo ATG1–ATG13 regula las etapas iniciales del proceso, mientras que los sistemas de conjugación ATG12–ATG5 y ATG8–fosfatidiletanolamina (PE) son esenciales para la expansión de la membrana y el cierre del autofagosoma. En particular, ATG8 constituye un marcador clave de la autofagia, ya que su asociación a la membrana del autofagosoma permiten monitorear la actividad autofágica *in vivo*. Una vez formado, el autofagosoma se fusiona con la vacuola, donde su contenido es degradado por hidrolasas vacuolares (Feng et al., 2025; Petersen et al., 2024). Este proceso conduce a la liberación de aminoácidos, ácidos grasos y azúcares que pueden reincorporarse al metabolismo celular (Figura 6).

Estudios previos han demostrado la importancia funcional de la autofagia en la tolerancia al estrés abiótico. Mutantes deficientes en genes *ATG* presentan una mayor acumulación de proteínas oxidadas, alteraciones en el estado redox celular, desbalances metabólicos y una mayor sensibilidad a condiciones como salinidad, hipoxia y estrés térmico (Chen et al., 2015; Luo et al., 2017; Sedaghatmehr & Balazadeh, 2024). Adicionalmente, ante condiciones de estrés abiótico, la activación de SnRK1 y la represión de TOR conducen a la inducción transcripcional de numerosos genes *ATG*, en particular *ATG8*, *ATG12* y *ATG18*, y a la activación post-traducciona de componentes claves de la maquinaria autofágica (Agbemafle et al., 2023; Soto-Burgos & Bassham, 2017).

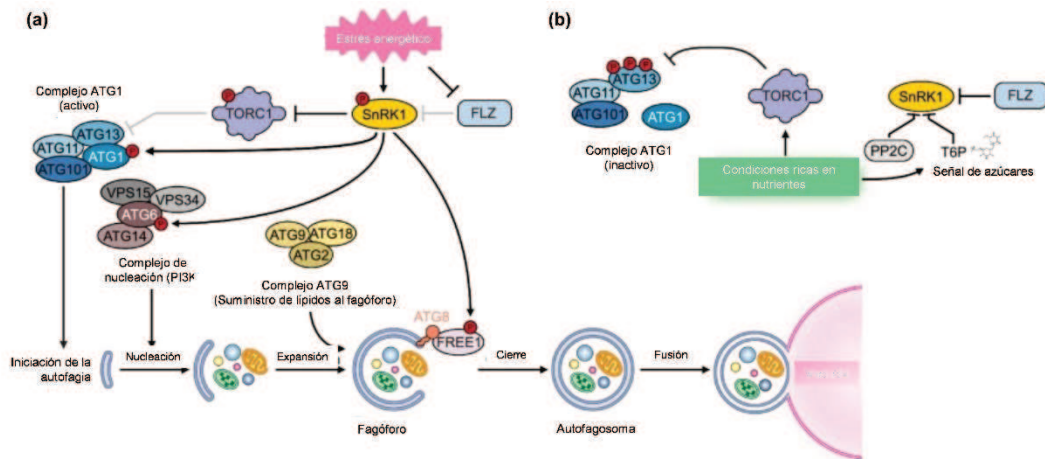


Figura 6. Regulación antagónica de la autofagia por SnRK1 y TOR. (a) Bajo condiciones de déficit energético, SnRK1 se activa y fosforila RAPTOR, inactivando TOR. A su vez, SnRK1 promueve la autofagia mediante la fosforilación de ATG1, ATG6 y FREE1, facilitando la formación y el cierre del autofagosoma. **(b)** En condiciones de abundancia de nutrientes, TOR fosforila ATG13 e inhibe la formación del complejo ATG1-ATG13, suprimiendo la autofagia, mientras que la actividad de SnRK1 es reprimida por FLZ, PP2C y T6P. Las flechas indican activación y las barras en T inhibición; las barras en gris claro representan regulaciones inactivas según la condición fisiológica. Figura adaptada de Feng et al. (2025).

La regulación de la autofagia surge como un punto de convergencia funcional entre TOR y SnRK1 (Figura 6), permitiendo a las plantas alternar entre crecimiento activo y reciclado celular según el estado energético. SnRK1 puede promover la autofagia tanto de manera indirecta, mediante la inhibición de TOR a través de la fosforilación de RAPTOR, como de forma directa, activando componentes del complejo ATG1 (Figura 6a). En contraste, la actividad de TOR reprime la autofagia y favorece el crecimiento mediante la inducción de la traducción y la expansión celular (Figura 6b). Esta regulación antagónica asegura un balance dinámico entre anabolismo y catabolismo, fundamental para sostener el desarrollo vegetal frente a fluctuaciones ambientales, y posiciona a la autofagia como un mecanismo clave en la integración entre energía, metabolismo y crecimiento (Feng et al., 2025).

En conjunto, frente a condiciones de estrés abiótico, las plantas activan una compleja red de respuestas que integran ajustes en el crecimiento y la inducción de mecanismos adaptativos. Estos procesos involucran tanto la restricción del crecimiento asociada a la modulación de la vía TOR como la activación de respuestas de estrés mediadas por SnRK1, en estrecha coordinación con múltiples vías hormonales. Trabajos previos del laboratorio han permitido establecer un vínculo entre la actividad mitocondrial y la regulación de estas respuestas, particularmente a través de CYTc. En este contexto, alteraciones en la función mitocondrial se asocian con la represión de la vía TOR (Canal et al., 2024), la modulación de la señalización de giberelinas mediante

la regulación de proteínas DELLA (Racca et al., 2018) y la activación de respuestas dependientes de ABA (Racca et al., 2022), evidenciando un rol central de la mitocondria en la integración entre estado energético y el crecimiento.

En esta tesis, nos proponemos profundizar el estudio de la relevancia de CYTc en el crecimiento y el desarrollo de las plantas, considerando tanto su rol a nivel tejido-específico como sus efectos sistémicos. En particular, analizaremos cómo la actividad mitocondrial se vincula con las principales vías de señalización que controlan el crecimiento vegetal y cómo esta interacción influye sobre procesos como el crecimiento y la proliferación celular. Además, estudiaremos el papel del estado energético celular en la modulación del desarrollo vegetal y de qué manera éste condiciona las respuestas frente a situaciones de estrés abiótico.

2 OBJETIVOS

El objetivo general del presente plan es estudiar la posible coordinación que existe entre la actividad respiratoria mitocondrial, particularmente a través de la producción de energía mediante la vía dependiente de citocromo c (CYTc), y vías de señalización reguladoras del crecimiento en plantas.

Los objetivos específicos son:

1. Profundizar la caracterización de plantas con niveles alterados de CYTc, de modo de determinar el papel de esta hemoproteína en procesos tales como el crecimiento y la proliferación celular y el desarrollo de órganos.

2. Analizar si los cambios en los niveles de CYTc generan alteraciones en la actividad de vías hormonales durante los procesos mencionados en el punto anterior. Dilucidar a qué nivel de estas vías impacta la alteración en los niveles de CYTc.

3. Analizar si los cambios en los niveles de CYTc generan alteraciones en la actividad de vías reguladoras del crecimiento en función de la disponibilidad de energía. Dilucidar a qué nivel de estas vías impacta la alteración en los niveles de CYTc.

4. Determinar si los cambios observados dependen de alteraciones en el estado energético y/o en el balance redox celular.

5. Determinar cuál es el efecto de suplir la deficiencia de CYTc en tejidos u órganos específicos sobre el crecimiento de otros órganos o tejidos, de modo de evaluar la existencia de una señalización a distancia y, en tal caso, analizar los posibles mecanismos involucrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y METODOS

Los ensayos realizados durante la etapa experimental de este trabajo se llevaron a cabo utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* Heyhn ecotipo Columbia (Col-0) a menos que se indique lo contrario, cuyas semillas fueron adquiridas en Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). Las líneas mutantes en el gen *CYTC-1* (*cytc-1a* y *cytc-1b*) y en el gen *CYTC-2* (*cytc-2a* y *cytc-2b*) fueron descritas previamente por Welchen et al. (2012), como así también las mutantes dobles *1b2a* y *1b2b*. Las condiciones de crecimiento y las descripciones de las líneas utilizadas serán detalladas en cada capítulo.

3.1 Cepas bacterianas

Todos los clonados fueron realizados utilizando la cepa de *E. coli* DH5 α . Para la generación de líneas transformantes de *Arabidopsis* se empleó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LB4404. Esta cepa presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg/L) y utiliza el sistema binario de transformación de *Agrobacterium*. Posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 (cuyo agente selectivo es la estreptomicina (300 mg/L) en la cepa Ach5. El vector utilizado para las construcciones fue el pBI101.3, vector binario que permite el clonado de regiones promotoras frente al gen reportero que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS). Confiere resistencia a kanamicina tanto en bacterias como en plantas.

3.2 Transformación de bacterias de *E. coli* con ADN plasmídico

Las células de *E. coli* fueron transformadas por el método de electroporación. La preparación de células competentes se realizó según las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación (Micro PulserTM, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Luego de la electroporación, las células se recuperaron en 1 mL de medio LB (peptona de carne 10% (p/v), extracto de levadura 5% (p/v) y cloruro de sodio 5% (p/v)) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El pellet fue resuspendido en 100 μ L de medio LB y sembrado en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y las colonias generadas fueron analizadas mediante PCR. Los clones positivos fueron repicados y cultivados en medio LB para realizar posteriormente mini-preparación de ADN plasmídico.

3.3 Transformación de células de *A. tumefaciens* con ADN plasmídico

La preparación de células competentes de *A. tumefaciens* (cepa LBA4404) se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación. Luego del disparo eléctrico las bacterias se recuperaron en 1 mL de medio LB y se incubaron durante 2 h a 28°C. Posteriormente, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos y el pellet fue resuspendido en 100 µL y sembrado en placas de Petri con LB-agar suplementado con estreptomicina (300 µg/mL), rifampicina (50 µg/mL) y el antibiótico correspondiente al plásmido con el que se procedió a la transformación.

3.4 Mini-preparación de ADN plasmídico

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *E. coli* transformadas se realizaron según el protocolo de (Birnboim & Doly, 1979). Para ello, se centrifugaron 1,5 mL de un cultivo saturado de células a 5000 x g durante 5 min. El sedimento celular fue resuspendido en 100 µL de solución de minipreparación I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8,0). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µL de solución de minipreparación II (NaOH 0,2 M, SDS 0,1% p/v), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 150 µL de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) y se incubó nuevamente en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se trató con 400 µL de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó durante 5 min a 8000 g y temperatura ambiente y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 2 h a 20°C con 2 vol. de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2). El ADN plasmídico se recuperó mediante centrifugación a 12000 g durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol 70% (v/v) para eliminar sales. Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 20 µL de agua destilada estéril. Cuando se necesitó preparar ADN plasmídico de alta calidad, se utilizó el kit comercial *Mini-preps DNA Purification* (AXYGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.5 Transformación de plantas

La transformación estable de plantas de *Arabidopsis* se llevó a cabo mediante el procedimiento de inmersión floral utilizando bacterias de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción de interés (Clough & Bent, 1998). Brevemente, las inflorescencias se sumergen en una suspensión bacteriana que contiene el vector binario de interés, sacarosa y un agente tensioactivo que facilita la penetración bacteriana en los tejidos

florales. Las plantas tratadas se mantuvieron en condiciones de alta humedad para favorecer la infección. Las semillas transformadas fueron sometidas a sucesivas rondas de selección con el antibiótico correspondiente hasta llegar a homocigosis.

3.6 Obtención de ADN genómico de plantas por CTAB.

La extracción de ADN genómico se realizó por el método de CTAB (Doyle & Doyle, 1987), para lo cual se cosecharon aproximadamente 100 mg de tejido fresco y se congeló la muestra con N₂ líquido. Posteriormente, se disgregó el tejido en mortero y se trasvasó a un tubo Eppendorff donde se agregaron 600 µl de *buffer* CTAB precalentado a 65°C (CTAB 2% (p/v), NaCl 1,4 M, Tris-HCl pH 8.0 100 mM, EDTA 20 mM, β-mercaptoetanol 0,2%). Se incubó durante 30 minutos, agitando cada 10 minutos, a 65°C y, posteriormente, se agregó 1 volumen cloroformo:isoamílico (preparado en el momento) y se agitó unos segundos, luego de lo cual se centrifugó 10 minutos a 5000 g a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo y se agregaron 0,6 volúmenes de Isopropanol helado o 2,5 volúmenes de etanol absoluto helado con 0,1 volumen de acetato de amonio 7,5 M. Se mezcló por inversión y se centrifugó 15 minutos a 12000 g y 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70%. Por último, el precipitado se resuspendió en 100 µL de agua y se llevó a bloque de 65°C para evaporar los restos de etanol.

3.7 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La amplificación de fragmentos de ADN para los clonados o el análisis de mutantes insercionales y líneas transgénicas se llevó a cabo mediante PCR. Brevemente, en cada reacción se empleó una solución *buffer*, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos específicos (500 ng) y 1,5 U de la enzima *Taq* DNA polimerasa. A esta mezcla de reacción se le adicionó el ADN molde y se procedió a la reacción de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Dlab con Gradiente modelo TC1000-G (D-LAB) utilizando los programas apropiados para cada caso y la temperatura de hibridación se estableció de acuerdo con la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$]. Los oligonucleótidos utilizados están descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados para chequeo de clonados y análisis de líneas mutantes.

Nombre	Secuencia	Descripción
cytc1_GKmutant-LP	ATCGGGCCTTTGTTTTACATC	Inserción TDNA mutantes <i>cytc-1a</i>

cytc1_GKmutant-RP	ACAAACCTTCTTGGGGTTGAG	
T-DNA GK	ATATTGACCATCATACTCATTGC	
CAT-11	GGCGAATTCATCTGATGGTGGATTGAT	
C1H	GGCGAATTCAAATTCCCACCAAGAACG	Inserción TDNA mutantes <i>cytc-1b</i>
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	
cytc2-b1 mutant -LP	TGGGAGATTTGCAAACTACC	
cytc2-b1 mutant -RP	AAACGCATGTGGTAGATCCAG	Inserción TDNA mutantes <i>cytc-2a</i>
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	
CAT-21	TATATCTGGACGAGCCTGTCT	
CAT-23	CATCATCATCTCAACAGTGT	Inserción TDNA mutantes <i>cytc-2b</i>
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	
akin10-2 LP	TGAGCAACATAATGCGAGATG	
akin10-2 RP	GAAGTCCAAGAGCCCATTTTC	Inserción TDNA mutantes SALKseq_093965 (<i>akin10-2</i>)
T-DNA GK	ATATTGACCATCATACTCATTGC	
pSUC2-Fcheq	ACGTGTCACGAAGATACCCT	
pCYCB1.1-Fcheq	ACAATCAGACCGTTGGGGTT	Chequeo de construcciones promotor específico- <i>CYTC-1/</i>
CDS-CI-RXhol	GGCctcgagTtcaCTTAGGCGCAGTAGATTC	promotor específico- GUS
GUSNH_R	GTTGGGGTTTCTACAGGAC	

3.8 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Los productos de amplificación obtenidos mediante PCR fueron separados y visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Para esto, se preparó agarosa en *buffer* TAE (Tris 5,5 g/L, EDTA 0.75 g/L, ácido acético glacial 0,1%(v/v)) en la concentración correspondiente al tamaño del ADN que debía separarse. Los productos de amplificación se diluyeron en *buffer* de siembra de ADN con el agente intercalante Gel Red y se sembraron en la matriz de agarosa. La corrida se llevó a cabo a 80 V durante 20 minutos. Como marcador de peso molecular se empleó ADN del bacteriófago λ (Promega) digerido con las enzimas EcoRI y HindIII. Finalizada la corrida electroforética, se procedió a la visualización del ADN mediante exposición a luz UV.

3.9 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

A fin de obtener una medida cuantitativa de los niveles de ARN de interés, se utilizó la técnica de RT-qPCR. A lo largo de esta tesis se emplearon diferentes protocolos de extracción de ARN, en función de las características del material vegetal analizado. Por este motivo, la descripción de los procedimientos de extracción y protocolo de RT-qPCR se detalla en cada capítulo. Los oligonucleótidos utilizados para el análisis de los niveles de transcritos se encuentran especificados en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR.

Nombre	Secuencia	AGI
CYTC1a-qRT_F	CGGTCACAAACAAGGACCCAATC	AT1G22840
CYTC1a-qRT_R	ACCAGCAGTTGTACCAGATTGTC	AT1G22840
CYTC1b-qRT_F	AAGGTGCCGGTCACAAACAAGGAC	AT4G10040
CYTC1b-qRT_R	TCTCCTCCCAATTCACAGCCATGC	AT4G10040
KIN10-qRT_F	TTGACAGAAACCACCTCATCGA	AT3G01090
KIN10-qRT_R	GATAGTACGTACAGTGCCATCATT	AT3G01090
KIN11-qRT_F	TGTGCCATGACTTCACCCACTG	AT3G29160
KIN11-qRT_R	TTCCCGGGCTTTGTATAGCTGAAG	AT3G29160
DIN6-qRT_F	AAGGTGCCGACGAGATCTTTGG	AT3G47340
DIN6-qTR_R	ACTTGTGAAGAGCCTTGATCTTGC	AT3G47340
SEN5-qRT_F	ACTCCGCCGTCTTAGCTTAC	AT3G15450
SEN5-qRT_R	TCCCATCTAGTCCACAGAACA	AT3G15450
AOX1a-qRT_F	AGCATCATGTTCCAACGACGTTTC	AT3G22370
AOX1a-qRT_R	GCTCGACATCCATATCTCCTCTGG	AT3G22370
RD29a-qRT_F	TTCGGTGGTGGTGCGACTGATG	AT5G52310
RD29a-qRT_R	CCGGAACAACAGTGGAGCCAAGT	AT5G52310
DREB2A-qRT_F	TGATTTTCAAATTCGTCCCCTATAG	AT5G05410
DREB2A-qRT_R	AGTACCGTCACCTCTACTTCTAG	AT5G05410

CAPÍTULO 1

*“INTERACCIÓN ENTRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA ACTIVIDAD DE
SNRK1 EN LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LAS RESPUESTAS A
ESTRÉS EN PLANTAS”*

4 CAPITULO 1

4.1 INTRODUCCION

La energía es necesaria para mantener el crecimiento de los organismos vivos. En las plantas, la principal fuente de energía es la fotosíntesis, que también implica la síntesis de compuestos de carbono reducidos que sirven como reservas de energía para ser utilizadas cuando la fotosíntesis no se encuentra activa, es decir, en la oscuridad o en tejidos no fotosintéticos. La producción de energía a partir de las reservas de carbono se logra principalmente mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS), que tiene lugar en las mitocondrias y requiere la actividad de la cadena respiratoria. La cadena respiratoria mitocondrial de las plantas vinculada a la OXPHOS es similar a la de los animales y está compuesta por cuatro complejos respiratorios y dos portadores de electrones adicionales, la ubiquinona y el citocromo c (CYTc) (Braun, 2020; Meyer et al., 2019; Millar et al., 2011; Schertl & Braun, 2014). Sin embargo, a diferencia de los animales, las mitocondrias vegetales contienen componentes de una vía respiratoria alternativa, concretamente NAD(P)H deshidrogenasas alternativas y la oxidasa alternativa (AOX), que reducen y oxidan directamente la ubiquinona, respectivamente, y no están vinculadas a la OXPHOS (Del-Saz et al., 2018; Millar et al., 2011; Schertl & Braun, 2014). La vía alternativa es fundamental cuando la vía vinculada a la OXPHOS, en adelante llamada canónica, está bloqueada o saturada, ya que actúa como una válvula de seguridad para evitar la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Del-Saz et al., 2018; Vanlerberghe, 2013). Se ha demostrado que el bloqueo de la cadena respiratoria canónica con inhibidores químicos induce la expresión de genes que codifican componentes de la cadena respiratoria alternativa, así como de un conjunto de otros genes nucleares implicados en la adaptación metabólica y en las respuestas a estrés (Ng et al., 2014; Wang et al., 2018b). Esta vía de señalización se conoce como respuesta retrógrada mitocondrial (MRR) y se desencadena por un aumento de las ROS derivadas de las mitocondrias (Khan et al., 2024), seguido de la activación del factor de transcripción *ANAC017* (Ng et al., 2013a). El aumento de la expresión de *ANAC017* equilibra las respuestas al estrés y al crecimiento para evitar un daño celular excesivo en caso de una disfunción mitocondrial grave (He et al., 2022a; Meng et al., 2019). Además, las situaciones estresantes originadas fuera de las mitocondrias, o incluso fuera de la célula, pueden provocar cambios en la función mitocondrial, lo que implica que las mitocondrias pueden actuar como centros de señalización, integrando las respuestas ante diferentes perturbaciones celulares (Dourmap et al., 2020; Van Aken, 2021; Welchen et al., 2014, 2021). Como ejemplo, el estrés osmótico afecta la expresión de los genes involucrados en la MRR, lo que, en

última instancia, optimiza las respuestas de la planta a este tipo de estrés (Skirycz et al., 2010).

Un crecimiento deficiente y una alteración de las respuestas al estrés también son características distintivas de las plantas que portan mutaciones no letales en genes que codifican componentes de la OXPHOS. Se ha descrito que la deficiencia del complejo I afecta el crecimiento y provoca la inducción de genes que responden al estrés (Fromm et al., 2016; Keren et al., 2012; Koprivova et al., 2010; Meyer et al., 2009; Yuan & Liu, 2012), y que aumenta la resistencia de las plantas a los patógenos (Yang et al., 2022) y la tolerancia al estrés abiótico (Koprivova et al., 2010; Meyer et al., 2009; Zsigmond et al., 2024). Por otra parte, las mutaciones en los componentes del complejo II afectan a la señalización del ácido salicílico, las respuestas al estrés y la resistencia a los patógenos (Belt et al., 2017; Gleason et al., 2011), mientras que la deficiencia del complejo V provoca un retraso en el crecimiento (Geisler et al., 2012; Yang et al., 2024) y una mayor sensibilidad al estrés térmico (Liu et al., 2021). Una conclusión general de estas observaciones es que la función mitocondrial está estrechamente relacionada con el crecimiento de las plantas y con las respuestas al estrés. En la mayoría de los casos, esto va acompañado de la activación de la MRR, pero no se ha establecido de manera definitiva una relación causal entre esta activación y las alteraciones fenotípicas observadas.

Es ampliamente aceptado que el crecimiento de las plantas y las respuestas al estrés se influyen negativamente entre sí (He et al., 2022b; Zhang et al., 2020). La consecuencia es que la mayoría de los intentos de mejorar la tolerancia de las plantas mediante la activación de la respuesta al estrés terminan en plantas cuyo crecimiento se ve gravemente afectado, lo que a menudo resulta indeseable desde el punto de vista agronómico. Aunque inicialmente se consideraba que la causa de la reducción del crecimiento era la limitación de recursos en situaciones de estrés, las evidencias actuales indican que, ante una situación de estrés, las plantas despliegan mecanismos regulatorios para inhibir el crecimiento antes de que se produzca una limitación excesiva de recursos o daño celular (Zhang et al., 2020). Dos actores bien conocidos que conectan el crecimiento y las respuestas al estrés con la disponibilidad de recursos nutricionales son las quinasas de proteínas *Target Of Rapamycin* (TOR) y *SNF1-RELATED KINASE 1* (SnRK1) (Margalha et al., 2019; Meng et al., 2022; Peixoto & Baena-González, 2022). La vía TOR promueve el crecimiento de las plantas y se activa en condiciones de suficiencia de nutrientes, mientras que la vía de SnRK1 se activa principalmente ante la falta de fuentes de carbono para ajustar el crecimiento en función de su disponibilidad. Además, la activación de las vías de respuesta al estrés conduce

a la inactivación de TOR y a la activación de SnRK1 (Belda-Palazón et al., 2020, 2022; Wang et al., 2018a).

Aunque se desconoce el mecanismo molecular exacto, hay pruebas de la existencia de una regulación cruzada entre ambas quinasas, en la que SnRK1 actúa principalmente aguas arriba de TOR (Belda-Palazón et al., 2022; Soto-Burgos & Bassham, 2017). Sin embargo, cabe mencionar que las acciones de TOR y SnRK1 no siempre son antagónicas. Por ejemplo, TOR promueve la activación de SnRK1 a través de la proteína *FCS-Like Zinc finger 8* (FLZ8) en condiciones favorables, presumiblemente para evitar una represión excesiva de los mecanismos de respuesta al estrés, lo que ayudaría a optimizar la adaptación en condiciones adversas (Jamsheer et al., 2022). Además, las actividades de TOR y SnRK1 son necesarias simultáneamente para optimizar el crecimiento del hipocotilo en oscuridad y durante la desetiología de las plántulas (Saile et al., 2023). Por lo tanto, la relación funcional entre SnRK1 y TOR puede variar según las condiciones internas y externas.

El CYTc es una pequeña proteína que transfiere electrones entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria vinculada a la OXPHOS (Welchen & Gonzalez, 2016). Las plantas de *Arabidopsis thaliana* con niveles reducidos de CYTc muestran un retraso en el crecimiento vegetativo, lo que se relaciona principalmente con la acción de uno de los dos genes *CYTC* presentes en *Arabidopsis*, concretamente el *CYTC-1* (Racca et al., 2018; Welchen et al., 2012). Además, un aumento en la expresión de *CYTC-1* favorece un mejor crecimiento (Racca et al., 2018), lo que sugiere que los niveles de CYTc determinan las características de crecimiento de las plantas. El crecimiento defectuoso de las mutantes en *CYTC-1* se relacionó con defectos en la señalización de la vía de giberelinas y en la activación de TOR (Canal et al., 2024; Racca et al., 2018). Las plantas con deficiencia de CYTc también muestran un retraso en la germinación, que solo se evidencia tras la disminución de la expresión de ambos genes *CYTC*, y una mayor sensibilidad al ácido abscísico (ABA) durante este proceso (Racca et al., 2022). Por otro lado, no existe información sobre los posibles efectos de los distintos niveles de CYTc en las respuestas de las plantas ante el estrés. En este contexto, nos proponemos analizar, a lo largo de este capítulo, si la alteración de los niveles de CYTc se asocia con cambios en la actividad de vías de respuesta al estrés relacionadas con el estado energético, como la vía de SnRK1.

4.2 OBJETIVOS

1. Profundizar la caracterización de plantas con niveles alterados de CYTc, de modo de determinar el papel de esta hemoproteína en procesos tales como el crecimiento y la proliferación celular y el desarrollo de órganos.
2. Analizar si los cambios en los niveles de CYTc generan alteraciones en la actividad de vías reguladoras del crecimiento en función de la disponibilidad de energía. Dilucidar a qué nivel de estas vías impacta la alteración en los niveles de CYTc.
3. Determinar si los cambios observados dependen de alteraciones en el estado energético y/o en el balance redox celular.

4.3 MATERIALES Y METODOS

4.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron líneas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ecotipo Columbia (*Col-0*), salvo que se indique lo contrario. Las mutantes simples en *CYTC-1* (*cytc-1a*, *cytc-1b*), las mutantes dobles en *CYTC-1* y *CYTC-2* (*cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*) y las plantas que sobreexpresan *CYTC-1* (*35S::CYTC-1*) fueron descritas previamente (Racca et al., 2018; Welchen et al., 2012). La línea mutante con una inserción de T-DNA en *KIN10* (*SALKseq_093965*, denominada *akin10-2*; Simon et al., (2018b) y las líneas que sobreexpresan *KIN10* fusionada a una etiqueta de hemaglutinina (*HA*) en el fondo *Ler* (*35S::KIN10*; Baena-González et al., 2007) fueron gentilmente provistas por el Dr. Antony Dodd (John Innes Centre, Norwich, Reino Unido). Las líneas *cytc-1a akin10-2* y *35S::CYTC-1 35S::KIN10* se generaron mediante cruzamientos, seguidos de una selección basada en los marcadores de resistencia correspondientes y de un genotipado. Para los análisis se utilizaron plantas dobles homocigotas de la filial F3.

Las plantas se cultivaron sobre sustrato de turba blanca bajo condiciones de días largos (16 h de luz / 8 h de oscuridad), a 22–24°C y con un flujo fotónico de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Alternativamente, las plantas se cultivaron en placas para analizar el crecimiento en la etapa de plántula y los efectos del manitol. Para ello, las semillas se esterilizaron con etanol al 70% (v/v) durante 5 min y luego con SDS al 0,1% (p/v) durante 15 min. Tras enjuagar con agua, las semillas se sembraron en medio 0,5× Murashige y Skoog (MS) con 0,8% o 1% (p/v) de agar para placas horizontales o verticales, respectivamente; se almacenaron durante 4 días a 4°C en oscuridad y, posteriormente, se transfirieron a una cámara de crecimiento bajo las condiciones de día largo mencionadas. El manitol se añadió directamente al medio de cultivo en distintas concentraciones (0–5% p/v y 0-50 mM de manitol para los análisis de largo de hipocótilo y de área de roseta, respectivamente). La respuesta se midió en función del tiempo transcurrido (DAS: días después de la siembra). El material fue fotografiado y las mediciones se realizaron utilizando el software ImageJ

Al comparar diferentes líneas, se utilizaron semillas obtenidas de plantas cultivadas simultáneamente y bajo las mismas condiciones. Los experimentos se repitieron al menos tres veces, obteniéndose resultados similares con semillas de diferentes lotes.

4.3.2 Aislamiento y análisis de ARN

El ARN se aisló según el método descrito por (Chang et al., 1993). Resumidamente, el material vegetal se homogeneizó en presencia de N₂ líquido y posteriormente se mezcló a 65°C con un *buffer* que contenía 2% (p/v) bromuro de cetiltrimetilamonio, 2% (p/v) polivinilpirrolidona, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl y 2% (v/v) 2-mercaptoetanol, seguido de dos rondas de extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ARN se obtuvo a partir de la fase acuosa después de la precipitación con 2 M LiCl.

Los niveles relativos de transcritos se midieron mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR) utilizando cebadores específicos. La transcripción reversa se realizó con 1 µg de ARN total empleando un cebador oligo(dT)₁₈ y la transcriptasa reversa MMLV (Promega). Para la qPCR, una alícuota del ADNc se sometió a amplificación con cebadores específicos (Tabla 2, Sección 3.7). La amplificación se detectó en un termociclador Bio-Rad CFX96 usando SYBR Green. Los valores de Ct se normalizaron utilizando cebadores para los genes de actina *ACT2/8* (Charrier et al., 2002).

4.3.3 Análisis de RNAseq

Para el análisis de RNA-seq, se extrajo ARN total de la parte central (que contenía el meristema apical del tallo y los primordios foliares) de rosetas de plantas silvestres (*WT*) y de *cytc-1b cytc-2b* en el mismo estado de desarrollo (11 hojas de roseta), cultivadas en macetas. Se utilizaron tres réplicas biológicas por genotipo para la secuenciación de ARN, realizada por un servicio externo (BGI Americas Corporation, Cambridge, MA, USA) mediante la tecnología DNBSEQ™, con una longitud de lectura de 150 pb.

Los datos crudos fueron filtrados con SOAPnuke v1.5.2 (Chen et al., 2018) y las lecturas se alinearon con el genoma de referencia de *A. thaliana* TAIR10 utilizando HISAT2 v2.0.4 (Kim et al., 2015). La identificación y cuantificación de transcritos se realizó mediante Bowtie2 v2.2.5 (Langmead & Salzberg, 2012) seguida de RSEM v1.2.8 (Li & Dewey, 2011).

La expresión génica diferencial entre las líneas mutante y WT se evaluó mediante DESeq2 (Love et al., 2014) con un valor de Q < 0.05. Los datos de RNA-seq fueron depositados en la base de datos BioProject bajo el número de acceso *PRJNA1102306*.

4.3.4 *Análisis por Western blot*

El análisis por *Western blot* se realizó con extractos proteicos totales. Se molieron 50 mg de material vegetal en nitrógeno líquido y se extrajeron con 100 μ L de solución Laemmli 2 \times suplementada con un inhibidor de fosfatasa (PhosSTOP; Roche), un inhibidor de proteasas (cOmplete; Roche) y con 0,2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Las proteínas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min y luego se centrifugaron a 12000 g durante 10 min. Posteriormente, las proteínas del sobrenadante (10 μ L) se separaron en un gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno.

Las membranas se hibridaron con anticuerpos de conejo contra CYTc (AS08 343A, Agrisera; dilución 1:2000), Fosfo-AMPK α (Thr172) (#4188; Cell Signaling Technology; dilución 1:10000), KIN10 (AS10 919, Agrisera; dilución 1:4000), P-RPS6 (AS19 4302, Agrisera; dilución 1:10000), RPS6A (AS19 4292, Agrisera; dilución 1:10000) o actina (AS13 2640, Agrisera; dilución 1:10000). La detección con anticuerpos secundarios se realizó con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Agrisera; dilución 1:50000) y el sustrato quimioluminiscente *SuperSignal West Pico* (Thermo Fisher Scientific). El anticuerpo de rata anti-HA (11867423001; Roche; dilución 1:10000) se detectó utilizando anticuerpos anti-IgG de rata conjugados con HRP (Agrisera; dilución 1:20000). Las intensidades de las bandas se cuantificaron utilizando el software ImageJ.

4.3.5 *Extracción y determinación de carbohidratos y aminoácidos libres*

Para la determinación de almidón, azúcares solubles y aminoácidos libres, las muestras (20 mg de plántulas frescas) se trituraron en N₂ líquido y se extrajeron con 250 μ L de etanol al 80% en 10 mM HEPES–KOH (pH 7,0). Las extracciones se incubaron a 80°C durante 20 min y luego se centrifugaron a 12000 g durante 10 min. El sobrenadante (S1) se transfirió a un tubo nuevo y el precipitado se sometió a dos rondas adicionales de extracción con etanol al 80% y al 50%, respectivamente, en 10 mM HEPES–KOH (pH 7,0). Los sobrenadantes obtenidos (S2 y S3) se combinaron con S1 y se utilizaron para cuantificar metabolitos, mientras que el precipitado se reservó para la determinación de almidón.

Los azúcares solubles se cuantificaron en una alícuota del extracto etanólico mediante un método enzimático (Stitt et al., 1989). El contenido total de aminoácidos libres se determinó mediante fluorimetría utilizando fluorescamina (Sigma) y glutamato como estándar, con longitudes de excitación y emisión de 405 y 485 nm, respectivamente (Bantan-Polak et al., 2001). El contenido de almidón se determinó mediante un método enzimático (Hendriks et al., 2003) a partir del precipitado obtenido en la extracción etanólica.

4.3.6 *Medición de ROS*

Los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) se determinaron utilizando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA; Molecular Probes). Se incubaron plántulas de seis días durante 10 min en placas multipocillos en oscuridad en una solución que contenía 1 μ M H₂DCFDA, luego se lavaron tres veces con 20 mM HEPES (pH 7,2) y los niveles de ROS se cuantificaron midiendo la fluorescencia emitida a 538 nm (\pm 25 nm) tras excitación a 485 nm (\pm 14 nm) utilizando un fluorómetro *Fluoroskan Ascent*[™] (Thermo Scientific).

Alternativamente, las plántulas se tiñeron con 10 mM nitroblue tetrazolium (*NBT*) en fosfato de potasio (pH 7,8) durante 10 min. Luego se lavaron con etanol al 70%, se mantuvieron protegidas de la luz y se fotografiaron.

4.3.7 *Detección de estructuras tipo autofagosomas*

Para detectar autofagosomas, se tiñeron las raíces con 1 μ M de *LysoTracker*[™] *Green DND-26* (Invitrogen) durante 15 min y luego se lavaron con agua destilada durante 5 min. Las imágenes se adquirieron de la capa externa de la raíz utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP8 con un objetivo seco 20 \times , empleando longitudes de excitación y detección de 488 y 498–531 nm, respectivamente. Las imágenes originales se utilizaron para cuantificar el número de autofagosomas con el software Fiji (Schindelin et al., 2012).

4.3.8 *Medición de ATP, ADP, AMP y adenilatos totales*

Los adenilatos se extrajeron según lo descrito por (Raveneau et al., 2017). En resumen, se homogeneizaron 50 mg de plántulas con 400 μ l de una mezcla

metanol:cloroformo (1:1) y se indujo la separación de fases mediante la adición de 250 μ l de H₂O. Tras la centrifugación, la fase acuosa se utilizó para la cuantificación de adenilatos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), como se describió previamente (Menegollo et al., 2019). Las muestras (10 μ l) se inyectaron en una columna Luna Omega C18 (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.; tamaño de partícula 3 μ m, 150 \times 4,6 mm), equipada con un cartucho de protección PS C18 SecurityGuard (Phenomenex) y acoplada a un sistema Prominence-i LC-2030C Plus (Shimadzu, Kioto, Japón). La separación se realizó a 30°C con un caudal de 0,75 ml min⁻¹ y utilizando como fase móvil una solución de NH₄H₂PO₄ 0,1 M, pH 6,0, con 1 % (v/v) de metanol. El pico correspondiente a ATP se identificó mediante la adición de un estándar comercial (Sigma-Aldrich). La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración con concentraciones conocidas y el software LabSolutions Lite (Shimadzu), a partir de la absorbancia medida a 254 nm.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 *La deficiencia de CYTc desencadena la expresión de genes de respuesta al estrés y altera las respuestas de crecimiento al manitol.*

Las plantas con niveles reducidos de CYTc muestran un crecimiento retardado, rosetas más pequeñas y floración tardía (Racca et al., 2018; Welchen et al., 2012). Para comprender mejor los procesos afectados por la deficiencia de CYTc, realizamos un análisis de expresión global utilizando ARN extraído de la parte central de las rosetas (que contienen el meristema y los primordios foliares) de plantas *WT* y de plantas mutantes dobles *cytc-1b cytc-2b* en la misma etapa de desarrollo. Los resultados indicaron que 2759 genes cambiaron su expresión en la mutante en relación con la *WT* ($Q < 0,05$), de los cuales 1113 se regulaban a la baja y 1646, al alza (Coronel et al., 2025), Tabla S1). El análisis de ontología génica (GO) de los genes regulados a la baja evidenció un enriquecimiento moderado en las categorías «desarrollo floral», «regulación del desarrollo» y «metabolismo de los carbohidratos» (Tabla 3), entre otras, lo que concuerda con los cambios en la tasa de crecimiento y el metabolismo del carbono descritos previamente para las mutantes *cytc* (Racca et al., 2018). Curiosamente, se observó un enriquecimiento significativo en términos relacionados con el estrés («respuesta al estrés», «respuesta a estímulos bióticos» y «respuesta a estímulos abióticos») para el grupo de genes regulados al alza (Tabla 3). Esto puede

ser un indicio de que la deficiencia de CYTc desencadena mecanismos que activan una respuesta relacionada con el estrés en las plantas.

Tabla 3. Las plantas deficientes en CYTc presentan un aumento en la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés. Términos GO de procesos biológicos enriquecidos en los grupos de genes con expresión modificada en plantas mutantes *cytc-1b cytc-2b*. El análisis se realizó con la herramienta BioMaps de la plataforma VirtualPlant 1.3 (www.virtualplant.org). Se muestran los 10 términos principales, basados en los valores de P más bajos, para los genes inducidos y reprimidos. Los términos mencionados en el texto se muestran en negrita.

Inducidos	Categoría funcional	p-value
GO:0050896	Respuesta a estímulos	3,19E-30
GO:0006950	Respuesta a estrés	8,13E-22
GO:0006952	Respuestas de defensa	1,81E-21
GO:0051707	Respuestas a otros organismos	4,22E-19
GO:0009607	Respuesta a estímulos bióticos	5,5E-19
GO:0009628	Respuesta a estímulos abióticos	1,01E-18
GO:0051704	Procesos multi-organismos	1,01E-18
GO:0009617	Respuesta a bacterias	2,93E-13
GO:0042742	Respuesta de defensa a bacterias	1,72E-11
GO:0045087	Respuesta inmune innata	8,87E-10
Reprimidos	Categoría funcional	p-value
GO:0009908	Desarrollo floral	0,000141
GO:0050896	Respuesta a estímulos	0,000141
GO:0065007	Regulación biológica	0,000141
GO:0042221	Respuesta a estímulos químicos	0,000155
GO:0050793	Regulación de procesos de desarrollo	0,000155
GO:0007389	Proceso de establecimiento de patrones	0,000196
GO:0050789	Regulación de procesos biológicos	0,000279
GO:0005975	Metabolismo de carbohidratos	0,000356
GO:0050794	Regulación de procesos celulares	0,00036
GO:0009698	metabolismo de fenilpropanoides	0,000383

Entre las diferentes fuentes de estrés, el crecimiento en presencia de manitol es un agente causante de estrés abiótico que anteriormente se relacionó con la función mitocondrial (Skirycz et al., 2010). En relación con esto, observamos que los cambios en la expresión que ocurren en plantas deficientes en CYTc comparten características con los que ocurren en plantas *WT* cultivadas en presencia de manitol, un agente que genera estrés osmótico (Tabla 4). Debido a esto, decidimos evaluar el comportamiento de las plantas deficientes en CYTc al ser cultivadas en presencia de manitol. En primer lugar, analizamos el crecimiento de las plántulas en placas que contenían concentraciones relativamente altas de manitol (3 y 5% p/v, equivalentes a 165 y 274 mM, respectivamente). Como se observa en la Figura 7 (a), la inclusión de manitol en el medio de cultivo provocó una inhibición significativa del crecimiento del hipocotilo en las plantas *WT*. En el caso de las mutantes *cytc*, la reducción del crecimiento en relación con las *WT* fue evidente en condiciones de control (es decir, sin manitol), pero el crecimiento se vio significativamente menos afectado por la presencia de manitol (Figuras 7a y 7b). De hecho, las diferencias de crecimiento entre las plantas *WT* y las

mutantes casi desaparecieron con un 3% (p/v) de manitol, y las mutantes crecieron mejor que las *WT* con un 5% (p/v) del agente osmótico (Figura 7a).

Tabla 4. Las plantas deficientes en CYTc presentan un aumento en la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés. Comparación de los genes con expresión modificada en plantas deficientes en CYTc (*cytc_mut*) y en plantas *WT* cultivadas en presencia de manitol (Skiryecz et al., 2010). Los números indican los valores Z como medida de la significancia del solapamiento entre los dos conjuntos de genes comparados (genes inducidos o reprimidos, en cada caso). El valor Z representa el número de desvíos estándar por el cual el solapamiento observado difiere de la media de los solapamientos obtenidos con 1000 muestras aleatorias. Un valor superior a 5 se considera significativo y se destaca en gris. Los números entre paréntesis indican el número de genes presentes en cada conjunto. El análisis se realizó con la herramienta GeneSect de VirtualPlant 1.3.

	<i>cytc_mut</i> - Reprimidos (1100)	<i>cytc_mut</i> - Inducidos (1626)
Manitol -Reprimidos (1705)	9.5 (139)	0.5 (101)
Manitol- Inducidos (2479)	0.5 (99)	17.2 (326)

El crecimiento de la roseta también se vio afectado de manera diferente por el manitol en las plantas deficientes en CYTc. En este caso, el crecimiento de las plantas *WT* fue sensible a concentraciones de manitol más bajas que las utilizadas en los ensayos de crecimiento del hipocotilo (es decir, 25 y 50 mM; Figura 7c,d), en consonancia con observaciones previas (Kalve et al., 2020; Skiryecz et al., 2010). Mientras tanto, las plantas deficientes en CYTc se vieron significativamente menos afectadas por el tratamiento y las diferencias en el crecimiento con respecto a las plantas *WT* se minimizaron en presencia de 50 mM de manitol (Figura 7c-e). Concluimos que la reducción de los niveles de CYTc modifica la respuesta de crecimiento al estrés inducido por manitol, lo que puede estar relacionado con la inducción basal de genes que responden al estrés observada en las líneas mutantes. En consonancia con esto, observamos que el gen *RD29a*, inducible por estrés, se activa de forma basal en plantas deficientes en CYTc (Figura 7f).

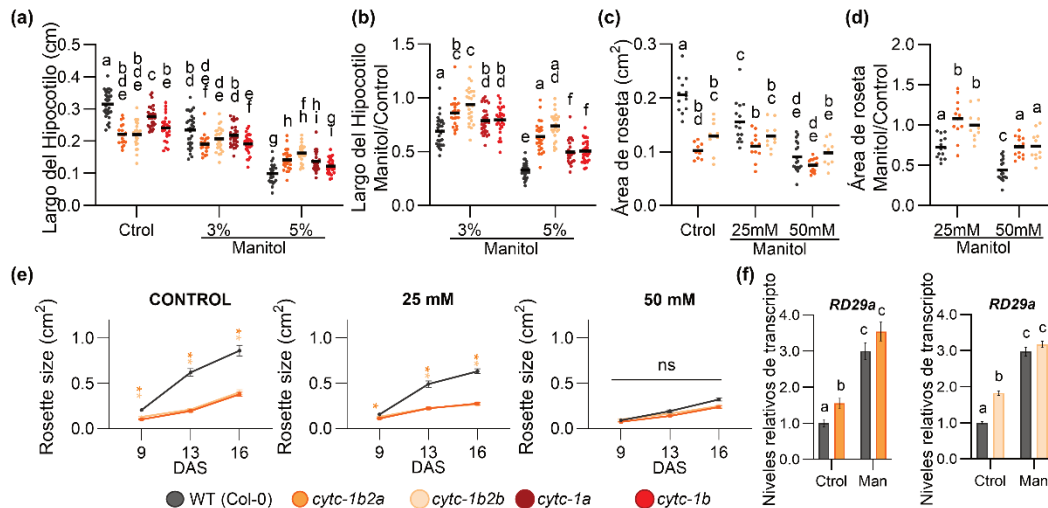


Figura 7. El crecimiento de las plantas deficientes en CYTc muestra una menor sensibilidad a la presencia de manitol en el medio. (a,b) Crecimiento del hipocótilo en plantas WT y deficientes en CYTc (mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b* y mutantes simples *cytc-1a* y *cytc-1b*) cultivadas en 0.5× MS/0.8% (p/v) de agar con distintas concentraciones de manitol (0–5% p/v). Las plantas se cultivaron durante 6 días bajo condiciones de día largo y la longitud del hipocótilo se midió con el software ImageJ. La longitud absoluta del hipocótilo se muestra en (a), mientras que (b) presenta el crecimiento relativo en presencia y ausencia de manitol. Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 18; P < 0.05; ANOVA). Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. **(c-e)** Tamaño de roseta en plantas WT, *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b* cultivadas bajo distintas concentraciones de manitol (0, 25 y 50 mM). El tamaño absoluto de la roseta se muestra en (c), mientras que (d) muestra el crecimiento relativo en presencia y ausencia de manitol y (e) el crecimiento en función del tiempo (DAS: días después de la siembra). Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 9; P < 0.05; ANOVA). Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. En (e) los asteriscos indican diferencias significativas entre mutantes y WT (P < 0.05; ANOVA). **(f)** Niveles de transcritos del gen inducible por estrés *RD29a* en plantas WT y mutantes dobles *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b*, en ausencia y presencia de manitol. Los valores se expresan relativos al genotipo WT. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; P < 0.05; test t de Student). Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes.

4.4.2 La deficiencia de CYTc no activa la MRR canónica

Nuestros resultados establecen una relación entre la función mitocondrial y las respuestas al estrés a través de CYTc. Los cambios en la función mitocondrial están estrechamente relacionados con las respuestas al estrés, pero los mecanismos implicados apenas se conocen en la mayoría de los casos. Un sistema bien definido relacionado con las respuestas al estrés es la MRR canónica, que se activa normalmente cuando se bloquea la respiración dependiente de CYTc con Antimicina A (AA) u otros inhibidores químicos de la OXPHOS (De Clercq et al., 2013; Ng et al., 2013a). Esta respuesta está asociada con un aumento de la producción de ROS, induce la expresión de genes que responden al estrés y de componentes de la vía respiratoria

alternativa (principalmente *AOX1a*) y está mediada por los factores de transcripción *ANAC013* y *ANAC017* (De Clercq et al., 2013; Ng et al., 2013a). Por lo tanto, evaluamos si los cambios de expresión observados en las plantas mutantes *cytc* podrían deberse a la activación de la MRR canónica. Para ello, primero comparamos el transcriptoma de las plantas mutantes *cytc* con el de las plantas tratadas con AA (Ng et al., 2013a). En ambos casos los análisis de transcriptómicas se realizaron en plantas adultas de *A. thaliana*. Sin embargo, mientras que en esta tesis se utilizaron muestras enriquecidas en meristemas, en el estudio de Ng et al., 2013a, se emplearon plantas enteras de 15 días de edad. Encontramos una superposición significativa entre los genes regulados al alza o a la baja por el tratamiento con AA y la deficiencia de CYTc (Figura 8a). Se observó un resultado similar al analizar los cambios provocados por el tratamiento con oligomicina (Figura 8b), que inhibe la ATP sintasa y, en consecuencia, detiene el transporte de electrones acoplado a protones (Geisler et al., 2012). Además, observamos que la respuesta transcriptómica a la deficiencia de CYTc comparte características con la de las plantas en las que la actividad del complejo V se ve comprometida una deficiencia de la subunidad *atp1* codificada en la mitocondria (Figura 8c,d; Yang et al., 2024). Estos resultados sugieren que una parte significativa de los cambios de expresión observados en las mutantes *cytc* probablemente esté relacionada con defectos en la OXPHOS. Para realizar un análisis más detallado, comparamos los genes directamente asociados con la MRR canónica (es decir, aquellos que la AA induce de manera dependiente de *ANAC017*) y los genes cuya inducción no depende de este factor de transcripción (Ng et al., 2013a). Los resultados indicaron que los cambios observados en las plantas mutantes *cytc* están más directamente relacionados con los causados por el tratamiento con AA, que son independientes de *ANAC017* (Figura 8e). Un resultado similar se observó al considerar los genes que también son inducidos por la oligomicina (Figura 8e).

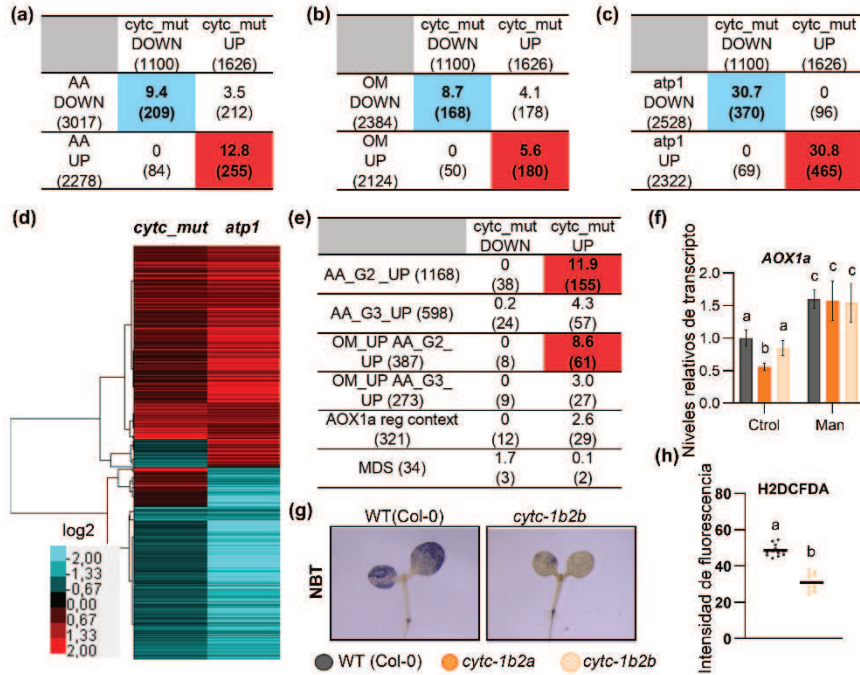


Figura 8. Las alteraciones en la expresión génica observadas en plantas deficientes en CYTc son similares a las descritas en condiciones de disfunción de la OXPHOS. (a–c) Comparación de los genes con expresión modificada en plantas deficientes en CYTc (*cytc_mut*) con aquellos de plantas tratadas con 50 μ M AA durante 3 h (panel A; Ng et al., 2013a), con 10 μ M oligomicina durante 4 h (OM, panel B; Geisler et al., 2012) y con plantas con expresión defectuosa del gen mitocondrial *atp1* del Complejo V (panel C; Yang et al., 2024). Ver la leyenda de la Figura 7(b) para más detalles sobre el análisis. **(d)** Análisis de agrupamiento jerárquico de genes con expresión diferencial en plantas deficientes en CYTc y en plantas con expresión defectuosa del gen *atp1*. El agrupamiento se realizó con el Cluster 3.0 (de Hoon et al., 2004). La intensidad del color indica el cambio de expresión (log₂; cian: reprimido; rojo: inducido). **(e)** Comparación de los genes con expresión modificada en plantas deficientes en CYTc (*cytc_mut*) y distintos conjuntos de genes que responden a la disfunción mitocondrial: AA_G2_UP y AA_G3_UP representan genes inducidos por 50 μ M AA que son independientes de *ANAC017* o regulados positivamente por *ANAC017*, respectivamente (Ng et al., 2013a); OM_UP/AA_UP G2 y G3 representan los subconjuntos mencionados que también son inducidos por 10 μ M oligomicina; “*AOX1a reg context*” refiere a genes que responden al tratamiento con AA de manera similar a *AOX1a* (Ng et al., 2013b); MDS corresponde al “*mitochondrial dysfunction stimulon*” definido por De Clercq et al., 2013). Ver la leyenda de la Figura 7(b) para más detalles sobre el análisis. **(f)** Niveles de transcritos de *AOX1a* medidos por RT-qPCR en plántulas WT y deficientes en CYTc (dobles mutantes *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*) de 6 días de cultivo en agar 0.5 \times MS/0.8% (p/v) y tratadas o no con 3% (p/v) de manitol durante 3 h. Los valores se expresan en relación con los de las plantas WT sin tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; P < 0.05; test de Student). Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. **(g, h)** Niveles de ROS en plántulas WT y mutantes *cytc-1b* y *cytc-2b* de 6 días de cultivo en agar 0.5 \times MS/0.8% (p/v), medidos tras la incubación con NBT (g) o H₂DCFDA (h). Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 12; P < 0.05; test t de Student). Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Por otra parte, Ng et al., (2013b) definieron un grupo de genes que responden de forma similar a *AOX1a* la disfunción mitocondrial, mientras que De Clercq et al., (2013) identificaron genes que responden a diferentes tipos de disfunción mitocondrial, a los que denominaron «*Mitochondrial Dysfunction Stimulon (MDS)*». Nuestro análisis indicó que no existe una superposición significativa entre estos grupos de genes y los

genes cuya expresión se ve afectada en las plantas mutantes *cytc* (Figura 8e). En este sentido, la mayoría de los genes del *MDS* no presentan cambios significativos en la expresión en las mutantes *cytc* (Tabla 5). Además, observamos que el gen *AOX1a*, directamente regulado por ANAC017, no se induce de manera significativa en plantas con deficiencia de CYTc en comparación con plantas *WT* (Figura 8f) y que las plantas con deficiencia de CYTc muestran niveles de ROS más bajos que las plantas *WT* (Figura 8g, h). Concluimos que la MRR canónica no se activa de manera significativa en plantas con deficiencia de CYTc.

TABLA 5. Expresión de genes asociados a la disfunción mitocondrial (MDS) en plantas deficientes en CYTc y en plantas tratadas con inhibidores de la OXPHOS. Los datos de antimicina A (AA) se obtuvieron de (Ng et al., 2013a). Los números en cursiva corresponden a genes que no se ven afectados por el tratamiento con AA en este experimento, pero que muestran una expresión reducida en plantas mutantes *anac017*. Los datos de rotenona y oligomicina (OM) se obtuvieron de De Clercq et al., (2013). n.d.: no detectado. n.s.: no significativo.

<i>MOS genes</i>	<i>cytc_mut</i>		AA	Rotenona	OM (bajo)	OM (alto)
	<i>Q-value</i>	<i>log2 FC</i>	<i>log2 FC</i>			
AT1G05060	0,9911	-0,01	1,78	1,4	1,41	1,1
AT1G05680	0,8325	-0,08	4,40	n.s.	n.s.	n.s.
AT1G24095	0,1404	-0,45	n.s.	1,03	1,14	1,06
AT1G32870	0,8195	-0,10	3,40	1,63	1,87	1,56
AT2G03130	0,9204	0,05	1,21	n.s.	n.s.	n.s.
AT2G03760	0,0392	0,56	2,83	3,02	3,42	2,14
AT2G04050	0,8614	0,05	4,10	2,23	2,11	1,96
AT2G04070	0,8900	-0,04	6,69	n.s.	n.s.	n.s.
AT2G07708	0,0354	-0,70	n.s.	n.s.	1,48	1,77
AT2G07783	n.d.	n.d.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
AT2G07811	n.d.	n.d.	n.s.	n.s.	1,32	1,22
AT2G20800	0,9922	-0,01	4,64	n.s.	n.s.	n.s.
AT2G21640	0,2332	-0,36	5,12	1,46	1,16	n.s.
AT2G32020	0,8638	-0,10	9,58	3,19	3,68	3,43
AT2G40080	0,5673	0,28	0,43	1,86	1,94	1,77
AT2G41730	0,6944	0,25	5,67	4,66	5,18	4,83
AT2G47000	0,7716	-0,17	5,89	3,73	2,78	2,15
AT2G47520	0,0225	-0,75	7,46	3,07	2,64	2,28
AT3G07650	0,9289	0,05	n.s.	n.s.	1,03	1,24
AT3G22370	0,4587	0,32	3,99	2,26	2,29	1,98
AT3G25250	0,6559	-0,16	7,82	3,64	3,41	2,96
AT3G27280	0,1993	0,20	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
AT3G49320	0,7865	0,14	-0,78	n.s.	n.s.	ft.S.

AT3G5093 0	0,9934	-0,01	n.s.	3,04	3,35	2,89	
AT3G6110 0	0,7799	-0,11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
AT3G6163 0	0,0507	-0,43	6,53	2,81	3,5	3,16	
AT4G3737 0	0,0267	0,61	5,60	3,99	4,44	4,16	
AT5G0957 0	0,9390	-0,04	3,70	n.s.	n.s.	n.s.	
AT5G1473 0	0,9321	0,07	2,17	4,75	5,68	5,19	
AT5G4165 0	0,6157	-0,26	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
AT5G4290 0	0,8195	0,13	2,31	1,11	1,37	1,55	
AT5G4345 0	0,0000	-1,35	4,15	4,11	3,55	2,46	
AT5G5144 0	0,5707	-0,30	1,64	1,07	n.s.	n.s.	
AT5G5520 0	0,9997	0,00	1,42	n.s.	n.s.	n.s.	
Escala							
	-3	-2	-1	0	1	2	3

4.4.3 La deficiencia de CYTc activa la vía dependiente de SnRK1.

Además de activar la *MRR* canónica al aumentar los niveles de ROS, los inhibidores de OXPHOS afectan la producción de energía mitocondrial. La proteína quinasa SnRK1 conecta la disponibilidad de energía con las respuestas al estrés (Margalha et al., 2019), lo que posiblemente establece un vínculo entre la disfunción mitocondrial y la activación de señales de estrés. Esta conexión se ha propuesto anteriormente, pero hasta el momento no se ha obtenido evidencia clara sobre su relevancia en la fisiología vegetal (Wurzinger et al., 2018). Para evaluar esto, primero comparamos los cambios de expresión causados por la sobreexpresión de *KIN10*, que codifica la subunidad alfa1 de SnRK1 (Baena-González et al., 2007), y la deficiencia de CYTc. Los resultados indicaron que una proporción significativa de los genes inducidos por SnRK1 están inducidos en las mutantes *cytc*, mientras que lo mismo ocurre con los genes reprimidos en ambas condiciones (Figura 9a,b). Por lo tanto, existe la posibilidad de que parte de los efectos de la deficiencia de CYTc se deba a cambios en los niveles de actividad de SnRK1. Para evaluar esto, primero analizamos los niveles de la forma fosforilada de la subunidad SnRK1 α , que están relacionados con la activación de la vía SnRK1 (Crozet et al., 2010; Shen et al., 2009). Se observó un aumento de la fosforilación de SnRK1 α en las mutantes dobles *cytc-1 cytc-2* (Figura 9c), las cuales también mostraron una inducción significativa de los genes regulados por SnRK1 *DIN6* y *SEN5* (Figura 9d), habitualmente utilizados como indicadores de la activación de esta vía (Baena-González et al., 2007; Shin et al., 2017). A su vez, se observó una disminución de la fosforilación de SnRK1 α y de los niveles de expresión de *DIN6* en plantas que

sobreexpresan CYTc (plantas 35S::CYTC-1; Figura 9e,f). Mientras tanto, los niveles totales de proteína SnRK1 α (KIN10) no se vieron afectados significativamente en las mutantes dobles *cytc-1 cytc-2* ni en las plantas 35S::CYTC-1 (Figura 9g). Por lo tanto, se puede concluir que los cambios en los niveles de CYTc afectan la actividad de la vía dependiente de SnRK1.

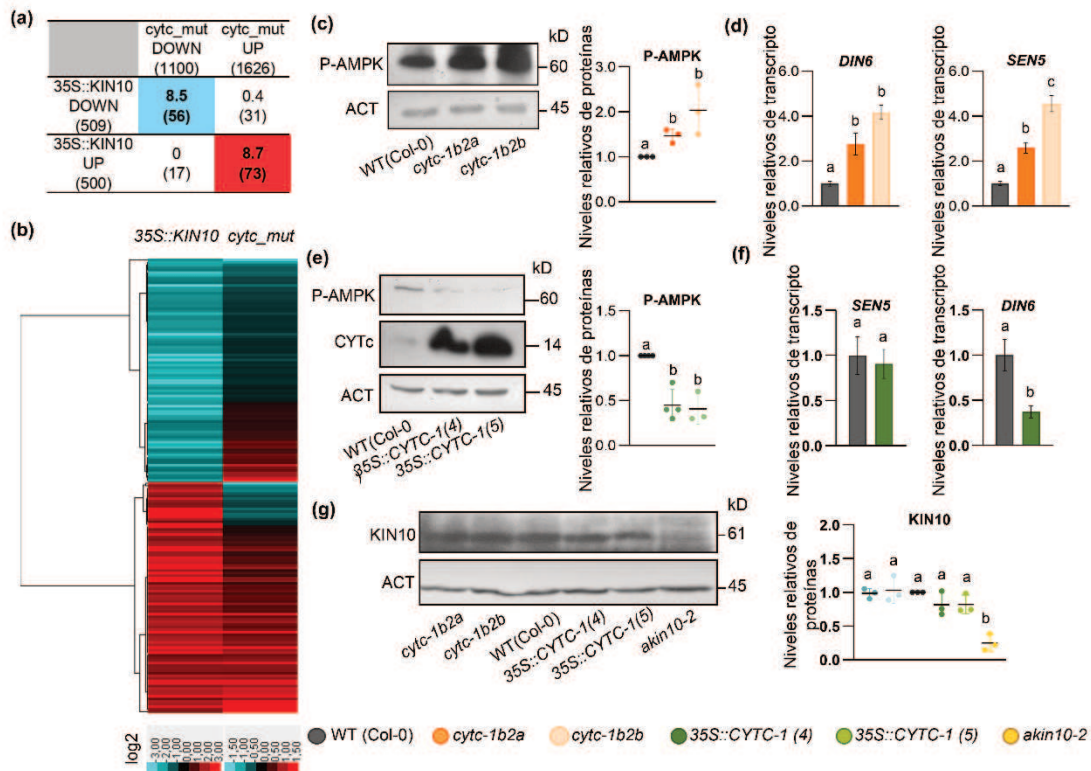


Figura 9. Las plantas deficientes en CYTc presentan una mayor actividad de la vía SnRK1. (a) Comparación entre los genes con cambios de expresión en plantas deficientes en CYTc (*cytc_mut*) y plantas que sobreexpresan la subunidad SnRK1 α (KIN10) (Baena-González et al., 2007). Ver la leyenda de la Figura 7(b) para más detalles sobre el análisis. (b) Análisis de agrupamiento jerárquico de los genes diferencialmente expresados en plantas deficientes en CYTc y en plantas que sobreexpresan KIN10. El análisis se realizó utilizando Cluster 3.0 (de Hoon et al., 2004). La intensidad del color indica el cambio de expresión (\log_2 ; cian: reprimidos; rojo: inducidos). Se usaron escalas de color diferentes para facilitar la visualización, dado que los cambios causados por la sobreexpresión de KIN10 son mayores que los observados en las plantas deficientes en CYTc. (c) Análisis mediante Western blot de la fosforilación de la subunidad SnRK1 α en plantas WT y deficientes en CYTc, empleando anticuerpos anti-P-AMPK. A la derecha se presenta la cuantificación de las intensidades de banda de P-AMPK normalizadas con actina y expresadas en relación con el genotipo WT. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres experimentos independientes; $P < 0.05$; ANOVA). (d) Niveles de transcritos de los genes regulados por SnRK1 *DIN6* y *SEN5*, analizados mediante RT-qPCR en plántulas WT y deficientes en CYTc de 6 días. Los valores se expresan en relación con la WT. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; $P < 0.05$; test t de Student). Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. (e) Análisis por Western blot de la fosforilación de la subunidad SnRK1 α en plantas WT y en dos líneas independientes que sobreexpresan CYTc (35S::CYTC-1), empleando anticuerpos anti-P-AMPK. A la derecha se presenta la cuantificación de las intensidades de banda de P-AMPK normalizadas con actina y expresadas en relación con la WT. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres experimentos independientes; $P < 0.05$; ANOVA). (f) Niveles de transcritos de los genes *DIN6* y *SEN5* medidos mediante RT-qPCR en plántulas WT y 35S::CYTC-1 cultivadas como en (c). Los valores se expresan en relación con la WT. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas

biológicas; $P < 0.05$; test t de Student). Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. (g) Análisis por *Western blot* de los niveles de KIN10 en plantas *WT*, deficientes en CYTc y *35S::CYTC-1* utilizando anticuerpos anti-KIN10. Los extractos se prepararon como en (c). Se empleó un extracto de la mutante *akin10-2* para confirmar la identidad de la banda correspondiente a KIN10. A la derecha se presenta la cuantificación de las intensidades de banda de KIN10 normalizadas con actina y expresadas en relación con la *WT*. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres experimentos independientes; $P < 0.05$; ANOVA).

4.4.4 *El CYTc afecta el crecimiento de las plantas a través de cambios en los niveles de la actividad de SnRK1*

Para continuar con nuestros estudios, evaluamos la relevancia de los cambios en la actividad de la vía dependiente de SnRK1 en las características fenotípicas de las plantas con niveles alterados de CYTc. Para esto, cruzamos la línea mutante simple *cytc-1a*, que presenta crecimiento retrasado (Racca et al., 2018), con una mutante nula en *KIN10* (*akin10-2*; Simon et al., 2018b) (Figura 10). El análisis por *Western blot* mostró que la mutante simple *cytc-1a*, al igual que la mutante doble *cytc-1 cytc-2*, presenta un aumento en la fosforilación de SnRK1 α , lo cual se vio significativamente suprimido en el fondo mutante *akin10-2* (Figura 10a). Esto estuvo de acuerdo con los cambios observados en los niveles de transcritos de *DIN6* (Figura 10b). Fenotípicamente, la mutación *akin10-2* también suprimió los defectos de crecimiento del hipocótilo de la mutante *cytc-1a* (Figura 10c,d). Además, el crecimiento de la roseta y el tiempo de floración se recuperaron en el fondo *akin10-2* (Figura 10c,e,f). Estudios previos mostraron que las plantas deficientes en CYTc presentan un aumento basal de la autofagia y del contenido de aminoácidos libres, posiblemente asociado a un incremento de la degradación de proteínas (Canal et al., 2024). De manera notable, la mutación en *KIN10* en el fondo *cytc-1a* restauró estos parámetros a los niveles de las plantas *WT* (Figura 10g-i).

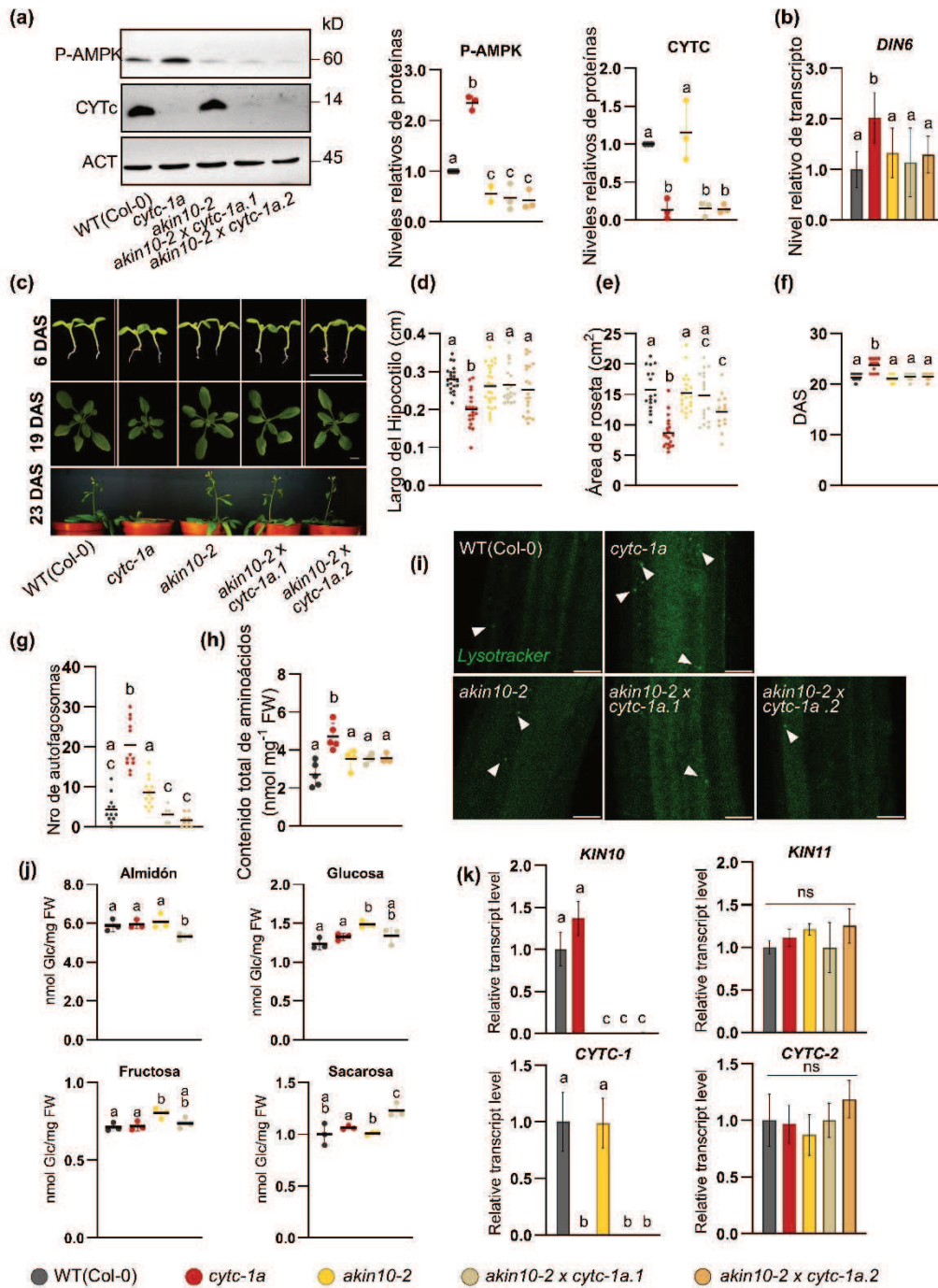


Figura 10. La pérdida de función de *KIN10* permite la recuperación del crecimiento y reduce la autofagia y los niveles de aminoácidos libres en plantas deficientes en *CYTc*. (a) Análisis por *Western blot* de la fosforilación de la subunidad SnRK1 α en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutantes dobles *cytc-1a* *akin10-2* (dos líneas provenientes de cruza independientes), utilizando anticuerpos anti-P-AMPK. Los extractos se obtuvieron de plántulas de 6 días cultivadas en 0.5x MS/0.8% (p/v) agar bajo fotoperíodo de día largo. Se emplearon anticuerpos anti-CYTc y anti-Actina para analizar los niveles de CYTc y controlar la carga de proteínas, respectivamente. A la derecha se presenta la cuantificación de las intensidades de las bandas P-AMPK y CYTc relativas a las plantas *WT* tras la normalización con actina. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres experimentos independientes; $P < 0.05$; ANOVA). (b) Niveles de transcritos del gen blanco de SnRK1 *DIN6* medidos mediante RT-qPCR en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutantes dobles *cytc-1a* *akin10-2* (dos líneas independientes), cultivadas como en (a). Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; $P < 0.05$; test t de Student). Se obtuvieron resultados

similares en tres experimentos independientes. **(c)** Imágenes representativas de plantas de las distintas líneas analizadas en los paneles (d–f). DAS: días después de la siembra. Barras: 1 cm. **(d)** Longitud del hipocótilo de plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutantes dobles *cytc-1a akin10-2* (dos líneas) cultivadas como en (a). Letras diferentes indican diferencias significativas ($n = 19$; $P < 0.05$; ANOVA). Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. **(e, f)** Tamaño de la roseta a 19 DAS (e) y número de días necesarios para alcanzar el estado reproductivo (f) en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutantes dobles *cytc-1a akin10-2* (dos líneas), cultivadas en macetas bajo fotoperíodo largo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n = 14$; $P < 0.05$; ANOVA). **(g)** Cuantificación del número de autofagosomas por cuadro correspondientes a raíces de 5 días de plantas *WT*, *cytc-1a*, *akin10-2* y *cytc-1a akin10-2* teñidas con $1 \mu\text{M}$ LysoTracker Green. Las plantas se cultivaron en placas orientadas en forma vertical con 0.5x MS 1% (p/v) agar bajo fotoperíodo largo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n > 9$ raíces; $P < 0.05$; ANOVA). Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. **(h)** Contenido de aminoácidos libres en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutantes dobles *cytc-1a akin10-2* (dos líneas) cultivadas como en (a). Letras diferentes indican diferencias significativas (cuatro réplicas biológicas; $P < 0.05$; ANOVA). **(i)** Imágenes representativas del experimento mostrado en (g). Las puntas de flecha señalan estructuras similares a autofagosomas. Barras: $20 \mu\text{m}$. **(j)** Niveles de almidón y de carbohidratos solubles en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutantes dobles *cytc-1a akin10-2*, cultivadas como en (a). Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; $P < 0.05$; test t de Student). Se observaron resultados similares en dos experimentos diferentes. **(k)** Niveles de transcritos de *CYTC-1*, *CYTC-2*, *KIN10* y *KIN11* determinados mediante RT-qPCR en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutantes dobles *cytc-1a akin10-2* (dos líneas), cultivadas como en (a). Los valores se expresan en relación al genotipo *WT*. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; $P < 0,05$; test t de Student). ns: no significativo.

Estos resultados indican que los defectos de crecimiento y la activación de la autofagia observados en plantas deficientes en CYTc se deben principalmente al aumento de la actividad de la vía de SnRK1, conocida por restringir el crecimiento bajo condiciones de deficiencia de carbono y/o energía. Curiosamente, las plantas deficientes en CYTc no presentan una disminución en los niveles de almidón ni en los carbohidratos solubles (Figura 10j), lo que sugiere que la falta de carbono no es la causa principal de la activación de la vía de SnRK1 en este caso. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los niveles de transcritos de los genes *KIN10* y *KIN11* en las plantas mutantes *cytc* (Figura 10k), lo que indica la existencia de una regulación postraduccional de la actividad de SnRK1.

También cruzamos una línea *35S::CYTC-1* con una línea que sobreexpresa *KIN10*, denominada *5.7* (Baena-González et al., 2007; Simon et al., 2018a). La sobreexpresión de *KIN10* afectó negativamente el crecimiento del hipocótilo, mientras que el aumento de los niveles de CYTc tuvo un efecto opuesto (Figura 11a,d). En las líneas de cruce, el efecto negativo de la sobreexpresión de *KIN10* sobre el crecimiento se eliminó casi por completo, ya que la longitud del hipocótilo se recuperó a valores similares o incluso mayores a los de las plantas *WT*, tanto en fondo *Col-0* como en *Ler* (Figura 11a,d).

Estas características fenotípicas también se observaron en plantas adultas, donde el aumento de los niveles de CYTc suprimió el efecto negativo sobre el

crecimiento de la roseta causado por la sobreexpresión de *KIN10* (Figura 11b–d). Para evitar cualquier efecto asociado a diferencias entre ecotipos por cruzar líneas de distintos fondos genéticos, también analizamos el crecimiento del hipocótilo en la población F1 (es decir, plantas dobles heterocigotas) de las cruza entre ambas líneas sobreexpresantes y/o las líneas *WT* correspondientes (Figura 11e). Los resultados confirmaron lo observado en las líneas homocigotas ya establecidas.

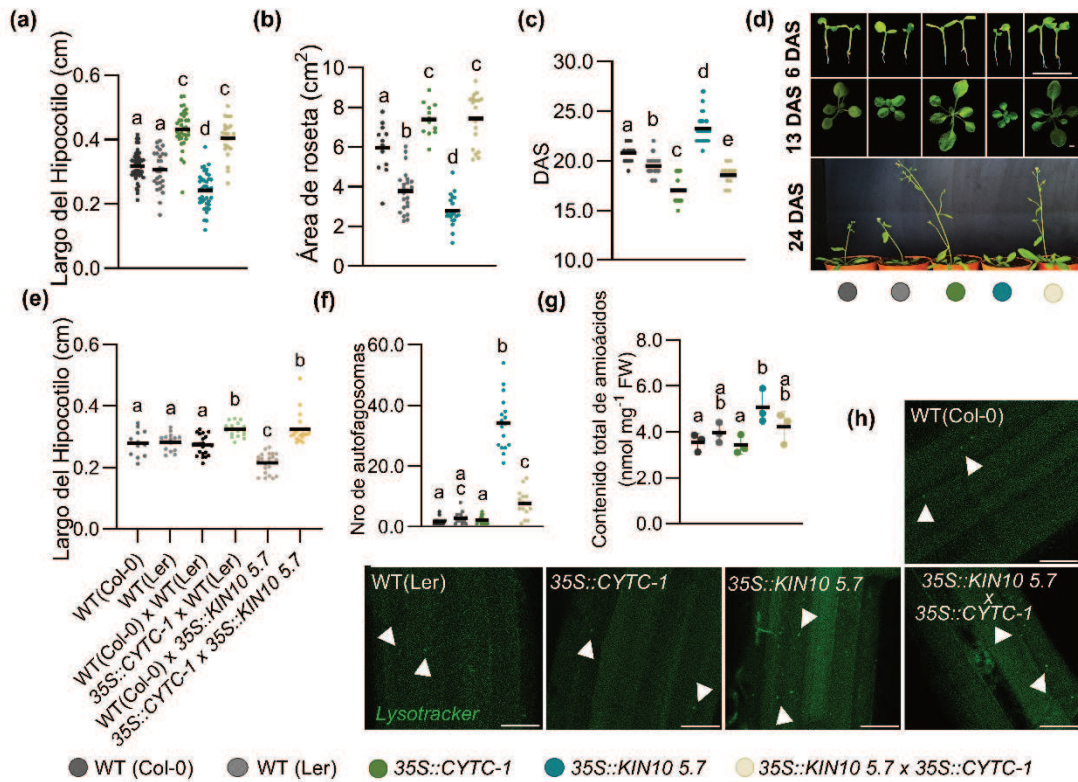


Figura 11. Un incremento de los niveles de CYTC inhibe la activación de SnRK1 y atenúa el defecto de crecimiento de las plantas que sobreexpresan *KIN10*. (a) Longitud del hipocótilo de plantas *WT* (ecotipos *Col-0* y *Ler*), 35S::CYTC-1, 35S::KIN10 5.7 y 35S::CYTC-1 x 35S::KIN10 5.7 cultivadas durante 6 días en 0.5× MS/0.8% (p/v) agar bajo fotoperíodo de día largo. Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 25; P < 0.05; ANOVA). (b, c) Tamaño de la roseta a 13 días después de la siembra (DAS) (b) y número de días necesarios para alcanzar el estado reproductivo (c) de plantas cultivadas en macetas bajo fotoperíodo de día largo. Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 12; P < 0.05; ANOVA). (d) Imágenes representativas de las plantas analizadas en los paneles (a–c). Barras: 1 cm. (e) Longitud del hipocótilo de plántulas de la población F1 de cruza entre líneas en fondos *Col-0* (*WT* o 35S::CYTC-1) y *Ler* (*WT* o 35S::KIN10). Se utilizó el polen de las líneas en *Ler* en todos los casos. Las plantas se cultivaron como en (a). Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 13; P < 0.05; ANOVA). (f) Cuantificación del número de estructuras tipo autofagosomas por cuadro correspondientes a plantas de las distintas líneas descritas en (a) cultivadas en placas orientadas en forma vertical con 0.5× MS/1% (p/v) agar bajo fotoperíodo de día largo y teñidas con 1 μM *LysoTracker Green*. Letras diferentes indican diferencias significativas (n > 8 raíces; P < 0.05; ANOVA). (g) Contenido de aminoácidos libres en las líneas cultivadas como en (a). Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; P < 0.05; test t de Student). (h) Imágenes representativas del experimento mostrado en (f). Las puntas de flecha señalan estructuras similares a autofagosomas. Barras: 20 μm.

La sobreexpresión de *CYTC-1* también eliminó el aumento de la autofagia y de los niveles de aminoácidos libres en plantas que sobreexpresan *KIN10* (Figura 11f-h). Considerando esto y que el crecimiento del hipocótilo no parece verse influido por el ecotipo, asumimos que los cambios observados se deben a los efectos de la sobreexpresión de *CYTc* sobre la actividad de la vía de SnRK1. De hecho, la sobreexpresión de *CYTC-1* produjo una disminución de los niveles de fosforilación de SnRK1 α en comparación con los observados en plantas que sobreexpresan *KIN10* (Figura 12a). Por otro lado, la sobreexpresión de *CYTC-1* tuvo un efecto menor en los niveles de transcritos de *KIN10* (Figura 12b) o en el contenido total de proteína SnRK1 α 1, determinado mediante anticuerpos anti-HA, ya que las plantas *35S::KIN10* expresan una proteína fusionada a HA (Figura 12c). En concordancia con lo observado, la sobreexpresión de *CYTC-1* también eliminó el aumento en la expresión de *DIN6* observado en plantas que sobreexpresan *KIN10* (Figura 12b). Además, al analizar los cruces entre plantas *35S::CYTC-1* y una línea *35S::KIN10* distinta, denominada 6.5, se obtuvieron resultados similares a los de la línea 5.7 (Figura 12d-h). Estos resultados refuerzan la idea de que los niveles de *CYTc* afectan la actividad de SnRK1 de manera postraduccional y que el *CYTc* modula el crecimiento vegetal a través de este mecanismo.

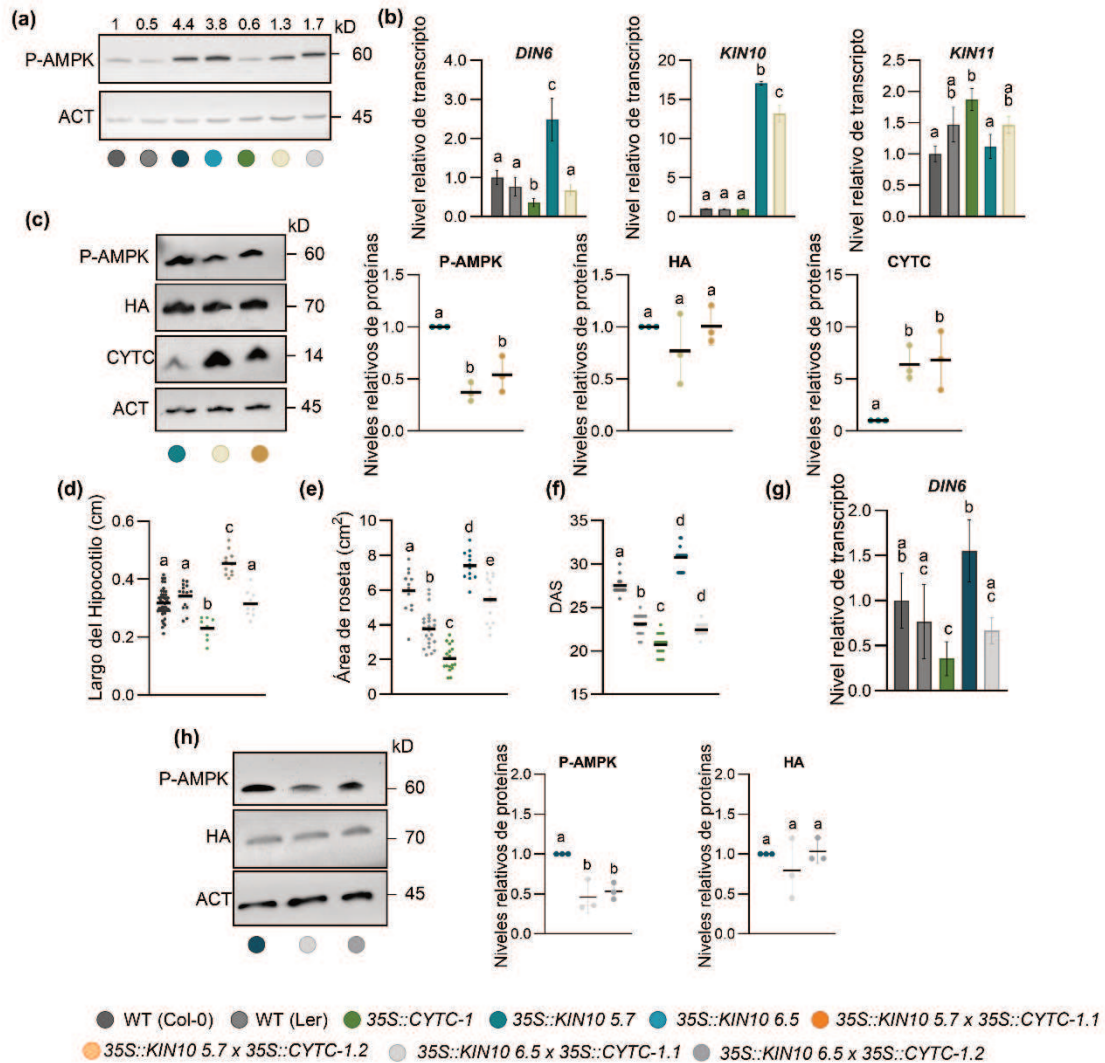


Figura 12. Análisis moleculares de las líneas de cruce entre plantas 35S::CYTC-1 y 35S::KIN10 (5.7 y 6.5). (a) Análisis por *Western blot* de la fosforilación de la subunidad SnRK1 α en plantas WT (ecotipos *Col-0* y *Ler*), 35S::CYTC-1, 35S::KIN10 (dos líneas independientes: 5.7 y 6.5) y 35S::CYTC-1 x 35S::KIN10 (dos líneas dobles homocigotas) usando anticuerpos anti-P-AMPK. Los extractos se prepararon a partir de plántulas cultivadas durante 6 días en 0.5x MS/0.8% (p/v) agar bajo fotoperíodo de día largo. Se utilizaron anticuerpos anti-Actina como control de carga. Los números sobre la imagen indican la intensidad de las bandas de P-AMPK relativa a la de las plantas WT (*Col-0*) y normalizada con la señal de actina. (b) Niveles de transcritos de los genes que codifican la subunidad SnRK1 α , *KIN10* y *KIN11*, y del gen blanco de SnRK1, *DIN6*, medidos mediante RT-qPCR en plántulas cultivadas como en (a). Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; $P < 0.05$; test t de Student) (c) Análisis por *Western blot* de la fosforilación de la subunidad SnRK1 α , niveles de la subunidad SnRK1 α 1 y niveles de CYTC en plantas 35S::KIN10 5.7 y 35S::CYTC-1 x 35S::KIN10 5.7 (dos líneas independientes). Los extractos se prepararon a partir de plántulas cultivadas, como en (a). Se utilizaron anticuerpos anti-P-AMPK y anti-HA para analizar la fosforilación de SnRK1 α y los niveles de la subunidad SnRK1 α 1, respectivamente. Se usaron anticuerpos anti-Actina como control de carga. A la derecha, se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas relativa a la de las plantas 35S::KIN10 5.7 tras normalización con actina. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres experimentos independientes; $P < 0.05$; ANOVA). (d) Longitud del hipocótilo de plantas WT (ecotipos *Col-0* y *Ler*), 35S::CYTC-1, 35S::KIN10 6.5 y 35S::CYTC-1 x 35S::KIN10 6.5 cultivadas durante 6 días en 0,5x MS/0,8% (p/v) agar bajo condiciones de día largo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n = 11$; $P < 0,05$; ANOVA). (e,f) Tamaño de la roseta a los 13 días después de la siembra (DAS) (e) y número de días requeridos para alcanzar la etapa reproductiva (f) de plantas cultivadas

en macetas bajo un fotoperiodo de día largo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n = 12$; $P < 0,05$; ANOVA). (g) Niveles de transcritos del gen blanco de SnRK1, *DIN6*, medidos mediante RT-qPCR en plantas *WT* (ecotipos *Col-0* y *Ler*), *35S::CYTC-1*, *35S::KIN10 6.5* y *35S::CYTC-1 × 35S::KIN10 6.5* cultivadas como en (a). Los valores se expresan en relación con la línea *WT (Col-0)*. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; $P < 0,05$; prueba t de Student). (h) Análisis por *Western blot* de la fosforilación de la subunidad SnRK1 α y de los niveles de la subunidad SnRK1 α 1 en plantas *35S::KIN10 6.5* y *35S::CYTC-1 × 35S::KIN10 6.5* (dos líneas). Los extractos se prepararon a partir de plántulas cultivadas como en (a). Se utilizaron anticuerpos anti-P-AMPK y anti-HA para analizar la fosforilación de SnRK1 α y los niveles de la subunidad SnRK1 α 1, respectivamente. Se utilizaron anticuerpos anti-Actina como control de carga. A la derecha se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas en relación con la de las plantas *35S::KIN10 6.5* después de la normalización con actina. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres experimentos independientes; $P < 0,05$; ANOVA).

4.4.5 La menor sensibilidad al manitol de las plantas deficientes en CYTc se debe a la activación de la vía dependiente de SnRK1

Dado que los cambios en la expresión génica observados en las plantas deficientes en CYTc comparten características con los de plantas *WT* cultivadas en presencia de manitol (Tabla 3) y que las mutantes dobles *cytc* son relativamente menos afectadas que las plantas *WT* por la incorporación de manitol en el medio de crecimiento (Figura 7a-d), analizamos si este comportamiento también está relacionado con cambios en la actividad de la vía de SnRK1. Tal como se observó en las mutantes dobles *cytc1 cytc-2*, la mutante simple *cytc-1a* fue relativamente menos sensible a la inhibición del crecimiento inducidas por manitol que la línea *WT*. En concordancia con esto, los hipocótilos de la mutante *cytc-1a*, que eran más cortos que los de la línea *WT* en ausencia de manitol, se comportaron como los de la línea *WT* en presencia de 3% (p/v) y de manitol fueron más largos que estos con 5% (p/v) de manitol (Figura 13a-b). Por el contrario, la doble mutante *cytc-1a akin10-2* se comportó de manera similar a la mutante simple *akin10-2*, que fue relativamente más sensible que la línea *WT* al 3% (p/v) de manitol (Figura 13a-b). Este resultado sugiere que la menor sensibilidad al manitol de las plantas deficientes en CYTc se debe a cambios en la actividad de la vía de SnRK1, lo que vincula la función mitocondrial con las respuestas de crecimiento bajo estrés. También analizamos el crecimiento de la roseta en presencia de un estrés osmótico leve, provocado por 25 mM de manitol en el medio de cultivo. Como se describió previamente (Kalve et al., 2020; Skiryecz et al., 2010), el área de la roseta de plantas *WT* a los 19 días después de la siembra (DAS) se redujo entre 25 y 30% en comparación con el control sin manitol (Figura 13c-f). En cambio, la mutante *cytc-1a* no mostró un cambio significativo frente a 25 mM de manitol (Figura 13c-f). Por otro lado, el comportamiento de las mutantes simples *akin10-2* y dobles *akin10-2 cytc-1a* fue similar al de las plantas *WT* (Figura 13c-f). A una concentración más alta de manitol (50 mM), el crecimiento de todas las líneas se vio severamente afectado (Figura 13c-f). Por lo

tanto, la respuesta diferencial de crecimiento ante el estrés inducido por manitol también se observa durante el crecimiento de la roseta y probablemente se relaciona con la activación de la vía de SnRK1 en las plantas deficientes en CYTc. En concordancia con esto, los niveles de transcriptos del gen marcador de estrés abiótico *RD29a*, que estaban aumentados en la mutante *cytc-1a* en condiciones basales, retornaron a niveles *WT* después del cruce con la línea *akin10-2* (Figura 13g).

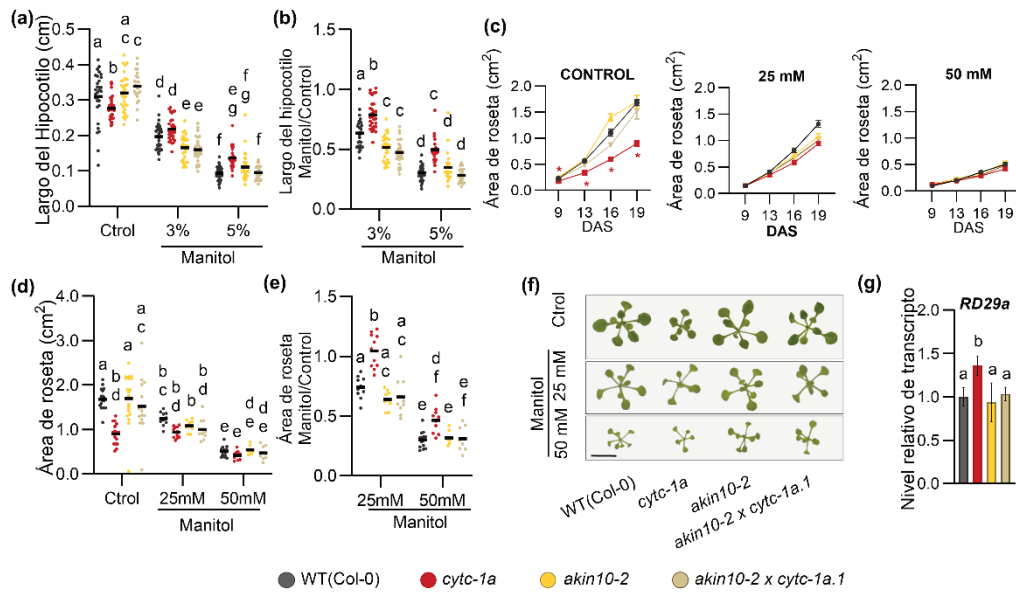


Figura 13. La pérdida de la función de *KIN10* restaura la sensibilidad al manitol en plantas deficientes en *CYTc*.

(a, b) Crecimiento del hipocótilo en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y en la mutante doble *cytc-1a akin10-2*, cultivadas en 0,5× MS 0,8% (p/v) agar con diferentes concentraciones de manitol (0–5% p/v). Las plantas se cultivaron durante 6 días bajo condiciones de día largo y la longitud del hipocótilo se midió utilizando el software ImageJ. La longitud absoluta del hipocótilo se muestra en (a), mientras que (b) presenta el crecimiento relativo en presencia y ausencia de manitol. Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 24; P < 0,05; ANOVA). Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. (c-f) Tamaño de roseta en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutante doble *cytc-1a akin10-2*, cultivadas durante 19 días en 0,5× MS 0,8% (p/v) agar con distintas concentraciones de manitol (0, 25 y 50 mM) bajo condiciones de día largo. En (c) se muestran las cuantificaciones del área de roseta en relación al tiempo (DAS: días después de la siembra). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las plantas *WT* (n = 9; P < 0,05; ANOVA). El tamaño absoluto de la roseta se muestra en (d), mientras que (e) presenta el crecimiento relativo en presencia y ausencia de manitol. Letras diferentes indican diferencias significativas (n = 9; P < 0,05; ANOVA). Las imágenes representativas se muestran en (f). Barra: 1 cm. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. (g) Niveles de transcriptos de *RD29a* medidos mediante RT-qPCR en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutante doble *cytc-1a akin10-2*, cultivadas como en (a) en ausencia de manitol. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres réplicas biológicas; P < 0,05; prueba t de Student).

4.4.6 La deficiencia de CYTc afecta la actividad de la vía TOR a través de SnRK1

Estudios previos mostraron que las plantas deficientes en CYTc presentan una menor activación de la vía TOR (Canal et al., 2024). Esto se refleja en una disminución de los niveles de la forma fosforilada de la proteína ribosomal S6 (P-RPS6; Figura 14). Mientras tanto, los niveles de P-RPS6 fueron más altos que en la línea WT en la mutante *akin10-2*, observándose un resultado similar en la cruce de *akin10-2* con la mutante *cytc-1a* (Figura 14). Esto ubica la actividad de TOR aguas abajo de SnRK1 e indica que los cambios en los niveles de CYTc afectan la actividad de TOR a través de SnRK1. Luego evaluamos si la activación de la vía TOR, observada tras introducir la mutación *akin10-2*, era requerida para la recuperación del crecimiento observada en la doble mutante *cytc-1a akin10-2*. Para esto, analizamos el crecimiento de las distintas líneas en presencia del inhibidor de TOR AZD-8055. Como se muestra en la Figura 14, la mutante *cytc-1a* fue relativamente menos sensible a la inhibición por AZD-8055, como se había reportado previamente (Canal et al., 2024), probablemente porque la actividad de TOR ya está reducida en estas plantas. Además, la recuperación del crecimiento observada en la doble mutante *cytc-1a akin10-2* se perdió en presencia del inhibidor de TOR (Figura 14), indicando que TOR participa aguas abajo de SnRK1 en este proceso.

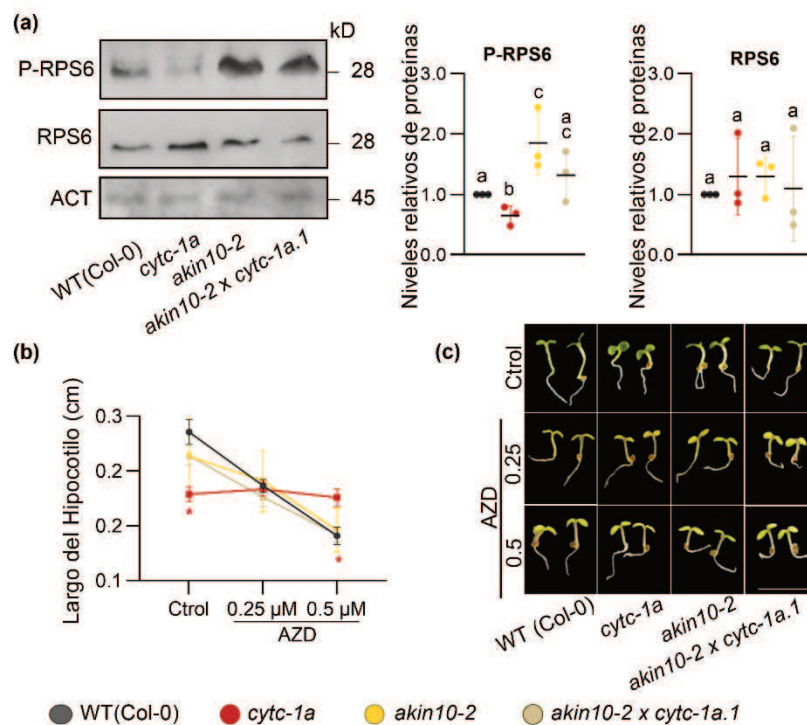


Figura 14. La deficiencia de CYTc afecta la actividad de la vía TOR a través de SnRK1. (a) Análisis por *Western blot* de la fosforilación de RPS6 en plantas WT, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutante doble *cytc-1a akin10-2*, utilizando anticuerpos anti-P-RPS6. Los extractos se prepararon a partir de plántulas cultivadas durante 3,5 días en medio 0,5 \times MS, seguidos de una noche extendida (16 h) para agotar nutrientes y un tratamiento con 20 mM glucosa

durante 3 h para activar TOR (Xiong et al., 2013). Se utilizaron anticuerpos anti-RPS6 como control de los niveles totales de RPS6. Los anticuerpos anti-Actina se usaron como control de carga. A la derecha se presenta la cuantificación de las intensidades de banda de P-RPS6 y RPS6 total, relativas a las de las plantas *WT*, luego de la normalización con actina. Letras diferentes indican diferencias significativas (tres experimentos independientes; $P < 0,05$; ANOVA). **(b)** Crecimiento del hipocótilo en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y mutante doble *cytc-1a akin10-2*, cultivadas como en (a) y tratadas con distintas concentraciones de *AZD-8055*. La longitud del hipocótilo se midió con el software ImageJ. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a plantas *WT* ($n = 20$; $P < 0,05$; ANOVA). **(c)** Imágenes representativas del experimento mostrado en (b). Barra: 0,5 cm.

4.4.7 La deficiencia de *CYTc* afecta la actividad de la vía *SnRK1* a través de señales energéticas

Por último, nos centramos en estudiar los mecanismos subyacentes a la activación de la vía *SnRK1* en plantas deficientes en *CYTc*. Dada la función de *SnRK1* como sensor del estado energético celular (Baena-González, 2010; Baena-González et al., 2007; Broeckx et al., 2016; Nukarinen et al., 2016; Wu et al., 2025), analizamos si los cambios en los niveles de energía podrían desencadenar su activación, utilizando Antimicina A (AA). Este inhibidor químico actúa bloqueando la función del complejo III de la cadena respiratoria, interrumpiendo el transporte de electrones y la producción de ATP (De Clercq et al., 2013; Dojcinovic et al., 2005). Para confirmar el efecto del tratamiento con AA sobre el estado energético celular, medimos el contenido de ATP, ADP y AMP, así como la carga energética de adenilatos (AEC) mediante HPLC (Figura 15a). Los resultados obtenidos muestran una disminución de los niveles de ATP y AEC como consecuencia del tratamiento con AA (Figura 15a). A su vez, este tratamiento provoca un aumento de la actividad de *SnRK1* y una disminución de la actividad de TOR (Figura 15b). Por último, al analizar la respuesta de la mutante *cytc-1a* al tratamiento con diferentes concentraciones de AA observamos que esta presenta una menor sensibilidad que el genotipo *WT*, como fue reportado previamente por Canal et al., (2024). La sensibilidad a AA se recupera al disminuir la actividad de *SnRK1* en la cruce con la mutante *akin10-2*, observándose una respuesta similar a la de las plantas *WT* (Figura 15c). En base a estos resultados, y considerando evidencias previas que indican que las plantas deficientes en *CYTc* presentan una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y en los niveles de ATP (Canal et al., 2024; Racca et al., 2022), podemos proponer que el aumento en la actividad de *SNRK1* observado en las mutantes *cytc* podría estar vinculado a una disminución en la producción de energía mitocondrial. Estudios usando otros inhibidores de la OXPHOS podrían ayudar a confirmar esta propuesta.

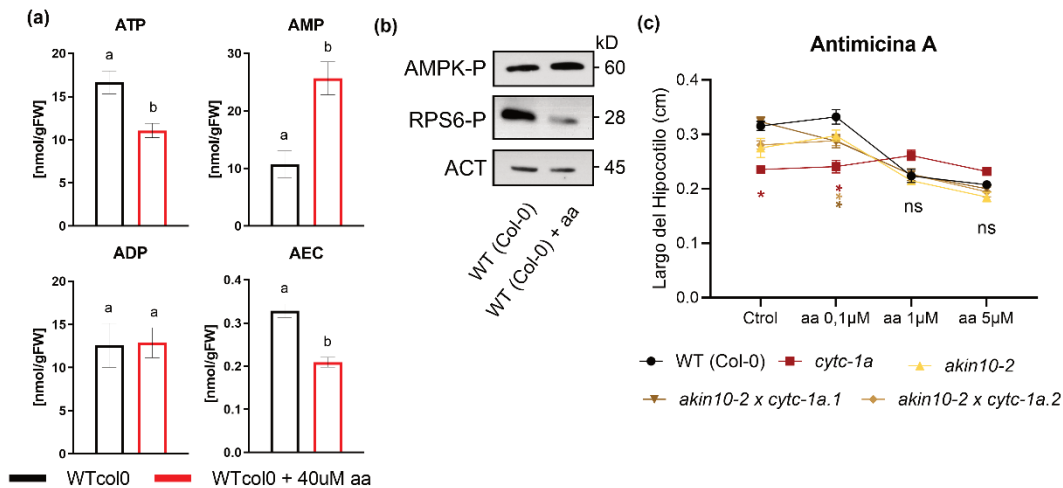


Figura 15. La alteración del estado energético mitocondrial se asocia con cambios en la actividad de SnRK1 y TOR. (a) Cuantificación del contenido de ATP, ADP y AMP y de la AEC (nmol mg⁻¹ de peso fresco) en plántulas cultivadas durante 3,5 días en medio MS líquido, seguidos de una noche prolongada para la depleción de nutrientes (16 h de oscuridad) y posterior tratamiento con 90 mM sacarosa en oscuridad durante 3 h. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (n = 3 réplicas biológicas, P < 0,05; prueba t de Student). **(b)** Análisis mediante *Western blot* de la fosforilación de la subunidad SnRK1α luego del tratamiento con AA en plántulas crecidas durante 6 días en MS 0.5x agar 0,8% (p/v) y tratadas posteriormente durante 2 horas con 40 µM AA en medio MS líquido. Se utilizaron anticuerpos anti-P-AMPK fosforilada para analizar la activación de SnRK1 y anticuerpos anti-Actina como control de carga. **(c)** Crecimiento de hipocotilos en plantas *WT*, mutantes simples *cytc-1a* y *akin10-2*, y doble mutante *cytc-1a akin10-2*, cultivadas durante 6 días en medio 0,5× MS/0,8% (p/v) agar y con el agregado de AA en distintas concentraciones. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (n = 9-17; P < 0,05, ANOVA).

4.5 DISCUSION

Según la teoría endosimbiótica, la adquisición de las mitocondrias está relacionada con el origen, el desarrollo y la diversificación de las células eucariotas. A lo largo de la evolución, se estableció una compleja red de señales para ajustar la función mitocondrial a las necesidades celulares y, a su vez, adaptar los procesos celulares en función del estado mitocondrial (Picard & Shirihi, 2022; Welchen et al., 2021). Estas señales se clasifican en dos categorías generales: anterógradas, que se originan en otras partes de la célula y modulan la función o la composición mitocondrial, y retrogradas, que comunican el estado de las mitocondrias al resto de la célula, activando respuestas adaptativas (Ng et al., 2014). Considerando las funciones canónicas de las mitocondrias, es probable que señales metabólicas, redox y asociadas al estado energético —entre otras— participen en la señalización retrógrada. Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales los cambios en la homeostasis mitocondrial se transmiten al resto de la célula están lejos de estar completamente dilucidados. En este trabajo mostramos que una deficiencia en el componente de la cadena respiratoria CYTc activa la expresión de genes relacionados

con las respuestas al estrés, lo que sugiere un posible rol del CYTc en la tolerancia al estrés en plantas. La tolerancia al estrés puede evaluarse mediante la supervivencia o el crecimiento de las plantas en condiciones adversas (Skirycz et al., 2011). En nuestro caso, observamos que el crecimiento de las plantas deficientes en CYTc se ve relativamente menos afectado que el de las plantas *WT* en presencia de manitol en el medio. Esto podría deberse a la activación basal de genes de respuesta al estrés observada en las mutantes *cytc*. De hecho, los cambios transcripcionales en plantas deficientes en CYTc se superponen significativamente con los de plantas cultivadas en presencia de concentraciones no letales de manitol. Además, la activación de programas de respuesta al estrés, conocidos por impactar en el crecimiento vegetal (He et al., 2022b), podría contribuir parcialmente al crecimiento reducido de las plantas deficientes en CYTc bajo condiciones normales.

Una activación de las respuestas a estrés y un crecimiento reducido fueron previamente observados al analizar plantas con mutaciones que afectan los niveles de otros componentes de la cadena respiratoria, así como después de bloquear el transporte electrónico mitocondrial mediante inhibidores químicos (Belt et al., 2017; De Clercq et al., 2013; Fromm et al., 2016; Geisler et al., 2012; Gleason et al., 2011; Keren et al., 2012; Koprivova et al., 2010; Meyer et al., 2009; Ng et al., 2013a; Yang et al., 2024, 2022; Yuan & Liu, 2012; Zsigmond et al., 2024). En la mayoría de los casos, si no en todos, esto estuvo acompañado de la inducción de genes que codifican componentes alternativos de la cadena respiratoria y de otros genes involucrados en la señalización retrógrada mitocondrial (*MRR*) canónica, controlada por *ANAC017* y factores de transcripción relacionados (De Clercq et al., 2013; Ng et al., 2013a). Durante mucho tiempo se asumió —y fue demostrado recientemente— que un aumento en la producción de ROS mitocondriales activa la *MRR* canónica (Khan et al., 2024) generalmente como consecuencia de la fuga de electrones desde componentes reducidos de la cadena respiratoria (Huang et al., 2016). De manera notable, nosotros encontramos que *AOX1a* y otros genes controlados por *ANAC017* no se inducen en plantas deficientes en CYTc, las cuales además presentan niveles de ROS normales o incluso reducidos.

Aun así, se observó previamente un leve aumento en la actividad de la vía AOX y en la derivación de electrones hacia esa vía en rosetas de plantas deficientes en CYTc cultivadas en condiciones de día largo similares a las empleadas aquí (Florez-Sarasa et al., 2021). Por lo tanto, las plantas deficientes en CYTc pueden ajustar su metabolismo respiratorio sin activar de manera marcada la *MRR* canónica. No obstante, los cambios transcripcionales observados indican que probablemente se vean afectadas otras vías

de señalización. De hecho, establecimos una relación causal entre las características fenotípicas y metabólicas de las plantas deficientes en CYTc y la actividad de la vía de señalización de SnRK1. Observamos que las plantas deficientes en CYTc, en particular las mutantes *cytc-1b cytc-2a*, *cytc-1b cytc-2b* y *cytc-1a*, presentan niveles aumentados de la forma fosforilada de la subunidad SnRK1 α y de transcritos de *DIN6*, marcadores asociados a la activación de SnRK1 (Baena-González et al., 2007; Crozet et al., 2010; Shen et al., 2009; Shin et al., 2017). Además, la pérdida de función de *KIN10*, uno de los genes que codifican la subunidad SnRK1 α , mejoró de manera marcada el crecimiento de las plantas mutantes en *CYTC-1*, reduciendo a la vez la fosforilación de SnRK1 α y los niveles de expresión de *DIN6*. La subunidad SnRK1 α está codificada por tres genes (*KIN10–12*), pero sólo *KIN10* y *KIN11* se expresan en niveles relevantes, siendo *KIN10* el que presenta una expresión ligeramente mayor (entre 10 y 100% según el órgano) (<http://travadb.org/>; Klepikova et al., (2016). Si bien las mutantes simples en estos genes no muestran alteraciones fenotípicas evidentes (Nukarinen et al., 2016), la mutante doble no es viable (Baena-González et al., 2007), lo que revela la existencia de un alto grado de redundancia entre ambos genes. Sin embargo, se ha demostrado que las mutantes simples en *KIN10* presentan alteraciones en la fosforilación del factor de transcripción bZIP63 durante la respuesta a la escasez de energía (Mair et al., 2015). Además, la mutación de *KIN10* elimina los defectos de crecimiento de la raíz de las mutantes *snrk2* (Belda-Palazón et al., 2020, 2022), afecta la formación de raíces laterales bajo condiciones de limitación energética (Muralidhara et al., 2021), revierte defectos de desarrollo en plantas con función reducida de *TPS1* (Zacharaki et al., 2022) y atenúa la inducción de la autofagia y de *DIN6* en mutantes *flz14* (Yang et al., 2023). En conjunto, estos antecedentes indican que la función de *KIN10* puede adquirir especial relevancia en condiciones en las que la actividad de SnRK1 se encuentra elevada, como ocurre en las plantas deficientes en CYTc.

El hecho de que la mutación en *KIN10* restablezca el crecimiento en condiciones normales, así como la sensibilidad al manitol, sugiere que el desempeño de las plantas deficientes en CYTc en ambas condiciones se debe a la activación de SnRK1, lo que proporciona un mecanismo de transducción de determinados cambios en la actividad mitocondrial en respuestas de crecimiento en tolerancia a estrés (Figura 16a-f). La vía de SnRK1 es conocida por restringir el crecimiento como estrategia para evitar una disminución excesiva de carbono o de nutrientes (Margalha et al., 2019; Peixoto & Baena-González, 2022). Además, se propuso que SnRK1 actuaría por encima de TOR (Belda-Palazón et al., 2020, 2022; Nukarinen et al., 2016; Soto-Burgos & Bassham,

2017), lo cual concuerda con que las plantas deficientes en CYTc presentan una menor actividad de la vía TOR, que se restituye cuando *KIN10* está mutado.

Se han reportado o propuesto previamente conexiones entre la función mitocondrial y SnRK1. Por un lado, la actividad de SnRK1 influye en distintos aspectos del metabolismo mitocondrial en condiciones de escasez de carbono (Pedrotti et al., 2018; Wurzinger et al., 2018), que constituye una respuesta anterógrada. Además, SnRK1 α 1 (*KIN10*), pero no SnRK1 α 2 (*KIN11*), interactúa con el componente del módulo quinasa del complejo *Mediator*, *CDKE1/CDK8/RAO1*, implicado tanto en la señalización retrógrada mitocondrial como en respuestas generales al estrés (Ng et al., 2013b). También, las mutaciones en *kin10* y *kin11* rescatan parcialmente la letalidad en plántulas de las mutantes en *AtTIM21/SD3*, que codifica un posible receptor de importación proteica mitocondrial (Hamasaki et al., 2019). Por otra parte, FLZ14, que interactúa con SnRK1 e inhibe su activación por fosforilación, se localiza en la superficie de la mitocondria (Yang et al., 2023; Zhao et al., 2025). En conjunto, estos datos indican la existencia de vías y señales que conectan a SnRK1 con la mitocondria, lo cual resulta coherente con su rol en el metabolismo energético. En el caso de CYTc, es notorio que no sólo los defectos en esta proteína provocan un aumento en la actividad de la vía de SnRK1, sino que, además, un incremento en los niveles de CYTc atenúa dicha actividad, sobre todo en plantas que sobreexpresan *KIN10*. Esta menor activación —evaluada mediante la fosforilación de SnRK1 α y la expresión de *DIN6*— no se relaciona con cambios en los niveles de transcritpo ni de proteína *KIN10* (Figura 10k), lo que indica que los niveles de CYTc modulan la actividad de SnRK1 y no sus niveles.

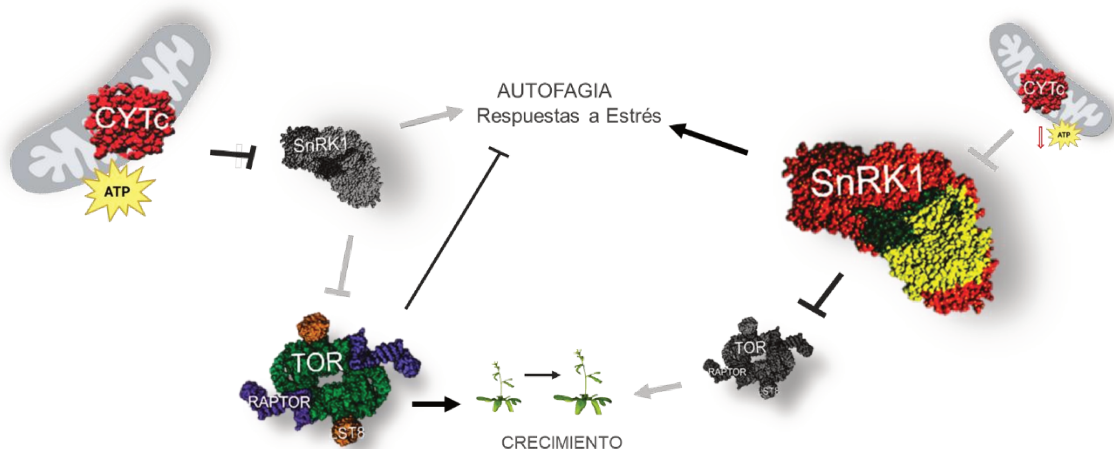


Figura 16. Modelo de la conexión entre los niveles de CYTc y las respuestas de crecimiento y estrés. Bajo condiciones normales (izquierda), CYTc —probablemente actuando como un componente de la OXPHOS— ejerce una

represión sobre la actividad de SnRK1, permitiendo así la activación de TOR y el crecimiento vegetal. Una disminución en los niveles de CYTc (derecha) activa SnRK1, lo que conduce a la inhibición del crecimiento y a la activación de la autofagia y de las respuestas al estrés. Dado que las condiciones de estrés afectan la función mitocondrial, se puede considerar que los procesos dependientes de CYTc forman parte de una señal que modula el equilibrio entre el crecimiento y las respuestas de estrés a través de SnRK1.

En relación con la conexión entre los niveles de CYTc y las respuestas de crecimiento y estrés a través de la vía de SnRK1, dado que las plantas deficientes en CYTc presentan una disminución en la producción de ATP y en el potencial de membrana interna (Canal et al., 2024; Racca et al., 2018, 2022), sin un aumento evidente en los niveles de ROS, proponemos la participación de señales vinculadas a la producción energética mitocondrial. Esta hipótesis implica que la vía de SnRK1 en plantas respondería a cambios en la disponibilidad energética celular, aun cuando SnRK1, en plantas, no parece activarse alostéricamente por AMP o ADP como su homóloga animal AMPK (Emanuelle et al., 2015). En este sentido, si bien nuestros resultados muestran que la actividad de las vías SnRK1 y TOR podría estar vinculada a la producción de ATP mitocondrial (Figura 16), son necesarios estudios más exhaustivos para confirmar esta hipótesis, ya que, en plantas, la actividad de SnRK1 se ha asociado principalmente con la disponibilidad de recursos de carbono a través de sus efectos sobre los niveles de trehalosa-6-fosfato (Baena-González & Lunn, 2020; Zhang et al., 2009). Es importante destacar que, en nuestras condiciones experimentales, las reservas de carbohidratos fueron similares a las de las plantas *WT* en las mutantes deficientes en CYTc, lo que indica que la activación de SnRK1 en estas plantas no se debe a una limitación de carbono. A partir de estos parámetros, puede postularse que, además de las reservas de carbono, la célula vegetal monitorea el uso de esas reservas para la producción de energía, ajustando el crecimiento mediante la vía de SnRK1 en función de esto. En este escenario, una disfunción leve del sistema OXPHOS desencadenaría una señal que desvincularía el estado de activación de SnRK1 de la disponibilidad de carbono. En cambio, una disfunción más severa activaría la señalización retrógrada mitocondrial canónica (*MRR*), promoviendo mecanismos adaptativos adicionales. La activación de *ANAC017*, por ejemplo, también provoca penalizaciones en el crecimiento en condiciones normales, pero mejora el desempeño de las plantas bajo estrés (He et al., 2022a; Meng et al., 2019; Van Aken et al., 2016). En definitiva, la respuesta de las plantas dependerá de la integración de múltiples señales relacionadas con la función mitocondrial, que probablemente interactúan con señales provenientes de otros compartimentos celulares para optimizar el desempeño ante distintas condiciones.

4.6 CONCLUSIONES

En este capítulo realizamos un análisis de los cambios globales en la expresión génica que se producen como consecuencia de una deficiencia de CYTc. Observamos que esto provoca cambios similares a los observados tras tratamientos con inhibidores de la OXPHOS, la regulación a la baja de la actividad del complejo V y los originados al someter las plantas a un estrés osmótico leve. Cabe destacar que en el caso de la deficiencia de CYTc, estos cambios no implican una activación general de la *MRR* canónica. En cambio, demostramos que la alteración de los niveles de CYTc afecta la actividad de la vía dependiente de SnRK1 y que ello se relaciona con las modificaciones en el crecimiento observadas tanto en condiciones normales como bajo estrés por manitol en estas plantas. Nuestros resultados establecen una conexión entre la función mitocondrial y la actividad de SnRK1 que, junto con otras vías de señalización, puede funcionar en la modulación del crecimiento de las plantas y de las respuestas al estrés en función de la disponibilidad de energía y nutrientes.

CAPÍTULO 2:

*“IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE CYTC EN LOS AJUSTES
METABÓLICOS VINCULADOS A LAS RESPUESTAS A
ESTRÉS”.*

5 CAPITULO 2

5.1 INTRODUCCIÓN

Los nuevos escenarios relacionados al cambio climático nos han llevado a profundizar en el estudio de herramientas que nos permitan entender cómo las plantas se adaptan a ambientes cada vez más variables y restrictivos, generando reconfiguraciones metabólicas que permitan mantener la homeostasis energética (Xu & Fu, 2022). Los mecanismos de adaptación de las plantas a condiciones de estrés abiótico han sido motivo de estudio a lo largo de los años, y se los ha relacionado tanto con plasticidad fenotípica vinculada al metabolismo del almidón (Fettke & Fernie, 2025), como con la acumulación de prolina y otros aminoácidos, así como azúcares (Gurrieri et al., 2020; Saddhe et al., 2021; Wang et al., 2015; Yu et al., 2025). Estas respuestas metabólicas se encuentran acompañadas por una reconfiguración transcripcional y un incremento de la actividad enzimática (Usadel et al., 2008, p. 20), las cuales dependen tanto del tipo de estrés como de la especie vegetal considerada (Krasensky & Jonak, 2012).

Las respuestas al estrés en las plantas ocurren a distintos niveles de organización e incluyen ajustes celulares estructurales asociados al sistema de membranas, modificaciones de la pared celular y cambios metabólicos orientados a mantener la estabilidad y la homeostasis celular (Krasensky & Jonak, 2012). En este contexto, el papel de la mitocondria ha sido ampliamente estudiado. Por ejemplo, se ha demostrado que el estrés térmico provoca alteraciones significativas en estas organelas, incluyendo cambios en la ultraestructura mitocondrial, acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y redistribución de cardiolipina, un lípido necesario para el mantenimiento de la estructura mitocondrial (Wang et al., 2024). En relación con la acumulación de ROS como consecuencia del estrés mitocondrial, en estas condiciones se activa la señalización retrógrada mediante los factores de transcripción *ANAC017* y *ANAC013*, lo que conduce a la inducción de la vía de la oxidasa alternativa (AOX), contribuyendo a la modulación de la respuesta metabólica al estrés (Giraud et al., 2009; Ng et al., 2013a; Van Aken & Pogson, 2017). Por otra parte, se ha propuesto que la disfunción mitocondrial está íntimamente relacionada con el metabolismo del carbono, incluyendo la inhibición de la glucólisis y la inducción de la vía alternativa de la malato deshidrogenasa citosólica (Busi et al., 2011). Asimismo, el tratamiento con rotenona, un inhibidor del Complejo I mitocondrial, modifica los niveles de aminoácidos y ácidos orgánicos, con una marcada disminución temprana de 2-oxoglutarato, aspartato y glutamina (Garmier et al., 2008), lo que evidencia una fuerte conexión entre la actividad mitocondrial y la remodelación de distintas vías metabólicas.

Como se ha descrito en el capítulo anterior, el citocromo *c* (CYTc) es una pequeña hemoproteína localizada en el espacio intermembrana cuya función canónica es la de transportar electrones entre el Complejo III y el Complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y se encuentra estrechamente relacionado con el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Canal et al., 2024; Racca et al., 2018; Welchen et al., 2012). Un estudio de los niveles de respiración y de partición de electrones entre la vía dependiente de CYTc y la vía alternativa en rosetas de plantas deficientes en CYTc indicó que, bajo determinadas condiciones, se produce una leve disminución de la respiración a expensas de la respiración alternativa (Florez-Sarasa et al., 2021). Esto sugiere que, ante la deficiencia de CYTc, las plantas activan mecanismos regulatorios que limitan el consumo de carbono por parte de la respiración. En concordancia con esto, las mutantes en ambos genes *CYTC* acumulan mayores cantidades de almidón y carbohidratos durante el período de iluminación (Racca et al., 2018).

A diferencia de las mutantes en *CYTC-1*, las plantas deficientes en *CYTC-2* no presentan cambios fenotípicos aparentes en comparación con las plantas *WT* (Welchen et al., 2012). Sin embargo, estudios detallados de la región promotora de este gen han demostrado que, a diferencia del promotor de *CYTC-1*, el promotor de *CYTC-2* adquirió dos dominios regulatorios tras la duplicación génica (*G-BOX* y *ACGT*), los cuales se han asociado con respuestas a señales ambientales (Welchen et al., 2009). Estos hallazgos se complementan con estudios basados en fusiones de los promotores unidos al gen reportero *GUS*, que mostraron que las regiones aguas arriba de los genes *CYTC-1* y *CYTC-2* dirigen patrones de expresión parcialmente diferentes, sugiriendo que *CYTC-1* estaría predominantemente asociado a procesos de crecimiento y desarrollo, mientras que *CYTC-2* podría cumplir un rol más relevante en respuestas a estrés (Welchen & Gonzalez, 2005). No obstante, resultados recientes demostraron que la mutación del gen *CYTC-1* incrementa la actividad basal de SnRK1, una vía central de respuesta a estrés que se activa por múltiples estímulos, tales como hambreado de carbono, calor e hipoxia (Baena-González et al., 2007; Chan et al., 2017; capítulo 1 de esta Tesis, Coronel et al., 2025; Eom et al., 2024; Gutierrez-Beltran et al., 2021). Estos resultados indican que la relación entre CYTc y la respuesta al estrés podría ser más amplia y compleja de lo que analizamos hasta el momento y no restringirse exclusivamente a la regulación transcripcional de *CYTC-2*. En concordancia con esta idea, se ha reportado que los genes que codifican CYTc presentan patrones de expresión diferencial frente a distintos tipos de estrés abiótico como frío, calor y radiación UV-B (Welchen et al., 2009; Welchen & Gonzalez, 2016). Adicionalmente, se ha sugerido que, bajo condiciones de estrés térmico, el CYTc podría ser capaz de salir

de la mitocondria, como consecuencia de señales dependientes de calcio, desencadenando respuestas que afectan la dinámica de ácidos nucleicos y proteínas, el metabolismo del carbono y la regulación de la muerte celular programada, mostrando una estrecha relación entre CYTc y los cambios metabólicos en respuesta a estrés (Dourmap et al., 2020; Martínez-Fábregas et al., 2013; Vacca et al., 2006; Wagner et al., 2016). Sin embargo, muchos de estos procesos aún se encuentran bajo estudio.

La reestructuración metabólica en las plantas bajo condiciones de estrés también depende, en gran parte, de la actividad hormonal. Por ejemplo, se ha reportado que el receptor de auxinas TIR1, a través de *HSP90*, mejora la respuesta a auxinas en altas temperaturas y que genes blancos como los *SAUR* se regulan positivamente ante estrés térmico (Franklin et al., 2011; Musazade et al., 2025; Wang et al., 2016). Además, se reportó que la aplicación exógena de auxinas podría atenuar el estrés por sequía, asociándose con un aumento en la acumulación de aminoácidos como la leucina y diferentes azúcares (Shi et al., 2014), lo que sugiere un rol de las auxinas en la modulación del metabolismo primario bajo condiciones de estrés. Por otra parte, en condición control, el tratamiento con giberelinas modula el contenido de aminoácidos, nitrato, malato y fumarato, metabolitos asociados al crecimiento y desarrollo en *Arabidopsis* (Ribeiro et al., 2012). En contraste, se ha demostrado que una mayor resistencia a estrés térmico en *Arabidopsis* se encuentra íntimamente relacionada a la acumulación de proteínas DELLA (Zhang & Wang, 2011), destacando el rol de la señalización de giberelinas en la adaptación al estrés. Finalmente, el ácido abscísico (ABA) se ha implicado como mediador central en las respuestas de las plantas a diversos tipos de estrés, asociado al metabolismo de oligosacáridos como la rafinosa y de biosíntesis de aminoácidos (Urano et al., 2009).

En este contexto, Welchen et al. (2021) presentaron una descripción detallada de las vías hormonales que podían verse moduladas por cambios en la función mitocondrial, en relación con el crecimiento y las respuestas a estrés. Si nos detenemos en CYTc, nuestro objeto de estudio, trabajos recientes han demostrado que el fenotipo de las plantas deficientes en CYTc depende, al menos en parte, de la actividad de la vía de giberelinas, como consecuencia de un aumento en el contenido de proteínas DELLA (Racca et al., 2018). Por otro lado, se ha demostrado que CYTc modula la sensibilidad a ABA durante la germinación, actuando en relación con el factor de transcripción ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4 (ABI4). En este contexto, ABA reprime la expresión de *CYTC-2* mediante la unión de ABI4 a una región específica de su promotor, necesaria para la regulación negativa del gen. Estos resultados posicionan a *CYTC-2* como un componente aguas abajo de la señalización de ABA–ABI4 y revelan un mecanismo por

el cual una vía hormonal asociada a estrés controla la expresión de un componente mitocondrial clave. Sin embargo, aunque este trabajo establece una conexión directa entre CYTc, ABA y la germinación, el rol de esta interacción en respuestas metabólicas y fisiológicas al estrés en etapas post-germinativas aún permanece poco explorado.

Teniendo en cuenta observaciones previas que reportan una mayor tolerancia de plantas deficientes en CYTc a distintas condiciones de estrés, como el hambreado de carbono y el estrés osmótico (Canal et al., 2024; capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025), así como el incremento en la actividad de la vía de SnRK1 en estas plantas (capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025), resulta relevante analizar de qué manera la deficiencia de CYTc modula los ajustes metabólicos asociados a la respuesta al estrés.

5.2 OBJETIVOS

1. Profundizar la caracterización de plantas con niveles alterados de CYTc, de modo de determinar el papel de esta hemoproteína en procesos tales como el crecimiento y la proliferación celular y el desarrollo de órganos.
2. Analizar si los cambios en los niveles de CYTc generan alteraciones en la actividad de vías hormonales durante los procesos mencionados en el punto anterior. Dilucidar a qué nivel de estas vías impacta la alteración en los niveles de CYTc.

5.3 MATERIALES Y METODOS

5.3.1 Condiciones de crecimiento

En este capítulo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ecotipo Columbia (*Col-0*). Las mutantes simples en *CYTC-1* (*cytc-1a*, *cytc-1b*) y las mutantes dobles en *CYTC-1* y *CYTC-2* (*cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*) fueron descritas en trabajos previos (Racca et al., 2018; Welchen et al., 2012).

5.3.1.1 Oscuridad extendida

Plántulas *WT*, *cytc-1a*, *cytc-1b*, *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b* se cultivaron durante 10 días en placas de Petri con medio MS suplementado con agar 1% y sacarosa 1% (Figura 17a). Posteriormente, se transfirieron a sustrato comercial (MECPLANT TABACO, MECPLANT, <https://mecplant.com.br/produto/tabaco/>) donde crecieron bajo fotoperíodo de día corto (8 h de luz / 16 h de oscuridad, 60% de humedad relativa con un flujo fotónico de $150 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante 3 semanas y se expusieron a 9 días de oscuridad prolongada en la misma cámara de crecimiento, seguidos de 3 días de recuperación bajo las condiciones iniciales de iluminación. Para definir los puntos de muestreo, realizamos mediciones de F_v/F_m a lo largo del tratamiento. Este parámetro indica la eficiencia máxima del PSII (es decir, la proporción de luz absorbida por el PSII que se convierte en energía química; (Baker et al., 2007) (ver sección 5.3.2). Las muestras se recolectaron en tres puntos experimentales: control (C), oscuridad (O) y recuperación (R). La colecta se realizó a la mitad del día en cada condición. Las plantas fueron fotografiadas en cada punto de colecta y la cuantificación del área de roseta se realizó utilizando el software ImageJ.

5.3.1.2 Estrés térmico

Como se detalla en la Figura 17b, plantas *WT*, *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b* fueron cultivadas durante 8 días en placas de Petri con medio MS suplementado con agar 1% y sacarosa 1%. Posteriormente, fueron transferidas a sustrato comercial (MECPLANT TABACO, MECPLANT, <https://mecplant.com.br/produto/tabaco/>) y cultivadas durante 10 días bajo día neutro (12 h de luz / 12 h de oscuridad, 60% de humedad relativa con un flujo fotónico de $150 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Luego, el material fue dividido en dos grupos experimentales: -GA (sin tratamiento con giberelinas) y +GA (tratadas con la hormona). Las plantas del grupo +GA se pulverizaron cada dos días con una solución de ácido giberélico (GA_3 , $20 \mu\text{M}$) suplementada con Tween-20 0,1%

(v/v), mientras que las plantas –GA recibieron agua suplementada con 0,1% Tween-20 como control.

Ambos grupos se sometieron a cuatro condiciones de temperatura:

- Control (C): 23 °C durante 10 días previo al tratamiento térmico.
- Estrés térmico (HS): 6 h de exposición a 38 °C.
- Recuperación (R): 24 h a 23 °C posteriores al tratamiento de HS.
- Alta temperatura (28°C): 3 días de exposición a 28 °C

Los tratamientos hormonales se realizaron únicamente durante la condición control. Las muestras se recolectaron a mitad del fotoperíodo en cada caso, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a –80 °C hasta su procesamiento. Las plantas fueron fotografiadas para análisis fenotípico y las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software ImageJ.

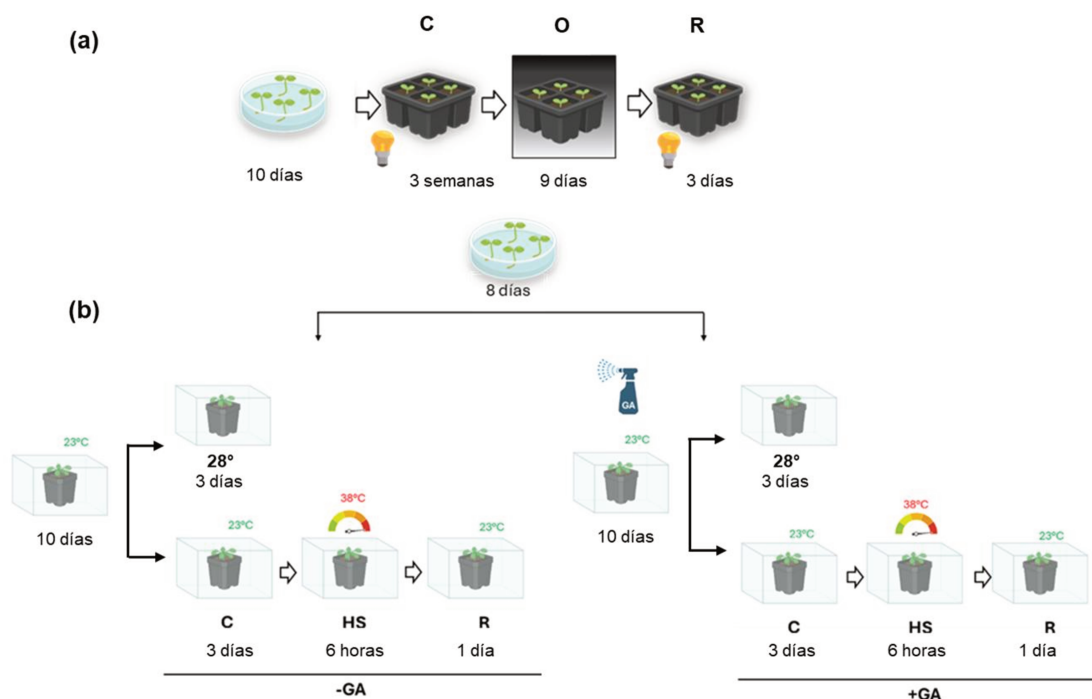


Figura 17. Imagen representativa de los experimentos realizados. (a) Tratamiento de oscuridad extendida. Plantas *WT*, *cytc-1a*, *cytc-1b*, *cytc-1b2a* y *cytc1b2b* fueron cultivadas durante 10 días en placas de Petri con medio MS suplementado con 1% agar y 1% sacarosa. Posteriormente, fueron transferidas a macetas y cultivadas durante 3 semanas en condiciones de día corto (8 h de luz/16 h de oscuridad) (C), seguidas por 9 días de oscuridad extendida (O) y, finalmente, 3 días de reiluminación (R). (b) Esquema representativo del experimento de estrés térmico. Plantas *WT*, *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* fueron cultivadas durante 8 días en placas de Petri con medio MS suplementado con 1% agar y 1% sacarosa y, posteriormente, transferidas a macetas y mantenidas a 23°C durante 10 días. A continuación, las plantas fueron separadas en 2 grupos y mantenidas durante 3 días: alta temperatura (28°C) y control (C). Al finalizar el tratamiento, se tomaron ambas muestras. Además, un grupo de las plantas control fue transferido a otra cámara y, al día siguiente, se aplicó un tratamiento térmico de 6 h a 38°C (HS) seguido por un día de recuperación en las condiciones control (R). Durante todo el experimento se realizaron dos grupos experimentales, -GA y +GA, correspondientes a plantas

sin tratar y tratadas con GA₃ (20 μM) respectivamente. Las plantas fueron tratadas con hormona únicamente durante los primeros 10 días de siembra. Se tomaron un total de 6 muestras por cada genotipo: -GA (C, HS, R) y +GA (C, HS, R).

5.3.2 Eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m)

La fluorescencia de clorofila se midió utilizando un analizador de rendimiento fotosintético (*MINI-PAM II, Walz, Alemania*). Las plantas fueron previamente aclimatadas durante 2 horas en oscuridad previo a la adquisición de los datos. La fluorescencia inicial (mínima) del PSII en estado adaptado a la oscuridad (F_0) y la fluorescencia máxima del PSII en estado adaptado a la oscuridad (F_m) se determinaron mediante pulsos de saturación, siguiendo el procedimiento descrito por (Maxwell & Johnson, 2000). A partir de estos valores, se calculó el rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m) como $(F_m - F_0)/F_m$. Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron siempre sobre la misma hoja y a la mitad del fotoperiodo correspondiente al tratamiento, aun cuando las determinaciones se efectuaron en oscuridad.

5.3.3 Extracción de material para análisis metabólicos

El protocolo de extracción fue adaptado de (Lisec et al., 2006). Brevemente, se utilizaron aproximadamente 30 mg de peso fresco de tejido vegetal colocados en tubos de rosca de 2 mL resistentes a altas temperaturas. A cada muestra se adicionaron 500 μL de metanol puro. Las muestras se homogeneizaron y se incubaron durante 20 minutos a 80°C en un termomixer a 750 rpm. Luego, se dejaron enfriar y se centrifugaron a 13500 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo de 2 mL, conservando el pellet para posteriores análisis de proteínas y almidón. Se realizó una cuantificación de clorofilas antes de continuar con la extracción. Al sobrenadante se adicionaron 260 μL de cloroformo y 525 μL de agua destilada. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13500 rpm durante 10 minutos a 4°C y la fase superior (acuosa) fue cuidadosamente transferida a un nuevo tubo y almacenada a -20°C hasta su análisis. La fracción obtenida fue utilizada para la cuantificación de glucosa, fructosa, sacarosa y aminoácidos. El pellet remanente se lavó con etanol 70% y se empleó para la determinación de proteínas totales y almidón.

5.3.4 RT-qPCR

El ARN total se extrajo utilizando TRIzol® siguiendo el protocolo de (Barrios & Gouveia, 2023) adaptado a muestras con alto contenido de metabolitos secundarios. En resumen, a 30 mg de tejido fresco se le agregaron 500 μ L de TRIzol y 30 mg de PVPP, seguido por una separación de fases con cloroformo frío y centrifugación para aislar la fase acuosa. Posteriormente, se practicó una segunda extracción con cloroformo para mejorar la pureza del ARN. La precipitación se efectuó con isopropanol frío y se incubó a -80 °C, seguida de dos lavados consecutivos con etanol al 75%. El pellet se resuspendió en agua tratada con DEPC y se trató con DNasa para eliminar el ADN genómico. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y la concentración se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). A partir de 1 μ g de ARN total, se realizó la transcripción reversa utilizando un cebador oligo(dT) y el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific), según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se efectuaron en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems) utilizando el kit de reacción SybrMaster (Cellco Biotech). Los cebadores seleccionados fueron previamente validados por curva estándar (eficiencia entre 90–110%). Por último, los valores de Ct se normalizaron utilizando los genes de referencia *TIP41* y *MON1* en los experimentos de oscuridad extendida, y *TIP41* y *UBC9* para el análisis de las muestras sometidas a estrés térmico (Ver Tabla 2 para mayor detalle de los oligonucleótidos utilizados). Los niveles relativos de transcripto se calcularon mediante el método $\Delta\Delta Ct$.

5.3.5 Análisis de estructuras tipo autofagosomas

El análisis de autofagia se realizó mediante microscopía confocal utilizando la línea reportera *35S::GFP-ATG8a* en fondos *WT* y *cytc-1a*. Plantas de 4 días cultivadas en medio MS suplementado con 1% agar fueron transferidas a MS líquido en condiciones control o suplementado con GA_3 (10 o 100 μ M) durante 24 h. Posteriormente, el material se dividió en dos grupos experimentales: control, cuyas plantas fueron visualizadas inmediatamente, y *HS*, expuestas a un tratamiento térmico de 4 h. Las imágenes se adquirieron en la capa externa de la raíz utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP8 con un objetivo seco 20 \times , empleando longitudes de excitación y detección de 488 y 498–531 nm, respectivamente. Las imágenes originales se utilizaron para cuantificar el número de autofagosomas con el software Fiji (Schindelin et al., 2012).

5.3.6 *Análisis por Western Blot*

El análisis por *Western Blot* se realizó utilizando extractos proteicos totales. Se molieron 30 mg de material vegetal en nitrógeno líquido y se extrajeron con 60 μ L de tampón Laemmli 2 \times suplementado con un inhibidor de fosfatasas (PhosSTOP; Roche), un inhibidor de proteasas (cOmplete; Roche) y 0,2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Las proteínas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min y luego se centrifugaron a 12000 g durante 10 min. Posteriormente, 10 μ L del sobrenadante se separaron en un gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa.

Las membranas se hibridaron con anticuerpos de conejo contra Fosfo-AMPK α (Thr172) (#4188; Cell Signaling Technology; dilución 1:10 000), GAPC1/2 (AS15 2894, Agrisera; dilución 1:5000) o actina (AS13 2640, Agrisera; dilución 1:10 000), seguido de la detección con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Agrisera; dilución 1:50 000) y el sustrato quimioluminiscente *SuperSignal West Pico* (Thermo Fisher Scientific).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 *Oscuridad extendida*

5.4.1.1 *Las plantas deficientes en CYTc presentan una menor susceptibilidad frente a períodos prolongados de oscuridad.*

Se ha reportado que las plantas que son sometidas a periodos prolongados de oscuridad presentan una marcada disminución de los pigmentos fotosintéticos, activación de programas de senescencia y degradación del aparato fotosintético (Weaver & Amasino, 2001). En concordancia con estos antecedentes, en nuestros experimentos las plantas *WT* mostraron fuertes alteraciones luego del tratamiento de oscuridad extendida (Figura 18a), evidenciadas por una disminución de los valores de Fv/Fm, parámetro asociado con la actividad fotosintética (Eckstein et al., 2021; Zhu et al., 2022). Asimismo, luego de 9 días de oscuridad, las plantas *WT* presentaron signos evidentes de senescencia y no fueron capaces de recuperarse por completo tras 3 días de reiluminación, lo que se reflejó en una disminución significativa del área de roseta

(Figura 18b-c). En contraste, las plantas deficientes en CYTc, tanto las mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*, como las mutantes simples *cytc-1a* y *cytc-1b*, mostraron valores de Fv/Fm significativamente más altos en comparación con las plantas WT luego de 9 días de oscuridad (Figura 18a). Además, se observó un aumento más pronunciado de este parámetro luego de 3 días de reiluminación (Figura 18a), lo que podría indicar que las mutantes *cytc* no sólo presentan una menor susceptibilidad durante el tratamiento de oscuridad, sino que también son capaces de recuperarse más rápido luego del período de estrés.

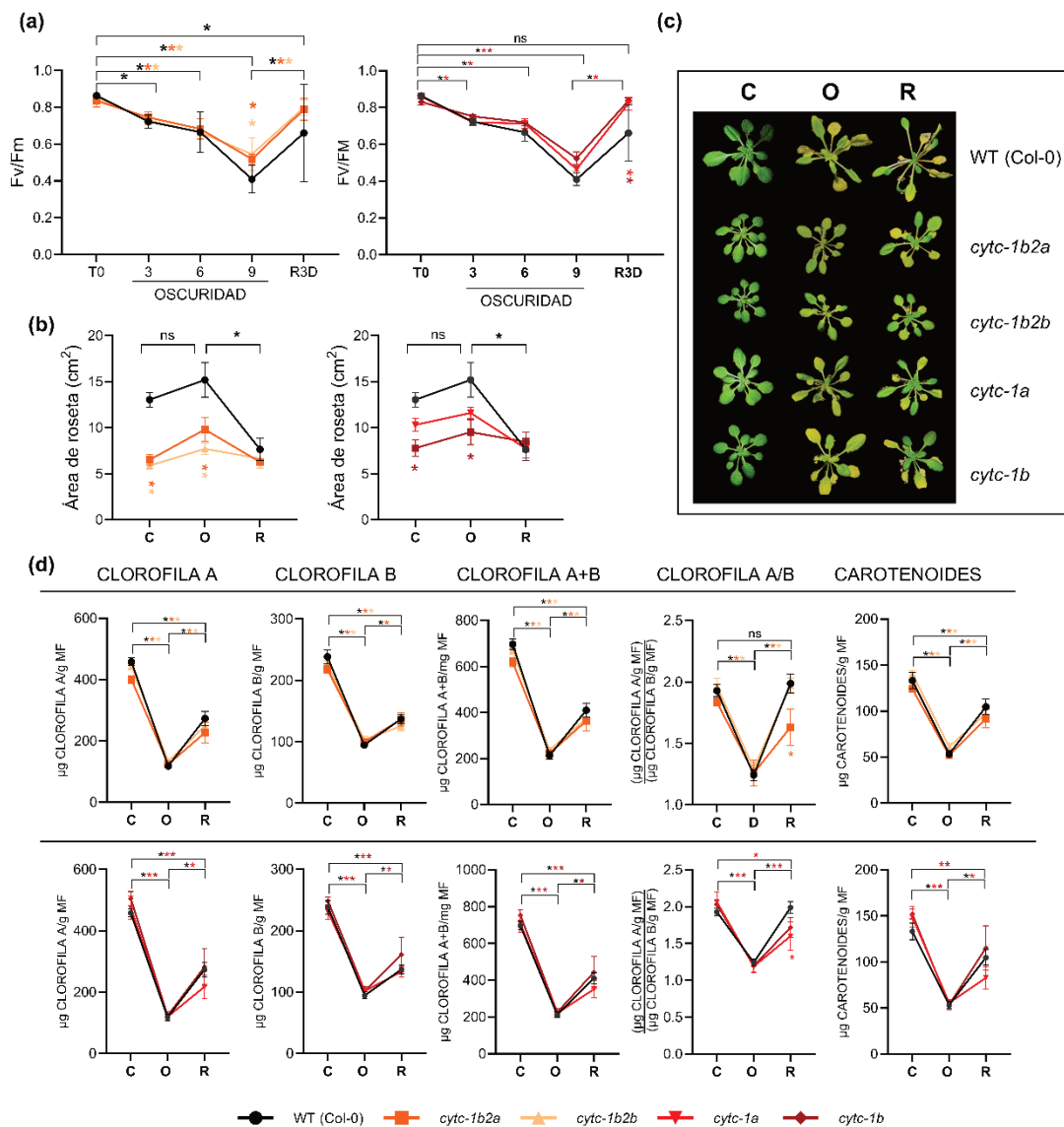


Figura 18. La deficiencia de CYTc aumenta la tolerancia a la oscuridad extendida. (a) Eficiencia cuántica máxima del PSII (Fv/Fm) en plantas WT y deficientes en CYTc (mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*, y mutantes simples *cytc-1a* y *cytc-1b*) antes del tratamiento de oscuridad (T0), durante el tratamiento (días 3, 6 y 9) y después de 3 días de re-iluminación (R3D), cultivadas como se detalla en el inciso 5.3.1.1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (corchetes) y entre genotipos en cada condición comparados con las plantas WT (en cada punto del eje X). ns: no significativo ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías; $n = 4$ réplicas biológicas). **(b)**

Cuantificación del área de roseta de plantas *WT* y deficientes en CYTc (mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*, y mutantes simples *cytc-1a* y *cytc-1b*) luego de 30 días de crecimiento en día corto (8 h de luz/ 16 h de oscuridad), seguidos de 9 días de oscuridad extendida y 3 días de re-iluminación (C, O y R respectivamente). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (corchetes) y entre genotipos en cada condición comparados con las plantas *WT* (en cada punto del eje X). ns: no significativo ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías; $n = 4-5$).

(c) Imagen representativa del tamaño de roseta medido bajo condiciones Control (C), Oscuridad (D) y Recuperación (R).

(d) Cuantificación del contenido total de pigmentos fotosintéticos en plantas *WT* y deficientes en CYTc (mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*, y mutantes simples *cytc-1a* y *cytc-1b*) en condiciones Control (C), Oscuridad (O) y Recuperación (R). Para mayor detalle ver inciso 5.3.1.1. De izquierda a derecha: clorofila a, clorofila b, contenido total de clorofilas (a+b), relación clorofila a/clorofila b y carotenoides, relativizados al contenido de masa fresca (MF). Las comparaciones se realizaron entre las mutantes dobles y las plantas *WT* (arriba), y entre las mutantes simples y las plantas *WT* (abajo). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (corchetes) y entre genotipos en cada condición comparados con las plantas *WT* (en cada punto del eje X) ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías; $n = 4-5$ réplicas biológicas).

Uno de los principales procesos afectados durante el tratamiento de oscuridad prolongada es la senescencia, que está íntimamente relacionada con la actividad del PSII y el contenido de pigmentos fotosintéticos (Weaver & Amasino, 2001). Éste no constituye únicamente un proceso destructivo para las células, sino que también cumple una función adaptativa, al permitir la disminución de la demanda global de nutrientes o agua, que interfiere con la recuperación post oscuridad (Dornbusch et al., 2012). En este contexto, las plantas deficientes en CYTc se mantuvieron relativamente estables a lo largo del experimento, mientras que en las plantas *WT* se evidenció una senescencia más severa, especialmente durante la fase de recuperación, consistente con una mayor pérdida foliar y una capacidad limitada para la restitución del tejido (Figura 18b-c). En conjunto, estos resultados sugieren que las plantas deficientes en CYTc presentan una mayor tolerancia a la oscuridad prolongada, lo que podría estar asociado con la preservación de la integridad del PSII.

Estudios previos en plantas deficientes en CYTc han demostrado que mutantes simples y dobles de 4 días de edad presentan una mayor tolerancia a la privación de carbono, reflejada en un aumento en el contenido de clorofila comparado con plantas *WT* (Canal et al., 2024). Sin embargo, nuestros resultados no evidenciaron diferencias significativas en el contenido de clorofila entre los genotipos *WT* y deficientes en CYTc bajo los diferentes tratamientos evaluados. Esto puede deberse a que, en plantas adultas, las respuestas en el contenido de pigmentos fotosintéticos suelen ser moderadas o manifestarse de manera más tardía, y no siempre permiten discriminar claramente entre genotipos (Eckstein et al., 2021). No obstante, todos los parámetros relacionados con el contenido de clorofila y carotenoides siguieron un patrón común, caracterizado por una disminución durante el periodo de oscuridad, seguida de una re-accumulación durante la fase de recuperación (Figura 18d). Esta respuesta consistente

entre distintos compuestos es indicativa de que el tratamiento de oscuridad prolongada fue efectivo para inducir una respuesta fisiológica.

5.4.1.2 *Las plantas deficientes en CYTc muestran una respuesta diferencial a la oscuridad prolongada acompañada por un mayor consumo de almidón.*

Durante los períodos de estrés, las plantas movilizan almidón para sostener la respiración. Se ha demostrado que, ante condiciones de estrés por sequía, la degradación de almidón en los cloroplastos genera maltosa y glucosa, que son exportadas al citosol mediante transportadores específicos, como por ejemplo, MEX1. Estos azúcares son posteriormente convertidos mayoritariamente en sacarosa que se carga al floema a través de transportadores tipo SUT/SUC y de la familia SWEET/MST, permitiendo su llegada a tejidos sumidero (Kaur et al., 2021). Resultados previos han mostrado que plantas deficientes en CYTc en estado vegetativo presentan una mayor acumulación de almidón dependiente del momento del día (Racca et al., 2018). En concordancia con estos antecedentes, nuestros resultados evidencian una mayor acumulación de almidón en condición control tanto en las mutantes simples *cytc-1a* y *cytc-1b* como en las mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b* (Figura 19a). Sin embargo, durante el período de oscuridad esta diferencia se atenúa, observándose niveles de almidón comparables entre plantas mutantes y *WT*.

Trabajos previos han reportado que, durante la noche extendida u oscuridad prolongada, SnRK1 se activa y promueve una reprogramación metabólica hacia procesos catabólicos, inhibiendo rutas consumidoras de energía y favoreciendo la movilización de reservas de carbono (Nukarinen et al., 2016; Peixoto & Baena-González, 2022). En concordancia, los análisis de RT-qPCR mostraron que, en condiciones control, las mutantes presentan niveles basales más elevados del transcritto *DIN6*, un marcador de la activación de la vía de SnRK1 (Baena-González et al., 2007), mientras que durante el tratamiento de oscuridad extendida todos los genotipos incrementaron su expresión, reduciéndose las diferencias entre *WT* y mutantes (Figura 19b). En este sentido, nuestros resultados sugieren que la mayor tolerancia de las plantas deficientes en CYTc a la oscuridad extendida podría estar asociada a una utilización más eficiente del almidón, posiblemente regulada por la actividad de SnRK1, que se encuentra aumentada en las plantas mutantes en *CYTC* (capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025).

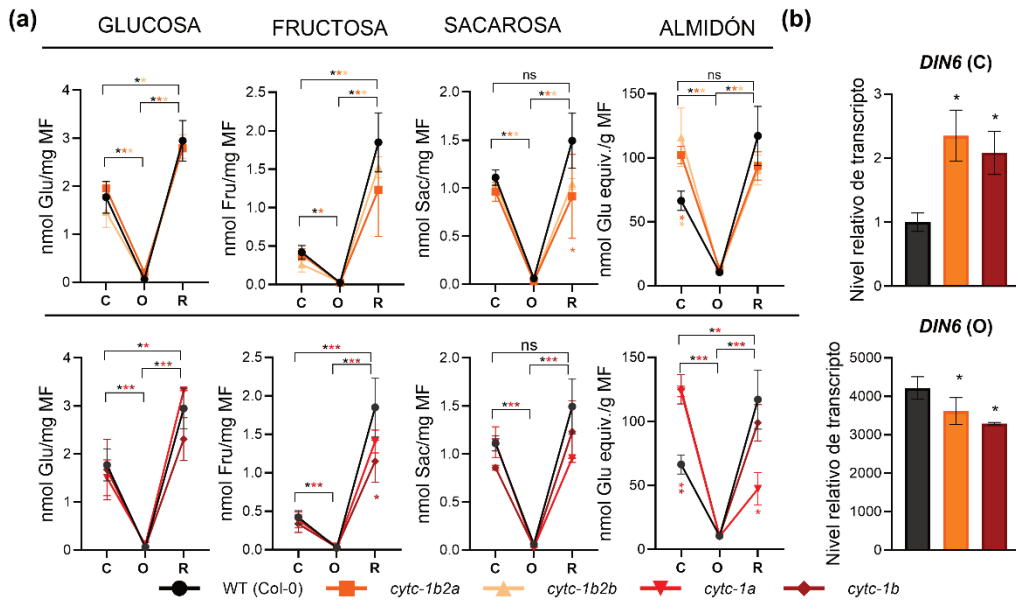


Figura 19. Las plantas deficientes en CYTc presentan un mayor consumo de almidón durante el tratamiento de oscuridad extendida. (a) Cuantificación del contenido de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón, relativizados al contenido de masa fresca (MF), en plantas WT y deficientes en CYTc (mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*, y mutantes simples *cytc-1a* y *cytc-1b*) cultivadas en condiciones Control (C), Oscuridad (O) y Recuperación (R). Para mayor detalle ver inciso 5.3.1.1. Las comparaciones se realizaron entre las mutantes dobles y las plantas WT (arriba), y entre las mutantes simples y las plantas WT (abajo). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (corchetes) y entre genotipos en cada condición comparados con las plantas WT (en cada punto del eje X). ns; no significativo ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías; $n = 3-6$ réplicas biológicas). (b) Niveles de transcripto del gen *DIN6*, gen blanco de la vía SnRK1, en plantas WT y mutantes doble *cytc-1b2a* y simple *cytc-1b*. Los análisis se realizaron con plantas en condiciones Control y Oscuridad. Los valores se expresan en relación al genotipo WT de la condición control. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones de las mutantes con la línea WT en la misma condición (tres réplicas biológicas; $p < 0.05$; prueba *t* de Student).

5.4.1.3 La mayor tolerancia de las plantas deficientes en CYTc podría estar relacionada con la utilización de aminoácidos como fuente alternativa de energía.

Bajo condiciones de limitación energética como noches extendidas o privación de carbono, SnRK1 se activa y desencadena un programa de ahorro energético que promueve la degradación de carbohidratos, proteínas y lípidos, así como la inducción de genes asociados al proceso de autofagia y la gluconeogénesis. En paralelo, la actividad de la vía TOR disminuye en raíces y meristemas en respuesta a la oscuridad y la falta de azúcares, lo que conduce a una reducción de la traducción y del crecimiento (Margalha et al., 2019). En este contexto, estudios previos reportaron que la autofagia contribuye a la movilización de aminoácidos durante la privación de carbono y que su activación bajo oscuridad proporciona sustratos (aminoácidos) para vías respiratorias

alternativas y el mantenimiento energético (Barros et al., 2017; McLoughlin et al., 2020). En concordancia con estos antecedentes, nuestros resultados muestran un incremento de los niveles de aminoácidos libres luego del tratamiento de oscuridad prolongada, seguido de una disminución durante la recuperación (Figura 20a). Esto se acompaña con cambios opuestos en los niveles de proteínas, indicando que la degradación de proteínas es una fuente importante de estos aminoácidos. También se observó un mayor contenido de aminoácidos libres en plantas deficientes en CYTc, en relación con plantas *WT*, en condición control, sobre todo en las mutantes simples en *CYTC-1* (Figura 20a). Sin embargo, este incremento no se acompañó de cambios significativos en el contenido total de proteínas (Figura 20a).

Por otra parte, las mutantes simples exhibieron una reducción estadísticamente significativa en la acumulación de aminoácidos durante la etapa de oscuridad y una acumulación adicional durante la recuperación (Figura 20a). Esta respuesta diferencial entre mutantes dobles y simples sugiere que el gen *CYTC-2* podría ejercer un efecto modulador, hasta ahora no descrito, sobre el metabolismo durante la oscuridad prolongada. En este escenario, la menor acumulación de aminoácidos observada en las mutantes simples en oscuridad podría estar asociada a una reprogramación metabólica más eficiente, mientras que este efecto aparecería atenuado en las mutantes dobles. Sin embargo, serán necesarios estudios adicionales para evaluar de manera directa el rol específico de *CYTC-2* y su contribución a los ajustes metabólicos observados bajo estas condiciones.

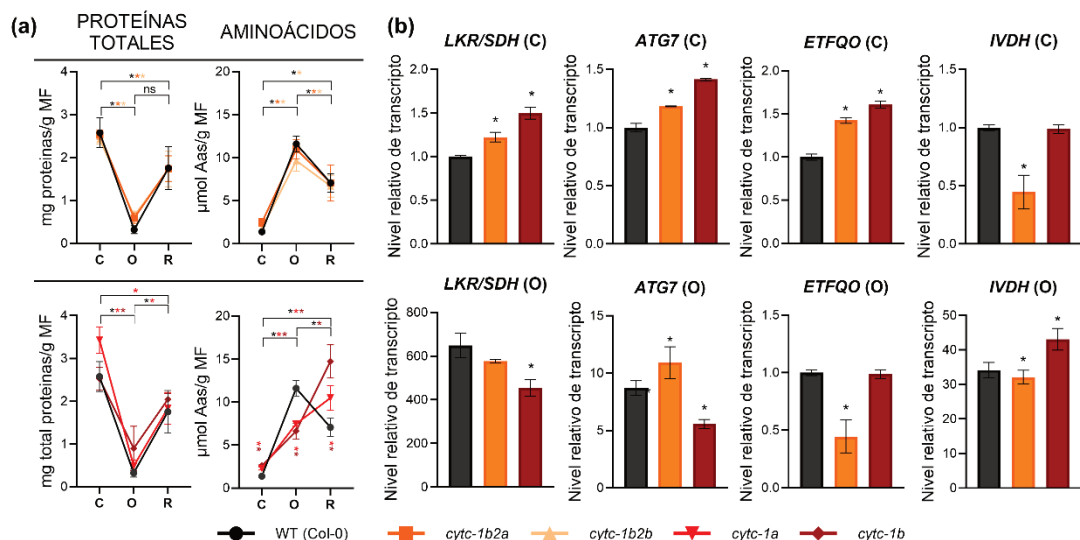


Figura 20. Niveles de aminoácidos durante períodos de oscuridad prolongada en plantas deficientes en CYTc. (a) Cuantificación del contenido de proteínas totales y aminoácidos, relativizado al contenido de masa fresca (MF), en plantas *WT* y deficientes en *CYTC* (mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*, y mutantes simples *cytc-1a* y *cytc-1b*) cultivadas en condiciones Control (C), Oscuridad (O) y Recuperación (R). Para mayor detalle ver inciso 5.3.1.1. Las

comparaciones se realizaron entre las mutantes dobles y las plantas *WT* (arriba), y entre las mutantes simples y las plantas *WT* (abajo). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (corchetes) y entre genotipos en cada condición comparados con las plantas *WT* (en cada punto del eje X) ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías; $n = 4-6$ réplicas biológicas). **(b)** Niveles de transcritos de los genes *ETFQO* e *IVDH*, pertenecientes a la vía respiratoria alternativa, *LKR/SDH*, involucrado en la degradación de lisina, y *ATG7*, asociado al proceso de autofagia, en plantas *WT* y mutantes doble *cytc-1b2a* y simple *cytc-1b*. Los análisis se realizaron con plantas cultivadas en condiciones Control y Oscuridad, como se describe en el inciso 5.3.1.1. Los valores se expresan en relación al genotipo *WT* de la condición control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones de las mutantes con la línea *WT* en la misma condición (tres réplicas biológicas; $p < 0.05$; prueba *t de Student*).

En concordancia con los cambios observados, nuestros resultados reflejan que, bajo condiciones control, las plantas mutantes presentaron mayor expresión de varios genes relacionados tanto con el catabolismo de aminoácidos como con la activación de la autofagia, en comparación con las plantas *WT* (Figura 20b). En particular, se observó una inducción de *LKR/SDH*, gen que codifica una enzima clave en la degradación de lisina (Tang et al., 2000), así como del gen *ATG7*, asociado con la activación del proceso autofágico (Michaeli et al., 2016), lo que sugiere una reprogramación metabólica orientada a sostener el aporte de sustratos respiratorios. Sin embargo, los resultados obtenidos tras nueve días de oscuridad fueron menos concluyentes, probablemente debido a que la expresión génica fue evaluada en una etapa tardía de la respuesta a la privación de carbono. En este sentido, se ha reportado que la autofagia se activa rápidamente durante los primeros días de oscuridad prolongada (Izumi et al., 2013), lo que indica que la dinámica temporal de inducción de los genes *ATG* es un factor crítico para interpretar adecuadamente su contribución a la homeostasis energética bajo estrés (Michaeli et al., 2016). Por lo tanto, el análisis de múltiples puntos temporales permitiría reconstruir con mayor precisión la secuencia de eventos transcripcionales asociados a la adaptación metabólica durante la oscuridad extendida en las plantas deficientes en *CYTc*.

La vía de respiración alternativa *ETF/ETFQO* se activa en condiciones de deficiencia de carbono/energía, como la oscuridad extendida, sequía, salinidad, estrés osmótico, proporcionando electrones a la cadena respiratoria a partir de aminoácidos en lugar de azúcares (Hildebrandt et al., 2015; Pires et al., 2016). En plantas deficientes en *CYTc* se observó una mayor expresión de *ETFQO*, un gen implicado en la transferencia de electrones desde la degradación de aminoácidos hacia la cadena respiratoria (Araújo et al., 2010; Ishizaki et al., 2005), en condición control. Por otra parte, tras el tratamiento de oscuridad, los niveles de expresión fueron similares a los del *WT* (Figura 20b). En contraste, *IVDH*, que codifica una deshidrogenasa asociada con la oxidación de ácido isovalérico (Araújo et al., 2010; Däschner et al., 2001), mostró un patrón de expresión diferente (Figura 20b). En forma notoria, la inducción de los genes

LKR/SDH, *ATG7* y *ETFQO* fue mayor en las mutantes simples que en las mutantes dobles en condiciones control, nuevamente evidenciando la presencia de un comportamiento diferencial. Estos resultados sugieren que el metabolismo alternativo mitocondrial podría ajustarse diferencialmente entre genotipos dependiendo del estado energético. No obstante, dado que estas respuestas metabólicas son altamente dinámicas, un análisis temporal más detallado será necesario para comprender cómo fluctúa la expresión de estos genes a lo largo del tratamiento de oscuridad.

En conjunto, nuestros resultados indican que la deficiencia de *CYTc* confiere una mayor tolerancia a la oscuridad prolongada, reflejada en una reprogramación metabólica que favorece la movilización de las reservas de carbono y la utilización de aminoácidos como sustratos alternativos para la respiración, junto con una preservación de la integridad de proteínas, posiblemente asociada a un aumento de la actividad basal de la vía de SnRK1.

5.4.2 Estrés térmico

5.4.2.1 La deficiencia de *CYTc* está relacionada con una mayor tolerancia al estrés térmico

Los cambios fenotípicos observados ante altas temperaturas dependen fuertemente de la etapa de desarrollo y del nivel de incremento de la temperatura en relación con la de crecimiento óptimo de las plantas. Durante la termomorfogénesis, asociada a temperaturas moderadamente elevadas, se han descrito como respuestas típicas la elongación de hipocótilos y peciolo y la hiponastia foliar (Patel & Franklin, 2009; Zhou et al., 2022). La hiponastia se refleja en un aumento del ángulo de las hojas respecto al suelo y forma parte de un síndrome morfológico adaptativo que incluye también cambios en el área foliar y la arquitectura de la planta (Thomas et al., 2024). En este contexto, las plantas *WT* mostraron una elongación significativa de los peciolo, característica de respuestas termomorfogénicas, al ser sometidas a una temperatura de 28 °C, mientras que las líneas deficientes en *CYTc* mostraron una respuesta más atenuada (Figura 21a-b). Dado que las respuestas termomorfogénicas están asociadas, entre otras cosas, a cambios en la homeostasis de giberelinas (Lu et al., 2021) y que las plantas deficientes en *CYTc* poseen mayores niveles de proteínas DELLA, inhibidores de la respuesta a giberelinas (Racca et al., 2022), analizamos el efecto de un tratamiento

con esta hormona sobre la respuesta de las plantas al aumento de temperatura. Se observó un efecto significativo de la hormona sobre la elongación de los peciolo, tanto en plantas *WT* como mutantes, sobre todo en condiciones control, mientras que el efecto fue menos marcado luego del tratamiento térmico (Figura 21a-b). Además, las mutantes mostraron un comportamiento similar al de las plantas *WT* en estas condiciones, lo que sugiere que la respuesta diferencial al calor se debe a cambios en la homeostasis de giberelinas.

Por otra parte, al someter las plantas a una temperatura mayor (38 °C) durante 6 h, el efecto más evidente fue el de un pronunciado aumento de la hiponastia en las plantas *WT* (Figura 21c). En este contexto, las líneas mutantes deficientes en *CYTc* mostraron una mayor estabilidad fenotípica a lo largo del experimento, evidenciada por una menor respuesta hiponástica frente al estrés térmico (Figura 21c). Por otra parte, la aplicación de GA_3 anuló las diferencias entre las líneas deficientes en *CYTc* y las plantas *WT*, incrementando la respuesta hiponástica de las mutantes (Figura 21c).

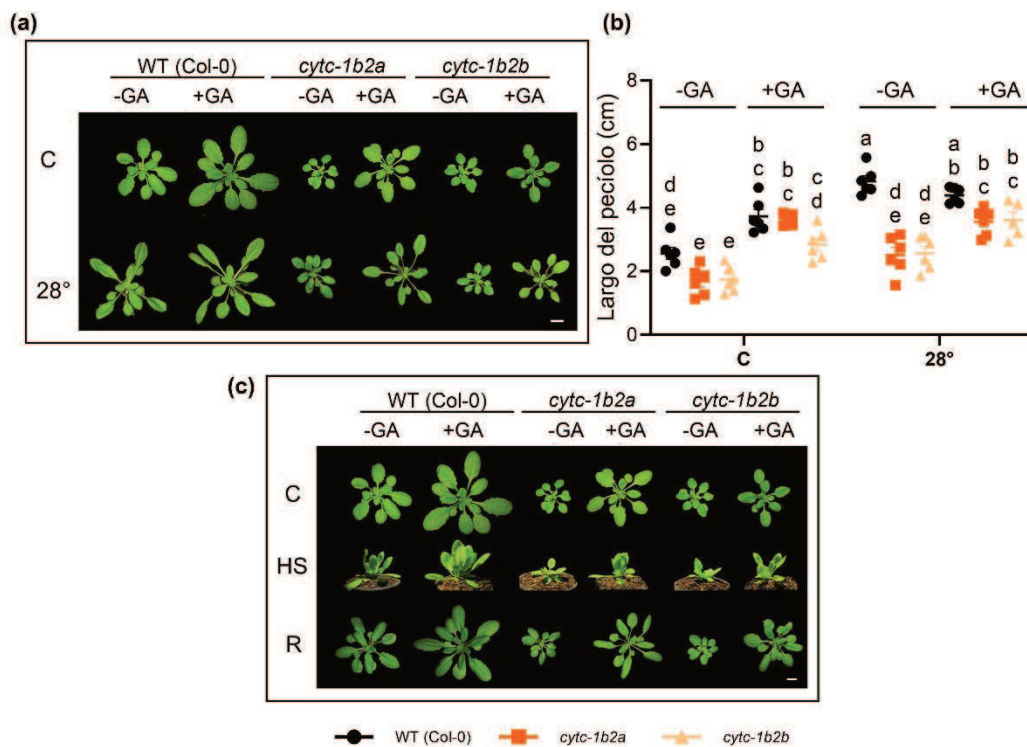


Figura 21. Las plantas deficientes en *CYTc* presentan una menor respuesta al estrés térmico y esta diferencia se pierde con el agregado de GA. (a) Imagen representativa del fenotipo observado en plantas *WT* y mutantes *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* bajo tratamientos sin y con giberelinas (-GA y +GA, respectivamente) en condiciones de temperatura control (C; 23 °C) y alta temperatura (28 °C) como se detalla en el inciso 5.3.1.2. (b) Largo de peciolo de plantas *WT* y mutantes *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* tratadas como se indica en (a). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; ANOVA de dos vías; $n = 5-6$), (c) Imagen representativa del fenotipo observado en plantas *WT* y mutantes *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* bajo tratamientos sin y con giberelinas (-GA y +GA, respectivamente) en condiciones de temperatura control (C; 23°C), shock térmico (HS; 38°C) y recuperación (R; 23°C) como se detalla en el inciso 5.3.1.2.

5.4.2.2 *Las plantas deficientes en CYTc presentan mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos luego de la fase de recuperación al calor*

A nivel metabólico, el estrés térmico impacta sobre la fotosíntesis, la respiración, la estabilidad de membranas y el balance redox, promoviendo una reprogramación de rutas centrales como la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el metabolismo de almidón y aminoácidos (Wang & Xu, 2025; Zhang et al., 2020). En base a esto, analizamos el contenido de pigmentos fotosintéticos en las plantas bajo estudio al ser sometidas a un estrés por aumento de temperatura a 38 °C. En condiciones sin tratamiento hormonal (-GA), no se detectaron diferencias significativas entre genotipos ya sea en condición control o luego del estrés térmico (C y HS) Figura 22a). Sin embargo, tras la fase de recuperación (R), las plantas deficientes en CYTc presentaron un mayor contenido de clorofila total y carotenoides en comparación con las plantas *WT* (Figura 22a). Estas diferencias se perdieron con el agregado de GA₃ (+GA), observándose niveles comparables o incluso menores en plantas deficientes en CYTc comparados con plantas *WT*, principalmente durante la etapa de recuperación (R) (Figura 22a). Al analizar el efecto del tratamiento hormonal (-GA vs +GA) en cada condición (Figura 22b), se detectaron diferencias significativas principalmente en las plantas deficientes en CYTc, mientras que en el genotipo *WT* estas diferencias no fueron significativas. En conjunto, estos resultados indican que las plantas deficientes en CYTc presentan una mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos que las plantas *WT* en ausencia del tratamiento con GA, particularmente tras la recuperación del estrés térmico, lo que podría indicar una mayor tolerancia. Dado que esta respuesta es revertida por el tratamiento hormonal, la respuesta diferencial podría estar relacionada con cambios en la homeostasis de esta hormona. En relación con eso, en trabajos previos se ha reportado la importancia de la vía de giberelinas en la tolerancia de las plantas al estrés térmico, asociada a una mayor acumulación de proteínas DELLA (Zhang & Wang, 2011).

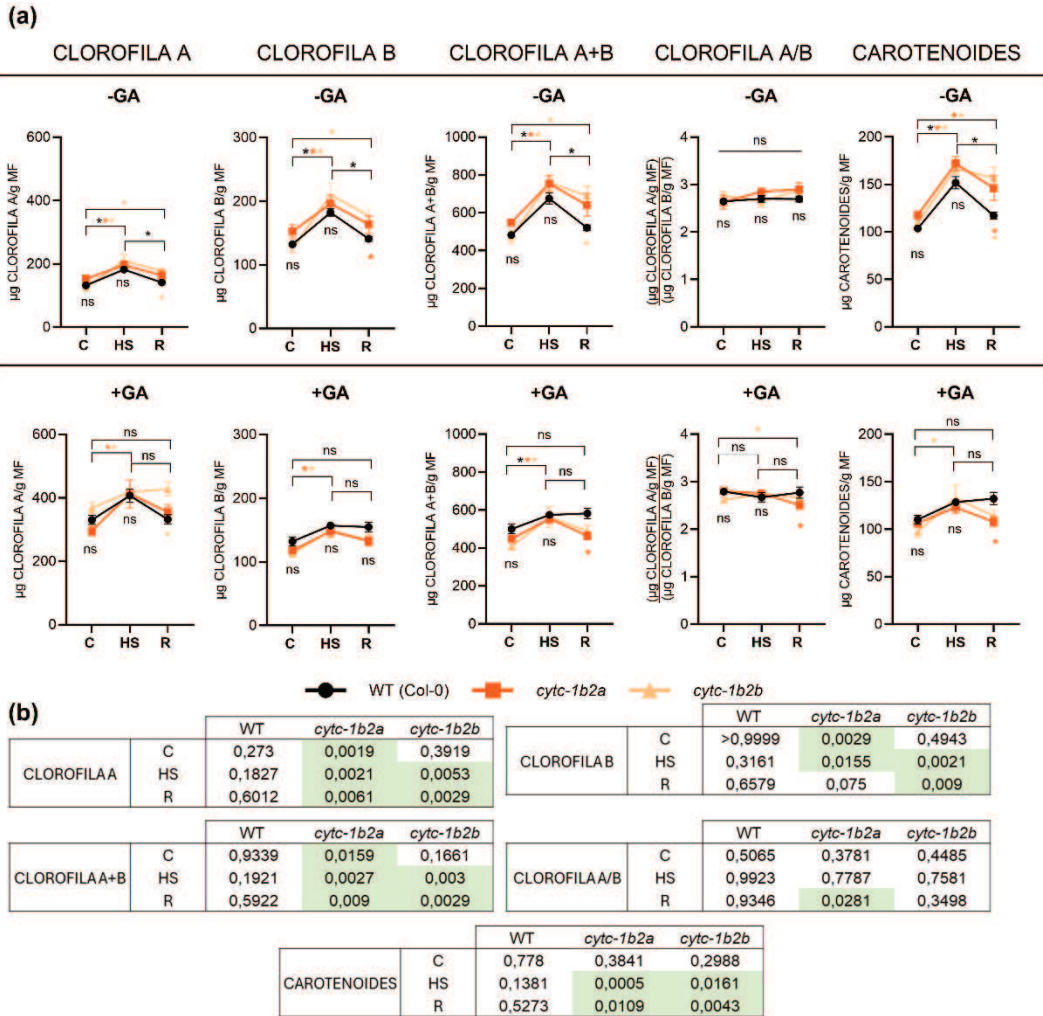


Figura 22. Las plantas deficientes en CYTc presentaron una mayor variación en el contenido de pigmentos fotosintéticos al ser tratadas con GA₃. (a) Contenido total de pigmentos fotosintéticos medido en plantas WT y mutantes *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* bajo tratamientos sin y con giberelinas (-GA y +GA, respectivamente) en condiciones de temperatura control (C; 23 °C), shock térmico (HS; 38 °C) y recuperación (R; 23 °C) como se detalla en el inciso 5.3.1.2. Las comparaciones se realizaron entre diferentes tratamientos hormonales, así como a lo largo de los tratamientos térmicos (C, HS Y R). Arriba se muestran las cuantificaciones de los tratamientos control (-GA) y abajo las del tratamiento hormonal (+GA). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (corchetes) y entre genotipos en cada condición comparados con las plantas WT (en cada punto del eje X) ($p < 0.05$; ANOVA de dos vías; $n = 4-6$ réplicas biológicas). ns: no significativo. (b) Valores de p correspondientes a las comparaciones entre -GA y +GA (ANOVA de dos vías; $n = 4-6$ réplicas biológicas). En verde se encuentran los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

5.4.2.3 *Las plantas deficientes en CYTc responden a los tratamientos térmicos aumentando el contenido de azúcares solubles.*

Se ha reportado que, en condiciones de estrés térmico, los azúcares solubles cumplen un rol dual, actuando como osmoprotectores y como moléculas señalizadoras que regulan la expresión de genes asociados a la tolerancia (Keunen et al., 2013; Sharma et al., 2019). En concordancia, la acumulación de azúcares bajo condiciones de estrés en plantas se asocia con cambios coordinados en el perfil hormonal y en rutas de señalización (Hernández et al., 2021). Nuestros resultados mostraron que, bajo condiciones -GA, no se detectaron diferencias significativas en el contenido de azúcares solubles entre los genotipos (Figura 23a-b). Sin embargo, luego del estrés térmico y durante la etapa de recuperación, las mutantes mostraron una mayor acumulación de azúcares solubles comparadas con las plantas *WT* (Figura 23a-b). Esta respuesta se revirtió en condiciones +GA, donde observamos una menor acumulación de azúcares solubles en las mutantes en comparación con las plantas *WT* (Figura 23a-b). Este cambio sugiere la existencia de un ajuste metabólico inducido por la activación de la vía de las giberelinas, más que una diferencia en la capacidad de acumulación basal de azúcares. De manera consistente, este comportamiento se refleja en el contenido de almidón, el cual presentó una tendencia al aumento en condición control, como fue previamente reportado (Racca et al., 2018), mientras que esta diferencia se perdió con el agregado de GA₃. En este sentido, el agregado de GA₃ sería capaz de mitigar la respuesta normal de las plantas deficientes en CYTc al estrés por calor, provocando una respuesta similar a la de las plantas *WT*.

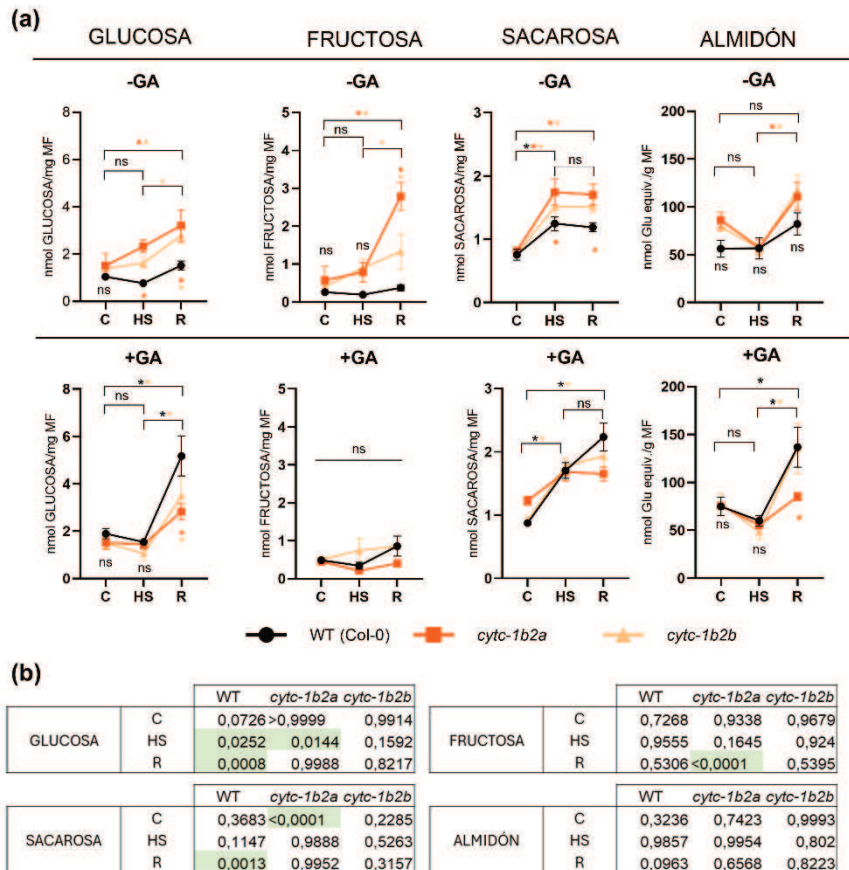


Figura 23. El tratamiento con GA afecta la acumulación de azúcares en plantas deficientes en CYTc expuestas a estrés térmico. (a) Cuantificación de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón en plantas WT y mutantes *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* bajo tratamientos sin y con giberelinas (-GA y +GA, respectivamente) en condiciones de temperatura control (C; 23 °C), shock térmico (HS; 38 °C) y recuperación (R; 23 °C) como se detalla en el inciso 5.3.1.2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (corchetes) y entre genotipos en cada condición comparados con las plantas WT (en cada punto del eje X) ($p < 0.05$; ANOVA de dos vías; $n = 4-6$ réplicas biológicas). ns= no significativo. (b) Valores p resultados de las comparaciones entre los tratamientos -GA vs +GA. Las celdas coloreadas indican los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$; ANOVA de dos vías; $n = 4-6$ réplicas biológicas).

5.4.2.4 Las mutantes deficientes en CYTc responden al estrés térmico con cambios en el contenido de aminoácidos asociados al proceso de autofagia

La autofagia es un proceso de reciclado celular que se activa ante diversos estímulos, entre ellos distintas condiciones de estrés (Su et al., 2020). Durante el estrés térmico, se ha demostrado que el número de autofagosomas aumenta, reflejando una respuesta fisiológica asociada a la necesidad de las plantas de sostener el metabolismo energético ante condiciones adversas (Chen et al., 2021). Este incremento del proceso de autofagia suele estar acompañado por un aumento del contenido total de aminoácidos como productos de la degradación de macromoléculas celulares

(McLoughlin et al., 2020), los cuales pueden ser utilizados como fuente alternativa en la respiración mitocondrial (Heinemann & Hildebrandt, 2021; Hirota et al., 2018).

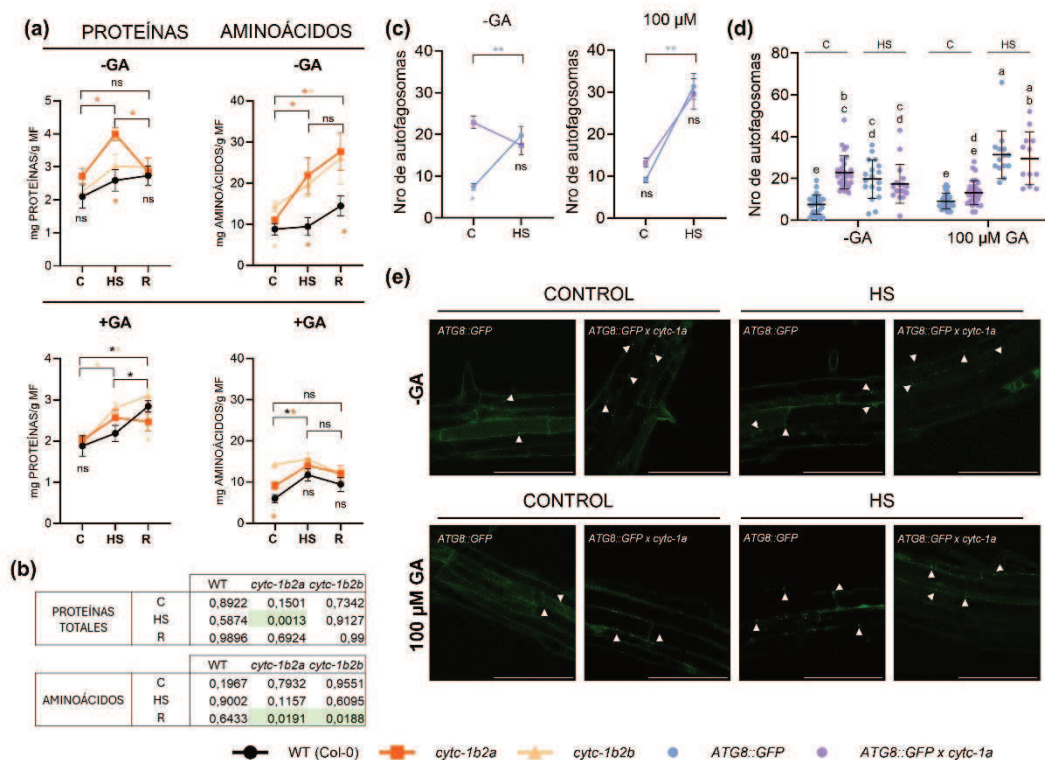


Figura 24. Niveles de aminoácidos y autofagia en plantas deficientes en CYTc durante los tratamientos térmicos en ausencia y presencia de giberelinas. (a) Cuantificación de proteínas totales y aminoácidos en plantas *WT* y mutantes *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* bajo tratamientos sin y con giberelinas (-GA y +GA, respectivamente) en condiciones de temperatura control (C; 23 °C), shock térmico (HS; 38 °C) y recuperación (R; 23 °C) como se detalla en el inciso 5.3.1.2. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (corchetes) y entre genotipos en cada condición en comparación con las plantas *WT* (en cada punto del eje X). ns: no significativo ($p < 0.05$; ANOVA de dos vías; $n = 4-6$ réplicas biológicas). (b) Valores p resultados de las comparaciones entre los tratamientos -GA vs +GA. Las celdas coloreadas indican los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$; ANOVA de dos vías; $n = 4-6$ réplicas biológicas). (c-e) Cuantificación de estructuras tipo autofagosomas en plántulas *WT* y mutantes *cytc-1b2a* y *cytc-1b2b* de 5 días de edad cultivadas en condición control y tratadas con GA₃ 100 μM durante 24 h a 23 °C, seguido de un período de 5 h a 38 °C (HS). Se fotografiaron entre 3 y 5 raíces, tomando entre 6 y 8 fotos de cada una. Los asteriscos y letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$; ANOVA de dos vías; $n = 16-32$). Los gráficos de las respuestas a los tratamientos se muestran en (c), mientras que los valores totales de cada medición se graficaron en (d). En (e) se observa una imagen representativa de los datos presentados en los incisos anteriores. Escala: 100 μm.

En concordancia con resultados previos (Canal et al., 2024; capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025; Racca et al., 2018), el contenido total de proteínas de las plantas deficientes en CYTc no difirió significativamente respecto al de las plantas *WT* a lo largo de los diferentes tratamientos (Figura 24a). Este resultado sugiere que las diferencias observadas en la respuesta al estrés no se asocian con una degradación proteica global.

En contraste, el análisis del contenido de aminoácidos libres reveló un patrón diferencial entre genotipos y tratamientos. En ausencia de giberelinas (-GA), las plantas deficientes en *CYTc* manifestaron una acumulación relativamente mayor de aminoácidos respecto a la línea *WT*. Sin embargo, tras la aplicación de GA_3 (+GA), dicha acumulación se redujo hasta niveles comparables con los del genotipo *WT* (Figura 24a). En concordancia, el análisis estadístico muestra diferencias significativas entre tratamientos (-GA vs +GA) únicamente en las líneas mutantes, preferentemente luego de la recuperación (Figura 24b). Estos resultados indican que las alteraciones en la vía de señalización de giberelinas podrían ser responsables de la mayor capacidad de acumulación de aminoácidos en las plantas deficientes en *CYTc*, posiblemente sustentada por un mecanismo de reciclaje activo vía autofagia (Figura 24c-e).

En este sentido, en ausencia de tratamiento hormonal (-GA), las plantas *WT* mostraron una inducción de la autofagia en respuesta al estrés térmico, evidenciada por un aumento en el número de autofagosomas (Figura 24c-e). En contraste, las líneas deficientes en *CYTc* exhibieron, en condición control, niveles aumentados de autofagia, acompañados por un incremento en el contenido de aminoácidos, como reportamos previamente (Canal et al., 2024; capítulo 1 de esta Tesis, Coronel et al., 2025). En estas mutantes, el tratamiento térmico no indujo un aumento adicional en el número de autofagosomas (Figura 24c-e). Sin embargo, el contenido de aminoácidos continuó en aumento, lo que podría estar relacionado con la activación basal de esta vía. Notablemente, tras la aplicación de GA_3 , las plantas deficientes en *CYTc* ya no presentaron un nivel basal aumentado de autofagia en condición control (Figura 24c-d), lo que coincide con la reversión en la acumulación de aminoácidos que se observa en dicha condición (Figura 24a). Por otra parte, bajo estrés térmico y en presencia de GA_3 , nuestros resultados muestran que tanto las mutantes como las plantas *WT* respondieron al tratamiento aumentando significativamente el número de autofagosomas; sin embargo, esta activación de la autofagia no se acompañó del un incremento en el contenido de aminoácidos, cuyos niveles se mantuvieron relativamente bajos. Estos resultados nos permiten generar dos hipótesis: por un lado, que la acumulación de aminoácidos en las mutantes en genes *CYTC* podría estar relacionada, en gran medida, con el aumento basal en el proceso de autofagia; por otra parte, que el tratamiento con GA_3 podría inducir la utilización de los aminoácidos durante el estrés térmico en estas plantas, impidiendo su acumulación. No obstante, serán necesarios estudios adicionales para evaluar de manera directa estas posibilidades.

En conjunto, estos resultados sugieren que la mayor tolerancia al calor observada en las mutantes *CYTc* en ausencia del tratamiento con GA está parcialmente

sustentada por un mecanismo de reciclaje activo de aminoácidos vía autofagia, el cual es reprimido cuando se promueve el crecimiento mediante señalización hormonal. En este sentido, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las mutantes en *CYTc* poseen un estado metabólico más conservado — es decir, priorizan mecanismos de protección por sobre el crecimiento — lo cual les confiere ventaja frente al estrés térmico. Mientras tanto, la aplicación de GA_3 desplaza este balance hacia el crecimiento, lo que revierte su ventaja de tolerancia al estrés por calor.

5.4.2.5 El tratamiento con GA_3 altera la actividad de SnRK1 durante la respuesta al estrés térmico en plantas deficientes en *CYTc*.

La actividad de SnRK1 como sensor de energía en respuesta al estrés ha sido ampliamente reportada (Baena-González et al., 2007; Broeckx et al., 2016; Nukarinen et al., 2016). Si bien la mayoría de estos estudios se han enfocado en condiciones de estrés nutricional o hambreado de carbono (Peixoto & Baena-González, 2022), evidencias más recientes indican que esta vía también participa en la respuesta a estrés térmico (Suzuki, 2023). Se ha demostrado que HOS1, un componente del complejo del poro nuclear con actividad E3 ubiquitina ligasa, es esencial para la correcta señalización de SnRK1, regulando su dinámica subcelular y contribuyendo a la tolerancia al estrés por calor bajo condiciones de baja disponibilidad energética (Margalha et al., 2023). En nuestras condiciones experimentales, bajo condición control, las plantas deficientes en *CYTc* mostraron un aumento de la fosforilación de SnRK1 en comparación con las plantas *WT* (Figura 25a). Sin embargo, tras 6 h de tratamiento a 38 °C, los niveles de fosforilación de SnRK1 en las plantas *WT* fueron iguales, o incluso superiores, a los observados en las plantas deficientes en *CYTc* (Figura 25b). Por otra parte, en la etapa de recuperación no se observaron diferencias entre los genotipos (Figura 25c). Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que un aumento en la fosforilación de SnRK1 en plantas deficientes en *CYTc* podría contribuir a un estado de aclimatación metabólica, reduciendo la necesidad de una activación adicional de esta vía frente a estrés térmico.

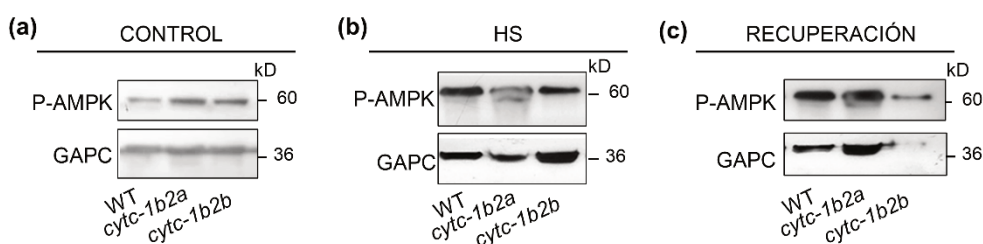


Figura 25. Niveles de fosforilación de SnRK1 en plantas sometidas a estrés térmico. (a-c) Análisis por *Western Blot* de la fosforilación de la subunidad SnRK1 α en plantas *WT* y deficientes en *CYTc* en tratamientos control y luego del estrés térmico (HS, 38 °C) y la recuperación (23 °C). Se empleó el anticuerpo anti-P-AMPK para analizar la fosforilación de SnRK1 y el anticuerpos anti-GAPC como control de carga.

A pesar de estos resultados, las plantas deficientes en *CYTc* presentaron niveles elevados de transcritos del gen *DIN6* (gen blanco de la vía de SnRK1 según Baena-González et al., 2007) en comparación con las plantas *WT*, en las condiciones de estrés térmico (Figura 26a). Este resultado podría deberse al aumento basal de la actividad de la vía de SnRK1 (capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025). En contraste, en condiciones de tratamiento hormonal (+GA), los niveles de *DIN6* en las mutantes en *CYTc* se redujeron luego del estrés térmico, alcanzando valores similares a los observados en las plantas *WT* (Figura 26a).

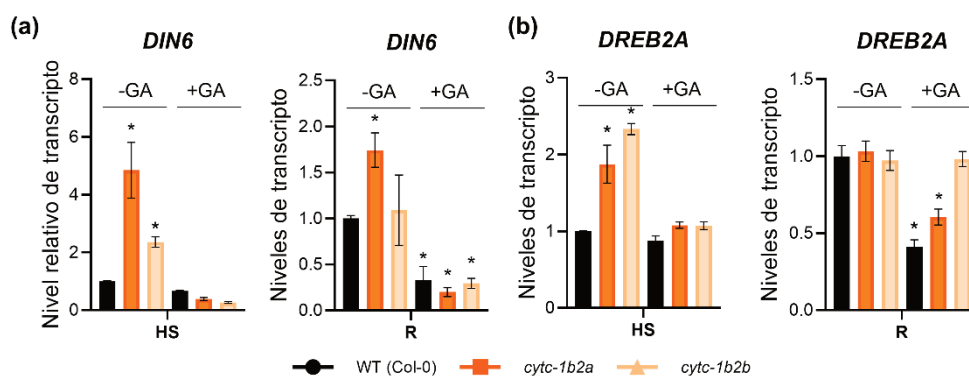


Figura 26. La actividad de SNRK1 en plantas deficientes de CYTc es afectada por el tratamiento con GA₃. (a-b) Niveles de transcritos de los genes *DIN6*, y *DREB2A*, asociados a la actividad de SnRK1 (Baena-González et al., 2007) y las respuestas a estrés térmico en plantas (Sato et al., 2014), en plantas *WT* y mutantes dobles *cytc-1b cytc-2a* y *cytc-1b cytc-2b*. Los análisis se realizaron con plantas cultivadas en condiciones de shock térmico (HS; 38 °C) y recuperación (R; 23 °C) como se detalla en el inciso 5.3.1.2. Los valores se expresan en relación con el genotipo *WT* de cada condición. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones con la línea *WT* (tres réplicas biológicas; $p < 0.05$; prueba *t* de Student).

En concordancia con estos resultados, los análisis de los niveles de transcritos del gen *DREB2A*, un factor de transcripción implicado en la respuesta al estrés en plantas (Sato et al., 2014), mostraron patrones de respuesta similares a los observados en los análisis de *DIN6*. Durante el tratamiento térmico, el grupo -GA presentó un aumento de los niveles de transcritos de *DREB2A* en las plantas deficientes en *CYTc* en comparación con plantas *WT*, respuesta que se revirtió tras la aplicación de GA₃ (Figura 26b). En síntesis, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con GA₃ podría interferir con la regulación de la respuesta a condiciones de estrés, posiblemente a través de la regulación de SnRK1, promoviendo una reprogramación metabólica que

contribuye a una disminución de la tolerancia al estrés térmico en plantas deficientes en CYTc.

5.5 DISCUSION

La respuesta a estrés abiótico en las plantas cuenta con diferentes mecanismos, desplegándose primero respuestas rápidas de protección y luego respuestas adaptativas que remodelan el desarrollo y el metabolismo (Zhu, 2016). En este sentido, se ha postulado que distintos tipos de estrés abiótico desencadenan la acumulación de diversos metabolitos, entre ellos sacarosa, trehalosa, rafinosa, manitol, sorbitol, inositol y prolina, así como metabolitos azufrados, como la metionina, la cisteína y el glutati6n (Xu & Fu, 2022). A nivel fisiol6gico, las respuestas r6pidas de los estomas limitan la p6rdida de agua temporalmente, mientras que las disminuciones a corto y mediano plazo de las tasas de divisi6n y expansi6n celular conducen a una emergencia m6s lenta de nuevas hojas y a una reducci6n de su tama1o final (Munns & Millar, 2023). Se demostr6, adem6s, que algunas respuestas r6pidas se propagan por toda la planta mediante ondas de especies reactivas de ox6geno (ROS) y Ca^{2+} , posiblemente mediadas por el sistema vascular vegetal (Kollist et al., 2019).

5.5.1 Respuestas adaptativas

Algunos tipos de estr6s, como la privaci6n de carbono, constituyen una se1al metab6lica clave que activa respuestas adaptativas en las plantas, caracterizadas por la represi6n del crecimiento y la reprogramaci6n del metabolismo hacia la movilizaci6n de reservas y el uso de fuentes alternativas de energ6a, permiti6ndole a la planta mantenerse viable hasta que retorne a una condici6n favorable (Baena-Gonz6lez & Sheen, 2008; Law et al., 2018). En efecto, la disponibilidad de carbono de la c6lula influye en la activaci6n de programas transcripcionales que incluyen tanto la inducci6n de rutas catab6licas como la supresi6n de procesos anab6licos, integrando se1ales energ6ticas y de estr6s (Usadel et al., 2008). Adem6s, la represi6n del crecimiento durante per6odos prolongados de oscuridad puede desencadenar procesos de senescencia, lo que constituye un cambio fisiol6gico que puede utilizarse para evaluar la susceptibilidad de las plantas a la privaci6n prolongada de carbono (Trivellini et al., 2012). En este sentido, la deficiencia mitocondrial, en nuestro caso representada por la deficiencia de CYTc, es capaz de generar un aumento en la tolerancia a la oscuridad

extendida, asociada al mantenimiento de la integridad del PSII. Esto es consistente con trabajos previos que reportaron que las plántulas de las mutantes en genes *CYTc* pueden sobrevivir mejor a la privación de carbono (Canal et al., 2024), aunque hasta el momento no se ha indagado en las respuestas metabólicas que sostienen estas adaptaciones.

En este sentido, estudios previos muestran que la activación sostenida de la vía de SnRK1 durante la privación de carbono incrementa la tolerancia a la oscuridad y promueve mecanismos de ajuste metabólico adaptativos, caracterizados por la represión de rutas consumidoras de energía y la activación de procesos catabólicos, incluyendo la movilización de reservas de carbono y un aumento del proceso de autofagia (Baena-González et al., 2007; Margalha et al., 2023; Nukarinen et al., 2016; Peixoto et al., 2021; Wurzinger et al., 2018). En concordancia con esto, se ha reportado que la sobreexpresión de *KIN10*, que codifica la subunidad catalítica SnRK1 α , confiere una mayor tolerancia a distintos tipos de estrés, asociada a una reprogramación transcripcional, limitación del crecimiento y activación de procesos de reciclaje celular (Chen et al., 2017; Cho et al., 2012; Soto-Burgos & Bassham, 2017). De manera consistente, en plantas deficientes en *CYTc* se ha demostrado que tanto la restricción en el crecimiento como el aumento basal del proceso de autofagia, dependen del aumento en la actividad de SnRK1 (capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025). Asimismo, la acumulación de aminoácidos en estas mutantes se ha vinculado funcionalmente a esta vía, dado que la mutación de *KIN10* en el fondo mutante *CYTc-1* revierte esta acumulación (capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025), estableciendo una relación directa entre la disfunción mitocondrial y la reprogramación metabólica mediada por SnRK1. En este contexto, durante el tratamiento de oscuridad, todos los genotipos respondieron con un aumento de la expresión de *DIN6*, gen blanco de SnRK1 (Baena-González et al., 2007), aunque la diferencia entre las plantas *WT* y las mutantes se vio reducida luego del tratamiento. Este patrón sugiere que, mientras las plantas *WT* inducen la vía en respuesta al estrés energético, las plantas deficientes en *CYTc* podrían presentar un estado basal elevado de actividad SnRK1 que las predispone a afrontar de manera más eficiente la privación prolongada de carbono, por ejemplo, optimizando el uso de almidón y aminoácidos o ajustando las vías alternativas mitocondriales. En conjunto, nuestros resultados indican que las alteraciones en la función mitocondrial dependientes de los niveles de *CYTc*, que conducen a una activación de SnRK1, son capaces de modificar la disponibilidad y el consumo de fuentes de carbono y coordinar respuestas adaptativas necesarias para mantener la integridad metabólica durante situaciones de estrés.

Otra vía estrechamente vinculada con la respuesta mitocondrial frente a condiciones de estrés abiótico es la vía de la oxidasa alternativa (AOX), la cual se induce ante distintos tipos de estrés, incluyendo el estrés nutricional, siendo particularmente importante para mantener la homeostasis metabólica (Buchanan-Wollaston et al., 2005; Feng et al., 2013). En este contexto, se ha reportado que, en respuesta a estrés abiótico, la activación de AOX puede promover la utilización de aminoácidos como fuente alternativa de energía (Oh et al., 2022). En trabajos previos se ha reportado una mayor sensibilidad al ABA en mutantes *cytc-2a* y *cytc-2b*, que además son regulados transcripcionalmente por el factor de transcripción *ABI4* (Racca et al., 2022). De manera consistente, la expresión de *AOX1a* también se encuentra regulada por ABA a través de sitios de unión de *ABI4* en su región promotora (Giraud et al., 2009). Adicionalmente, se ha reportado que la activación de la vía AOX es parte de una respuesta retrógrada mitocondrial mediada por el factor de transcripción *ANAC017*, particularmente bajo condiciones de oscuridad, promoviendo la inducción de genes asociados a la función mitocondrial, entre ellos *CYTC-2* (Broda et al., 2021). En este sentido, si la actividad de *CYTC-2* estuviera relacionada con una respuesta a oscuridad prolongada similar a la observada cuando se incrementa la actividad de AOX, este mecanismo podría explicar las diferencias observadas en la acumulación de aminoácidos entre las mutantes simples y las mutantes dobles en genes *CYTC*. En conjunto, estos resultados permiten sugerir que *CYTC-2* podría desempeñar un rol regulador del consumo de aminoácidos bajo condiciones de estrés por oscuridad extendida. No obstante, son necesarios estudios más exhaustivos que aborden de manera directa la actividad de *CYTC-2*, su regulación ante el estrés y su relación con el metabolismo de aminoácidos para validar estas hipótesis.

En resumen, nuestros resultados indican que la deficiencia mitocondrial es capaz de inducir la actividad de la vía de SnRK1, lo que conferiría una mayor tolerancia a oscuridad extendida a partir de una reprogramación metabólica asociada tanto al uso más eficiente de las reservas de almidón, así como a una mejor utilización de las reservas de aminoácidos (Figura 27a). No obstante, serán necesarios estudios adicionales para dilucidar de manera específica cómo estos mecanismos contribuyen a mejorar la supervivencia de las plantas frente al hambre de carbono bajo condiciones de deficiencia mitocondrial.

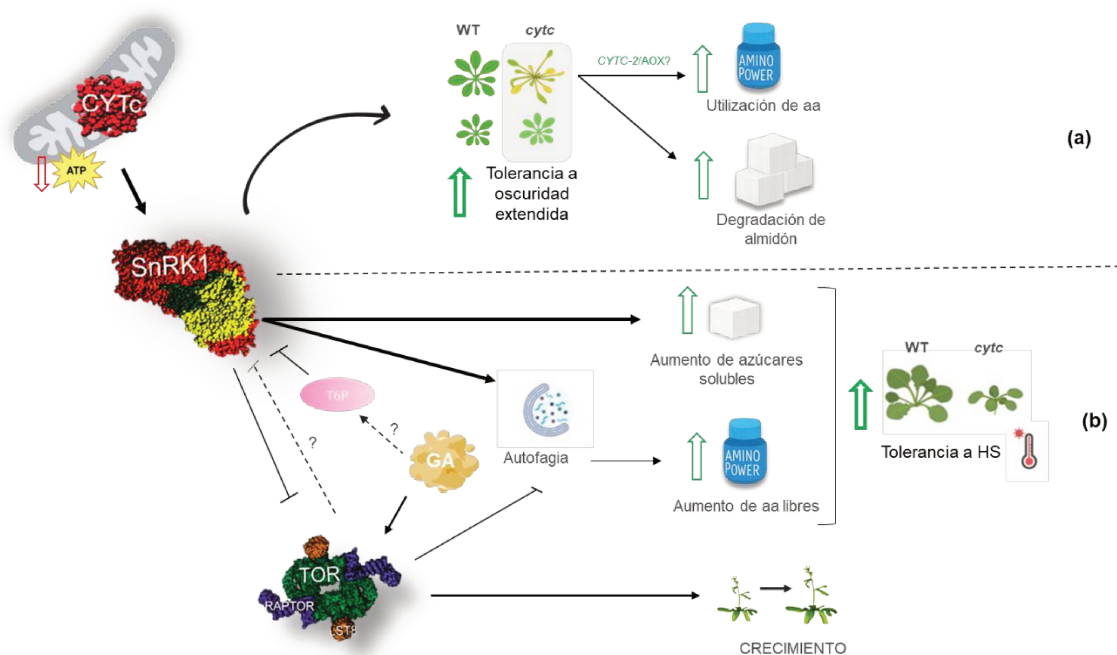


Figura 27. Modelo que representa de qué manera la deficiencia mitocondrial (representada por bajas cantidades de CYTc) es capaz de aumentar la tolerancia a estrés en las plantas. (a) El aumento basal de la actividad de SnRK1 incrementa la tolerancia a oscuridad extendida en las plantas mutantes en genes *CYTc*, asociada al uso eficiente de las reservas de almidón y de aminoácidos libres. **(b)** La activación de SnRK1 también mejora la tolerancia al estrés térmico mediante un aumento de azúcares solubles y aminoácidos, esto último provocado por el proceso de autofagia. Sin embargo, la señalización por giberelinas (posiblemente a través de cambios en las vías de TOR y/o SnRK1) aumenta la sensibilidad de las mutantes al calor e inhibe la acumulación de azúcares solubles y aminoácidos. Esta señalización podría estar relacionada con una indicción de esta hormona sobre la vía TOR, o a través de la regulación de T6P, la cual inhibiría la actividad de SnRK1, Las flechas continuas indican relaciones demostradas experimentalmente o previamente reportadas, mientras que las líneas punteadas reflejan relaciones hipotéticas o aún no confirmadas.

5.5.2 Respuestas rápidas

Las respuestas rápidas de las plantas a estrés abarcan un gran número de vías metabólicas y moleculares en escalas temporales que van desde segundos a horas, dependiendo del tipo de estrés, y que generalmente se encuentran asociadas a señalizaciones de ROS/Ca²⁺ (Kollist et al., 2019). El *heat shock response* se considera una respuesta rápida al estrés térmico, caracterizada por la activación de *heat shock factors* (HSFs) y la síntesis inmediata de *heat shock proteins* (HSPs) para proteger la función proteica y mitigar daños celulares (Dündar et al., 2025; Wang & Xu, 2025). Entre las respuestas características a este tipo de estrés térmico, las plantas exponen fenotipos tales como la elongación del hipocótilo y el crecimiento hiponástico, que contribuyen a promover la capacidad de enfriamiento de la planta, así como un aumento

en la síntesis de sustancias o proteínas protectoras, incluyendo azúcares solubles, prolina y antioxidantes (De Smet et al., 2021; Park et al., 2019; Wahid et al., 2007). Adicionalmente, diversos estudios han propuesto que la modulación de las HSPs y otros mecanismos de defensa pueden estar regulados por fitohormonas, contribuyendo de este modo a mejorar la termotolerancia de las plantas (Li et al., 2021; Yu et al., 2025).

En *Arabidopsis* y otras especies vegetales, las giberelinas promueven la elongación del hipocótilo, la elongación del pecíolo y un desarrollo acelerado, principalmente a través de la degradación de proteínas DELLA, que actúan como represoras del crecimiento (Achard & Genschik, 2009). La activación de programas de crecimiento mediante la aplicación de giberelinas bajo condiciones de estrés térmico puede limitar la capacidad de la planta para inducir respuestas protectoras, como la acumulación de HSPs o la activación de defensas antioxidantes, reduciendo la tolerancia al calor (Zhang & Wang, 2011). En este contexto, se ha reportado que las plantas deficientes en CYTc presentan una mayor acumulación de proteínas DELLA, lo que se asocia a un retraso en el crecimiento y el desarrollo (Racca et al., 2018). De acuerdo con estos antecedentes, nuestros resultados muestran que la aplicación de GA₃ en plantas mutantes en genes *CYTC* libera programas de crecimiento, pero a expensas de los mecanismos adaptativos al estrés térmico. Este fenómeno permitiría explicar por qué la ventaja fenotípica observada en las mutantes a altas temperaturas desaparece tras el tratamiento con GA₃, conduciendo a una respuesta similar a la de las plantas *WT*.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que, ante un estrés térmico, el contenido de azúcares solubles aumenta en las mutantes, posiblemente desempeñando un papel como osmoprotectores o señalizadores ante este tipo de estrés (Keunen et al., 2013; Sharma et al., 2019). En contraste, se ha reportado que la aplicación de GA₃ es capaz de modular el metabolismo de los azúcares solubles, reduciendo su acumulación y promoviendo su utilización en rutas anabólicas vinculadas al crecimiento (Li et al., 2024; Zhang & Wang, 2011). En este contexto, las plantas deficientes en CYTc podrían ser particularmente sensibles a esta redistribución del carbono debido a su homeostasis mitocondrial alterada, lo que modificaría el balance entre el consumo energético y la respuesta al estrés. De este modo, la activación de la vía de giberelinas podría interferir con estos mecanismos al favorecer procesos de crecimiento, reduciendo la disponibilidad de azúcares para funciones protectoras.

En respuesta a este desbalance entre crecimiento y disponibilidad energética, la autofagia actúa como una vía compensatoria de reciclaje celular, liberando aminoácidos

que pueden utilizarse como sustratos auxiliares en condiciones de estrés (Hirota et al., 2018). En plantas, TOR actúa como un regulador negativo de la autofagia, de modo que cuando TOR se encuentra activo, la autofagia se inhibe. En el contexto de las plantas deficientes en CYTc, la acumulación elevada de aminoácidos en ausencia del tratamiento con GA podría deberse a una autofagia más activa (Canal et al., 2024; capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025). En este sentido, la aplicación de GA₃ podría activar TOR, cuya actividad se encuentra disminuida en las mutantes, como se ha sugerido previamente (Marash et al., 2024; Meng et al., 2022; Smailov et al., 2020), lo que conllevaría a la represión del proceso de autofagia (Liao & Bassham, 2020) y, en consecuencia, a inhibir la acumulación de aminoácidos en condición control.

Por otra parte, en el contexto de respuesta a estrés por calor, nuestros resultados muestran que, si bien el tratamiento con GA₃ provoca una inducción de la autofagia en plantas *WT* y mutantes en genes *CYTC*, la acumulación de aminoácidos en estas líneas no se ve significativamente aumentada, anulándose las diferencias entre ellas. En este sentido, diversos estudios han demostrado que el proceso de autofagia se activa en plantas expuestas a estrés por calor, contribuyendo a la eliminación de proteínas dañadas y a la adaptación celular frente a altas temperaturas (Chen et al., 2021; Sedaghatmehr et al., 2019; Zhou et al., 2014). La mayor inducción de la autofagia luego del estrés térmico y el tratamiento hormonal podría estar relacionada con esto último más que con un proceso de adaptación metabólica. Aunque no existe evidencia clara de que la aplicación de giberelinas modifique la activación de la autofagia bajo estas condiciones, la respuesta metabólica a GA₃ puede incluir modulaciones en el perfil de aminoácidos y otros metabolitos. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, niveles bajos de GA se asociaron con aumentos en varios aminoácidos (incluyendo leucina, alanina, aspartato, entre otros), mientras que el tratamiento con GA₃ produjo cambios menores en el contenido de aminoácidos comparado con plantas control (Ribeiro et al., 2012). Estos antecedentes podrían indicar que la aplicación de GA₃ sería capaz de promover una reorganización del metabolismo primario bajo estrés, que incluye ajustes en las rutas de aminoácidos y otros compuestos solubles, aunque el mecanismo específico de utilización y redistribución de estos metabolitos bajo estrés térmico no está del todo claro.

En relación con los mecanismos mediante los cuales la señalización hormonal modula la respuesta al estrés por calor en las plantas mutantes en genes *CYTC*, nuestros resultados permiten plantear dos hipótesis principales. Dado que las plantas deficientes en CYTc presentan una actividad aumentada de SnRK1 (capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025) y que el tratamiento con giberelinas revierte la menor

susceptibilidad de estas mutantes a estrés térmico así como la mayor expresión del gen blanco de SnRK1 *DIN6*, nuestros resultados nos permiten proponer que el efecto de la hormona podría estar mediado, al menos en parte, por la vía de SnRK1. Si bien la evidencia directa que vincula la señalización de giberelinas con la regulación de SnRK1 es aún limitada, revisiones bibliográficas sugieren que este efecto podría producirse a través de dos rutas no excluyentes: por un lado, a través de la regulación de la vía TOR y, por el otro, mediada por cambios en los niveles de trehalosa-6-fosfato (T6P), un metabolito estrechamente asociado al estado energético celular y a la actividad de SnRK1 (Baena-González et al., 2007; Zhang et al., 2009).

En concordancia con la primera hipótesis, en las líneas mutantes en genes *CYTC*, hemos reportado una mayor actividad de SnRK1 en comparación con las plantas *WT* y posicionado a esta quinasa como un regulador negativo de TOR en estas plantas (capítulo 1 de esta Tesis; Coronel et al., 2025). En este contexto, se ha demostrado que la señalización por giberelinas es capaz de aumentar la actividad de TOR para inducir la germinación en trigo (Smailov et al., 2020), reforzando su rol como señal promotora del crecimiento. En otros sistemas, como en mamíferos, TOR es capaz de inhibir la actividad de AMPK (homólogo funcional de SnRK1) a través de la vía TSC1/TSC2/Rheb (Inoki et al., 2003; Shaw et al., 2004). Mientras que en plantas, aunque la evidencia directa aún no ha sido probada, se ha propuesto que TOR podría inhibir la actividad de SnRK1 mediante la fosforilación de un residuo conservado de manera análoga a lo observado en mamíferos y levaduras (Ingargiola et al., 2020). Alternativamente, dado el carácter antagónico de estas vías, el aumento de la actividad de TOR podría ser suficiente para disminuir la actividad de SnRK1, actuando como un señalizador del crecimiento. En conjunto, podríamos proponer que un aumento en la señalización por GA podría inhibir la actividad de SnRK1 a través de la activación de la vía TOR, limitando así las respuestas a estrés observadas en las plantas deficientes en *CYTc*. En cualquier caso, son necesarios estudios adicionales para confirmar estos mecanismos y establecer su relevancia en este contexto fisiológico.

En otro escenario, podemos sugerir un punto de convergencia a través de la vía de trehalosa-6-fosfato (T6P). Este metabolito, sintetizado por las trehalosa-6-fosfato sintasas (TPS), actúa como un sensor del estado del carbono y modula la actividad de SnRK1, reprimiéndola bajo condiciones de abundancia de carbono (Figuroa & Lunn, 2016; Zhang et al., 2009). En este contexto, T6P promueve la expresión de genes relacionados con la síntesis de aminoácidos, proteínas y nucleótidos, así como con rutas metabólicas vinculadas al ciclo de los ácidos tricarbónicos y el transporte de electrones mitocondrial, respuestas relacionadas, al menos en parte, con la actividad de las auxinas

en este modelo (Morales-Herrera et al., 2023; Zhang et al., 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que T6P determina el crecimiento inducido por temperatura a través de la regulación de la señalización KIN10-PIF4, integrando respuestas al calor con el estado endógeno de azúcares (Hwang et al., 2019). Por otra parte, se ha demostrado que la señalización por GA puede influir sobre rutas del metabolismo de carbohidratos, particularmente de la sacarosa, regulando el crecimiento en plantas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) (González & Cejudo, 2007). Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias directas que vinculen a las GA con la regulación de TPS/T6P. Bajo este marco, podríamos proponer que un aumento de GA favorecería indirectamente un estado de abundancia de carbono, elevando los niveles de T6P, lo que contribuiría a la inhibición de SnRK1 y al desplazamiento del balance metabólico hacia rutas de crecimiento y anabolismo. Aunque esta relación aún requiere confirmación experimental directa, el modelo es consistente con la integración de señales hormonales y energéticas que regulan el crecimiento y la respuesta al estrés en plantas.

En resumen, podemos proponer un modelo en el cual la deficiencia mitocondrial, reflejada en la disminución de CYTc, conduce a la activación basal de la vía de SnRK1, otorgando a las plantas un estado de adaptación que se traduce en una mayor tolerancia al estrés térmico. Esta respuesta estaría relacionada con una mayor acumulación de azúcares solubles, posiblemente actuando como osmoprotectores o señalizadores, así como un aumento basal en el proceso de autofagia, acompañado de un incremento de aminoácidos solubles, los que podrían ser utilizados como fuente alternativa de energía ante situaciones de estrés. Por otra parte, el tratamiento con giberelinas podría inducir la actividad de TOR, e inhibir la actividad de SnRK1, ya sea a través de mecanismos específicos de regulación entre estas vías o mediante la señalización dependiente de T6P. Este cambio se ve reflejado en una inhibición de la respuesta favorable observada en las mutantes, lo cual está asociado a una disminución del proceso de autofagia y, en consecuencia, a una menor acumulación de aminoácidos, así como a modificaciones en la acumulación de azúcares solubles (Figura 27b). Este marco conceptual abre nuevas perspectivas para explorar cómo la interacción entre la señalización mitocondrial, el metabolismo del carbono y las hormonas de crecimiento contribuye a la adaptación de las plantas frente al estrés térmico.

5.6 CONCLUSIONES

A lo largo de este capítulo, hemos descrito dos tipos de respuestas vinculadas a la actividad de citocromo *c*. Por un lado, la deficiencia de *CYTC-1* se asocia a una reestructuración metabólica, posiblemente dependiente de la actividad de la vía de SnRK1, que conferiría a estas plantas un estado de aclimatación, otorgándoles una mayor tolerancia ante condiciones de estrés. Esta respuesta estaría relacionada con una utilización más eficiente de las reservas de azúcares y aminoácidos, esto último vinculado con el proceso de autofagia. Asimismo, estas vías se encuentran íntimamente vinculadas con señalizaciones hormonales, particularmente de giberelinas, las que serían capaces de inhibir estas respuestas al promover programas asociados al crecimiento y desarrollo. Por otra parte, nuestros resultados permiten proponer la hipótesis de que, bajo condiciones de estrés, las plantas activarían respuestas relacionadas con *CYTC-2*, contribuyendo éste a la inducción de respuestas adaptativas al estrés. Si bien estas últimas hipótesis aún deben ser comprobadas experimentalmente, resaltan el papel central de la mitocondria como organela clave en la coordinación de las respuestas a estrés en las plantas. En un contexto de cambio climático a nivel global, comprender el rol de la mitocondria y de los mecanismos que optimizan el uso de recursos energéticos en las plantas resulta fundamental para el desarrollo de herramientas biotecnológicas orientadas a mejorar el crecimiento y la tolerancia a condiciones ambientales desfavorables.

CAPÍTULO 3:

*“IMPLICANCIAS DE LA EXPRESIÓN TEJIDO-ESPECÍFICA
DE CYT_c EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE
A.thaliana”*

6 CAPITULO 3

6.1 INTRODUCCION

En plantas, la regulación del crecimiento depende de un conjunto de procesos que ocurren simultáneamente y que involucran proliferación, elongación y diferenciación celular en distintos órganos. Tras la germinación, el crecimiento postembrionario se sostiene a partir de células madre localizadas en los meristemas apicales del tallo (SAM) y de la raíz (RAM), que actúan como centros organizadores del crecimiento (Jürgens, 2001). En el SAM, la producción continua de células permite la formación de hojas y brotes en el tejido aéreo de las plantas, mientras que, en raíces, la organización en zonas de proliferación y elongación controla la expansión del sistema radicular (Chaiwanon et al., 2016). Dado que estos procesos celulares requieren energía y recursos, la demanda energética variará según el estado de desarrollo de la planta y la actividad de cada tejido, lo que implica una integración entre señales de crecimiento y estados metabólicos de las células.

La importancia de la generación de energía por parte de las mitocondrias en plantas es menos evidente que en organismos no fotosintéticos, debido a que en las plantas gran parte de la energía se obtiene a partir de la luz mediante la fotosíntesis, que ocurre en los cloroplastos. Es por esto que el estudio de la función mitocondrial en plantas es necesario para entender el papel de esta organela en el funcionamiento vegetal. Existen evidencias que indican que la biogénesis mitocondrial en plantas es un proceso regulado, ya que distintos tipos celulares presentan diferente número de mitocondrias por célula y diferentes niveles de transcritos de algunos genes de proteínas mitocondriales (Welchen et al., 2014). Además de esto, existen señales que se originan en las mitocondrias y que impactan en el funcionamiento celular global (Kleine & Leister, 2016).

Como hemos descrito en los capítulos anteriores, trabajos previos del laboratorio han propuesto al CYTc como un elemento esencial para la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas, así como para la respuesta a estrés. Hemos demostrado que las líneas mutantes dobles homocigotas, nulas en *CYTC-2* y deficientes en *CYTC-1* (*cytc-1b2a* y *cytc-1b2b*), presentan un retraso en el crecimiento y el desarrollo (Welchen et al., 2012), mientras que la sobreexpresión de *CYTC-1* o *CYTC-2* (*35S:CYTC-1* y *35S:CYTC-2*) utilizando el promotor constitutivo *35SCaMV* produce un efecto contrario al de la mutación, es decir un mayor crecimiento de las raíces, un aumento en el tamaño de las rosetas y un adelanto en el inicio de la etapa reproductiva (Racca et al., 2018). En cuanto a los patrones de expresión, el gen *CYTC-1* se expresa

preferentemente en regiones meristemáticas y tejidos con alta tasa de proliferación, como el ápice del tallo, el ápice de las raíces principales y secundarias y los primordios de las hojas, mientras que el gen *CYTC-2* se expresa principalmente en haces vasculares, anteras y polen (Welchen & Gonzalez, 2005). Si bien *CYTC* es una proteína que sería necesaria durante todas las etapas del desarrollo de la planta, los patrones de expresión observados sugieren que su importancia sería mayor en determinados tejidos o estadios de desarrollo. Considerando que *CYTC-1* se expresa preferentemente en tejidos meristemáticos (Welchen & Gonzalez, 2005), en este capítulo nos proponemos analizar la importancia de este gen desde una perspectiva tejido-específica.

6.2 OBJETIVOS

1. Profundizar la caracterización de plantas con niveles alterados de CYTc, de modo de determinar el papel de esta hemoproteína en procesos tales como el crecimiento y la proliferación celular y el desarrollo de órganos.
2. Determinar cuál es el efecto de suplir la deficiencia de CYTc en tejidos u órganos específicos sobre el crecimiento de otros órganos o tejidos, de modo de evaluar la existencia de una señalización a distancia y, en tal caso, analizar los posibles mecanismos involucrados.

6.3 MATERIALES Y METODOS

Al igual que en los capítulos anteriores, en este capítulo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ecotipo Columbia (*Col-0*). Las mutantes simples en *CYTC-1* (*cytc-1a*, *GK586B10*) fueron descritas en trabajos previos (Welchen et al., 2012). Con el fin de indagar sobre el efecto de CYTc en distintos tejidos, hemos generado herramientas de complementación, que contienen la secuencia codificante del gen *CYTC-1* bajo el control de promotores específicos de tejido, de manera de restaurar la expresión de este gen en sitios puntuales de la planta. Las construcciones se realizaron bajo el control de los promotores del gen *CYCB1;1* (At4g37490), que dirige la expresión en células en división (Beeckman et al., 2001), y del gen *SUC2* (At1g22710), que dirige la expresión en vasculatura (Truernit & Sauer, 1995).

6.3.1 Generación de líneas *cytc-1a* transformantes estables con las construcciones *pCYCB1;1::CYTC-1* y *pSUC2::CYTC-1*

Dado que estas herramientas se encontraban disponibles en el laboratorio, durante esta tesis se procedió a la transformación mediante el método de *floral dip* (Clough & Bent, 1998). Ambas construcciones se encontraban en el vector *pBi101.3* en *Escherichia coli DH5 α* . Los plásmidos se extrajeron utilizando un kit de extracción Wizard™ Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) según las especificaciones del fabricante. Brevemente, las células fueron lisadas por un método alcalino, el lisado se aplicó a una columna de sílice para la unión del ADN y posteriormente se realizaron pasos de lavado para eliminar contaminantes. Finalmente, el ADN plasmídico fue eluido con agua libre de nucleasas y almacenado a -20°C para su posterior análisis.

Los plásmidos se introdujeron en *Agrobacterium tumefaciens LB4404* por el método de electroporación para continuar con la transformación de plantas de *A. thaliana* utilizando el método de *floral dip*. La selección de plantas transformantes positivas se realizó mediante su resistencia al antibiótico kanamicina. En las líneas transformantes obtenidas se confirmó la integración del transgén mutante *cytc-1a* y de la construcción de interés en el genoma vegetal por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para cada construcción (Tabla 1). El ADN genómico se extrajo a partir de tejido de hoja de plantas de dieciséis días siguiendo el protocolo que utiliza CTAB (Doyle & Doyle, 1987). En resumen, el tejido vegetal fue macerado e incubado en un *buffer* de lisis (CTAB, NaCl, EDTA y Tris). Posteriormente, se realizaron extracciones con cloroformo:alcohol isoamílico para separar la fase acuosa,

seguidas de la precipitación con isopropanol frío. Finalmente, el ADN fue lavado, secado y resuspendido en *buffer* TE para su posterior análisis. Se incluyeron en el análisis plantas *WT* y mutantes *cytc-1a* como controles negativo y positivo, respectivamente, para la presencia del transgén mutante *cytc-1a*.

6.3.2 Caracterización morfológica de los genotipos bajo estudio.

Se analizó el crecimiento de las líneas transformantes *pCYCB1;1::CYTC-1* y *pSUC2::CYTC-1* (al menos dos líneas independientes para cada construcción), en comparación con plantas *WT* y mutantes *cytc-1a*. Se midió la duración de las distintas etapas de desarrollo: largo de las raíces, número y tamaño de las hojas y tiempo necesario para alcanzar el estadio reproductivo. Los estudios de crecimiento de la raíz se realizaron mediante el cultivo de plántulas en placas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS) 0.5× y agar 0,8% (p/v) en un fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad durante siete días. Para el análisis de los estadios vegetativo y reproductivo, las plantas fueron cultivadas en sustrato de turba blanca bajo condiciones de días largos (16 h de luz/8 h de oscuridad), a 22–24°C y con un flujo fotónico de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El material fue fotografiado y las mediciones se realizaron sobre las imágenes utilizando el programa ImageJ.

Para estudiar los parámetros celulares afectados, se analizaron las distintas zonas radiculares según indican Ubeda-Tomás et al. (2012). Para ello, se cultivaron plantas durante siete días en placas mantenidas en posición vertical con medio MS que contenía agar 1% (p/v). Las raíces fueron posteriormente teñidas con Yoduro de Propidio 1 μM (Invitrogen®). El análisis se realizó utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP8 con un objetivo seco 20× bajo excitación/emisión de 488/498-531 nm. Para cada genotipo, se cuantificó el tamaño de las células maduras, el número de células y el tamaño de la zona meristemática, y el tamaño de la zona de elongación. Las mediciones se realizaron sobre las imágenes utilizando el programa ImageJ.

6.3.3 Tinción de GUS

Se realizó la tinción histoquímica de la actividad de β -glucuronidasa (GUS) en plántulas de 4 días de edad, siguiendo el método reportado por Li (2011). Brevemente, las plántulas fueron fijadas en tampón TBS (10X: 100 mM Tris, 500 mM NaCl) suplementado con 0,4% formaldehído y luego lavadas para eliminar el exceso de fijador. Posteriormente, los tejidos se incubaron en una solución de tinción compuesta por

tampón fosfato (50 mM), Triton X-100, ferrocianuro de potasio, ferricianuro de potasio y 1 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronido (X-Gluc) como sustrato cromogénico. La incubación se realizó a 37°C en oscuridad hasta la aparición de la coloración azul característica. Finalmente, las muestras fueron aclaradas mediante una serie creciente de etanol para remover la clorofila y posteriormente almacenadas en etanol al 70% hasta su análisis y documentación.

6.3.4 *Análisis por Western Blot*

Raíces de plántulas de 7 días de edad fueron separadas del tejido aéreo y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Para el análisis de *Western blot*, se molieron 15 mg de material vegetal en nitrógeno líquido y se extrajeron con 30 μ L de tampón Laemmli 2 \times suplementado con un inhibidor de proteasas (cOmplete; Roche) y 0,2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Las proteínas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min y luego se centrifugaron a 12000 g durante 10 min. Posteriormente, 10 μ L del sobrenadante se separaron en un gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno. La membrana se incubó con los anticuerpos de conejo contra CYTc (AS08 343A, Agrisera; dilución 1:2000) y actina (AS13 2640, Agrisera; dilución 1:10000) como control de carga. La detección con anticuerpos secundarios se realizó con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Agrisera; dilución 1:50000) y el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific).

6.4 RESULTADOS

6.4.1 *La expresión tejido-específica de CYTC-1 es capaz de recuperar el crecimiento de las rosetas y el tiempo de floración en plantas deficientes en este gen.*

Como se detalló previamente, la expresión de *CYTC-1* se ha observado principalmente en tejidos meristemáticos, mientras que *CYTC-2* presenta expresión preferencial en tejido vascular (Welchen & Gonzalez, 2005). Por otra parte, las mutantes simples en *CYTC-1* presentan alteraciones en el crecimiento mientras que las mutantes en *CYTC-2* no presentan diferencias evidentes en relación con plantas *WT* (Welchen et al., 2012). Para evaluar el rol del CYTc en distintos tejidos, se transformaron plantas de *A. thaliana* mutantes *cytc-1a* con construcciones que dirigen la expresión de *CYTC-1* específicamente a tejidos en proliferación (*pCYCB1;1::CYTC-1*) o a la vasculatura

(*pSUC2::CYTC-1*), utilizando promotores previamente caracterizados para estos dominios de expresión (Beeckman et al., 2001; Truernit & Sauer, 1995).

Nuestros resultados muestran que, como se ha descrito anteriormente, las plantas deficientes en *CYTc* presentaron alteraciones en el crecimiento y el desarrollo, evidenciadas por rosetas de menor tamaño y un mayor tiempo requerido para la transición a estadio reproductivo en comparación con plantas *WT* (Figura 28a-b). En contraste, las líneas mutantes complementadas mostraron una reversión del fenotipo, es decir, en estas líneas, el tamaño de la roseta, el tiempo de aparición del escapo floral y el número de hojas al momento del cambio al estadio reproductivo recuperaron valores comparables a los observados en plantas *WT*, independientemente del promotor utilizado (Figura 28a-b).

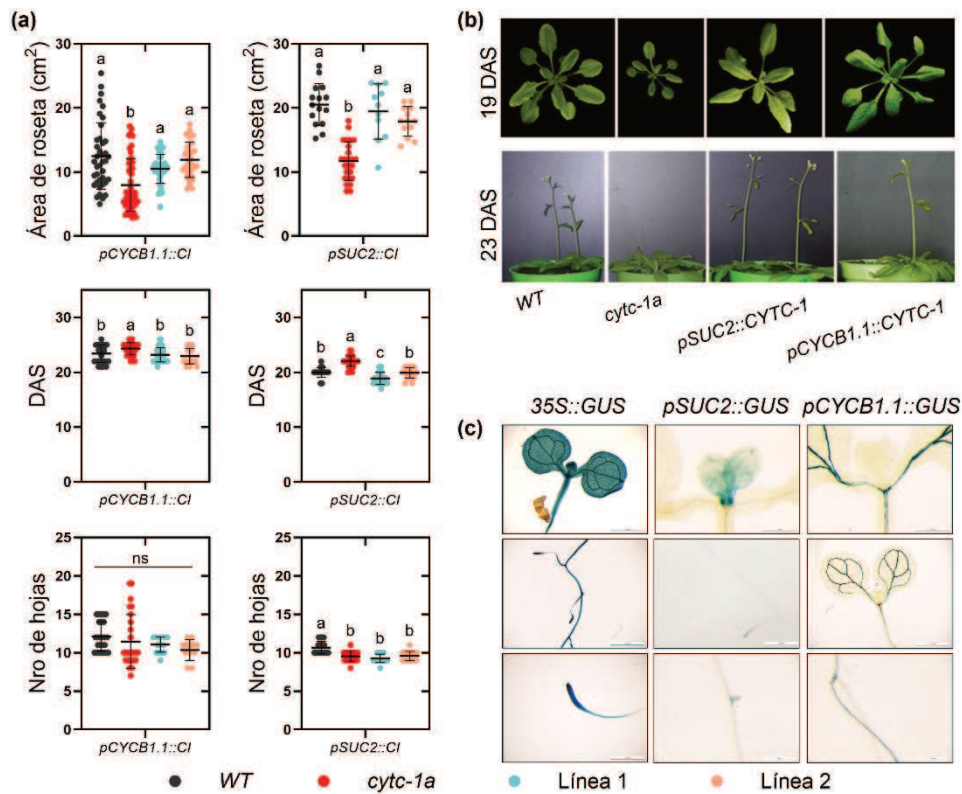


Figura 28. La expresión de *CYTC-1* en diferentes tejidos es capaz de recuperar el crecimiento de las mutantes *cytc-1a*. (a) Tamaño de la roseta de plantas de 19 días, número de hojas al momento del cambio a estadio reproductivo y tiempo de aparición del escapo floral (medido en días después de la siembra: DAS). Las plantas fueron cultivadas a una temperatura de 22-24°C y una intensidad lumínica aproximada de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con las plantas *WT* en cada conjunto de datos. (n= 13-40; p <0,05; ANOVA). Los experimentos se realizaron al menos tres veces obteniendo resultados similares. (b) Imagen representativa de las cuantificaciones presentadas en (a). DAS: días después de la siembra. (c) Tinción de GUS en plántulas cultivadas en 0.5× MS agar 0.8% (p/v) que expresan el gen reportero *GUS* bajo los promotores de los genes *SUC2* y *CYCB1;1* o el promotor constitutivo 35SCaMV. Escala: 1 mm.

Para confirmar que los promotores utilizados dirigen la expresión en los sitios esperados, se realizó un análisis con construcciones que contienen el gen reportero *GUS* bajo el control de dichos promotores. Los resultados indicaron que tanto el promotor *CYCB1;1* como el promotor *SUC2* reprodujeron los patrones de expresión previamente descritos para estos genes (Figura 28c). En particular, la expresión de *pCYCB1;1::GUS* se detectó en regiones meristemáticas, incluyendo el ápice de la raíz (tanto primaria como laterales) y el meristema apical del tallo, extendiéndose hacia los primordios foliares (Figura 28c), en concordancia con lo reportado previamente (Beeckman et al., 2001). Por su parte, la expresión de *pSUC2::GUS* se restringió a la vasculatura (Figura 28c), de acuerdo con descripciones previas para este promotor (Truernit & Sauer, 1995). En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión tejido-específica de *CYTC-1* en tejidos particulares es suficiente para restaurar el crecimiento de la roseta y la transición al estadio reproductivo en plantas deficientes en este gen.

6.4.2 *La expresión tejido-específica de CYTC-1 se vincula con distintos patrones de recuperación del crecimiento radicular en mutantes cytc-1a.*

El crecimiento radicular ocurre a lo largo de un eje organizado en zonas con funciones diferenciadas, que incluyen la región meristemática, de transición y de elongación (Figura 29a; Salvi et al., 2020; Ubeda-Tomás et al., 2012). En la zona meristemática predomina la proliferación celular, mientras que en la zona de elongación el aumento del tamaño celular contribuye principalmente a la extensión de la raíz (Verbelen et al., 2006). En este contexto, se analizó el crecimiento radicular en líneas complementadas que dirigen la expresión de *CYTC-1* mediante los promotores de los genes *SUC2* y *CYCB1;1*. Nuestros resultados indican que la longitud total de la raíz se recuperó parcialmente en ambas líneas complementadas en comparación con las plantas deficientes en *CYTc* (Figura 29b).

Cuando analizamos los parámetros celulares asociados al crecimiento radicular, observamos que las plantas deficientes en *CYTc* presentaron alteraciones tanto en el número de células y el tamaño de la zona meristemática como en el tamaño de la zona de elongación y de las células maduras (Figura 29b–d). En las líneas complementadas, el efecto sobre cada zona de la raíz dependió del promotor utilizado. En las plantas que expresan *CYTC-1* bajo el control del promotor del gen *SUC2*, la recuperación del largo radicular se asoció principalmente a un aumento en el tamaño de las células maduras elongadas. En contraste, en las líneas complementadas con *pCYCB1;1::CYTC-1*, la

recuperación se observó mayoritariamente en la zona meristemática, reflejada en un aumento del tamaño y el número de células de esta región (Figura 29b–d).

Por otra parte, se analizaron los niveles de proteína CYTc en tejido radicular mediante *Western blot*. Las líneas complementadas presentaron un incremento en los niveles de proteína en comparación con las plantas mutantes *cytc-1a* (Figura 29e-f). En conjunto, estos resultados indican que la expresión tejido-específica de *CYTC-1* se asocia con la recuperación del crecimiento radicular, a través de contribuciones diferenciales en las regiones meristemática y de elongación, según el dominio de expresión conferido por cada promotor, destacando la importancia de CYTc para el crecimiento de distintas zonas de la raíz.

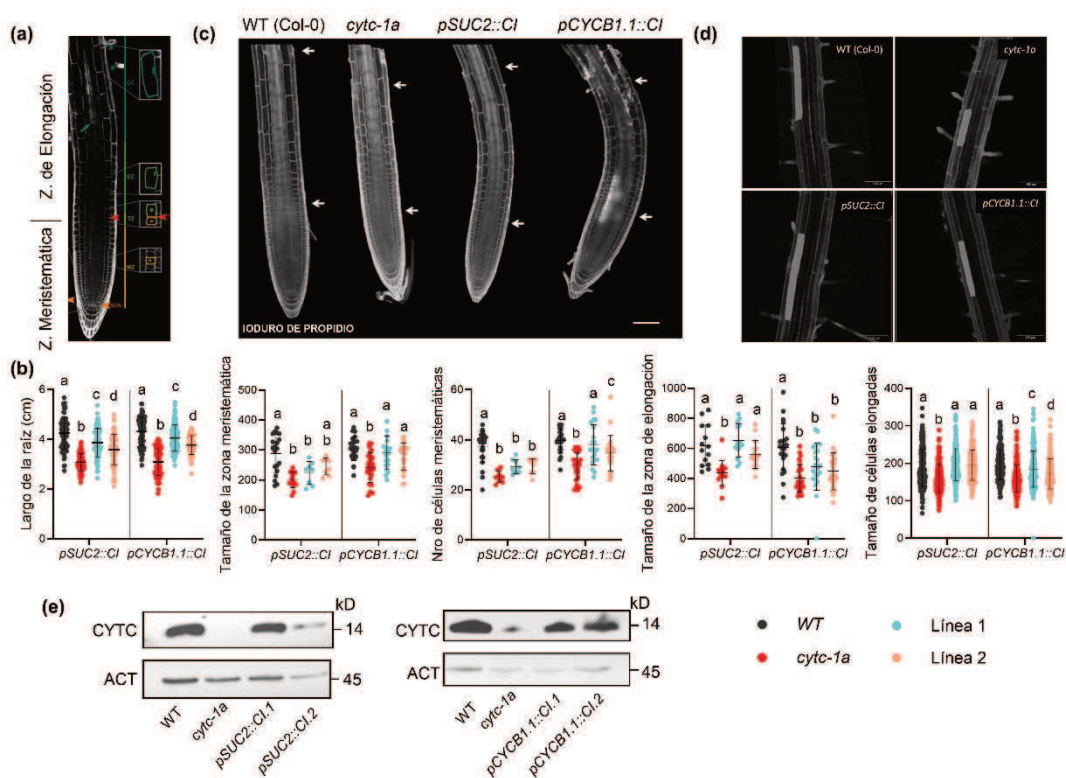


Figura 29. El desarrollo radicular varía en función de la región de la raíz en la que se expresa *CYTC-1*. (a) Imagen ilustrativa de las zonas radiculares adaptada de Salvi et al. (2020). (b) Cuantificación del largo de la raíz, tamaño y número de células de la zona meristemática, tamaño de la zona de elongación y tamaño de las células maduras de plantas WT, mutantes *cytc-1a* y líneas que dirigen la expresión de CYTc bajo los promotores de los genes *SUC2* y *CYCB1;1* (*pSUC2::CYTC-1* y *pCYCB1;1::CYTC-1* respectivamente). Las plantas se cultivaron durante 7 días en placas con medio MS que contenía agar 1% (p/v), se tiñeron con yoduro de propidio 1 µM (Invitrogen®) y se observaron mediante microscopía confocal bajo una excitación/emisión de 488/498-531 nm. Se tomaron entre 8 y 10 fotos de cada raíz. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (n = 9-26 para zonas radiculares y largo de raíces; n > 200 para células elongadas, tomadas de al menos 9 raíces; p < 0,05; ANOVA). (c-d) Imágenes adquiridas por microscopía confocal representativas de las zonas meristemáticas (c) y de las células elongadas (d). Escala: 100 µm. (e) Análisis por *Western Blot* de raíces de plántulas de 7 días de edad, cultivadas en medio MS suplementado con agar 1% (p/v) en

condiciones de día largo (16 h de luz/8 h de oscuridad). Se emplearon anticuerpos anti-CYTc y anti-Actina para analizar los niveles de CYTc y controlar la carga respectivamente.

En conjunto, nuestros resultados indican que la expresión de *CYTC-1* es suficiente para recuperar el crecimiento aéreo de las plantas deficientes en CYTc (Racca et al., 2018; Welchen et al., 2012), ya sea cuando su expresión se restituye en tejidos meristemáticos como cuando se dirige su expresión a la vasculatura. Esta recuperación no solo se refleja en el crecimiento vegetativo, sino también en el desarrollo, evidenciado por la restauración del tiempo de aparición del escapo floral en las plantas complementadas. Estos resultados podrían revelar la existencia de un componente tejido-específica que se traduce en efectos sistémicos. En raíces, el impacto de la expresión de *CYTC-1* depende del sitio donde se dirige su expresión, lo que sugiere que los mecanismos que conducen a la recuperación del crecimiento y desarrollo podrían estar condicionados por el contexto tisular en el que se restablece la actividad mitocondrial. Sin embargo, serán necesarios estudios adicionales que permitan confirmar estas hipótesis y dilucidar los mecanismos subyacentes.

6.5 DISCUSION

La regulación del crecimiento y el desarrollo en plantas ocurre de manera dependiente del estadio ontogénico y se sustenta en la coordinación de diferentes procesos celulares como la proliferación, la elongación y la diferenciación celular. La contribución relativa de cada uno de estos procesos varía según el contexto tisular y determina los patrones de crecimiento observados en los distintos órganos (De Veylder et al., 2007; Donnelly et al., 1999). La proliferación celular predomina en las regiones meristemáticas y está controlada por redes hormonales específicas: en el meristema apical del tallo (SAM), la actividad proliferativa depende principalmente del balance entre citoquininas y auxinas, junto con la acción de factores de transcripción como *WUSCHEL* y *CLAVATA*, que regulan el mantenimiento de las células madres en el meristema (Leibfried et al., 2005; Shpak & Uzair, 2025; Somssich et al., 2016). De manera análoga, en el meristema apical de la raíz (RAM) la proliferación está organizada en el centro quiescente y regulada por gradientes hormonales de auxinas y citoquininas (Petricka et al., 2012; Zhang et al., 2013). En contraste, la elongación celular ocurre principalmente en tejidos en proceso de diferenciación y constituye el principal mecanismo de crecimiento en órganos ya formados. Este proceso está asociado a la remodelación de la pared celular, mediada por proteínas como las expansinas, y a la posterior entrada

de agua impulsada por la presión de turgencia, lo que permite la expansión celular (Ali et al., 2023; Pacifici et al., 2018).

A nivel molecular, la importancia de la proliferación celular en la determinación del tamaño de órganos ha sido ampliamente documentada. Se ha reportado que la deficiencia en ciclinas de tipo B (CYCB), componentes clave de la maquinaria del ciclo celular que regulan la transición G2/M, compromete la proliferación celular en los meristemas y, en consecuencia, impacta sobre el crecimiento generando raíces más cortas y rosetas más pequeñas (Romeiro Motta et al., 2021; Weimer et al., 2016). Adicionalmente, estudios previos han demostrado que la actividad mitocondrial es esencial para el correcto desarrollo y mantenimiento de la actividad meristemática en plantas, ya que las células de estas regiones presentan una elevada demanda energética asociada a la proliferación celular activa (Van Aken et al., 2007; Wang et al., 2019; Zhou et al., 2011). En este sentido, nuestros resultados refuerzan la importancia de la expresión de *CYTC-1* en los meristemas, reflejada en la recuperación del tamaño de las rosetas y raíces y el tiempo de floración en plantas complementadas con la construcción que contiene el promotor de ciclina. Además, la expresión de *CYTC-1* en el RAM fue suficiente para restaurar el tamaño del meristema radicular y el número de células en este tejido, lo que sugiere que la recuperación del crecimiento estaría asociada, al menos en parte, con la actividad proliferativa.

Por otra parte, se ha demostrado que las células vasculares, particularmente las células acompañantes del floema, cumplen un rol activo en la regulación del crecimiento vegetal mediante la integración del estado metabólico y la distribución de recursos (López-Salmerón et al., 2019). En *Arabidopsis*, la expresión del gen *SUC2* en células acompañantes es esencial para la carga de sacarosa al floema, ya que plantas mutantes en este gen provocan defectos severos en la partición del carbono y reducción del crecimiento, generando desarrollo retardado, crecimiento atrofiado y esterilidad (Gottwald et al., 2000). Estos antecedentes sugieren que *SUC2* condicionaría la disponibilidad de carbono en los tejidos sumidero, lo cual impacta directamente sobre los procesos de crecimiento (Wippel & Sauer, 2012). En este contexto, nuestros resultados muestran que la expresión de *CYTC-1* bajo el promotor del gen *SUC2* es suficiente para recuperar el crecimiento y desarrollo de la parte aérea, alcanzando valores similares a los observados para plantas *WT*. Considerando que mutantes *cytc-1a* presentan una acumulación de almidón y azúcares en etapas vegetativas (capítulo 2 de esta tesis; Racca et al., 2018), es posible que la recuperación del fenotipo en las líneas complementadas *pSUC2::CYTC-1* esté relacionada con una utilización de las reservas de carbono una vez que se recupera la actividad mitocondrial.

En particular, la elongación celular depende de la provisión de precursores necesarios para la expansión celular, así como de la señalización de azúcares y hormonas que induzcan el crecimiento (Braidwood et al., 2014; Kircher & Schopfer, 2012; Zluhan-Martínez et al., 2021). Estos antecedentes explicarían por qué la recuperación del crecimiento de la raíz en las líneas *pSUC2::CYTC-1* se da por la expansión de las células elongadas. En contraste, esta expresión tejido-específica no fue capaz de recuperar el tamaño y número de células del meristema. Esto podría estar relacionado con que la actividad meristemática se encuentra regulada principalmente por redes hormonales, señalización de la vía de TOR y el control del ciclo celular, más que por la disponibilidad de carbono *per se* (Lee et al., 2013; Mohammed et al., 2018). En consecuencia, modificaciones en la distribución de carbono ya disponible en las plantas mutantes *cytc-1a* pueden no traducirse en cambios en el tamaño o la actividad meristemática. Podríamos concluir que la expresión tejido-específica de genes mitocondriales puede generar efectos sistémicos sobre el crecimiento de la planta, aunque los mecanismos mediante los cuales estas señales se integran y coordinan aún requieren ser esclarecidos.

6.6 CONCLUSIONES

En este capítulo hemos demostrado la importancia de la expresión de CYTc para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Asimismo, se estableció un vínculo entre la expresión del gen *CYTC-1* en tejidos específicos y el crecimiento de distintos órganos de la planta, evidenciando un rol central de *CYTC-1* en este proceso. Finalmente, este trabajo resalta la importancia de abordar el estudio del crecimiento vegetal desde una perspectiva tejido-específica, para entender cómo se coordinan los diferentes niveles regulatorios que gobiernan el mismo.

CONCLUSIONES GENERALES

7 CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de esta tesis hemos profundizado en la caracterización de plantas deficientes en CYTc, particularmente desde el punto de vista de su crecimiento y respuestas a estrés abiótico. En este sentido, demostramos que la deficiencia en el crecimiento de plantas mutantes en *CYTC-1* está estrechamente vinculada con la activación de SnRK1 como vía de señalización ante condiciones de deficiencia energética. La activación de esta vía, además, les confiere a las plantas mayor tolerancia a condiciones desfavorables.

En segundo lugar, demostramos que la deficiencia mitocondrial originada por una disminución en los niveles de CYTc se asocia con una optimización en el uso de los recursos metabólicos vinculados con la producción alternativa de energía, como son los aminoácidos, cuya acumulación se da por un aumento de la actividad de la vía de autofagia. Esta optimización de recursos se correlaciona con la menor sensibilidad de plantas deficientes en CYTc a diferentes tipos de estrés, como oscuridad extendida y estrés térmico. Adicionalmente, observamos que estos procesos se relacionan con la homeostasis hormonal, al menos a nivel de la vía de giberelinas.

Por último, en relación con el rol del CYTc en el desarrollo de órganos, demostramos su importancia para el desarrollo tejido-específico, particularmente en el desarrollo de la raíz, donde la expresión localizada del mismo en tejidos en proliferación o en tejido vascular es capaz de promover en forma específica el crecimiento del meristema o la elongación celular, respectivamente.

En conjunto, los resultados presentados a lo largo de esta tesis permiten integrar la actividad mitocondrial, particularmente a través de la vía de CYTc, como un componente central en la coordinación entre el estado energético celular, las vías reguladoras del crecimiento y las respuestas a estrés en plantas. Si bien los mecanismos moleculares que subyacen a esta función señalizadora aún se encuentran bajo estudio, la evidencia presentada en este trabajo aporta nueva información para comprender cómo las alteraciones en la actividad mitocondrial pueden integrarse con distintas vías reguladoras a nivel celular, tisular y sistémico. En este marco, los hallazgos de esta tesis abren nuevas preguntas y líneas de investigación que permitirán comprender el rol de la mitocondria como un componente clave en la adaptación y la plasticidad vegetal frente a condiciones ambientales cambiantes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., & Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, *60*(4), 1085–1092. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern301>
- Agbemafle, W., Wong, M. M., & Bassham, D. C. (2023). Transcriptional and post-translational regulation of plant autophagy. *Journal of Experimental Botany*, *74*(19), 6006–6022. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad211>
- Ali, O., Cheddadi, I., Landrein, B., & Long, Y. (2023). Revisiting the relationship between turgor pressure and plant cell growth. *New Phytologist*, *238*(1), 62–69. <https://doi.org/10.1111/nph.18683>
- Anderson, G. H., Veit, B., & Hanson, M. R. (2005). The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biology*, *3*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-12>
- Araújo, W. L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T. R., Tohge, T., Krahnert, I., Witt, S., Obata, T., Schauer, N., Graham, I. A., Leaver, C. J., & Fernie, A. R. (2010). Identification of the 2-Hydroxyglutarate and Isovaleryl-CoA Dehydrogenases as Alternative Electron Donors Linking Lysine Catabolism to the Electron Transport Chain of Arabidopsis Mitochondria. *The Plant Cell*, *22*(5), 1549–1563. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075630>
- Baena-González, E. (2010). Energy Signaling in the Regulation of Gene Expression during Stress. *Molecular Plant*, *3*(2), 300–313. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp113>
- Baena-González, E., & Lunn, J. E. (2020). SnRK1 and trehalose 6-phosphate – two ancient pathways converge to regulate plant metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology, Physiology and Metabolism*, *55*, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.01.010>
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, *448*(7156), 938–942. <https://doi.org/10.1038/nature06069>
- Baena-González, E., & Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science*, *13*(9), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.06.006>
- Baker, N. R., Harbinson, J., & Kramer, D. M. (2007). Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant, Cell & Environment*, *30*(9), 1107–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01680.x>
- Bantan-Polak, T., Kassai, M., & Grant, K. B. (2001). A Comparison of Fluorescamine and Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde Fluorogenic Reagents for Microplate-Based Detection of Amino Acids. *Analytical Biochemistry*, *297*(2), 128–136. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5338>
- Barrada, A., Djendli, M., Desnos, T., Mercier, R., Robaglia, C., Montané, M.-H., & Menand, B. (2019). A TOR-YAK1 signaling axis controls cell cycle, meristem activity and plant growth in Arabidopsis. *Development*, *146*(3), dev171298. <https://doi.org/10.1242/dev.171298>
- Barreto, P., Koltun, A., Nonato, J., Yassitepe, J., Maia, I. de G., & Arruda, P. (2022). Metabolism and Signaling of Plant Mitochondria in Adaptation to Environmental Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911176>
- Barrios, W. E. W. B., & Gouveia, D. onçalves. (2023). *RNA Extraction Protocol for Leaves with High Content of Secondary Metabolites*. <https://www.protocols.io/view/rna-extraction-protocol-for-leaves-with-high-conte-csmawc2e>
- Barros, J. A. S., Cavalcanti, J. H. F., Medeiros, D. B., Nunes-Nesi, A., Avin-Wittenberg, T., Fernie, A. R., & Araújo, W. L. (2017). Autophagy Deficiency Compromises Alternative Pathways of Respiration following Energy Deprivation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, *175*(1), 62–76. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01576>
- Beeckman, T., Burssens, S., & Inzé, D. (2001). The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *52*(suppl_1), 403–411. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.403
- Belda-Palazón, B., Adamo, M., Valerio, C., Ferreira, L. J., Confraria, A., Reis-Barata, D., Rodrigues, A., Meyer, C., Rodriguez, P. L., & Baena-González, E. (2020). A dual function of SnRK2 kinases in the regulation of SnRK1 and plant growth. *Nature Plants*, *6*(11), 1345–1353. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00778-w>
- Belda-Palazón, B., Costa, M., Beeckman, T., Rolland, F., & Baena-González, E. (2022). ABA represses TOR and root meristem activity through nuclear exit of the SnRK1 kinase.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(28), e2204862119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2204862119>
- Belt, K., Huang, S., Thatcher, L. F., Casarotto, H., Singh, K. B., Van Aken, O., & Millar, A. H. (2017). Salicylic Acid-Dependent Plant Stress Signaling via Mitochondrial Succinate Dehydrogenase. *Plant Physiology*, 173(4), 2029–2040. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00060>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Braidwood, L., Breuer, C., & Sugimoto, K. (2014). My body is a cage: Mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist*, 201(2), 388–402. <https://doi.org/10.1111/nph.12473>
- Braun, H.-P. (2020). The Oxidative Phosphorylation system of the mitochondria in plants. *Mitochondrion*, 53, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.04.007>
- Broda, M., Khan, K., O’Leary, B., Pružinská, A., Lee, C. P., Millar, A. H., & Van Aken, O. (2021). Increased expression of ANAC017 primes for accelerated senescence. *Plant Physiology*, 186(4), 2205–2221. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab195>
- Broeckx, T., Hulsmans, S., & Rolland, F. (2016). The plant energy sensor: Evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6215–6252. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw416>
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J.-F., Wu, S.-H., Swidzinski, J., Ishizaki, K., & Leaver, C. J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 42(4), 567–585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02399.x>
- Busi, M. V., Gomez-Lobato, M. E., Rius, S. P., Turowski, V. R., Casati, P., Zabaleta, E. J., Gomez-Casati, D. F., & Araya, A. (2011). Effect of Mitochondrial Dysfunction on Carbon Metabolism and Gene Expression in Flower Tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 4(1), 127–143. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq065>
- Canal, M. V., Mansilla, N., Gras, D. E., Ibarra, A., Figueroa, C. M., Gonzalez, D. H., & Welchen, E. (2024). Cytochrome c levels affect the TOR pathway to regulate growth and metabolism under energy-deficient conditions. *New Phytologist*, 241(5), 2039–2058. <https://doi.org/10.1111/nph.19506>
- Castro-Camba, R., Sánchez, C., Vidal, N., & Vielba, J. M. (2022). Interactions of Gibberellins with Phytohormones and Their Role in Stress Responses. *Horticulturae*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030241>
- Chaiwanon, J., Wang, W., Zhu, J.-Y., Oh, E., & Wang, Z.-Y. (2016). Information Integration and Communication in Plant Growth Regulation. *Cell*, 164(6), 1257–1268. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.044>
- Chan, A., Carianopol, C., Tsai, A. Y.-L., Varatharajah, K., Chiu, R. S., & Gazzarrini, S. (2017). SnRK1 phosphorylation of FUSCA3 positively regulates embryogenesis, seed yield, and plant growth at high temperature in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4219–4231. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx233>
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113–116. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., & Kreis, M. (2002). Expression Profiling of the Whole Arabidopsis Shaggy-Like Kinase Multigene Family by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Plant Physiology*, 130(2), 577–590. <https://doi.org/10.1104/pp.009175>
- Chen, H., Dong, J., & Wang, T. (2021). Autophagy in Plant Abiotic Stress Management. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22084075>
- Chen, L., Liao, B., Qi, H., Xie, L.-J., Huang, L., Tan, W.-J., Zhai, N., Yuan, L.-B., Zhou, Y., Yu, L.-J., Chen, Q.-F., Shu, W., & Xiao, S. (2015). Autophagy contributes to regulation of the hypoxia response during submergence in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy*, 11(12), 2233–2246. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1112483>
- Chen, L., Su, Z.-Z., Huang, L., Xia, F.-N., Qi, H., Xie, L.-J., Xiao, S., & Chen, Q.-F. (2017). The AMP-Activated Protein Kinase KIN10 Is Involved in the Regulation of Autophagy in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01201>
- Chen, Yuxin, Chen, Yongsheng, Shi, C., Huang, Z., Zhang, Y., Li, S., Li, Y., Ye, J., Yu, C., Li, Z., Zhang, X., Wang, J., Yang, H., Fang, L., & Chen, Q. (2018). SOAPnuke: A MapReduce

- acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *GigaScience*, 7(1), gix120. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix120>
- Cho, Y.-H., Hong, J.-W., Kim, E.-C., & Yoo, S.-D. (2012). Regulatory Functions of SnRK1 in Stress-Responsive Gene Expression and in Plant Growth and Development. *Plant Physiology*, 158(4), 1955–1964. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189829>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium* -mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
- Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L., & Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of Experimental Biology*, 217(1), 67–75. <https://doi.org/10.1242/jeb.089938>
- Coronel, F. P., Gras, D. E., Canal, M. V., Roldan, F., Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2025). Cytochrome c levels link mitochondrial function to plant growth and stress responses through changes in SnRK1 pathway activity. *The Plant Journal*, 121(2), e17215. <https://doi.org/10.1111/tpj.17215>
- Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S., Hodges, M., Vidal, J., & Thomas, M. (2010). Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* Sucrose Nonfermenting 1-related Protein Kinase 1 (AtSnRK1) and Its Activating Kinase (AtSnAK) Determines Their Catalytic Activities. *Journal of Biological Chemistry*, 285(16), 12071–12077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.079194>
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C. A., & Baena-González, E. (2014). Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00190>
- Däschner, K., Couée, I., & Binder, S. (2001). The Mitochondrial Isovaleryl-Coenzyme A Dehydrogenase of *Arabidopsis* Oxidizes Intermediates of Leucine and Valine Catabolism. *Plant Physiology*, 126(2), 601–612. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.601>
- De Clercq, I., Vermeirssen, V., Van Aken, O., Vandepoele, K., Murcha, M. W., Law, S. R., Inzé, A., Ng, S., Ivanova, A., Rombaut, D., van de Cotte, B., Jaspers, P., Van de Peer, Y., Kangasjärvi, J., Whelan, J., & Van Breusegem, F. (2013). The Membrane-Bound NAC Transcription Factor ANAC013 Functions in Mitochondrial Retrograde Regulation of the Oxidative Stress Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(9), 3472–3490. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117168>
- de Hoon, M. J. L., Imoto, S., Nolan, J., & Miyano, S. (2004). Open source clustering software. *Bioinformatics*, 20(9), 1453–1454. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth078>
- De Smet, I., Quint, M., & van Zanten, M. (2021). High and low temperature signalling and response. *Journal of Experimental Botany*, 72(21), 7339–7344. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab447>
- De Veylder, L., Beeckman, T., & Inzé, D. (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 655–665. <https://doi.org/10.1038/nrm2227>
- Del-Saz, N. F., Ribas-Carbo, M., McDonald, A. E., Lambers, H., Fernie, A. R., & Florez-Sarasa, I. (2018). An In Vivo Perspective of the Role(s) of the Alternative Oxidase Pathway. *Trends in Plant Science*, 23(3), 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.006>
- Dojcinovic, D., Krosting, J., Harris, A. J., Wagner, D. J., & Rhoads, D. M. (2005). Identification of a region of the *Arabidopsis* AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression. *Plant Molecular Biology*, 58(2), 159–175. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-5390-1>
- Donnelly, P. M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R. E., & Dengler, N. G. (1999). Ciclo celular y agrandamiento celular en hojas en desarrollo de *Arabidopsis*. *Developmental Biology*, 215(2), 407–419. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9443>
- Dornbusch, T., Lorrain, S., Kuznetsov, D., Fortier, A., Liechti, R., Xenarios, I., & Fankhauser, C. (2012). Measuring the diurnal pattern of leaf hyponasty and growth in *Arabidopsis* – a novel phenotyping approach using laser scanning. *Functional Plant Biology*, 39(11), 860–869. <https://doi.org/10.1071/FP12018>
- Dourmap, C., Roque, S., Morin, A., Caubrière, D., Kerdiles, M., Béguin, K., Perdoux, R., Reynoud, N., Bourdet, L., Audebert, P.-A., Moullec, J. L., & Couée, I. (2020). Stress signalling dynamics of the mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation system in higher plants. *Annals of Botany*, 125(5), 721–736. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz184>

- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *PHYTOCHEMICAL BULLETIN*. <https://worldveg.tind.io/record/33886>
- Dündar, G., Ramirez, V. E., & Poppenberger, B. (2025). The heat shock response in plants: New insights into modes of perception, signaling, and the contribution of hormones. *Journal of Experimental Botany*, *76*(7), 1970–1977. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae419>
- Eckstein, A., Grzyb, J., Hermanowicz, P., Zgłobicki, P., Łabuz, J., Strzałka, W., Dziga, D., & Banaś, A. K. (2021). Arabidopsis Phototropins Participate in the Regulation of Dark-Induced Leaf Senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms22041836>
- Emanuelle, S., Hossain, M. I., Moller, I. E., Pedersen, H. L., van de Meene, A. M. L., Doblin, M. S., Koay, A., Oakhill, J. S., Scott, J. W., Willats, W. G. T., Kemp, B. E., Bacic, A., Gooley, P. R., & Stapleton, D. I. (2015). SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK. *The Plant Journal*, *82*(2), 183–192. <https://doi.org/10.1111/tpj.12813>
- Endo, T., & Wiedemann, N. (2025). Molecular machineries and pathways of mitochondrial protein transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *26*(11), 848–867. <https://doi.org/10.1038/s41580-025-00865-w>
- Eom, S. H., Kim, E., & Hyun, T. K. (2024). HXK, SnRK1, and TOR signaling in plants: Unraveling mechanisms of stress response and secondary metabolism. *Science Progress*, *107*(4), 00368504241301533. <https://doi.org/10.1177/00368504241301533>
- Feng, H., Guan, D., Sun, K., Wang, Y., Zhang, T., & Wang, R. (2013). Expression and signal regulation of the alternative oxidase genes under abiotic stresses. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *45*(12), 985–994. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt094>
- Feng, L., Li, X., Zheng, X.-A., Zheng, Z., Liu, Q.-R., Liu, C., Zhu, Q.-L., Shen, W., Yang, C., Li, H., Wan, X., Zheng, Y., Zhou, J., & Gao, C. (2025). SnRK1 and TOR: Central regulators of autophagy in plant energy stress responses. *aBIOTECH*, *6*(4), 663–679. <https://doi.org/10.1007/s42994-025-00218-3>
- Fettke, J., & Fernie, A. R. (2025). Do storage reserves contribute to plant phenotypic plasticity? *Trends in Plant Science*, *30*(4), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.10.017>
- Figueroa, C. M., & Lunn, J. E. (2016). A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose. *Plant Physiology*, *172*(1), 7–27. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00417>
- Florez-Sarasa, I., Welchen, E., Racca, S., Gonzalez, D. H., Vallarino, J. G., Fernie, A. R., Ribas-Carbo, M., & Del-Saz, N. F. (2021). Cytochrome c Deficiency Differentially Affects the In Vivo Mitochondrial Electron Partitioning and Primary Metabolism Depending on the Photoperiod. *Plants*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/plants10030444>
- Franklin, K. A., Lee, S. H., Patel, D., Kumar, S. V., Spartz, A. K., Gu, C., Ye, S., Yu, P., Breen, G., Cohen, J. D., Wigge, P. A., & Gray, W. M. (2011). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(50), 20231–20235. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110682108>
- Fromm, S., Senkler, J., Eubel, H., Peterhänsel, C., & Braun, H.-P. (2016). Life without complex I: Proteome analyses of an Arabidopsis mutant lacking the mitochondrial NADH dehydrogenase complex. *Journal of Experimental Botany*, *67*(10), 3079–3093. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw165>
- Garmier, M., Carroll, A. J., Delannoy, E., Vallet, C., Day, D. A., Small, I. D., & Millar, A. H. (2008). Complex I Dysfunction Redirects Cellular and Mitochondrial Metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *148*(3), 1324–1341. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125880>
- Geisler, D. A., Pöpke, C., Obata, T., Nunes-Nesi, A., Matthes, A., Schneitz, K., Maximova, E., Araújo, W. L., Fernie, A. R., & Persson, S. (2012). Downregulation of the Δ -Subunit Reduces Mitochondrial ATP Synthase Levels, Alters Respiration, and Restricts Growth and Gametophyte Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(7), 2792–2811. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099424>
- Gilroy, E., & Breen, S. (2022). Interplay between phytohormone signalling pathways in plant defence – other than salicylic acid and jasmonic acid. *Essays in Biochemistry*, *66*(5), 657–671. <https://doi.org/10.1042/EBC20210089>
- Giraud, E., Van Aken, O., Ho, L. H. M., & Whelan, J. (2009). The Transcription Factor ABI4 Is a Regulator of Mitochondrial Retrograde Expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a. *Plant Physiology*, *150*(3), 1286–1296. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139782>
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L. F., Foley, R. C., Anderson, C. R., Carroll, A. J., Millar, A. H., & Singh, K. B. (2011). Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), 10768–10773. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016060108>
- González, M.-C., & Cejudo, F. J. (2007). Gibberellin-regulated expression of neutral and vacuolar invertase genes in petioles of sugar beet plants. *Plant Science*, 172(4), 839–846. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.01.001>
- Gottwald, J. R., Krysan, P. J., Young, J. C., Evert, R. F., & Sussman, M. R. (2000). Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13979–13984. <https://doi.org/10.1073/pnas.250473797>
- Gurrieri, L., Merico, M., Trost, P., Forlani, G., & Sparla, F. (2020). Impact of Drought on Soluble Sugars and Free Proline Content in Selected Arabidopsis Mutants. *Biology*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biology9110367>
- Gutierrez-Beltran, E., Elander, P. H., Dalman, K., Dayhoff, G. W., Moschou, P. N., Uversky, V. N., Crespo, J. L., & Bozhkov, P. V. (2021). Tudor staphylococcal nuclease is a docking platform for stress granule components and is essential for SnRK1 activation in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 40(17), EMBJ2020105043. <https://doi.org/10.15252/emj.2020105043>
- Hamasaki, H., Kurihara, Y., Kuromori, T., Kusano, H., Nagata, N., Yamamoto, Y. Y., Shimada, H., & Matsui, M. (2019). SnRK1 Kinase and the NAC Transcription Factor SOG1 Are Components of a Novel Signaling Pathway Mediating the Low Energy Response Triggered by ATP Depletion. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00503>
- Han, C., Chen, G., Zheng, D., & Feng, N. (2023). Transcriptomic and metabolomic analyses reveal that ABA increases the salt tolerance of rice significantly correlated with jasmonic acid biosynthesis and flavonoid biosynthesis. *Scientific Reports*, 13(1), 20365. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47657-w>
- He, C., Liew, L. C., Yin, L., Lewsey, M. G., Whelan, J., & Berkowitz, O. (2022a). The retrograde signaling regulator ANAC017 recruits the MKK9–MPK3/6, ethylene, and auxin signaling pathways to balance mitochondrial dysfunction with growth. *The Plant Cell*, 34(9), 3460–3481. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac177>
- He, Z., Webster, S., & He, S. Y. (2022b). Growth–defense trade-offs in plants. *Current Biology*, 32(12), R634–R639. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.070>
- Heinemann, B., & Hildebrandt, T. M. (2021). The role of amino acid metabolism in signaling and metabolic adaptation to stress-induced energy deficiency in plants. *Journal of Experimental Botany*, 72(13), 4634–4645. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab182>
- Hendriks, J. H. M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., & Geigenberger, P. (2003). ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of Arabidopsis and Other Plant Species. *Plant Physiology*, 133(2), 838–849. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024513>
- Hernández, J. A., Díaz-Vivancos, P., Acosta-Motos, J. R., Albuquerque, N., Martínez, D., Carrera, E., García-Bruntón, J., & Barba-Espín, G. (2021). Interplay among Antioxidant System, Hormone Profile and Carbohydrate Metabolism during Bud Dormancy Breaking in a High-Chill Peach Variety. *Antioxidants*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/antiox10040560>
- Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araújo, W. L., & Braun, H.-P. (2015). Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant*, 8(11), 1563–1579. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>
- Hirota, T., Izumi, M., Wada, S., Makino, A., & Ishida, H. (2018). Vacuolar Protein Degradation via Autophagy Provides Substrates to Amino Acid Catabolic Pathways as an Adaptive Response to Sugar Starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 59(7), 1363–1376. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy005>
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzländer, M., Belt, K., & Millar, A. H. (2016). The Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Signaling and Stress Response in Plants. *Plant Physiology*, 171(3), 1551–1559. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00166>
- Hulsmans, S., Rodriguez, M., Coninck, B. D., & Rolland, F. (2016). The SnRK1 Energy Sensor in Plant Biotic Interactions. *Trends in Plant Science*, 21(8), 648–661. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.008>
- Hwang, G., Kim, S., Cho, J., Paik, I., Kim, J., & Oh, E. (2019). Trehalose-6-phosphate signaling regulates thermoresponsive hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Reports*, 20(10), EMBR201947828. <https://doi.org/10.15252/embr.201947828>

- Ingargiola, C., Duarte, G. T., Robaglia, C., Leprince, A.-S., & Meyer, C. (2020). The Plant Target of Rapamycin: A Conduc TOR of Nutrition and Metabolism in Photosynthetic Organisms. *Genes*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/genes11111285>
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell*, *115*(5), 577–590. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00929-2)
- Ishizaki, K., Larson, T. R., Schauer, N., Fernie, A. R., Graham, I. A., & Leaver, C. J. (2005). The Critical Role of Arabidopsis Electron-Transfer Flavoprotein:Ubiquinone Oxidoreductase during Dark-Induced Starvation. *The Plant Cell*, *17*(9), 2587–2600. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035162>
- Izumi, M., Hidema, J., & Ishida, H. (2013). Deficiency of autophagy leads to significant changes of metabolic profiles in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, *8*(8), e25023. <https://doi.org/10.4161/psb.25023>
- Jamsheer K, M., Jindal, S., Sharma, Mohan, Awasthi, P., S, S., Sharma, Manvi, Mannully, C. T., & Laxmi, A. (2022). A negative feedback loop of TOR signaling balances growth and stress-response trade-offs in plants. *Cell Reports*, *39*(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110631>
- Jin, S., Wei, M., Wei, Y., & Jiang, Z. (2024). Insights into Plant Sensory Mechanisms under Abiotic Stresses. *Plants*, *13*(14). <https://doi.org/10.3390/plants13141907>
- Jung, C., Nguyen, N. H., & Cheong, J.-J. (2020). Transcriptional Regulation of Protein Phosphatase 2C Genes to Modulate Abscisic Acid Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249517>
- Jürgens, G. (2001). Apical–basal pattern formation in Arabidopsis embryogenesis. *The EMBO Journal*, *20*(14), 3609–3616. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3609>
- Kalve, S., Sizani, B. L., Markakis, M. N., Helmoortel, C., Vandeweyer, G., Laukens, K., Sommen, M., Naulaerts, S., Vissenberg, K., Prinsen, E., & Beemster, G. T. S. (2020). Osmotic stress inhibits leaf growth of *Arabidopsis thaliana* by enhancing ARF-mediated auxin responses. *New Phytologist*, *226*(6), 1766–1780. <https://doi.org/10.1111/nph.16490>
- Kaur, H., Manna, M., Thakur, T., Gautam, V., & Salvi, P. (2021). Imperative role of sugar signaling and transport during drought stress responses in plants. *Physiologia Plantarum*, *171*(4), 833–848. <https://doi.org/10.1111/pp1.13364>
- Keren, I., Tal, L., des Francs-Small, C. C., Araújo, W. L., Shevtsov, S., Shaya, F., Fernie, A. R., Small, I., & Ostersetzer-Biran, O. (2012). nMAT1, a nuclear-encoded maturase involved in the trans-splicing of nad1 intron 1, is essential for mitochondrial complex I assembly and function. *The Plant Journal*, *71*(3), 413–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04998.x>
- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W., & Cuypers, A. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: Extending the traditional concept. *Plant, Cell & Environment*, *36*(7), 1242–1255. <https://doi.org/10.1111/pce.12061>
- Khan, K., Tran, H. C., Mansuroglu, B., Önsell, P., Buratti, S., Schwarzländer, M., Costa, A., Rasmusson, A. G., & Aken, O. V. (2024). Mitochondria-derived reactive oxygen species are the likely primary trigger of mitochondrial retrograde signaling in Arabidopsis. *Current Biology*, *34*(2), 327–342.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.12.005>
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, *12*(4), 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- Kircher, S., & Schopfer, P. (2012). Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(28), 11217–11221. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203746109>
- Kleine, T., & Leister, D. (2016). Retrograde signaling: Organelles go networking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, EBEC 2016: 19th European Bioenergetics Conference, 1857*(8), 1313–1325. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.017>
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, *88*(6), 1058–1070. <https://doi.org/10.1111/tpj.13312>
- Kollist, H., Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Nuhkat, M., Kangasjärvi, J., & Mittler, R. (2019). Rapid Responses to Abiotic Stress: Priming the Landscape for the Signal Transduction

- Network. *Trends in Plant Science*, 24(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.003>
- Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), 909–921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x>
- Koprivova, A., des Francs-Small, C. C., Calder, G., Mugford, S. T., Tanz, S., Lee (이복 레), B.-R., Zechmann, B., Small, I., & Kopriva, S. (2010). Identification of a Pentatricopeptide Repeat Protein Implicated in Splicing of Intron 1 of Mitochondrial *nad7* Transcripts. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32192–32199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147603>
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 4, e06100. <https://doi.org/10.7554/eLife.06100>
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593–1608. <https://doi.org/10.1093/jxb/err460>
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, 13(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Law, S. R., Chrobok, D., Juvany, M., Delhomme, N., Lindén, P., Brouwer, B., Ahad, A., Moritz, T., Jansson, S., Gardeström, P., & Keech, O. (2018). Darkened Leaves Use Different Metabolic Strategies for Senescence and Survival. *Plant Physiology*, 177(1), 132–150. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00062>
- Lee, Y., Lee, W. S., & Kim, S.-H. (2013). Hormonal regulation of stem cell maintenance in roots. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1153–1165. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers331>
- Leibfried, A., To, J. P. C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J., & Lohmann, J. U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, 438(7071), 1172–1175. <https://doi.org/10.1038/nature04270>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, N., Euring, D., Cha, J. Y., Lin, Z., Lu, M., Huang, L.-J., & Kim, W. Y. (2021). Plant Hormone-Mediated Regulation of Heat Tolerance in Response to Global Climate Change. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.627969>
- Li, X. (2011). Histostaining for Tissue Expression Pattern of Promoter-driven GUS Activity in Arabidopsis. *Bio-Protocol*. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.93>
- Li, X., Cai, Z., Liu, X., Wu, Y., Han, Z., Yang, G., Li, S., Xie, Z., Liu, L., & Li, B. (2024). Effects of Gibberellic Acid on Soluble Sugar Content, Organic Acid Composition, Endogenous Hormone Levels, and Carbon Sink Strength in Shine Muscat Grapes during Berry Development Stage. *Horticulturae*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/horticulturae10040346>
- Li, X., Wu, L., Qiu, Y., Wang, T., Zhou, Q., Zhang, Q., Zhang, W., & Liu, Z. (2019). Abscisic Acid Receptors Modulate Metabolite Levels and Phenotype in Arabidopsis Under Normal Growing Conditions. *Metabolites*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/metabo9110249>
- Liao, C.-Y., & Bassham, D. C. (2020). Combating stress: The interplay between hormone signaling and autophagy in plants. *Journal of Experimental Botany*, 71(5), 1723–1733. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz515>
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Et, A. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>
- Liu, T., Arsenault, J., Vierling, E., & Kim, M. (2021). Mitochondrial ATP synthase subunit d, a component of the peripheral stalk, is essential for growth and heat stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 107(3), 713–726. <https://doi.org/10.1111/tpj.15317>
- López-Salmerón, V., Cho, H., Tonn, N., & Greb, T. (2019). The Phloem as a Mediator of Plant Growth Plasticity. *Current Biology*, 29(5), R173–R181. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.01.015>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

- Lu, H.-P., Wang, J.-J., Wang, M.-J., & Liu, J.-X. (2021). Roles of plant hormones in thermomorphogenesis. *Stress Biology*, 1(1), 20. <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00022-1>
- Luo, L., Zhang, P., Zhu, R., Fu, J., Su, J., Zheng, J., Wang, Z., Wang, D., & Gong, Q. (2017). Autophagy Is Rapidly Induced by Salt Stress and Is Required for Salt Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01459>
- Magen, S., Seybold, H., Laloum, D., & Avin-Wittenberg, T. (2022). Metabolism and autophagy in plants—A perfect match. *FEBS Letters*, 596(17), 2133–2151. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14359>
- Mair, A., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Anrather, D., Simeunovic, A., Weiste, C., Valerio, C., Dietrich, K., Kirchlner, T., Nägele, T., Vicente Carbajosa, J., Hanson, J., Baena-González, E., Chaban, C., Weckwerth, W., Dröge-Laser, W., & Teige, M. (2015). SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *eLife*, 4, e05828. <https://doi.org/10.7554/eLife.05828>
- Marash, I., Gupta, R., Anand, G., Leibman-Markus, M., Lindner, N., Israeli, A., Nir, D., Avni, A., & Bar, M. (2024). TOR coordinates cytokinin and gibberellin signals mediating development and defense. *Plant, Cell & Environment*, 47(2), 629–650. <https://doi.org/10.1111/pce.14748>
- Margalha, L., Confraria, A., & Baena-González, E. (2019). SnRK1 and TOR: Modulating growth–defense trade-offs in plant stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 70(8), 2261–2274. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz066>
- Margalha, L., Elias, A., Belda-Palazón, B., Peixoto, B., Confraria, A., & Baena-González, E. (2023). HOS1 promotes plant tolerance to low-energy stress via the SnRK1 protein kinase. *The Plant Journal*, 115(3), 627–641. <https://doi.org/10.1111/tpj.16250>
- Martínez-Fábregas, J., Díaz-Moreno, I., González-Arzola, K., Janocha, S., Navarro, J. A., Hervás, M., Bernhardt, R., Díaz-Quintana, A., & De la Rosa, M. Á. (2013). New Arabidopsis thaliana Cytochrome c Partners: A Look Into the Elusive Role of Cytochrome c in Programmed Cell Death in Plants*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(12), 3666–3676. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.030692>
- Martins, A. O., Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L., & Fernie, A. R. (2018). To Bring Flowers or Do a Runner: Gibberellins Make the Decision. *Molecular Plant*, 11(1), 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.005>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- McLoughlin, F., Marshall, R. S., Ding, X., Chatt, E. C., Kirkpatrick, L. D., Augustine, R. C., Li, F., Otegui, M. S., & Vierstra, R. D. (2020). Autophagy Plays Prominent Roles in Amino Acid, Nucleotide, and Carbohydrate Metabolism during Fixed-Carbon Starvation in Maize. *The Plant Cell*, 32(9), 2699–2724. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00226>
- Menegollo, M., Tessari, I., Bubacco, L., & Szabadkai, G. (2019). Determination of ATP, ADP, and AMP Levels by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography in Cultured Cells. *Methods in Molecular Biology*, 1925, 223–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9018-4_19
- Meng, X., Li, L., De Clercq, I., Narsai, R., Xu, Y., Hartmann, A., Claros, D. L., Custovic, E., Lewsey, M. G., Whelan, J., & Berkowitz, O. (2019). ANAC017 Coordinates Organellar Functions and Stress Responses by Reprogramming Retrograde Signaling. *Plant Physiology*, 180(1), 634–653. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01603>
- Meng, Y., Zhang, N., Li, J., Shen, X., Sheen, J., & Xiong, Y. (2022). TOR kinase, a GPS in the complex nutrient and hormonal signaling networks to guide plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 73(20), 7041–7054. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac282>
- Meyer, E. H., Tomaz, T., Carroll, A. J., Estavillo, G., Delannoy, E., Tanz, S. K., Small, I. D., Pogson, B. J., & Millar, A. H. (2009). Remodeled Respiration in ndufs4 with Low Phosphorylation Efficiency Suppresses Arabidopsis Germination and Growth and Alters Control of Metabolism at Night. *Plant Physiology*, 151(2), 603–619. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141770>
- Meyer, E. H., Welchen, E., & Carrie, C. (2019). Assembly of the Complexes of the Oxidative Phosphorylation System in Land Plant Mitochondria. *Annual Review of Plant Biology*, 70(Volume 70, 2019), 23–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100412>

- Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A. R., & Avin-Wittenberg, T. (2016). Autophagy in Plants – What’s New on the Menu? *Trends in Plant Science*, 21(2), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.008>
- Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L., & Day, D. A. (2011). Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62(Volume 62, 2011), 79–104. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103857>
- Mohammed, B., Bilooei, S. F., Dóczy, R., Grove, E., Railo, S., Palme, K., Ditengou, F. A., Bögre, L., & López-Juez, E. (2018). Converging Light, Energy and Hormonal Signaling Control Meristem Activity, Leaf Initiation, and Growth1[CC-BY]. *Plant Physiology*, 176(2), 1365–1381. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01730>
- Møller, I. M., Rasmusson, A. G., & Van Aken, O. (2021). Plant mitochondria – past, present and future. *The Plant Journal*, 108(4), 912–959. <https://doi.org/10.1111/tj.15495>
- Morales-Herrera, S., Jourquin, J., Coppé, F., Lopez-Galvis, L., De Smet, T., Safi, A., Njo, M., Griffiths, C. A., Sidda, J. D., Mccullagh, J. S. O., Xue, X., Davis, B. G., Van der Eycken, J., Paul, M. J., Van Dijck, P., & Beeckman, T. (2023). Trehalose-6-phosphate signaling regulates lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(40), e2302996120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2302996120>
- Munns, R., & Millar, A. H. (2023). Seven plant capacities to adapt to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 74(15), 4308–4323. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad179>
- Muralidhara, P., Weiste, C., Collani, S., Krischke, M., Kreis, P., Draken, J., Feil, R., Mair, A., Teige, M., Müller, M. J., Schmid, M., Becker, D., Lunn, J. E., Rolland, F., Hanson, J., & Dröge-Laser, W. (2021). Perturbations in plant energy homeostasis prime lateral root initiation via SnRK1-bZIP63-ARF19 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(37), e2106961118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106961118>
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T., & Hakoshima, T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor *GID1*. *Nature*, 456(7221), 459–463. <https://doi.org/10.1038/nature07519>
- Musazade, E., Mrisho, I. I., & Feng, X. (2025). Auxin metabolism and signaling: Integrating independent mechanisms and crosstalk in plant abiotic stress responses. *Plant Stress*, 18, 101034. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2025.101034>
- Nakashima, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Reports*, 32(7), 959–970. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1418-1>
- Ng, S., Clercq, I. D., Aken, O. V., Law, S. R., Ivanova, A., Willems, P., Giraud, E., Breusegem, F. V., & Whelan, J. (2014). Anterograde and Retrograde Regulation of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Proteins during Growth, Development, and Stress. *Molecular Plant*, 7(7), 1075–1093. <https://doi.org/10.1093/mp/issu037>
- Ng, S., Giraud, E., Duncan, O., Law, S. R., Wang, Y., Xu, L., Narsai, R., Carrie, C., Walker, H., Day, D. A., Blanco, N. E., Strand, Å., Whelan, J., & Ivanova, A. (2013b). Cyclin-dependent Kinase E1 (CDKE1) Provides a Cellular Switch in Plants between Growth and Stress Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3449–3459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.416727>
- Ng, S., Ivanova, A., Duncan, O., Law, S. R., Van Aken, O., De Clercq, I., Wang, Y., Carrie, C., Xu, L., Kmiec, B., Walker, H., Van Breusegem, F., Whelan, J., & Giraud, E. (2013a). A Membrane-Bound NAC Transcription Factor, ANAC017, Mediates Mitochondrial Retrograde Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(9), 3450–3471. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113985>
- Nukarinen, E., Nägele, T., Pedrotti, L., Wurzing, B., Mair, A., Landgraf, R., Börnke, F., Hanson, J., Teige, M., Baena-Gonzalez, E., Dröge-Laser, W., & Weckwerth, W. (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Scientific Reports*, 6(1), 31697. <https://doi.org/10.1038/srep31697>
- Oh, G. G. K., O’Leary, B. M., Signorelli, S., & Millar, A. H. (2022). Alternative oxidase (AOX) 1a and 1d limit proline-induced oxidative stress and aid salinity recovery in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 188(3), 1521–1536. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab578>
- Pacifici, E., Di Mambro, R., Dello Ioio, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2018). Acidic cell elongation drives cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *The EMBO Journal*, 37(16), EMBJ201899134. <https://doi.org/10.15252/embj.201899134>

- Pan, R., Jones, A. D., & Hu, J. (2014). Cardiolipin-Mediated Mitochondrial Dynamics and Stress Response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(1), 391–409. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121095>
- Park, Y.-J., Lee, H.-J., Gil, K.-E., Kim, J. Y., Lee, J.-H., Lee, H., Cho, H.-T., Vu, L. D., De Smet, I., & Park, C.-M. (2019). Developmental Programming of Thermonastic Leaf Movement. *Plant Physiology*, 180(2), 1185–1197. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00139>
- Patel, D., & Franklin, K. A. (2009). Temperature-regulation of plant architecture. *Plant Signaling & Behavior*, 4(7), 577–579. <https://doi.org/10.4161/psb.4.7.8849>
- Pedrotti, L., Weiste, C., Nägele, T., Wolf, E., Lorenzin, F., Dietrich, K., Mair, A., Weckwerth, W., Teige, M., Baena-González, E., & Dröge-Laser, W. (2018). Snf1-RELATED KINASE1-Controlled C/S1-bZIP Signaling Activates Alternative Mitochondrial Metabolic Pathways to Ensure Plant Survival in Extended Darkness. *The Plant Cell*, 30(2), 495–509. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00414>
- Peixoto, B., & Baena-González, E. (2022). Management of plant central metabolism by SnRK1 protein kinases. *Journal of Experimental Botany*, 73(20), 7068–7082. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac261>
- Peixoto, B., Moraes, T. A., Mengin, V., Margalha, L., Vicente, R., Feil, R., Höhne, M., Sousa, A. G. G., Lilue, J., Stitt, M., Lunn, J. E., & Baena-González, E. (2021). Impact of the SnRK1 protein kinase on sucrose homeostasis and the transcriptome during the diel cycle. *Plant Physiology*, 187(3), 1357–1373. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab350>
- Petersen, M., Avin-Wittenberg, T., Bassham, D. C., Dagdas, Y., Fan, C., Fernie, A. R., Jiang, L., Mishra, D., Otegui, M. S., Rodriguez, E., & Hofius, D. (2024). Autophagy in plants. *Autophagy Reports*, 3(1), 2395731. <https://doi.org/10.1080/27694127.2024.2395731>
- Petricka, J. J., Winter, C. M., & Benfey, P. N. (2012). Control of Arabidopsis Root Development. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 563–590. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105501>
- Picard, M., & Shirihai, O. S. (2022). Mitochondrial signal transduction. *Cell Metabolism*, 34(11), 1620–1653. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.10.008>
- Pires, M. V., Pereira Júnior, A. A., Medeiros, D. B., Daloso, D. M., Pham, P. A., Barros, K. A., Engqvist, M. K. M., Florian, A., Krahnert, I., Maurino, V. G., Araújo, W. L., & Fernie, A. R. (2016). The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 39(6), 1304–1319. <https://doi.org/10.1111/pce.12682>
- Racca, S., Gras, D. E., Canal, M. V., Ferrero, L. V., Rojas, B. E., Figueroa, C. M., Ariel, F. D., Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2022). Cytochrome c and the transcription factor ABI4 establish a molecular link between mitochondria and ABA-dependent seed germination. *New Phytologist*, 235(5), 1780–1795. <https://doi.org/10.1111/nph.18287>
- Racca, S., Welchen, E., Gras, D. E., Tarkowská, D., Turečková, V., Maurino, V. G., & Gonzalez, D. H. (2018). Interplay between cytochrome c and gibberellins during Arabidopsis vegetative development. *The Plant Journal*, 94(1), 105–121. <https://doi.org/10.1111/tpj.13845>
- Rasmusson, A. G., Soole, K. L., & Elthon, T. E. (2004). ALTERNATIVE NAD(P)H DEHYDROGENASES OF PLANT MITOCHONDRIA. *Annual Review of Plant Biology*, 55(Volume 55, 2004), 23–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant.55.031903.141720>
- Raveneau, M.-P., Benamar, A., & Macherel, D. (2017). Water content, adenylate kinase, and mitochondria drive adenylate balance in dehydrating and imbibing seeds. *Journal of Experimental Botany*, 68(13), 3501–3512. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx182>
- Retzer, K., García-González, J., Müller, K., Lacey, J., Pree, S., Friedl, N., & Weckwerth, W. (2025). *Analysing the Role of KIN10 in Directional Root Growth Regulation in Arabidopsis thaliana* (p. 2025.04.25.650732). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2025.04.25.650732>
- Ribeiro, D. M., Araújo, W. L., Fernie, A. R., Schippers, J. H. M., & Mueller-Roeber, B. (2012). Action of Gibberellins on Growth and Metabolism of Arabidopsis Plants Associated with High Concentration of Carbon Dioxide. *Plant Physiology*, 160(4), 1781–1794. <https://doi.org/10.1104/pp.112.204842>
- Ritonga, F. N., Zhou, D., Zhang, Y., Song, R., Li, C., Li, J., & Gao, J. (2023). The Roles of Gibberellins in Regulating Leaf Development. *Plants*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/plants12061243>
- Romeiro Motta, M., Zhao, X., Pastuglia, M., Belcram, K., Roodbarkelari, F., Komaki, M., Harashima, H., Komaki, S., Kumar, M., Bulankova, P., Heese, M., Riha, K., Bouchez, D., & Schnittger, A. (2021). B1-type cyclins control microtubule organization during cell

- division in Arabidopsis. *The EMBO Reports*, 23(1), EMBR202153995. <https://doi.org/10.15252/embr.202153995>
- Saddhe, A. A., Manuka, R., & Penna, S. (2021). Plant sugars: Homeostasis and transport under abiotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 171(4), 739–755. <https://doi.org/10.1111/ppl.13283>
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Saha, B., Borovskii, G., & Panda, S. K. (2016). Alternative oxidase and plant stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 11(12), e1256530. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1256530>
- Saile, J., Wießner-Kroh, T., Erbstein, K., Obermüller, D. M., Pfeiffer, A., Janocha, D., Lohmann, J., & Wachter, A. (2023). SNF1-RELATED KINASE 1 and TARGET OF RAPAMYCIN control light-responsive splicing events and developmental characteristics in etiolated Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell*, 35(9), 3413–3428. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad168>
- Salem, M. A., Li, Y., Bajdzienko, K., Fisahn, J., Watanabe, M., Hoefgen, R., Schöttler, M. A., & Giavalisco, P. (2018). RAPTOR Controls Developmental Growth Transitions by Altering the Hormonal and Metabolic Balance. *Plant Physiology*, 177(2), 565–593. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01711>
- Salvi, E., Di Mambro, R., & Sabatini, S. (2020). Dissecting mechanisms in root growth from the transition zone perspective. *Journal of Experimental Botany*, 71(8), 2390–2396. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa079>
- Sato, H., Mizoi, J., Tanaka, H., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Morimoto, K., Otori, T., Kusakabe, K., Nagata, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). Arabidopsis DPB3-1, a DREB2A Interactor, Specifically Enhances Heat Stress-Induced Gene Expression by Forming a Heat Stress-Specific Transcriptional Complex with NF-Y Subunits. *The Plant Cell*, 26(12), 4954–4973. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132928>
- Schertl, P., & Braun, H.-P. (2014). Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00163>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sedaghatmehr, M., & Balazadeh, S. (2024). Autophagy: A key player in the recovery of plants from heat stress. *Journal of Experimental Botany*, 75(8), 2246–2255. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae018>
- Sedaghatmehr, M., Thirumalaikumar, V. P., Kamranfar, I., Marmagne, A., Masclaux-Daubresse, C., & Balazadeh, S. (2019). A regulatory role of autophagy for resetting the memory of heat stress in plants. *Plant, Cell & Environment*, 42(3), 1054–1064. <https://doi.org/10.1111/pce.13426>
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R., & Zheng, B. (2019). Phytohormones Regulate Accumulation of Osmolytes Under Abiotic Stress. *Biomolecules*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/biom9070285>
- Shaw, R. J., Bardeesy, N., Manning, B. D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R. A., & Cantley, L. C. (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell*, 6(1), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.007>
- Shen, W., Reyes, M. I., & Hanley-Bowdoin, L. (2009). Arabidopsis Protein Kinases GRIK1 and GRIK2 Specifically Activate SnRK1 by Phosphorylating Its Activation Loop. *Plant Physiology*, 150(2), 996–1005. <https://doi.org/10.1104/pp.108.132787>
- Shi, H., Chen, L., Ye, T., Liu, X., Ding, K., & Chan, Z. (2014). Modulation of auxin content in Arabidopsis confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.008>
- Shi, L., Wu, Y., & Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: Conservation and innovation. *Development*, 145(13), dev160887. <https://doi.org/10.1242/dev.160887>
- Shin, J., Sánchez-Villarreal, A., Davis, A. M., Du, S., Berendzen, K. W., Koncz, C., Ding, Z., Li, C., & Davis, S. J. (2017). The metabolic sensor AKIN10 modulates the Arabidopsis circadian clock in a light-dependent manner. *Plant, Cell & Environment*, 40(7), 997–1008. <https://doi.org/10.1111/pce.12903>

- Shpak, E. D., & Uzair, M. (2025). WUSCHEL: The essential regulator of the Arabidopsis shoot Apical Meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 85, 102739. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2025.102739>
- Simon, N. M. L., Kusakina, J., Fernández-López, Á., Chembath, A., Belbin, F. E., & Dodd, A. N. (2018a). The Energy-Signaling Hub SnRK1 Is Important for Sucrose-Induced Hypocotyl Elongation. *Plant Physiology*, 176(2), 1299–1310. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01395>
- Simon, N. M. L., Sawkins, E., & Dodd, A. N. (2018b). Involvement of the SnRK1 subunit KIN10 in sucrose-induced hypocotyl elongation. *Plant Signaling & Behavior*, 13(6), e1457913. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1457913>
- Skirycz, A., De Bodt, S., Obata, T., De Clercq, I., Claeys, H., De Rycke, R., Andriankaja, M., Van Aken, O., Van Breusegem, F., Fernie, A. R., & Inzé, D. (2010). Developmental Stage Specificity and the Role of Mitochondrial Metabolism in the Response of Arabidopsis Leaves to Prolonged Mild Osmotic Stress. *Plant Physiology*, 152(1), 226–244. <https://doi.org/10.1104/pp.109.148965>
- Skirycz, A., Vandembroucke, K., Clauw, P., Maleux, K., De Meyer, B., Dhondt, S., Pucci, A., Gonzalez, N., Hoeberichts, F., Tognetti, V. B., Galbiati, M., Tonelli, C., Van Breusegem, F., Vuylsteke, M., & Inzé, D. (2011). Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnology*, 29(3), 212–214. <https://doi.org/10.1038/nbt.1800>
- Smailov, B., Alybayev, S., Smekenov, I., Mursalimov, A., Saparbaev, M., Sarbasov, D., & Bissenbaev, A. (2020). Wheat Germination Is Dependent on Plant Target of Rapamycin Signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.606685>
- Somssich, M., Je, B. I., Simon, R., & Jackson, D. (2016). CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*, 143(18), 3238–3248. <https://doi.org/10.1242/dev.133645>
- Song, Y., Alyafei, M. S., Masmoudi, K., Jaleel, A., & Ren, M. (2021). Contributions of TOR Signaling on Photosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168959>
- Soto-Burgos, J., & Bassham, D. C. (2017). SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 12(8), e0182591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182591>
- Stitt, M., Lilley, R. M., Gerhardt, R., & Heldt, H.-W. (1989). Metabolite Levels in Specific Cells and Subcellular Compartments of Plant-Leaves. *Methods in Enzymology*, 174, 518–552.
- Su, T., Li, X., Yang, M., Shao, Q., Zhao, Y., Ma, C., & Wang, P. (2020). Autophagy: An Intracellular Degradation Pathway Regulating Plant Survival and Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00164>
- Sun, T. (2008). Gibberellin Metabolism, Perception and Signaling Pathways in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 6, e0103. <https://doi.org/10.1199/tab.0103>
- Suzuki, N. (2023). Fine Tuning of ROS, Redox and Energy Regulatory Systems Associated with the Functions of Chloroplasts and Mitochondria in Plants under Heat Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021356>
- Szarka, A., Bánhegyi, G., & Asard, H. (2013). The Inter-Relationship of Ascorbate Transport, Metabolism and Mitochondrial, Plastidic Respiration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(9), 1036–1044. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5059>
- Tang, G., Zhu, X., Tang, X., & Galili, G. (2000). A novel composite locus of Arabidopsis encoding two polypeptides with metabolically related but distinct functions in lysine catabolism. *The Plant Journal*, 23(2), 195–203. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2000.00770.x>
- Thomas, M. D., Roberts, R., Heckathorn, S. A., & Boldt, J. K. (2024). Species Survey of Leaf Hyponasty Responses to Warming Plus Elevated CO₂. *Plants*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/plants13020204>
- Trivellini, A., Jibrán, R., Watson, L. M., O'Donoghue, E. M., Ferrante, A., Sullivan, K. L., Dijkwel, P. P., & Hunter, D. A. (2012). Carbon Deprivation-Driven Transcriptome Reprogramming in Detached Developmentally Arresting Arabidopsis Inflorescences1[C][W][OA]. *Plant Physiology*, 160(3), 1357–1372. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203083>
- Truernit, E., & Sauer, N. (1995). The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta*, 196(3), 564–570. <https://doi.org/10.1007/BF00203657>

- Ubeda-Tomás, S., Beemster, G. T. S., & Bennett, M. J. (2012). Hormonal regulation of root growth: Integrating local activities into global behaviour. *Trends in Plant Science*, 17(6), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.002>
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant Journal*, 57(6), 1065–1078. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03748.x>
- Usadel, B., Bläsing, O. E., Gibon, Y., Retzlaff, K., Höhne, M., Günther, M., & Stitt, M. (2008). Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in *Arabidopsis* rosettes. *Plant Physiology*, 146(4), 1834–1861. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115592>
- Vacca, R. A., Valenti, D., Bobba, A., Merafina, R. S., Passarella, S., & Marra, E. (2006). Cytochrome c Is Released in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner and Is Degraded via Caspase-Like Proteases in Tobacco Bright-Yellow 2 Cells en Route to Heat Shock-Induced Cell Death. *Plant Physiology*, 141(1), 208–219. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078683>
- Van Aken, O. (2021). Mitochondrial redox systems as central hubs in plant metabolism and signaling. *Plant Physiology*, 186(1), 36–52. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab101>
- Van Aken, O., Ford, E., Lister, R., Huang, S., & Millar, A. H. (2016). Retrograde signalling caused by heritable mitochondrial dysfunction is partially mediated by ANAC017 and improves plant performance. *The Plant Journal*, 88(4), 542–558. <https://doi.org/10.1111/tpj.13276>
- Van Aken, O., Pečenková, T., Van De Cotte, B., De Rycke, R., Eeckhout, D., Fromm, H., De Jaeger, G., Witters, E., Beemster, G. T. S., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2007). Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development. *The Plant Journal*, 52(5), 850–864. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03276.x>
- Van Aken, O., & Pogson, B. J. (2017). Convergence of mitochondrial and chloroplastic ANAC017/PAP-dependent retrograde signalling pathways and suppression of programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*, 24(6), 955–960. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.68>
- Vanlerberghe, G. C. (2013). Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 6805–6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
- Verbelen, J.-P., Cnodder, T. D., Le, J., Vissenberg, K., & Baluška, F. (2006). The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signaling & Behavior*, 1(6), 296–304. <https://doi.org/10.4161/psb.1.6.3511>
- Waadts, R., Sella, C. A., Hsu, P.-K., Takahashi, Y., Munemasa, S., & Schroeder, J. I. (2022). Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(10), 680–694. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00479-6>
- Wagner, S., De Bortoli, S., Schwarzländer, M., & Szabò, I. (2016). Regulation of mitochondrial calcium in plants versus animals. *Journal of Experimental Botany*, 67(13), 3809–3829. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw100>
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- Wang, B., Zhao, X., Zhao, Y., Shanklin, J., Zhao, Q., & Liu, C.-J. (2021). *Arabidopsis* SnRK1 negatively regulates phenylpropanoid metabolism via Kelch domain-containing F-box proteins. *New Phytologist*, 229(6), 3345–3359. <https://doi.org/10.1111/nph.17121>
- Wang, F., & Deng, X. W. (2011). Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell Research*, 21(9), 1286–1294. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.118>
- Wang, Hongyan, Tang, X., Wang, Honglei, & Shao, H.-B. (2015). Proline accumulation and metabolism-related genes expression profiles in *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00792>
- Wang, P., Zhao, Y., Li, Z., Hsu, C.-C., Liu, X., Fu, L., Hou, Y.-J., Du, Y., Xie, S., Zhang, C., Gao, J., Cao, M., Huang, X., Zhu, Y., Tang, K., Wang, X., Tao, W. A., Xiong, Y., & Zhu, J.-K. (2018a). Reciprocal Regulation of the TOR Kinase and ABA Receptor Balances Plant

- Growth and Stress Response. *Molecular Cell*, 69(1), 100-112.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.002>
- Wang, R., Zhang, Y., Kieffer, M., Yu, H., Kepinski, S., & Estelle, M. (2016). HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in *Arabidopsis* by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. *Nature Communications*, 7(1), 10269. <https://doi.org/10.1038/ncomms10269>
- Wang, W., Zhang, X., & Niittylä, T. (2019). OPENER Is a Nuclear Envelope and Mitochondria Localized Protein Required for Cell Cycle Progression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 31(7), 1446–1465. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00033>
- Wang, Y., Berkowitz, O., Selinski, J., Xu, Y., Hartmann, A., & Whelan, J. (2018b). Stress responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biology and Medicine, Redox Signalling in Plants and Implications for Mammalian Physiology*, 122, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.031>
- Wang, Y., Pan, R., & Hu, J. (2024). Impact of acute heat stress on mitochondrial function, ultrastructure and cardiolipin distribution in *Arabidopsis*. *aBIOTECH*, 5(3), 362–367. <https://doi.org/10.1007/s42994-024-00151-x>
- Wang, Y.-X., & Xu, J.-H. (2025). The heat shock transcription factors regulate response mechanisms to abiotic stresses in plants. *Crop Design*, 4(3), 100109. <https://doi.org/10.1016/j.crope.2025.100109>
- Weaver, L. M., & Amasino, R. M. (2001). Senescence Is Induced in Individually Darkened *Arabidopsis* Leaves, but Inhibited in Whole Darkened Plants. *Plant Physiology*, 127(3), 876–886. <https://doi.org/10.1104/pp.010312>
- Weimer, A. K., Biedermann, S., Harashima, H., Roodbarkelari, F., Takahashi, N., Foreman, J., Guan, Y., Pochon, G., Heese, M., Van Damme, D., Sugimoto, K., Koncz, C., Doerner, P., Umeda, M., & Schnittger, A. (2016). The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 35(19), 2068–2086. <https://doi.org/10.15252/embj.201593083>
- Welchen, E., Canal, M. V., Gras, D. E., & Gonzalez, D. H. (2021). Cross-talk between mitochondrial function, growth, and stress signalling pathways in plants. *Journal of Experimental Botany*, 72(11), 4102–4118. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa608>
- Welchen, E., García, L., Mansilla, N., & Gonzalez, D. H. (2014). Coordination of plant mitochondrial biogenesis: Keeping pace with cellular requirements. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00551>
- Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2005). Differential Expression of the *Arabidopsis* Cytochrome c Genes *Cytc-1* and *Cytc-2*. Evidence for the Involvement of TCP-Domain Protein-Binding Elements in Anther- and Meristem-Specific Expression of the *Cytc-1* Gene. *Plant Physiology*, 139(1), 88–100. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065920>
- Welchen, E., & Gonzalez, D. H. (2016). Cytochrome c, a hub linking energy, redox, stress and signaling pathways in mitochondria and other cell compartments. *Physiologia Plantarum*, 157(3), 310–321. <https://doi.org/10.1111/ppl.12449>
- Welchen, E., Hildebrandt, T. M., Lewejohann, D., Gonzalez, D. H., & Braun, H.-P. (2012). Lack of cytochrome c in *Arabidopsis* decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(7), 990–1001. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.04.008>
- Welchen, E., Viola, I. L., Kim, H. J., Prendes, L. P., Comelli, R. N., Hong, J. C., & Gonzalez, D. H. (2009). A segment containing a G-box and an ACGT motif confers differential expression characteristics and responses to the *Arabidopsis* *Cytc-2* gene, encoding an isoform of cytochrome c. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 829–845. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern331>
- Wippel, K., & Sauer, N. (2012). *Arabidopsis* SUC1 loads the phloem in *suc2* mutants when expressed from the SUC2 promoter. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 669–679. <https://doi.org/10.1093/jxb/err255>
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2018). Biology in Bloom: A Primer on the *Arabidopsis thaliana* Model System. *Genetics*, 208(4), 1337–1349. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300755>
- Wu, Z., Zhang, J., Li, G., & Zhao, Y. (2025). The SnRK1 Kinase: A Key Regulator in Plant Growth, Development, and Environmental Sensing. *Physiologia Plantarum*, 177(5), e70559. <https://doi.org/10.1111/ppl.70559>

- Wurzinger, B., Nukarinen, E., Nägele, T., Weckwerth, W., & Teige, M. (2018). The SnRK1 Kinase as Central Mediator of Energy Signaling between Different Organelles. *Plant Physiology*, *176*(2), 1085–1094. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01404>
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. (2013). Glucose–TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, *496*(7444), 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>
- Xu, Y., Freund, D. M., Hegeman, A. D., & Cohen, J. D. (2022). Metabolic signatures of *Arabidopsis thaliana* abiotic stress responses elucidate patterns in stress priming, acclimation, and recovery. *Stress Biology*, *2*(1), 11. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00034-5>
- Xu, Y., & Fu, X. (2022). Reprogramming of Plant Central Metabolism in Response to Abiotic Stresses: A Metabolomics View. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105716>
- Yang, C., Li, X., Yang, L., Chen, S., Liao, J., Li, K., Zhou, J., Shen, W., Zhuang, X., Bai, M., Bassham, D. C., & Gao, C. (2023). A positive feedback regulation of SnRK1 signaling by autophagy in plants. *Molecular Plant*, *16*(7), 1192–1211. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.07.001>
- Yang, F., Vincis Pereira Sanglard, L., Lee, C.-P., Ströher, E., Singh, S., Oh, G. G. K., Millar, A. H., Small, I., & Colas des Francs-Small, C. (2024). Mitochondrial atp1 mRNA knockdown by a custom-designed pentatricopeptide repeat protein alters ATP synthase. *Plant Physiology*, *194*(4), 2631–2647. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae008>
- Yang, Y., Zhao, Y., Zhang, Y., Niu, L., Li, W., Lu, W., Li, J., Schäfer, P., Meng, Y., & Shan, W. (2022). A mitochondrial RNA processing protein mediates plant immunity to a broad spectrum of pathogens by modulating the mitochondrial oxidative burst. *The Plant Cell*, *34*(6), 2343–2363. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac082>
- Yaschenko, A. E., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2025). Arabidopsis as a model for translational research. *The Plant Cell*, *37*(5), koae065. <https://doi.org/10.1093/plcell/koae065>
- Yu, J., Zhang, R., Li, X., Dong, D., & Wang, S. (2025). Sugar Metabolism and Transport in Response to Drought–Rehydration in *Poa pratensis*. *Agronomy*, *15*(2). <https://doi.org/10.3390/agronomy15020320>
- Yuan, H., & Liu, D. (2012). Functional disruption of the pentatricopeptide protein SLG1 affects mitochondrial RNA editing, plant development, and responses to abiotic stresses in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *70*(3), 432–444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04883.x>
- Zacharakí, V., Ponnu, J., Crepin, N., Langenecker, T., Hagmann, J., Skorzinski, N., Musialak-Lange, M., Wahl, V., Rolland, F., & Schmid, M. (2022). Impaired KIN10 function restores developmental defects in the Arabidopsis trehalose 6-phosphate synthase1 (tps1) mutant. *New Phytologist*, *235*(1), 220–233. <https://doi.org/10.1111/nph.18104>
- Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Gómez-Cadenas, A., & Mittler, R. (2022). Plant responses to climate change: Metabolic changes under combined abiotic stresses. *Journal of Experimental Botany*, *73*(11), 3339–3354. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac073>
- Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.-K., & Wang, P. (2025). Tackling abiotic stress in plants: Recent insights and trends. *Stress Biology*, *5*(1), 8. <https://doi.org/10.1007/s44154-025-00216-x>
- Zhang, H., Zhao, Y., & Zhu, J.-K. (2020). Thriving under Stress: How Plants Balance Growth and the Stress Response. *Developmental Cell*, *55*(5), 529–543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.012>
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J.-K. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, *23*(2), 104–119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>
- Zhang, S., & Wang, X. (2011). Overexpression of GASA5 increases the sensitivity of Arabidopsis to heat stress. *Journal of Plant Physiology*, *168*(17), 2093–2101. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.06.010>
- Zhang, W., Swarup, R., Bennett, M., Schaller, G. E., & Kieber, J. J. (2013). Cytokinin Induces Cell Division in the Quiescent Center of the Arabidopsis Root Apical Meristem. *Current Biology*, *23*(20), 1979–1989. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.008>
- Zhang, Y., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Powers, S. J., Schluempmann, H., Delatte, T., Wingler, A., & Paul, M. J. (2009). Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. *Plant Physiology*, *149*(4), 1860–1871. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133934>

- Zhang, Y., Xu, J., Li, Ruofan, Ge, Y., Li, Y., & Li, Ruili. (2023). Plants' Response to Abiotic Stress: Mechanisms and Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13). <https://doi.org/10.3390/ijms241310915>
- Zhao, Y., Wang, X., Lei, Q., Zhang, X., Wang, Y., Ji, H., Ma, C., Wang, P., Song, C.-P., & Zhu, X. (2025). The SnRK1-JMJ15-CRF6 module integrates energy and mitochondrial signaling to balance growth and the oxidative stress response in Arabidopsis. *New Phytologist*, 246(1), 158–175. <https://doi.org/10.1111/nph.20425>
- Zhao, Y., & Wang, X.-Q. (2020). The hot issue: TOR signalling network in plants. *Functional Plant Biology*, 48(1), 1–7. <https://doi.org/10.1071/FP20071>
- Zhou, J., Wang, J., Yu, J.-Q., & Chen, Z. (2014). Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00174>
- Zhou, X., Li, Q., Chen, X., Liu, J., Zhang, Q., Liu, Y., Liu, K., & Xu, J. (2011). The Arabidopsis RETARDED ROOT GROWTH Gene Encodes a Mitochondria-Localized Protein That Is Required for Cell Division in the Root Meristem. *Plant Physiology*, 157(4), 1793–1804. <https://doi.org/10.1104/pp.111.185827>
- Zhou, Y., Xu, F., Shao, Y., & He, J. (2022). Regulatory Mechanisms of Heat Stress Response and Thermomorphogenesis in Plants. *Plants*, 11(24). <https://doi.org/10.3390/plants11243410>
- Zhu, F., Aseekh, S., Koper, K., Tong, H., Nikoloski, Z., Naake, T., Liu, H., Yan, J., Brotman, Y., Wen, W., Maeda, H., Cheng, Y., & Fernie, A. R. (2022). Genome-wide association of the metabolic shifts underpinning dark-induced senescence in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 34(1), 557–578. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab251>
- Zhu, J.-K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
- Zhu, M., & Assmann, S. M. (2017). Metabolic Signatures in Response to Abscisic Acid (ABA) Treatment in Brassica napus Guard Cells Revealed by Metabolomics. *Scientific Reports*, 7(1), 12875. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13166-w>
- Zluhan-Martínez, E., López-Ruíz, B. A., García-Gómez, M. L., García-Ponce, B., de la Paz Sánchez, M., Álvarez-Buylla, E. R., & Garay-Arroyo, A. (2021). Integrative Roles of Phytohormones on Cell Proliferation, Elongation and Differentiation in the Arabidopsis thaliana Primary Root. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.659155>
- Zsigmond, L., Juhász-Erdélyi, A., Valkai, I., Aleksza, D., Rigó, G., Kant, K., Szepesi, Á., Fiorani, F., Körber, N., Kovács, L., & Szabados, L. (2024). Mitochondrial complex I subunit NDUFS8.2 modulates responses to stresses associated with reduced water availability. *Plant Physiology and Biochemistry*, 208, 108466. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108466>