UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS.

“Análisis de la participación de las proteínas S6K y PP2A de *Arabidopsis thaliana* en respuesta al estrés osmótico”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD EN: BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

M.C. MAURICIO NAHUAM CHÁVEZ AVILÉS

ASESOR: D.C. HOMERO REYES DE LA CRUZ

MORELIA MICHOACÁN, ABRIL DE 2013.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ

EN EL LABORATORIO DE

CONTROL TRADUCCIONAL

DEL INSTITUTO DE

INVESTIGACIONES QUÍMICO

BIOLÓGICAS

DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA

DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi familia:

A ti **Ale**, que cuando el camino sólo ofreció cuestas por subir, siempre creíste en mí y me apoyaste en todo lo posible para que alcanzara la cumbre, no importando los sacrificios que tuviste que hacer para que siguiera creciendo, a ti que siempre has estado y espero estarás compartiendo la alegría y también las desventuras, por el resto de nuestras vidas. No hay palabras que describan la magnitud del esfuerzo que has hecho para que pueda culminar esta etapa y es por ello que no puedo más que escribir……

¡¡¡¡¡GRACIAS!!!!

A mis hijos: **Adair** y **Mariana** a quienes siempre llevo en el corazón y el pensamiento, y quienes con su alegría e inocencia me redefinen como persona día con día, haciéndome más llevadera esta etapa y quienes me han hecho crecer como ser humano permitiéndome balancear mi vida, los amo.

A todos mis familiares por compartir aquellos momentos que llevo gratamente en el corazón y de quienes siempre recibí apoyo en diversas formas.

GRACIAS A TODOS POR PERMITIRME SER TAN AFORTUNADO DE REALIZAR UN TRABAJO QUE REALMENTE DISFRUTO.

AGRADECIMIENTOS

Al **D.C. Homero Reyes de la Cruz** por creer en mi persona para desarrollar el presente trabajo y haberme permitido crecer en esta etapa formativa, por apoyarme en ese punto de inflexión y motivarme a continuar a pesar de las circunstancias. Por impulsar mi sentido de la creatividad, ya que siempre apoyó las ideas presentadas por más extravagantes que estás fueran.

A la D.C. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por todas sus recomendaciones, críticas y consejos que me permitieron adquirir un poco más de confianza.

A mis sinodales, al D.C. Jesús Campos García, a la D.C. Elda Ma. Gpe. Beltrán Peña y al D.C. José López Bucio, quienes con sus críticas fortalecieron el presente trabajo impulsando así el culmino del mismo.

A los D.C. Ernesto García Pineda y José Fernando Covian Nares, por el tiempo dedicado a realizar valiosas observaciones en el proceso de revisión de la presente.

A mis **AMIGOS**, César, Claudia, Randy, Luis Ma., Ara, Liz, Hans, Edgar, Amada, Maricarmen, Alberto y Esther; por estar siempre que los necesité para poder seguir adelante.

A mis compañeros, César Arturo y Areli quienes me aguantaron 4 largos años en cada una de las facetas y estados de ánimo……gracias por escucharme cuando tuve esa necesidad tan fuerte de desahogarme.

A todo el personal de IIQB porque de manera indirecta siempre influirán en cada trabajo realizado en esta institución.

ÍNDICE

I RESUMEN……..……..v

II ABSTRACT…….....vii

III INTRODUCCIÓN

3.1 Regulación del crecimiento y desarrollo vegetal mediado por auxinas……...1

3.2 Regulación del crecimiento durante el estrés abiótico……2

3.3 Percepción de las señales externas a través de TOR……3

3.4 Modulación de las respuestas celulares mediadas por TOR y S6Ks……..6

3.5 Señalización de TOR-S6K durante el estrés……...7

3.6 Proteínas fosfatasas tipo 2A..……8

3.7 El ácido fosfatídico como un intermediario en las respuestas al estrés y la modulación de la actividad de la vía TOR-S6K…….... 10

3.8 Justificación……11

IV HIPÓTESIS……..12

V OBJETIVOS……..12

5.1 Objetivo general……....12

5.2 Objetivos específicos……12

VI RESULTADOS

6.1 Capítulo I “PP2A mediates lateral root development under NaCl-induced osmotic stress throughout auxin redistribution in *Arabidopsis thaliana*” ….13

6.2 Capítulo II “Las proteínas S6Ks de *Arabidopsis thaliana* modulan el desarrollo de raíces laterales en respuesta al estrés osmótico a través de la regulación diferencial de la producción de ácido fosfatídico”……..…….28

6.3 Capítulo III “The TOR-S6K pathway: integrating plant growth, development and adaptative responses”…..……..55

VII DISCUSIÓN GENERAL

7.1 Efectos del estrés osmótico inducido por NaCl sobre el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de raíces laterales……..…..90

7.2 El transporte polar de auxinas está involucrado en la respuesta morfogenética inducida por estrés…….……90

7.3 La actividad de PP2A y la respuesta morfogenética inducida por

NaCl ……92
7.4 Papel de las proteínas S6Ks de *Arabidopsis* en la respuesta morfogenética inducida por estrés……..……93
7.5 Papel del transporte polar de auxinas, el ácido fosfatídico y las proteínas S6Ks en la respuesta morfogenética inducida por estrés ……95
VIII CONCLUSIONES ……..……97
IX PERSPECTIVAS……..……99
IX.1 Movilización del marcador *DR5::uidA* a las líneas mutantes en *s6k1* y *s6k2*……99
IX.2 Modulación de la actividad de PP2A a través de la producción del PA ….99
IX.3 Papel de los inositol polifosfatos (IPn) en la regulación de la expresión génica……99
X REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS ……100

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Representación esquemática de los efectos del estrés abiótico sobre la morfología del sistema radicular …….. 3

Figura 2. Modelo de la vía de señalización TOR en plantas. ……..…… 6

CAPÍTULO I

Figure 1. NaCl-induced osmotic stress effects on *Arabidopsis* seedlings development……..……18

Figure 2. NaCl-induced osmotic stress effects on *Arabidopsis* active auxin levels…… 19

Figure 3. NaCl-induced osmotic stress modulates LR development by increasing auxin transport…… 19

Figure 4. Regulation of auxin transport during NaCl-induced osmotic stress ... 20

Figure 5. NaCl-induced osmotic stress modulates LRP developmental stages ……..21

Figure 6. NaCl-induced osmotic stress effects on PP2A activity in *Arabidopsis* roots……..…21

Figure 7. OA effect on RSA modulation during NaCl-induced osmotic stress……22

Figure 8. OA effect on active auxin levels during NaCl-induced osmotic stress ……..……23

Supplementary material S1. Calibration plot of phosphate by spectrophotometric method……..…27

CAPÍTULO II

Figura 1. Efectos del estrés osmótico inducido por NaCl en el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis* ……..……36

Figura 2. Efecto del estrés osmótico en la modulación de los niveles de expresión de *S6K1* y *S6K2*……..37

Figura 3. Efecto del estrés osmótico inducido por NaCl en la arquitectura del

sistema radicular de las mutantes en *s6k1* y *s6k2*……..……..39
Figura 4. El estrés osmótico inducido por NaCl media el desarrollo de raíces laterales modulando el transporte polar de auxinas ……..……40
Figura 5. Regulación del transporte de auxinas en respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl……...41
Figura 6 Efecto del estrés osmótico sobre la producción de ácido fosfatídico en respuesta al estrés osmótico en *A. thaliana* Col-0, *s6k1* y *s6k2*……43
Figura Suplementaria S1. Genotipificación de la línea mutante insercional en *s6k1* 113295 y la *s6k2* 039937 ……53
Figura Suplementaria S2. Análisis de la expresión de *S6K1* y *S6K2.*……...53
Figura Suplementaria S3. Curva de calibración de ácido fosfatídico mediante un método espectrofotométrico ……..……54

CAPÍTULO III

Figure 1. Mammalian TOR-S6K signaling……..…..62
Figure 2. Plant TOR-S6K signaling……..…..…..64
Figure 3. Cross-Talking between Polar Auxin Transport (PAT) and TOR-S6K signaling pathway ……..…..…..73

I RESUMEN

Las plantas como organismos sésiles confrontan diversos retos durante su ciclo de vida por lo que han desarrollado mecanismos eficientes de adaptación para integrar y coordinar las señales para modular su crecimiento y reproducción de forma exitosa. El estrés osmótico es uno de los retos por el cual las plantas alteran su desarrollo y crecimiento, el cual de forma natural es generado por la disminución de la disponibilidad de agua por sequía, congelamiento, o por un incremento en la salinidad del suelo; este último representa un problema de interés agronómico ya que más de 80% de los suelos cultivables presentan índices elevados de salinidad. El estrés osmótico induce cambios en el crecimiento y desarrollo y debido a que la vía de señalización TOR-S6K modula dichos procesos en respuesta a diferentes estímulos, en todos los eucariotes incluyendo a las plantas, fue de nuestro interés determinar cuál es la función de las proteínas S6K y PP2A de *Arabidopsis thaliana* en dicho proceso. En el presente trabajo se encontró que las plántulas crecidas en condiciones de estrés osmótico se caracterizan por una disminución del crecimiento del brote, un acortamiento de la raíz primaria así como un incremento en el número de raíces laterales (RLs). Se determinó que la modificación de la arquitectura del sistema radicular (ASR) es mediada por un incremento en el transporte polar de auxinas (TPA), el cual induce el crecimiento y la formación *de novo* de los primordios de RLs. Como la vía TOR-S6K es modulada de forma positiva por auxinas y se ha implicado a las proteínas S6K en este proceso, en el presente estudio se analizó la expresión de los transcritos de *S6K1* y *S6K2* en las raíces de plántulas crecidas en condiciones de estrés osmótico inducido por NaCl, la cual fue incrementada 2 y 6 veces respectivamente. Para determinar la posible función de las proteínas S6K, se analizaron líneas mutantes *s6k1* y *s6k2*, las cuáles mostraron tolerancia a los efectos inducidos por el estrés osmótico debido a que presentaron un menor acortamiento de la raíz primaria (18 y 23 % respectivamente) y una disminución en el desarrollo de RLs, hecho que sugiere la participación de estas proteínas en la modulación de las respuestas al estrés osmótico inducido por NaCl. Los reportes en la literatura indican que las S6Ks de hojas de plantas de tabaco transgénicas crecidas en condiciones de estrés osmótico disminuían su actividad y que esto pudiera deberse a la acción de las

fosfatasas PP2A. Por lo antes mencionado, en el presente trabajo se midió la actividad de PP2A en raíces de plántulas crecidas en condiciones de estrés osmótico, encontrándose que dicha actividad disminuyó hasta en un 50 %, lo que sugiere que la regulación de la actividad de la S6K se lleva a cabo de manera diferencial y tejido específica. Así que la fosfatasa PP2A podría funcionar como un regulador positivo en la mediación de las respuestas a dicho estrés en la raíz. Por otra parte se ha reportado que la fosfolipasa D (PLD) es activada durante el estrés osmótico, produciendo ácido fosfatídico (PA), el cual es capaz de incrementar el tráfico vesicular y por ende incrementar el transporte polar de auxinas (TPA) ya que el inhibidor del tráfico vesícular, la brefeldina A bloquea el ciclo de las proteínas PIN1 y PIN2 que se lleva a cabo entre la membrana plasmática y los polos internos. En nuestras condiciones experimentales se observó un incremento en el TPA bajo estrés osmótico, así como la estimulación en la síntesis de PA hasta dos veces. También, se ha demostrado que las auxinas median sus efectos a través de la producción de PA, y que este mensajero es capaz de activar la señalización de TOR-S6K. Debido a que las mutantes *s6k1* y *s6k2* presentaron un fenotipo de tolerancia al estrés, se determinó el efecto de la mutación en *s6k1* y *s6k2* sobre la producción de PA, encontrándose que dicha producción está incrementada en ambas líneas mutantes en condiciones control. Por otra parte se observó que la producción de PA en la mutante *s6k1* en condiciones de estrés permaneció constante. Interesantemente, el nivel de producción de PA en la línea mutante *s6k2* en respuesta al estrés osmótico disminuyó un 50% con respecto a la producción en condiciones control. Estos datos en conjunto sugieren que las cinasas codificadas por dichos genes regulan positivamente la respuesta al estrés osmótico probablemente a través de la regulación diferencial de la producción del PA y que la S6K2 podría ser el principal regulador en este proceso.

II ABSTRACT

As sessile organisms, plants need to constantly adjust their growth and development to environmental information such as light, water or ion availability. Significant changes in water potentials in the environment can impose osmotic stress to plants. Under natural conditions, high salinity and drought are the major causes of osmotic stress. Plants respond to osmotic stress modulating gene expression, cellular metabolism and growth patterns. Modulation of cellular responses to external cues requires coordinated control of protein kinases and phosphatases to complement the circuit. TOR-S6K signaling pathway has been considered as principal integrator of several signals to modulate growth and development in all eukaryotes, including plants. Hence, it was our interest to determinate the roles of S6K and PP2A from *Arabidopsis thaliana* in this process. In this work, it was shown that at 100 mM NaCl *Arabidopsis* seedling decreased primary root (PR) growth and lateral root (LR) development stimulated, through an increased polar auxin transport (PAT), which is observed by increased GUS activity in vascular tissues and in lateral and primary roots tips. TOR-S6K pathway is stimulated by auxins and S6K proteins have been implicated in the stress responses, for this reason, *S6K1* and *S6K2* transcript levels were determined. An increase in *S6K1* and *S6K2* transcript levels (2 and 6 fold respectively) was observed in roots from stressed seedlings. To gain knowledge about the role of S6K proteins in such stress condition, *s6k1* and *s6k2* insertional single mutant lines were tested, both *s6k1* and *s6k2* mutants showed tolerance to the effects triggered by the osmotic stress condition, reflected as an increased PR growth (18 and 23% respectively) and a diminished LR number compared with the wild type (WT) line. This data suggest that S6K proteins are positive regulators mediating stress responses. Due to the fact that S6K activity is sensitive to osmotic stress, it has been hypothesized that PP2A might be responsible for S6K regulation in the plant osmotic stress response. Hence PP2A activity was measured in roots of stressed seedlings in which a PP2A activity below 50% was observed. These data suggest that the S6K regulation is tissue specific, and that PP2A act as positive regulator in osmotic stress-induced root system architecture modulation. On the other hand, phospholipase D (PLD) is activated during osmotic stress producing phosphatidic acid (PA), which is capable to activate vesicular traffic, increasing the PAT. Since an

increased PAT in stressed seedlings was observed, the PA production was determined. In roots from WT stressed seedlings; the PA production was increased two-fold. Additionally, recent results also indicate that different PLDs mediate plant stress responses through different molecular and cellular events, such as TOR-S6K activation. Since that *s6k* mutant lines showed tolerance to the effects triggered by NaCl, and that during osmotic stress condition the PA production is increased, PA was measured in *s6k1* and *s6k2* mutant lines. It was found that both *s6k1* and *s6k2* mutants had increased PA production in control conditions. Interestingly, in osmotic stress condition the PA production levels in *s6k1* were sustained, while in *s6k2* were diminished to 50 %. Together this data suggest that S6K proteins could positively regulate osmotic stress responses.

III INTRODUCCIÓN

3.1 Regulación del crecimiento y desarrollo vegetal mediado por las auxinas

Las auxinas juegan un papel central en el crecimiento y desarrollo vegetal. El ácido 3-indolacético (AIA), la auxina predominante en la naturaleza, regula la división y elongación celular y desencadena procesos de diferenciación específica guiando a numerosos y diversos eventos del desarrollo, tales como el establecimiento de la polaridad embriogénica, la diferenciación vascular, la dominancia apical y las respuestas trópicas a la luz y la gravedad (Woodward y Bartel 2005). La participación de las auxinas en diversos aspectos del desarrollo es regulada a tres niveles: la homeostasis de las auxinas, el transporte direccional de auxinas y vía de transducción de señales (Chapman y Estelle 2009, Petrasek y Friml 2009; Zhao *et al*. 2011, Ludwin-Muller *et al*. 2011). Las auxinas son sintetizadas principalmente en el ápice del brote y en las hojas jóvenes (Ljung *et al*. 2001, 2005), y son movilizadas en corrientes polarizadas por los transportadores de influjo de auxinas tipo AUX1 (AUXIN RESISTANT 1 / LIKE AUX1 (AUX1/LAX)) y por proteínas acarreadoras de eflujo como las proteínas transportadoras de la subfamilia B con cassette de unión a ATP (ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY B (ABCB)) y las proteínas PIN-FORMED (PIN) (Peer *et al*. 2011). Las PIN son proteínas de membrana plasmática que se localizan en forma polar, lo cual correlaciona con los requerimientos de la direccionalidad de las auxinas (Petrásek *et al*. 2006). La localización de los transportadores PIN a nivel celular determina la dirección del transporte intracelular de auxinas así como la señalización direccional a las células vecinas (Wisniewska *et al*. 2006). PIN1 y ABCB19 son los mediadores primarios del transporte de auxinas en dirección a la raíz en la estela, mientras AUX1, PIN2 y ABCB4 median el flujo de las auxinas en dirección del follaje a partir del ápice de la raíz (Peer *et al*. 2011). La movilización de auxinas fuera del meristemo del brote es dependiente de PIN1, PIN7, ABCB1, ABCB19 y AUX1 (Steinmann *et al*. 1999, Friml *et al*. 2004, Reinhardt *et al*. 2003; Blakeslee *et al*. 2008), y el transporte de auxinas fuera del meristemo de la raíz depende de PIN3, PIN4, AUX1, ABCB1 y en menor proporción de ABCB19 (Geisler *et al*. 2006, Bouchard *et al*. 2006, Blakeslee *et al*. 2008). Estas proteínas

transportadoras establecen el gradiente de auxinas que es regulado por la expresión y relocalización subcelular de las proteínas transportadoras en respuesta a las señales ambientales y del desarrollo (Friml 2010). Las auxinas regulan la transcripción de genes blanco tales como los factores de respuesta a auxinas (ARF) mediante la promoción de la degradación de los represores transcripcionales AUXINAS/ÁCIDO INDOL ACÉTICO (Aux/IAA por sus siglas en inglés) a través del receptor de auxinas TIR1 y la proteólisis mediada por ubiquitinización (Dharmasiri *et al*. 2005, Gray *et al*. 2001).

3.2 Regulación del crecimiento durante el estrés abiótico

Las plantas como organismos sésiles, necesitan ajustar su crecimiento y desarrollo (definidos como un incremento en el tamaño del órgano y la producción de nuevos órganos, respectivamente) de manera constante para censar la información de estímulos como la luz o la disponibilidad de iones y agua (Robert y Offringa 2008). Además, dichos cambios son mediados por la modulación de la expresión de genes, el metabolismo celular y los patrones de crecimiento en respuesta al estrés. En la naturaleza, el estrés osmótico es ocasionado por una elevada salinidad en el suelo (Vickers *et al*. 2009); en este tipo de estrés ocurren cambios morfológicos característicos como la disminución del área foliar, la modulación del sistema radicular (disminución del crecimiento de la raíz principal y un incremento en el desarrollo de raíces laterales), así como un ajuste en el transporte iónico (reflejado por mecanismos de regulación en el influjo, el eflujo y la compartamentalización de iones) y cambios metabólicos (modulación del metabolismo del carbono enfocado a la producción de moléculas osmoprotectoras) (Xion y Zhu 2002). La modulación del sistema radicular en respuesta a diversos estímulos juega un papel decisivo en los procesos de adaptación vegetal, guiando la respuesta morfogenética inducida por estrés (SIMR por sus siglas en inglés) (Fig.1) (Potters *et al*. 2007).

El estrés salino, inhibe el crecimiento de la raíz primaria a través de la inhibición de la elongación y división celular, lo que resulta en la pérdida del meristemo apical radicular (RAM por sus siglas en inglés) (West *et al*. 2004). Sin embargo, el efecto del estrés salino sobre las raíces laterales es controversial, debido a que se ha

reportado tanto la estimulación como la inhibición de la emergencia y el crecimiento de raíces laterales en *Arabidopsis* (West *et al*. 2004, Wang *et al*. 2009, Zolla *et al*. 2010, Zhao *et al*. 2011), por lo tanto, no es claro si el estrés salino genera una respuesta SIMR característica.

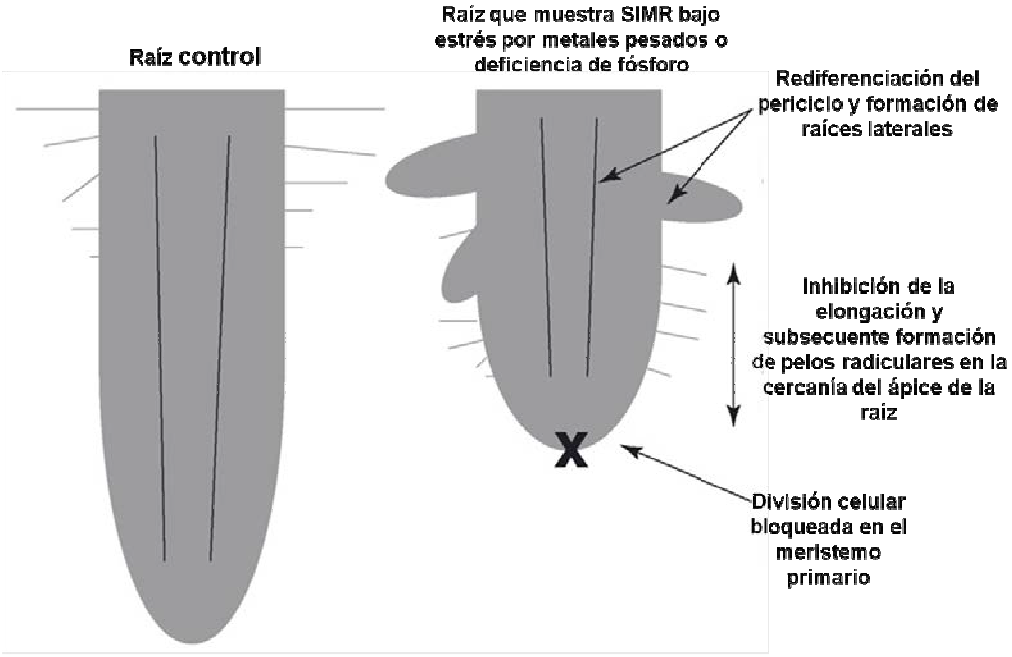


Figura 1. Representación esquemática de los efectos del estrés abiótico sobre la morfología del sistema radicular. Se puede observar la raíz primaria con un crecimiento constante y una raíz con la respuesta morfogenética inducida por estrés (SIMR) característica (Modificado de Potters *et al*. 2007).

3.3 Percepción de las señales externas a través de TOR

Las respuestas son iniciadas a nivel bioquímico y molecular, y requieren la coordinación de eventos celulares para asegurar la respuesta apropiada al estímulo dado. Las plantas han evolucionado con sofisticadas redes de comunicación intracelular e intercelular para llevar la información del estímulo percibido a la maquinaria responsable de la mediación de las respuestas (Hong-Bo *et al*. 2008). Varios segundos mensajeros como el calcio, nucleótidos cíclicos, fosfolípidos, etc., son empleados por las plantas para codificar la información y llevarla a los elementos río abajo de la señalización (proteínas), los cuales decodifican o interpretan las señales para iniciar diversas respuestas celulares tales como

cambios en la actividad enzimática, la modulación de la expresión génica, el rearreglo del citoesqueleto celular, entre otras (Bögre *et al*. 2003; Hong-Bo *et al*. 2008). Una de las casacadas de transducción de señales que está íntimamente relacionada con la disponibilidad de nutrientes, el estado energético celular, las señales del desarrollo así como factores de estrés, es la vía de señalización del blanco de la rapamicina (TOR por sus siglas en inglés) (Wullschleger *et al*. 2006, Díaz-Troya *et al*. 2008, Ma y Blenis 2009).

Las proteínas cinasas son componentes de varias vías de transducción de señales en eucariontes y han sido adaptadas en diferentes especies para acoplar diversos estímulos a la generación de una respuesta fisiológica específica (Turck *et al*. 1998). Además, dichas cinasas juegan papeles importantes en la transducción de las señales (Mizoguchi *et al*. 1995). TOR es una cinasa serina/treonina que pertenece a la familia de proteínas relacionadas con las cinasas de fosfatidilinositol (PIK por sus siglas en inglés) (Schemelzle y Hall 2000). En mamíferos TOR forma parte de dos complejos multiproteicos TORC1 y TORC2 (Martin y Hall 2005; Wullschleger *et al*. 2006) los cuales difieren en sus efectores río abajo. El primer complejo, TORC1 está integrado por TOR, la proteína reguladora asociada a TOR (RAPTOR) y por mLST8/GβL. Mientras que el segundo complejo TORC2 está integrado por TOR, la proteína acompañante de TOR insensible a la rapamicina (RICTOR/AVO3) y mLST8/GβL (Hara *et al*. 2002, Kim *et al*. 2002, Nojima *et al*. 2003). TORC1 fosforila a la cinasa de la proteína ribosomal S6 (PRS6) (S6K) y a las proteínas de unión al factor de inicio de la traducción eucariótico 4E (eIF4E) (4E-BPs), con lo cual se promueve la traducción y la biogénesis ribosomal de manera sensible a la rapamicina (Pearson *et al*. 1995). Por otra parte TORC2 tiene como blanco al citoesqueleto de actina y es insensible a la rapamicina (Abraham 2002, Jacinto y Hall 2003). Río arriba de la señalización de TOR se encuentran otros elementos como la proteína cinasa de fosfoinositidos (PI3K), que en mamíferos fosforila al fosfatidilinositoldifosfato (PIP2) de membrana, generando el fofatidilinositoltrifosfato (PIP3). La acumulación de PIP3 en la membrana, recluta a la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositidos (PDK1), la cual fosforila a AKT (PKB) la cual a su vez es fosforilada por TORC2, una vez completamente activa

AKT fosforila al complejo TSC1/TSC2 disociándolo, y permitiendo así que TSC1 realice su función de proteína activadora G sobre RHEB favoreciendo la activación del TORC1 para activar la señalización dependiente de dicho complejo. TORC1 fosforila entonces a S6K1, la cual requiere un segundo evento de fosforilación dependiente de PDK1 para que quedar completamente activa y mediar entonces la síntesis de proteínas.

Varios componentes de la vía de señalización TOR están presentes en *Arabidopsis* y son los candidatos ideales para operar el enlace entre el censado nutricional y la regulación del crecimiento (Menand *et al*. 2004). Algunos miembros de los complejos TOR tal como RAPTOR y las proteínas mLST8/GbL están presentes en plantas (Anderson *et al*. 2005, Deprost *et al*. 2005). Además, existen evidencias de sustratos y reguladores de TOR como la proteína S6K y otros miembros de la familia de las AGC cinasas (Turck *et al*. 2004) así como PDK1 (Deak *et al*. 1999, Bögre *et al*. 2003, Otterhag *et al*. 2006). Adicionalmente se ha reportado que PDK1 de *Arabidopsis* fosforila a S6K1, y que RAPTOR (al igual que en células de mamíferos) interactúa *in vivo* con S6K y TOR (a través de sus dominios HEAT) (Otterhag *et al*. 2006, Mahfouz *et al*. 2006). Por lo descrito anteriormente, se ha propuesto que la vía de señalización TOR-S6K en plantas opera de manera similar a la de mamíferos (Fig. 2). El papel antagónico de la ruta de señalización de TOR-S6K es llevado a través de las proteínas fosfatasas (PPasas), de entre ellas las del tipo 2A (PP2A) juegan un papel importante en la regulación del estado de fosforilación de S6K1 modulando su actividad (Peterson *et al*. 1999). Además se ha descrito que Tap46 (proteína asociada a PP2A) puede asociarse a la subunidad catalítica de las PPasas, manteniendo inactiva a las PP2As (Ahn *et al*. 2011).

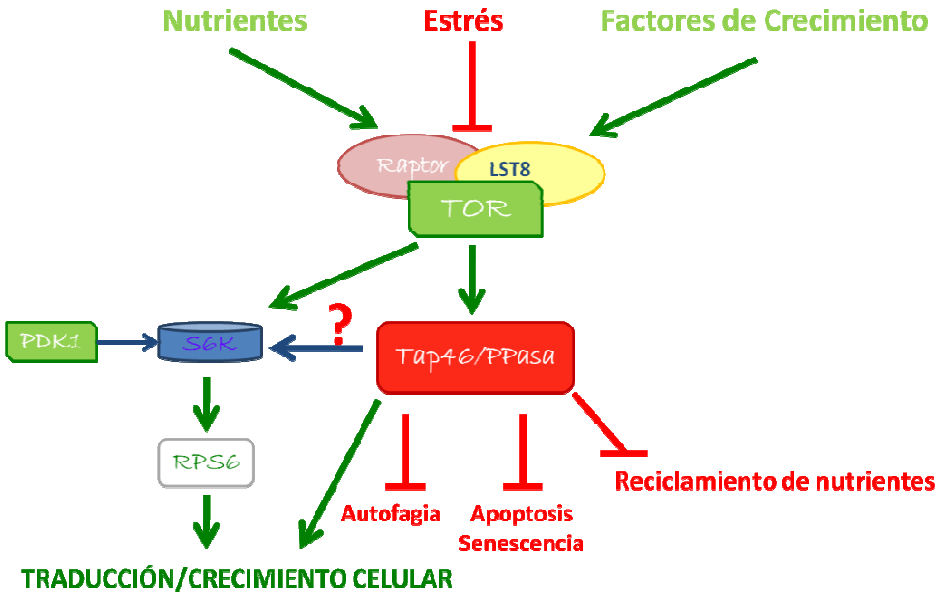


Fig.2 Modelo de la vía de señalización TOR en plantas. El complejo TOR integrado por RAPTOR, LST8 y TOR, regula la traducción, el metabolismo y el crecimiento vegetal en respuesta a señales de crecimiento, nutrientes y condiciones ambientales. Dicho complejo promueve el crecimiento celular y la traducción a través de la regulación de S6K y su sustrato PRS6. Se ha sugerido que Tap46 y su proteína asociada PP2Ac juegan un papel primordial en la regulación de la señalización de TOR, a través de la promoción de la traducción, la represión de la autofagia, el reciclamiento de nutrientes y la senescencia así como la muerte celular programada (apoptosis). Sin embargo, se desconoce si las PPasas pueden regular la actividad de S6K en plantas (Modificado de Anh *et al*. 2011).

3.4 Modulación de las respuestas celulares mediadas por TOR y S6Ks

La mayoría de los organismos metazoarios poseen dos genes que codifican para la proteína S6K (*S6K1* y *S6K2*). Estas cinasas muestran un nivel de identidad en su secuencia aminoacídica de ~70% de la proteína completa y un 83% en el dominio catalítico (Gout *et al*. 1998, Shima *et al.* 1998, Lee-Fruman *et al*. 1999). Se ha reportado la redundancia funcional entre S6K1 y S6K2 en la fosforilación de la PRS6, sin embargo, ambas cinasas desempeñan papeles adicionales, debido a que los ratones mutantes en *s6k1* o *s6k2* muestran fenotipos diferenciales, que sugieren que S6K1 juega un papel importante en la regulación del crecimiento y metabolismo, mientras que S6K2 modula, al menos en parte el tamaño celular (Pende *et al*. 2004).

En *Arabidopsis* se identificaron dos genes homólogos a *S6K* con una identidad del 87% (Mizoguchi *et al*. 1995) denominados *ATPK6* y *ATPK19*, y referidos después como *S6K1* y *S6K2* respectivamente. La proteína S6K2 fue propuesta como la ortóloga de p70S6K1 de mamíferos, debido a que mostró la capacidad de fosforilar a la PRS6 (Zhang *et al*. 1994; Turck *et al*. 1998). Posteriormente se demostró que S6K1 también fosforilaba a la PRS6. Adicionalmente, se encontró que S6K1 y S6K2 son principalmente de localización citoplasmática y nuclear, respectivamente; sugiriendo que los dos homólogos de *S6K* de *Arabidopsis* podrían desempeñar diferentes papeles funcionales además de la función conservada de fosforilar a la PRS6 (Mahfouz *et al*. 2006).

Tzeng *et al*. (2009) reportaron que S6K regula el crecimiento a través de la modulación de la elongación, al observar que la sobreexpresión del gen de la *S6K1* de lily (*LS6K1*) en *Arabidopsis*, disminuía la elongación celular en los órganos florales. S6K1 y TOR se expresan en las regiones meristemáticas del brote y de la raíz, tanto en *Arabidopsis* (Zhang *et al*. 1994) como en Lili (Tzeng *et al*. 2009), así como en células que se elongan activamente en la raíz (Zhang *et al*. 1994). También se ha reportado que S6K1 se asocia al complejo RBR1-E2F (factor transcripcional E2 relacionado al retinoblatoma 1) regulando negativamente la división celular, con lo que se establece una conexión entre el punto de control de la transición entre proliferación y diferenciación celular. Por lo que, una desregulación en dicho punto, podría influenciar el grado de poliploidia ocasionando inestabilidad cromosomal (Henriques *et al*. 2010). También se ha reportado que la actividad de las S6Ks de plantas se incrementa en respuesta a auxinas y citocininas (Turck *et al*. 2004).

3.5 Señalización de TOR-S6K durante el estrés

Las plantas enfrentan retos continuamente durante su ciclo de vida, la vía TOR en plantas es crucial por ser el enlace entre diferentes señales de estrés y por tanto modula el crecimiento y el destino celular bajo diferentes condiciones ambientales. En este sentido, las plantas con niveles de expresión de *AtTOR* alterados, están afectadas en la respuesta al estrés osmótico. En estas plantas, el nivel de expresión

de *AtTOR* está inversamente correlacionado con la sensibilidad de la raíz primaria al estrés osmótico: las líneas AtTOR-RNAi, son hipersensibles a elevadas concentraciones de azúcares debido a que estas poseen niveles elevados de carbohidratos (glucosa, fructuosa y sacarosa), mientras que las líneas sobreexpresantes son menos sensibles que las silvestres (Deprost *et al*. 2007), lo que sugiere que TOR es necesaria para el reciclamiento de nutrientes y que el nivel de expresión o actividad de la proteína pueden ser modulados durante el estrés osmótico. También, la expresión y la actividad de S6K son moduladas durante el estrés osmótico (Mizoguchi *et al*. 1995), durante dicho proceso disminuye el estado de fosforilación de S6K y por ende la actividad de la misma, lo cual es reflejado por una disminución en el estado de fosforilación de la PRS6; adicionalmente, líneas sobreexpresantes de S6K1 son hipersensibles a dicho estrés (Mahfouz *et al*. 2006). Estos datos sugieren que las respuestas al estrés osmótico pueden ser diferencialmente moduladas por las proteínas TOR y S6K, ya que las líneas mutantes o sobreexpresantes tanto en TOR como en S6K responden diferencialmente a dicho estrés, por lo que podrían actuar probablemente a través de diferentes transductores de señales en cada caso.

3.6 Proteínas fosfatasas tipo 2A

Una manera en que la célula regula diferentes procesos incluidas las vías de transducción de señales, es complementando el circuito de fosforilación y defosforilación. El papel antagónico de la ruta de señalización TOR es llevado a través de proteínas fosfatasas, entre ellas, las proteínas fosfatasas del tipo 2A (PP2A). En levaduras, TOR y PP2A regulan el nivel transcripcional de un conjunto de genes de respuesta a estrés mediante la fosforilación de factores transcripcionales, los cuales en estado fosforilado son mantenidos en el citoplasma. Bajo condiciones de estrés osmótico o deficiencia de nutrientes, estos factores transcripcionales son defosforilados y pueden translocarse al núcleo y regular la expresión de un conjunto de genes de respuesta a estrés (Beck y Hall 1999, Peterson *et al*. 1999, Rohde *et al*. 2001). Así que podría ser posible que dicho mecanismo de regulación estuviera conservado en plantas, sin embargo, esto no ha

sido determinado. Las fosfatasas PP2As son proteínas heterotriméricas que consisten de varias subunidades: una catalítica (C), una de andamiaje/reguladora (A) y una reguladora adicional (B). Estas fosfatasas regulan procesos celulares como la transcripción, la traducción, el ciclo celular, el metabolismo y la apoptosis en la mayoría de las células. El genoma de *Arabidopsis* codifica para 5 subunidades C, 3A y 17B, generando un total de 255 posibles holoenzimas (Kerk *et al*. 2002). En los animales, las subunidades B modulan la localización subcelular, la especificidad del sustrato y la actividad de las holoenzimas (Gallego y Virshup 2005). Mientras que las subunidades A y C están altamente conservadas entre los eucariotes, las subunidades B son diversas, hecho que es consistente con su función reguladora (Luan 2003).

En *Arabidopsis*, las PP2As desempeñan papeles esenciales en el desarrollo y la transducción de señales. Ha sido reportado que las fosfatasas PP2A participan en la modulación del PAT, antagonizando el efecto de la proteínas cinasa PINOID (PID) (proteína cinasa de las proteínas PIN), WAG1, y WAG2 sobre el estado de fosforilación de las proteínas PIN (Michniewicz *et al*. 2007, Dhonukshe *et al*. 2010, Huang *et al*. 2010, Zhang *et al*. 2010). La mutación en la subunidad de andamiaje A1 *rcn1*$^{-/-}$ (root curl in naphthyl phthalamic acid (NPA)) genera plantas con un elevado transporte basipetalo de auxinas en hipocotilos y raíces (Rashote *et al*. 2001). Además de la hipersensibilidad de la raíz primaria al estrés osmótico (Blakeslee *et al.* 2008), estás mutantes presentan una reducción de aproximadamente el 50% en la actividad de PP2A (Deruere *et al*. 1999). Estos datos y los anteriormente descritos sugieren una regulación cruzada entre las cinasas S6K y las fosfatasas PP2A en respuesta al estrés osmótico, debido a que estás últimas modulan el TPA y a su vez, la vía TOR-S6K es regulada de forma positiva por auxinas (Beltrán-Peña *et al*. 2002, Turck *et al*. 2004).

3.7 El ácido fosfatídico como un intermediario en las respuestas al estrés y la modulación de la actividad de la vía TOR-S6K

Los mecanismos celulares por los cuales las plantas responden al estrés osmótico son diversos e incluyen la regulación de la expresión de transportadores, la modulación de los componentes de la señalización y los reguladores epigenéticos (Apse *et al*. 1999; Zhu. 2002; Chinnusamy y Zhu. 2009). La modificación de los lípidos de las membranas producen varios segundos mensajeros como el ácido fosfatídico (PA por sus siglas en inglés), fosfoinositidos, inositol polifosfatos entre otros (Wang *et al*. 2004, Bargmann y Munnik 2006, Boss *et al*. 2009). El PA es producido en células vegetales como en células animales a través de la hidrólisis de fosfolípidos catalizada por la fosfolipasa D (PLD) (Munnik *et al*. 1998). Diferentes PLDs poseen funciones redundantes y únicas en la mediación del crecimiento y desarrollo vegetal durante el estrés crónico, a través de diferentes eventos celulares y moleculares. La PLD es activada durante el estrés hiperosmótico en *Arabidopsis* generando PA (Zhu 2002, Bray 2004). Se ha demostrado que el PA producido por PLD activa la señalización de TOR en mamíferos (Fang *et al*. 2001); recientemente se reportó que las auxinas y la insulina median sus efectos a través de la producción del PA en coleóptilos de maíz (Buentello-Volante *et al*. 2010). En este sentido, PLDζ2 regula el tráfico vesicular y es requerida en la mediación de la respuesta a auxinas, la sobreexpresión de dicha fosfolipasa estimula el reciclamiento vesicular y el transporte de auxinas en las células de la zona de transición (Mancuso *et al*. 2007). Además también se ha demostrado que la PLDα3 contribuye a la producción basal de PA y que dicho intermediario participa en la modulación de la actividad de la vía TOR-S6K durante el estrés osmótico como sucede en mamíferos (Hong *et al*. 2008). Sin embargo, se desconoce a qué nivel se lleva a cabo dicha modulación.

3.8 JUSTIFICACIÓN

Las plantas como organismos sésiles deben de ser capaces de adaptarse a los cambios en la intensidad de luz, temperatura y otros factores abióticos como la elevada salinidad en el suelo y la baja disponibilidad de agua. Bajo condiciones naturales, el estrés osmótico es producido por una elevada salinidad, sequía o congelamiento del suelo. Durante la exposición al estrés osmótico, las plantas exhiben un amplio rango de respuestas a nivel molecular, celular y en la planta completa. Estas respuestas incluyen cambios morfológicos y del desarrollo como la modulación del ciclo de vida, inhibición del crecimiento del brote y del sistema radicular, modulación del transporte iónico (la toma, la expulsión y el acomplejamiento de iones) y cambios metabólicos que implican la regulación del metabolismo del carbono, y la producción de moléculas osmoprotectoras. Algunos de estos efectos son desencadenados por las respuestas primarias al estrés osmótico, mientras que otros son originados como respuestas secundarias a dicho estrés. La respuesta morfogenética inducida por estrés (SIMR), engloba aspectos de respuesta primaria así como de respuesta secundaria, debido a que durante el estrés osmótico se regula la arquitectura del sistema radicular (dicha modulación esta fisiológicamente ligada a la regulación de la homeóstasis de auxinas), la cual a su vez se ha demostrado también es modulada por la producción de PA vía PLD, así mismo, el PA puede afectar el estado de activación de la vía de transducción de señales TOR-S6K. Durante el estrés osmótico, el crecimiento y desarrollo del sistema radicular es afectado, y debido a que la vía de transducción de señales TOR-S6K ha sido considerada como la vía maestra de regulación del crecimiento así como un integrador de las respuestas a estrés en eucariontes es posible que exista comunicación cruzada entre la vía de transducción de señales desencadenada por el estrés osmótico y la de TOR-S6K, por lo que dicha interacción puede ser disectada combinando aproximaciones genéticas y farmacológicas así como estudios bioquímicos y fisiológicos en *Arabidopsis thaliana.*

IV HIPÓTESIS

La regulación de la actividad de las proteínas S6K y PP2A contribuye en la modulación de la arquitectura del sistema radicular en respuesta al estrés osmótico en *Arabidopsis thaliana*.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar el papel de las proteínas S6K y PP2A de *Arabidopsis thaliana* en la mediación de las respuestas al estrés osmótico.

5.2 Objetivos específicos

1.- Analizar los efectos morfogenéticos inducidos por el NaCl en plántulas silvestres.

2.- Determinar cuál es la participación de las auxinas en la respuesta morfogenética inducida por NaCl.

3.- Medir la actividad de PP2A en condiciones de estrés osmótico en plántulas silvestres.

4.- Analizar los efectos morfogenéticos inducidos por el NaCl en plántulas mutantes *s6k1* y *s6k2* de *Arabidopsis thaliana*.

5.- Determinar los niveles del ácido fosfatídico en condiciones de estrés en plántulas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, *s6k1* y *s6k2*.

VI RESULTADOS

6.1 CAPÍTULO I "PP2A mediates lateral root development under NaCl-induced osmotic stress throughout auxin redistribution in *Arabidopsis thaliana*"

PP2A mediates lateral root development under NaCl-induced osmotic stress throughout auxin redistribution in Arabidopsis thaliana

Mauricio Nahuam Chávez-Avilés

Claudia Lizeth Andrade-Pérez &

Homero Reyes de la Cruz

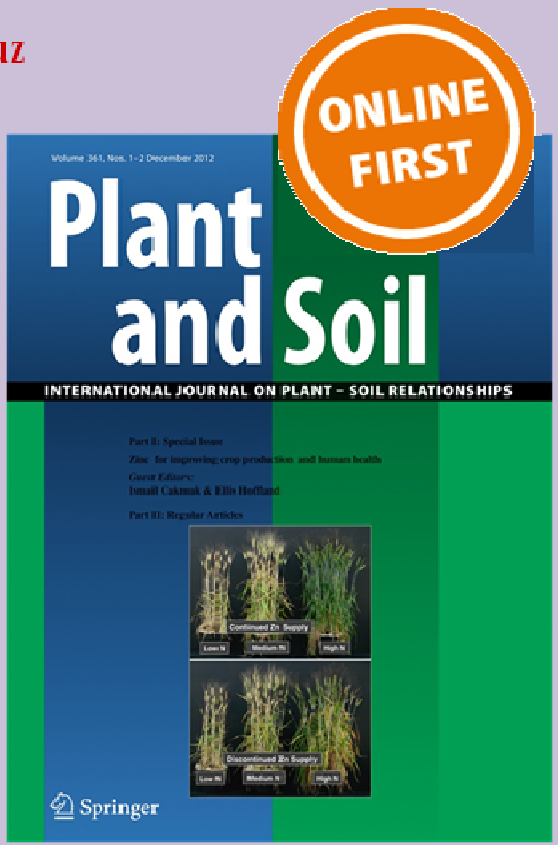
Plant and Soil

An International Journal on Plant-Soil Relationships

ISSN 0032-079X

Plant Soil

DOI 10.1007/s11104-012-1540-9



PP2A mediates lateral root development under NaCl-induced osmotic stress throughout auxin redistribution in *Arabidopsis thaliana*

Plant and Soil DOI 10.1007/s11104-02-1540-9

VI.1.a) Resumen

El desarrollo de las raíces laterales es regulado por programas modulados por fitohormonas, de entre las cuáles las auxinas juegan un papel esencial en la regulación de la organogénesis. Las auxinas son sintetizadas y almacenadas en los tejidos aéreos y son distribuidas hacia la punta de la raíz primaria mediante el transporte acropetalo. Posteriormente son distribuidas mediante el transporte basipetalo en un proceso célula-célula desencadenando la división asimétrica de las células del polo del xilema los cuales darán origen a las raíces laterales. Los niveles de auxinas pueden ser modulados en respuesta a diferentes condiciones como estrés, regulando así la arquitectura del sistema radicular (ASR) a través del crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de raíces laterales. En el presente trabajo se observó que el estrés salino inhibe el crecimiento de la raíz primaria y estimula el desarrollo de raíces laterales de manera dosis dependiente y se encontró que dicho proceso es regulado mediante el transporte. Adicionalmente una reducción del 50% de actividad de proteína fosfatasa tipo 2A (PP2A) fue asociada al estrés salino, mientras que la adición del inhibidor de PP2A (ácido okadaíco) al medio con el estrés presentó efectos aditivos sobre el fenotipo de respuesta al estrés salino. Estos datos sugieren que PP2A actúa como un regulador positivo en la modulación de la ASR durante el estrés salino.

Plant Soil
DOI 10.1007/s11104-012-1540-9

REGULAR ARTICLE

PP2A mediates lateral root development under NaCl-induced osmotic stress throughout auxin redistribution in *Arabidopsis thaliana*

Mauricio Nahuam Chávez-Avilés · Claudia Lizeth Andrade-Pérez · Homero Reyes de la Cruz

Received: 30 August 2012 / Accepted: 19 November 2012
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract
Aim Auxin plays an important role in modulating root system architecture. The effect of salinity on root development has been extensively studied; however, evidence on how salinity affects lateral root development and its underlying molecular mechanism is scarce. Here, we analyzed the role of protein phosphatase PP2A activity in auxin redistribution during Arabidopsis root system adaptation under NaCl-induced osmotic stress.
Method Arabidopsis Col-0 and *DR5::UidA* seedlings were grown in MS media containing NaCl alone or in combination with the auxin transport inhibitor naphthylphthalamic acid, the synthetic auxin α-Naphthaleneacetic acid or the phosphatase inhibitor Okadaic acid. After 8 days, primary root length and lateral root number in seedlings were quantified and the auxin distribution was analyzed.
Results Promotion of primary root shortening and lateral root development induced by osmotic stress correlated with an increase in active auxin content and a >50 % reduction in protein phosphatase type 2A (PP2A) activity. Moreover, the observed effects on seedlings under osmotic stress are more pronounced with the PP2A inhibitor Okadaic acid.
Conclusion Our data suggest PP2A is a positive regulator of osmotic stress-induced root system architecture modulation, involving auxin redistribution in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords Root system architecture · Auxin redistribution · Protein phosphatases · Osmotic stress

Abbreviations

LR	lateral root
RSA	root system architecture
PP2A	protein phosphatase type 2A
OA	Okadaic acid
PID	PINOID protein
PIN	PINFORMED protein
PAT	polar auxin transport
NPA	naphthylphthalamic acid
NAA	α-Naphthaleneacetic acid
dat	days after transference
dag	days after germination

Introduction

Plants, as sessile organisms, confront several challenges during their life cycle and must adapt to changes in light

Responsible Editor: John McPherson Cheeseman.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11104-012-1540-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. N. Chávez-Avilés · C. L. Andrade-Pérez · H. Reyes de la Cruz (✉)
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
Edificio B-3, Ciudad Universitaria,
Morelia, Michoacán, Mexico C.P. 58030
e-mail: delacruz@umich.mx

Published online: 04 December 2012

intensity, temperature, soil texture, and other abiotic factors such as high salinity and low water availability (Vickers et al. 2009). Significant changes in environmental water potentials can impose osmotic stress. Under natural conditions, high salinity and drought are the major causes of osmotic stress (Xiong and Zhu 2002). Plants respond to osmotic stress by modulating gene expression, cellular metabolism, and growth patterns. Changes in plant growth and development in response to osmotic stress are characterized by reduced foliar area and root system architecture remodeling (Kerk et al. 2002) (principal root growth shortening and increased lateral roots (LR) development) (Xiong and Zhu 2002). Auxin plays an important role in modulating RSA and during root system development; the establishment of auxin gradients with their maxima at the plant tips is essential for proper lateral root primordia (LRP) development (Wang et al. 2009). The modulation of cellular responses to external cues requires coordinated control of protein kinases and phosphatases to complet the circuit. Multiple complexes contain both signaling enzymes, which are important in the regulation and specificity of the signal transduction pathways. PINOID protein (PID) is a Ser-Thr kinase that mediates asymmetrical localization of the membrane-associated PINFORMED (PIN) family of auxin transport facilitators. PIN proteins mediate the polar efflux of auxins from cells, and their localization determines the direction of local intracellular auxin transport (Wisniewska et al. 2006). PIN localization can be modulated by different cues and its localization depends on its phosphorylation state (Friml et al. 2004). PID is recruited to phospholipid-enriched membrane fractions and activated by phosphatidyl-dependent kinase 1 (PDK1), initiating a signal cascade that leads to membrane localization of a polar auxin transport (PAT) complex, thus modulating RSA (Zegzouti et al. 2006). An antagonistic role must be filled in such modulation; in this sense, PP2As are the principal Ser/Thr protein phosphatases that regulate many cellular processes, including transcription, translation, cell cycle regulation, metabolism, and apoptosis in most cells (Kerk et al. 2002). These proteins are stronger candidates to convey the link that turns signal transduction pathways on and off in plant growth modulation. PP2As are heterotrimeric proteins composed of a catalytic subunit (PP2A-C), scaffold subunit (PP2A-A), and regulatory subunit (PP2A-B). The Arabidopsis genome encodes 5 C subunits, 3 A subunits, and 17 B subunits that can combine in up to 255 PP2A holoenzymes (Kerk et al. 2002). PP2As mediate PAT; *rcn1* (root curl in naphthylphthalamic acid [NPA], which encode a PP2A-A subunit) mutants exhibit pronounced root curling in the presence of NPA, an auxin transport inhibitor, and have shown increased sensitivity to this compound (Garbers et al. 1996). Moreover, PP2A antagonizes PIN phosphorylation by PID (Michniewicz et al. 2007). Additionally, *rcn1* mutants were hypersensitive to osmotic stress (Blakeslee et al. 2008).

There is scarce knowledge about the regulatory functions of PP2A-B and PP2A-C subunits in Arabidopsis. However, some have suggested roles for PP2As in plant osmotic stress responses. For instance, all catalytic subunits are upregulated in response to high salinity in rice (Yu et al. 2010; Yu et al. 2005) and potato (Pais et al. 2009) leaves. However, no evidence has been generated about the functional role of PP2As in the osmotic stress response in roots. Given the key role of the root system in mediating osmotic stress responses, we explored the role of PP2A in the modulation of RSA and its relationship with PAT and lateral root development in response to NaCl-induced osmotic stress. Using a pharmacological approach, we found that PP2A activity in roots was reduced by >50 % during osmotic stress. This result correlates with the primary root shortening and increased lateral root development induced by NaCl and is mediated by increased PAT. The stress-mediated effects, as well as PAT, increased with Okadaic acid, a PP2A inhibitor. These data suggest PP2A activity positively regulates salt stress responses through PAT modulation and auxin redistribution.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* Col-0) and the transgenic Arabidopsis line *DR5::uidA* (Ulmasov et al. 1997) were used for all experiments. Seeds were surface-disinfected with absolute ethanol for 5 min and with a disinfectant solution (sodium hypochlorite 5 % and SDS 1 %) for 5 min. After washing 5 times in sterile deionized water and 3 days of stratification at 4 °C, seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2× Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog 1962), (MS basal salt mixture,

Sigma), supplemented with 0.6 % (w/v) sucrose (USB), 1 % (w/v) phytoagar (Sigma) at pH 7.0 (0.9 gL^{-1} MS basal salt mixture, 0.2× MS). Four days after germination (Christensen et al. 2000), the seedlings were transferred to MS medium with the following formulations: NaCl (50, 75, 100, or 125 mM); 1 μM *N*-1-naphthylphthalamic acid (NPA, Chem Service) alone or in combination with 100 mM NaCl; 0.01 μM α-Naphthaleneacetic acid (NAA, Sigma) alone or in combination with 100 mM NaCl; and 1 nM okadaic acid (OA, Sigma) alone or in combination with 100 mM NaCl. Plates were placed vertically at an angle of ~65° to allow root growth along the agar surface under a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness at 21 ± 1 °C, using a plant growth chamber (Lumistell ICP-55). Transferred seedlings were grown for 8 days after transference (dat) and RSA or GUS activity were evaluated.

Root analysis

Radical system observation from *A. thaliana* seedlings was performed with a stereomicroscope (Luxeo 4-D, Labomed). Primary root length was measured using a ruler and LRs emerging from primary roots in wild-type and transgenic seedlings were observed with 4× zoom, and the total root number from each seedling was counted.

Histological analysis

In order to analyze GUS activity in the Arabidopsis *DR5::uidA* transgenic line, seedlings from each treatment group were incubated 4 h at 37 °C in reaction buffer (1.124 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide [X-Gluc]) in 200 mM sodium phosphate pH 7.0). Seedlings with blue staining were chemically treated for tissue clarification according to Malamy and Benfey (Malamy and Benfey 1997). At least 20 seedlings from each treatment were analyzed and a representative plant from each treatment was chosen and imaged using Nomarski optics on a Leica DMR microscope.

Developmental stage determination of lateral root primordia

Lateral root primordia (LRP) were counted on day 8 after transference. Stained *DR5::uidA* transgenic seedlings were cleared to facilitate visualization and counting of LRP. Each LRP was classified according to its developmental stage according to Malamy and Benfey (1997).

Protein phosphatase 2A assay

Arabidopsis roots were ground in liquid nitrogen and homogenized for 1 min in ice-cold sample buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 0.02 % (v/v) β-mercaptoethanol, and a protease inhibitor mix [Amersham Biosciences]). Cell debris was removed by centrifugation at 2,000 g for 10 min. The supernatant was centrifuged at 100,000 g at 4 °C for 1 h, and protein phosphatase 2A activity was measured using the Ser/Thr phosphatase assay system (Promega) according to the manufacturer's instructions. A calibration curve was generated using phosphate solutions and had correlation coefficient of $R^2 = 0.97$ (Fig. S1). Protein quantification was performed by Bradford assay (Bradford 1976) (Quick Start™ Bradford Dye Reagent, Bio-Rad).

Data analysis

Prism 5 (Graphpad software, La Jolla, CA) was used for all statistical analyses. Data were expressed as means±SE of 40 measurements and were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc analysis for testing differences in growth and root developmental responses or by the Student's *t*-test for PP2A activity. Differences were considered significant at $\alpha < 0.01$.

Results

Salt-induced osmotic stress modifies Arabidopsis RSA-modulating auxin transport

In order to analyze the effects of NaCl-induced osmotic stress on Arabidopsis root architecture, a transference system was employed. Arabidopsis seeds were placed and germinated on plates with 0.2× MS media, grown for 4 days, and then transferred to control and stress media containing various NaCl concentrations and grown for 8 days (Fig. 1). Primary root longitude and lateral root number and density were measured. We observed NaCl dose-dependent shortening of primary root length (Fig. 1a–f) and increased lateral root

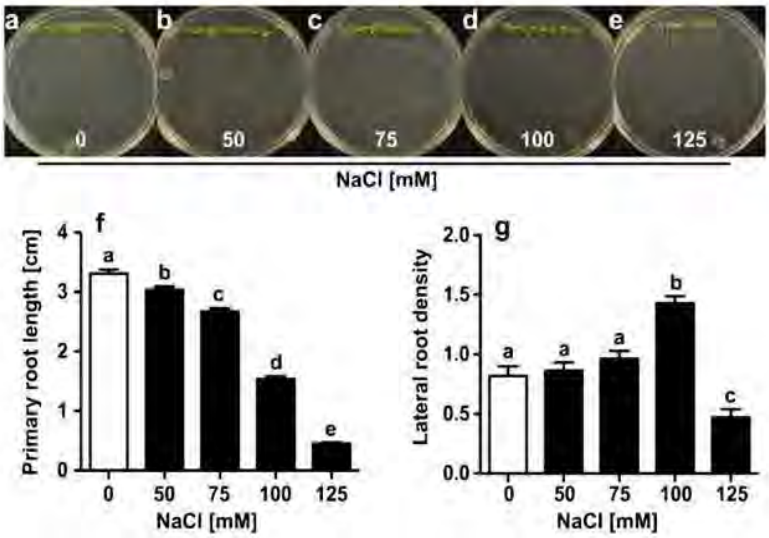


Fig. 1 NaCl-induced osmotic stress effects on Arabidopsis seedling development. Wild-type Arabidopsis (Col-0) seeds were germinated on 0.2× MS medium and 4 dag, the seedlings were transferred to 0.2× MS medium supplemented with NaCl. Eight days after transfer, the RSA was evaluated. Control (**a**), 50 mM NaCl (**b**), 75 mM NaCl (**c**), 100 mM NaCl (**d**), 125 mM NaCl (**e**), Primary root length (**f**), Lateral root density (**g**). *Photographs* show representative plates from each treatment. Data in f and g are means±SE, $n = 40$. *Different letters* represent statistically different means (0.01 significance level in Tukey's post hoc test). The experiment was repeated 3 times with similar results

density (Fig. 1g). To determine the mechanism of RSA modulation, 100 mM NaCl was chosen for further experiments, because at this concentration the seedlings demonstrated characteristic responses to osmotic stress (Fig. 1d, f, g), whereas 125 mM NaCl compromised plant viability and induce chlorosis in aerial tissues (Fig. 1e).

To analyze whether auxin redistribution mediates the RSA modulation observed in NaCl-induced osmotic stress, we employed the *DR5::uidA* transgenic line (Tanaka et al. 2006; Ulmasov et al. 1997). DR5 promoters are highly responsive to active auxin; therefore, promoter activity is an indirect indicator of endogenous auxin levels (Tanaka et al. 2006). After 8 days of growth in stress media (100 mM NaCl), *DR5::uidA* seedlings were stained with GUS and clarified according to Malamy and Benfey (1997) (Fig. 2). GUS activity increased in primary root and developing lateral root tips of stressed seedlings (Fig. 2e, f) vs. seedlings grown in control conditions (Fig. 2b, c). Increased active auxin levels were also observed in vascular tissue, suggesting NaCl-induced osmotic stress modulates RSA through auxin homeostasis modulation, increasing auxin transport.

To investigate whether salt-induced osmotic stress increases auxin transport or sensitivity, we evaluated the individual effects of NAA (a synthetic auxin that does not require transporters to enter cells) or NPA (an auxin transport inhibitor) in addition to plant growth media control (Fig. 3c and e, respectively) and stress conditions (Fig. 3d and f, respectively). No effects on primary root growth were observed with NAA or NPA in seedlings grown in control media (Fig. 3g). Moreover, NAA or NPA addition to stress media had no effect on primary root length inhibition in stressed seedlings (Fig. 3b, g). In contrast, seedlings grown in media supplemented with NPA showed the characteristic decrease in lateral root density (Fig. 3h). However, although NPA effectively repressed LR development in control seedlings, it did not completely restrain the osmotic effects on LR development (Fig. 3h). These data suggest modulation of RSA by salt-induced osmotic stress occurs through auxin transport regulation, not auxin sensitivity.

To determine whether salt-induced osmotic stress modulates polar auxin transport (PAT), we employed the Arabidopsis *DR5::uidA* transgenic line and evaluated the effects on endogenous active auxin levels

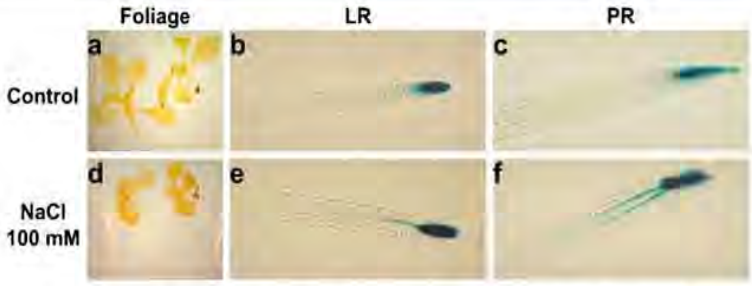


Fig. 2 NaCl-induced osmotic stress effects on Arabidopsis active auxin levels. *DR5::uidA* Arabidopsis seeds were germinated on 0.2× MS medium and 4 dag, the seedlings were transferred to 0.2× MS media supplemented without (**a**, **b**, **c**) or with 100 mM NaCl (**d**, **e**, **f**). Eight dat, the seedlings were stained for GUS activity and cleared for microscopic analysis: foliage at 0.8× (**a**, **d**), lateral root at 40× (**b**, **e**), primary root at 40× (**c**, **f**). *Photographs* show representative individuals of at least 20 stained seedlings. The experiment was repeated twice with similar results

under combined stress treatments with NAA or NPA (Fig. 4). NAA addition did not modify the auxin levels observed in control seedlings (Fig. 4g, m vs. i, o). In addition, the increased active auxin levels observed in developing lateral roots (Figs. 2e and 4h) and primary root tips (Figs. 2f and 4n) from stressed seedlings were not modified by NAA (Fig. 4j, p, respectively). In contrast, NPA reduces PAT in control and stressed seedlings, as demonstrated by a reduction in active auxin levels in lateral (Fig. 4k, l) and primary roots (Fig. 4q, r) tips. However, in the combined stress plus NPA treatment, active auxin levels in primary root vascular tissues

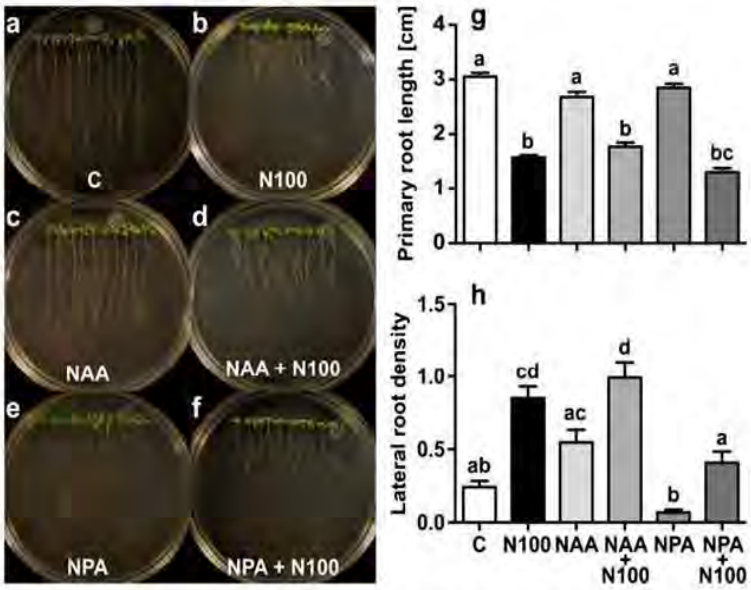


Fig. 3 NaCl-induced osmotic stress modulates LR development by increasing auxin transport. Wild-type Arabidopsis (Col-0) seeds were germinated on 0.2× MS medium and 4 dag, the seedlings were transferred to 0.2× MS with the indicated compound concentrations: Control + DMSO(**a**), 100 mM NaCl + DMSO (**b**), 0.01 μM NAA (**c**), 100 mM NaCl + 0.01 μM NAA (**d**), 1 μM NPA (**e**), 100 mM NaCl +1 μM NPA (**f**). Primary root length (**g**) and Lateral root density (**h**) in seedlings grown in control or 0.2× MS media supplemented with 100 mM NaCl (N100); 0.01 μM NAA alone (NAA) or in combination with 100 mM NaCl (NAA N100); 1 μM NPA alone (NPA) or in combination with 100 mM NaCl (NPA N100). *Data* in g and h show means±SE, $n = 40$. *Photographs* show plates representative of each treatment. *Different letters* represent statistically different means (0.01 significance level in Tukey's post hoc test). The experiment was repeated 3 times with similar results

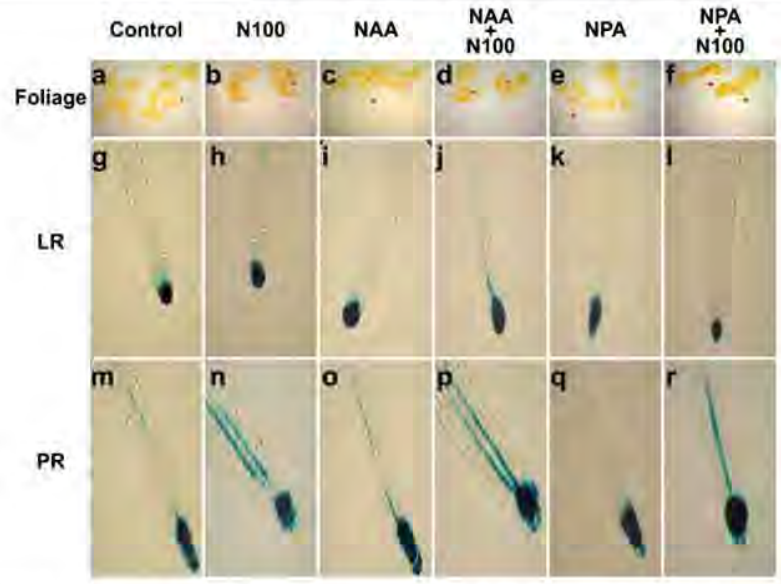


Fig. 4 Regulation of auxin transport during NaCl-induced osmotic stress. *DR5::uidA* Arabidopsis seeds were germinated on 0.2× MS medium and 4 dag, the seedlings were transferred to control 0.2× MS medium (**a**, **g**, **m**) or 0.2× MS medium supplemented with 100 mM NaCl (**b**, **h**, **n**); 0.01 μM NAA alone (**c**, **i**, **o**) or in combination with 100 mM NaCl (**d**, **j**, **p**); 1 μM NPA alone (**e**, **k**, **q**) or in combination with 100 mM NaCl (**f**, **l**, **r**). At 8 dat, the seedlings were stained for GUS activity and cleared for microscopy analysis. Foliage at 0.8× (**a**–**f**), Lateral roots at 40× (**g**–**l**), Primary root at 40× (**m**–**r**). *Photographs* are representative of at least 20 stained seedlings. The experiment was repeated twice with similar results

remain higher than in control or NPA-treated seedlings (Fig. 4r). These data suggest salt-induced osmotic stress modifies Arabidopsis RAS by modulating PAT.

Salt-induced osmotic stress changes lateral root primordia development

The increase in LR number could be due to induction of new LRP by activation of pericycle cells or by accelerated growth of preexistent lateral root primordia. To distinguish between these possibilities, LRP were counted from *DR5::uidA* seedlings at 8 dat to salt-induced osmotic stress media. Each LRP was classified according to its developmental stage according to Malamy and Benfey (1997). Osmotic stress diminished the total number of LRP vs. control or NAA treatment and yielded a slight, but not statistically significant, decrease on total LRP number with NAA; thus, NAA has no additional effects on LRP reduction in stressed seedlings (Fig. 5a). In the same way, seedlings grown in stress media with NPA trended to a lower total LRP number in comparison to salt stress or NPA conditions alone (Fig. 5a).

When the distribution of LRP developmental stages was evaluated, we observed that all stages of LRP were diminished in stressed seedlings (Fig. 5b, I VII), except for the lateral roots emerged (LRE), which showed a similar distribution (Fig. 5b, E). A displacement of primordia developmental stage to LRE was observed with NAA addition to seedlings grown in control media. Nevertheless, seedlings grown on stress media supplemented with NAA showed a similar pattern of developmental stage distribution. NPA addition to control media diminished LRP (Fig. 5a) and reduced all developmental stages, overall in LRE (Fig. 5b, E). When NPA was added to stress media, a reduction in all developmental stages was associated with stress condition alone; in particular, later stages of primordia development (V, VI, and VII) were absent. Interestingly, in seedlings grown in stress media with NPA, an increment in LRE with NPA was observed (Fig. 5b).

These data suggest salt-induced osmotic stress promotes modification of Arabidopsis RSA inducing de novo formation and LRP growth in an auxin transport-dependent manner.

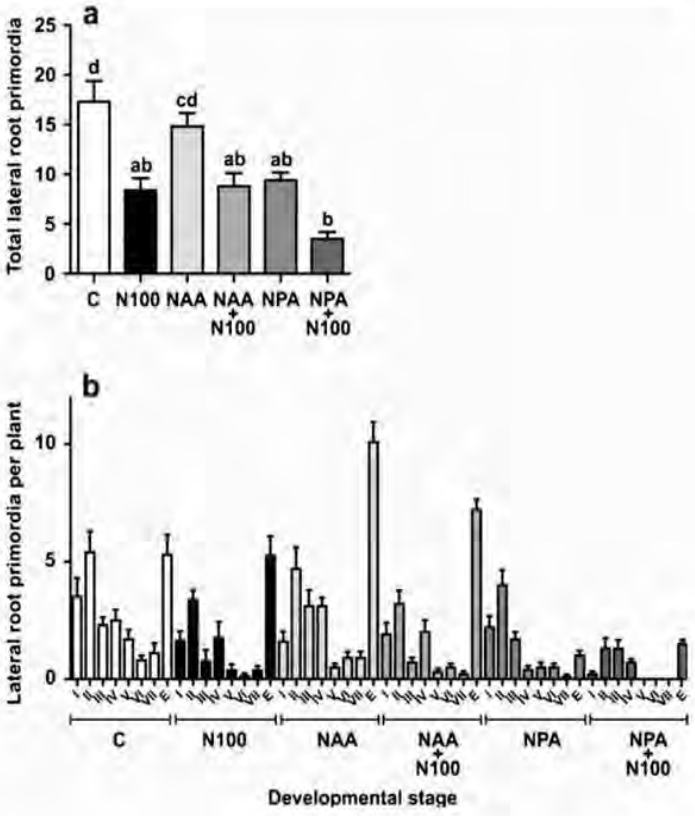


Fig. 5 NaCl-induced osmotic stress modulates LRP developmental stages. *DR5::uidA* Arabidopsis seeds were germinated on 0.2× MS medium and 4 dag, the seedlings were transferred to control 0.2× MS medium (C) or 0.2× MS medium supplemented with 100 mM NaCl (N100); 0.01 μM NAA alone (NAA) or in combination with 100 mM NaCl (NAA N100); 1 μM NPA alone (NPA) or in combination with 100 mM NaCl (NPA N100). Eight days after transfer, the seedlings were stained for GUS activity and cleared for microscopic analysis. The total lateral root primordia (**a**) and the developmental stages of each lateral root primordia (**b**) were quantified per plant. *Data* show means±SE, n = 40. *Different letters* in **a** represent statistically different means at 0.01 significance in Tukey's post hoc test. The experiment was repeated 3 times with similar results

Protein phosphatase type 2A activity mediates RSA and PAT-induced changes by salt-induced osmotic stress

In PAT modulation, efflux auxin transport is regulated by phosphorylation-dephosphorylation of PIN proteins by PID and PP2A, respectively. Evidence suggests that salt-induced osmotic stress modulates PAT. For this reason, we sought to determine whether PAT modulation could be mediated by PP2A activity regulation. To analyze this possibility, we obtained cell extracts from seedling roots at 8 dat to osmotic stress media and PP2A activity was determined. Osmotic stress clearly reduced (60 %) PP2A activity from stressed Arabidopsis roots (Fig. 6), suggesting this activity has an important role in osmotic stress responses.

To establish a connection between PP2A activity and the modulation of RSA by salt-induced osmotic stress, we evaluated the effects of the protein phosphatases

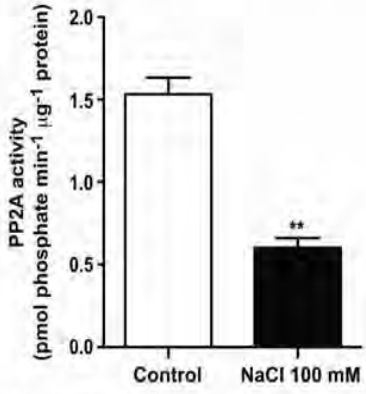


Fig. 6 NaCl-induced osmotic stress effects on PP2A activity in Arabidopsis roots. Wild-type Arabidopsis (Col-0) seeds were germinated on 0.2× MS medium and 4 dag, the seedlings were transferred to 0.2× MS without (control) or with 100 mM NaCl. After 8 days, the roots from all seedlings were separated and ground to obtain protein extracts for the PP2A activity assay. *Values* show the median±SE of 3 independent determinations ** $\alpha = 0.01$, Student's *t*-test

inhibitor okadaic acid (OA) (Fig. 7). It has been demonstrated that 1 nM OA specifically inhibits protein phosphatase type 2A (Rojo et al. 1998). Seedlings grown for 4 dag were transferred to control, control plus OA, salt stress, and salt stress plus OA media and grown for 8 dat. RSA in control seedlings (Figs. 1a and 7a) was not modified by addition of OA alone (Fig. 7b). Nevertheless, the effects of osmotic stress over RSA (primary root shortening and increased lateral root density) (Figs. 1d and 7c) were more pronounced when OA was added to the stress media (Fig. 7d-7f). These data suggest PP2A activity is only involved in osmotic stress-induced responses.

Salt stress seems to modulate RSA by modifying PAT. We investigated the role of PP2A on PAT changes. Arabidopsis *DR5::uidA* transgenic line seedlings were transferred to control, control plus OA, salt stress, and salt stress plus OA media and grown for 8 dat. The active auxin levels were similar in primary and lateral root tips from control (Fig. 8e, i) and OA treated seedlings (Fig. 8f, j); however, when the inhibitor was added to stress media, seedlings showed a slight increase in active auxin levels, a phenomenon that was more evident in vascular tissues from lateral and primary roots (Fig. 7h, l). These data suggest PP2A activity negatively modulates PAT during salt-induced osmotic stress.

Discussion

Effects of NaCl-induced osmotic stress on primary root growth and lateral root development

RSA modulation in response to diverse stimuli plays a decisive role in plant adaptation to stress conditions, leading to a stress-induced morphogenetic response (SIMR), which in RSA is characterized by primary root shortening (inhibition of root elongation) and induction of lateral root development (increased lateral root number) (Potters et al. 2007). Recent studies have provided valuable insights into the molecular and cellular mechanisms by which plants respond to salt-induced osmotic stress. Salt-induced

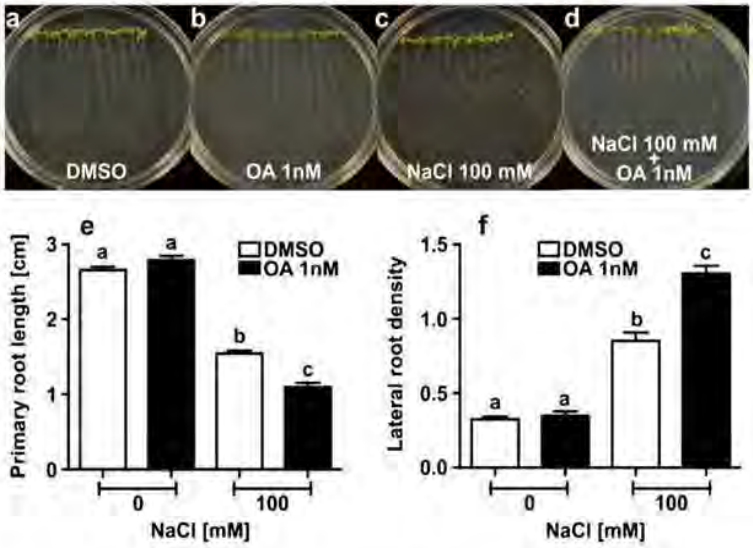


Fig. 7 OA effect on RSA modulation during NaCl-induced osmotic stress. Wild-type Arabidopsis (Col-0) seeds were germinated on 0.2× MS medium and 4 dag, the seedlings were transferred to 0.2× MS with the indicated compound concentrations. *Photographs* from representative seedlings grown in control 0.2× MS media supplemented with DMSO (**a**) or 0.2× MS media supplemented with 1 nM OA (**b**); 100 mM NaCl (**c**) or a combination of 1 nM OA plus 100 mM NaCl (**d**). Primary root length (**e**) and Lateral root density (**f**) from seedlings treated with DMSO (*white bars*) and 1 nM OA (*black bars*), were quantified. *Data* in e and f show means±SE, n = 40. *Different letters* represent statistical significance at 0.01 in Tukey's post hoc test. The experiment was repeated 3 times with similar results

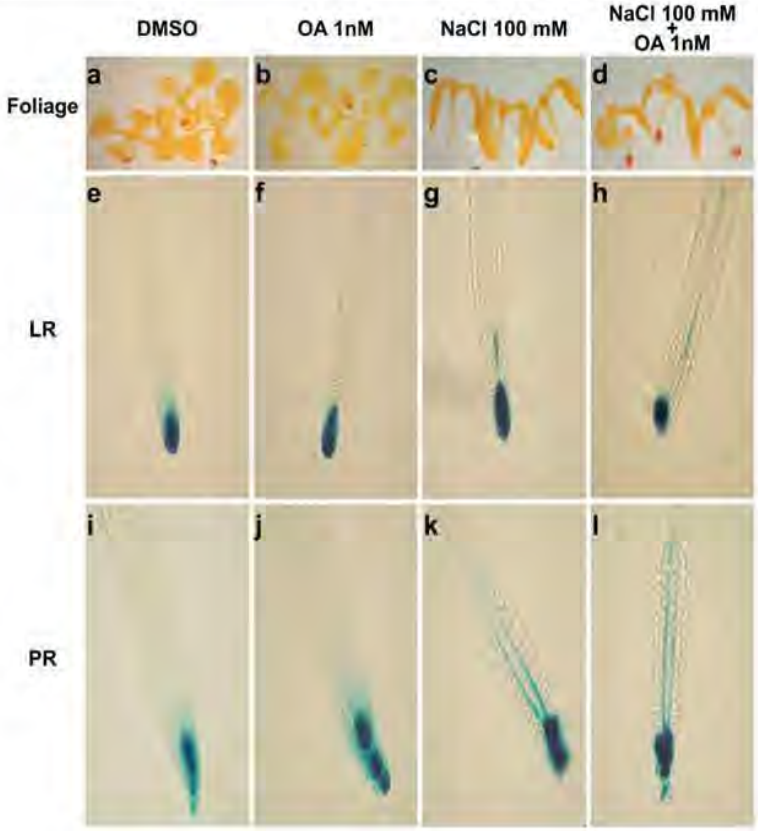


Fig. 8 OA effect on active auxin levels during NaCl-induced osmotic stress. *DR5::uidA* Arabidopsis seeds were germinated on 0.2× MS medium and 4 dag, the seedlings were transferred to 0.2× MS with the indicated compound concentrations. Seedlings were grown in control 0.2× MS media supplemented with DMSO (**a**, **e**, **i**) or 0.2× MS media supplemented with 1 nM OA (**b**, **f**, **j**); 100 mM NaCl (**c**, **g**, **k**) or combined 1 nM OA plus 100 mM NaCl (**d**, **h**, **l**). After 8 days, the seedlings were stained for GUS activity and cleared for microscopic analysis. Foliage at 0.8× (**a**–**d**), Lateral roots at 40× (**e**–**h**), Primary root at 40× (**i**–**l**). *Photographs* show representative individuals of at least 20 stained seedlings. The experiment was repeated twice with similar results

osmotic stress inhibits PR growth by reducing cell division and elongation, resulting in root apical meristem loss (West et al. 2004). However, descriptions of salt-induced osmotic stress effects on LR are inconsistent, because stimulation and inhibition of emergence and growth of LRs have been described in Arabidopsis (Wang et al. 2009; West et al. 2004; Zhao et al. 2011; Zolla et al. 2010). Thus, it is unclear whether salinity renders a characteristic SIMR. Our data show that at 100 mM NaCl, seedlings exhibit reduced PR growth and stimulated RL development, similar to the report by Wang et al. (2009). However, different results were obtained in previous reports, perhaps due to different experimental conditions and media formulations [supplementation with high sucrose (~2 %) or addition of micronutrients such as NO^{3-} and MS basal salts] (Wang et al. 2009; West et al. 2004; Zhao et al. 2011; Zolla et al. 2010).

Role of PAT in salt-induced SIMR

Plants activate different molecular and physiological mechanisms to adapt to salt stress and reprogram their development. Auxins are the principal intrinsic signal that control organ formation, including LR formation (Benkova et al. 2003; Friml et al. 2003). LR development is regulated by the formation of auxin gradients and establishment of auxin maxima in the root apex (Casimiro et al. 2001; Osmont et al. 2007; Peret et al. 2009). In this context, we employed the Arabidopsis *DR5::uidA* transgenic line to determinate if the SIMR induced by osmotic stress was mediated by auxin redistribution. Salt-induced osmotic stress stimulates accumulation of active auxins, observed as increased GUS activity in vascular tissues and lateral and primary root tips (Figs. 2e, f 2, 4h, n, 8g, k). These results are consistent with Wang et al. (2009), who observed that auxin content and distribution were markedly

affected by salt treatment. Alterations in auxin homeostasis during salt-induced osmotic stress could be explained mainly by increased auxin sensitivity, auxin production, or PAT modulation. Lateral root density increased under stress conditions and NPA almost completely inhibited PAT, reducing lateral root density; when seedlings were grown on salt plus NPA, lateral root density increased, indicating that osmotic stress overcame the inhibitory effect of NPA (Fig. 3h) and suggesting that the PAT modulation mechanism mediates alterations to auxin homeostasis. Thus, an increase in active auxin content was observed in the vascular tissue of primary roots from seedlings grown in osmotic stress (Figs. 2f, 4n), which is reduced by NPA (Fig. 4r). NPA tends to reduce LRP number increased by osmotic stress (Fig. 5a), suggesting that de novo LRP development induced by salt is mediated by increased auxin transport. LRE was similar between control and osmotic conditions (Fig. 5b, E), indicating this process is not affected by osmotic stress. Moreover, NPA addition to control or stress media diminished LRE and, with dual treatment, primordia in late developmental stages (V, VI, and VII) were absent, but were present under stress (Fig. 5b), providing additional evidence that salt-induced osmotic stress increases lateral root density and RSA through modulation of PAT. SIMR induced by osmotic stress originated by modulation of PAT triggering LRP development; this assumption is consistent with the work of Zolla et al. (2010), who observed that LR proliferation is mediated by salt stress, promoting auxin accumulation in developing LRPs.

PP2A activity and salt-induced SIMR

We have demonstrate that PAT has a key role in salt-induced SIMR; in this sense, the Arabidopsis auxin efflux carrier PIN2, which is distributed asymmetrically within cells, plays an important role in regulating basipetal auxin transport (Ottenschlager et al. 2003). Moreover, auxin redistribution is dependent of PIN2 protein levels and localization (Paciorek et al. 2005; Wisniewska et al. 2006). Localization of PIN proteins is regulated by phosphorylation by the serine/threonine kinase PINOID, which phosphorylates PIN proteins and leads to preferential apical PIN localization (Benjamins et al. 2001; Christensen et al. 2000), while reversible phosphorylation driven by PP2A renders hypophosphorylated PIN forms and induces basal PIN localization (Michniewicz et al. 2007). Modulation of RSA during salt-induced osmotic stress was dependent of auxin redistribution; for this reason, we determined the PP2A activity in roots from stressed seedlings, finding a reduction of 60 % (Fig. 6). Arabidopsis *rcn1*$^{-/-}$, which encodes subunit A of PP2A, showed increased stress sensitivity (Blakeslee et al. 2008), suggesting PP2A activity is required for stress tolerance. Additionally, *rcn1*$^{-/-}$ mutants have shown an increased basipetal auxin transport in hypocotyls and roots (Rashotte et al. 2001), which correlates with PP2A activity level in the mutant line (approximately 50 %) (Deruere et al. 1999). Together, these data support the hypothesis that PP2A activity is negatively regulated during osmotic stress; this regulation increases PAT, which, in turn, induces lateral root development. To establish a connection between PP2A activity and RSA modulation induced by osmotic stress, we evaluated the effects of the PP2A inhibitor OA at a concentration (1 nM) that specifically inhibits the protein phosphatase type 2A (Rojo et al. 1998). At this concentration, OA does not have effects on RSA (Fig. 7b), which could be explained by the fact that OA 1 nM was calculated to inhibit 50 % PP2A activity in cell extracts (Rojo et al. 1998); thus, hence higher doses may be required to produce plant responses similar those of osmotic stress conditions (Deruere et al. 1999). We also observed an OA additive effect on primary root shortening and increment in lateral root density from seedlings with OA added to the stress media (Fig. 7d). PAT also increased in the lateral and primary root of seedlings treated with salt plus OA (Fig. 8h, l). These data reinforce our hypothesis for the role of PP2A activity during salt stress, indicating that cross-talk between auxin and salt-induced osmotic stress signaling modulates LR development processes via the PP2A-dependent spatiotemporal accumulation and distribution of auxins.

Acknowledgments This work was supported by The CONACyT Grant no. 25540 and CIC-UMSNH Grant. No. 3.27 2009, 2010, 2011. Chávez-Avilés was recipient of CONACyT fellowship No. 211462. We thanks to Daniel Godínez Hernández and Marcia Yvette Gauthereau Torres for reviewing the manuscript.

References

Benjamins R, Quint A, Weijers D, Hooykaas P, Offringa R (2001) The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport. Development 128(20):4057–4067

Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. Cell 115(5):591–602. doi:10.1016/S0092-8674(03)00924-3

Blakeslee JJ, Zhou HW, Heath JT, Skottke KR, Barrios JA, Liu SY, DeLong A (2008) Specificity of RCN1-mediated protein phosphatase 2A regulation in meristem organization and stress response in roots. Plant Physiol 146(2):539–553. doi:10.1104/pp.107.112995

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inze D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. Plant Cell 13(4):843–852

Christensen SK, Dagenais N, Chory J, Weigel D (2000) Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. Cell 100(4):469–478. doi:10.1016/S0092-8674(00)80682-0

Deruere J, Jackson K, Garbers C, Soll D, Delong A (1999) The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo. Plant J 20(4):389–399. doi:10.1046/j.1365-313x.1999.00607.x

Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. Nature 426(6963):147–153. doi:10.1038/nature02085

Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, Ouwerkerk PB, Ljung K, Sandberg G, Hooykaas PJ, Palme K, Offringa R (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. Science 306(5697):862–865. doi:10.1126/science.1100618

Garbers C, DeLong A, Deruere J, Bernasconi P, Soll D (1996) A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in Arabidopsis. EMBO J 15(9):2115–2124

Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Barsam B, Veretnik S, Gribskov M (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. Plant Physiol 129(2):908–925. doi:10.1104/pp.004002

Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development 124(1):33–44

Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler MG, Ohno C, Zhang J, Huang F, Schwab R, Weigel D, Meyerowitz EM, Luschnig C, Offringa R, Friml J (2007) Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. Cell 130(6):1044–1056. doi:10.1016/j.cell.2007.07.033

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and Bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15(3):473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. Annu Rev Plant Biol 58:93–113. doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806.104006

Ottenschlager I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M, Palme K (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100(5):2987–2991. doi:10.1073/pnas.0437936100

Paciorek T, Zazimalova E, Ruthardt N, Petrasek J, Stierhof YD, Kleine-Vehn J, Morris DA, Emans N, Jurgens G, Geldner N, Friml J (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. Nature 435(7046):1251–1256. doi:10.1038/nature03633

Pais SM, Gonzalez MA, Tellez-Inon MT, Capiati DA (2009) Characterization of potato (Solanum tuberosum) and tomato (Solanum lycopersicum) protein phosphatases type 2A catalytic subunits and their involvement in stress responses. Planta 230(1):13–25. doi:10.1007/s00425-009-0923-5

Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. Trends Plant Sci 14(7):399–408. doi:10.1016/j.tplants.2009.05.002

Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MA (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? Trends Plant Sci 12(3):98–105. doi:10.1016/j.tplants.2007.01.004

Rashotte AM, DeLong A, Muday GK (2001) Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. Plant Cell 13(7):1683–1697

Rojo E, Titarenko E, Leon J, Berger S, Vancanneyt G, Sanchez-Serrano JJ (1998) Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 13(2):153–165

Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer P, Friml J (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. Cell Mol Life Sci 63(23):2738–2754. doi:10.1007/s00018-006-6116-5

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell 9(11):1963–1971. doi:10.1105/tpc.9.11.1963

Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. Nat Chem Biol 5(5):283–291. doi:10.1038/nchembio.158

Wang Y, Li K, Li X (2009) Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. J Plant Physiol 166(15):1637–1645. doi:10.1016/j.jplph.2009.04.009

West G, Inze D, Beemster GT (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. Plant Physiol 135(2):1050–1058. doi:10.1104/pp.104.040022

Wisniewska J, Xu J, Seifertova D, Brewer PB, Ruzicka K, Blilou I, Rouquie D, Benkova E, Scheres B, Friml J (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. Science 312(5775):883. doi:10.1126/science.1121356

Xiong L, Zhu JK (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant Cell Environ 25(2):131–139. doi:10.1046/j.1365-3040.2002.00782.x

Yu RM, Wong MM, Jack RW, Kong RY (2005) Structure, evolution and expression of a second subfamily of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes in the rice plant

(Oryza sativa L.). Planta 222(5):757–768. doi:10.1007/s00425-005-0018-x

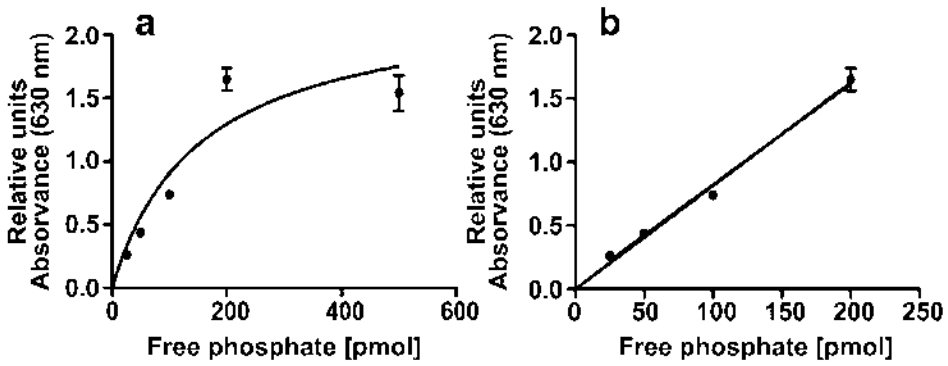
Yu L, Nie J, Cao C, Jin Y, Yan M, Wang F, Liu J, Xiao Y, Liang Y, Zhang W (2010) Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol 188(3):762–773. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03422.x

Zegzouti H, Anthony RG, Jahchan N, Bogre L, Christensen SK (2006) Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 103(16):6404–6409. doi:10.1073/pnas.0510283103

Zhao Y, Wang T, Zhang W, Li X (2011) SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in Arabidopsis. New Phytol 189(4):1122–1134. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03545.x

Zolla G, Heimer YM, Barak S (2010) Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. J Exp Bot 61(1):211–224. doi:10.1093/jxb/erp290

Supplementary Material



Supplementary material S1. Calibration plot of phosphate by spectrofotometric method.

6.2 CAPÍTULO II "Las proteínas S6Ks de *Arabidopsis thaliana* modulan el desarrollo de raíces laterales en respuesta al estrés osmótico a través de la regulación diferencial de la producción del ácido fosfatídico"

Chávez-Avilés Mauricio Nahuam y Reyes de la Cruz Homero.

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B-3. Morelia, Mich., México. C.P. 58030 Tel-Fax. (443) 326-57-88 Ext 115

6.2.1 Resumen

Las membranas celulares juegan un papel importante en la percepción del estrés y en la modulación de las vías de transducción de señales. Avances recientes indican que los lípidos de membrana son una fuente rica en segundos mensajeros en respuesta a estrés en las plantas. El ácido fosfatídico (PA por sus siglas en inglés) desempeña un papel importante en la modulación de la arquitectura del sistema radicular (ASR) en condiciones de estrés osmótico, el cual es originado por la modulación de la homeóstasis de auxinas, generando el fenotipo de la ASR, caracterizado por la disminución del crecimiento de la raíz primaria (RP) y un incremento en el desarrollo de raíces laterales (RLs), el cual es dependiente de la producción del PA. Adicionalmente, el PA ha sido implicado en la modulación de la vía de transducción de señales TOR-S6K, la cual regula el crecimiento y desarrollo. En el presente trabajo, observamos que el estrés osmótico inducido por NaCl inhibe el crecimiento de la RP y promueve el desarrollo de RLs de manera dosis-dependiente. Se observó que en condiciones de estrés en las raíces se incrementan 2 y 6 veces respectivamente, los niveles de transcritos de *S6K1* y *S6K2*. Las mutantes en *s6k1* y *s6k2* mostraron un fenotipo de tolerancia al acortamiento de la RP con un crecimiento adicional del 18 y 23% respectivamente, con respecto a la línea silvestre y una disminución del desarrollo de RLs. Se observó que la ASR es modulada a través de la regulación del transporte polar de auxinas (TPA). Interesantemente, se encontró que la producción de PA en las líneas mutantes está aumentada en condiciones basales y que es diferencialmente modulada

en respuesta al estrés osmótico. Estos datos sugieren que las cinasas S6Ks podrían regular positivamente las respuestas al estrés.

6.2.2 Abstract

Cell membranes play key roles in stress perception and signal transduction modulation. Recent results indicate that membrane lipids are rich sources for second messengers in plant responses to stress. Phosphatidic acid (PA) have a key role in the modulation of the root system architecture (RSA) in osmotic stress condition. RSA modulation in response to diverse stimuli plays a decisive role in plant adaptation process to stress conditions, in which RSA is characterized by a primary root (PR) shortening (by inhibition of root elongation) and increasing lateral root number (RLs), which is originated by auxin homeostasis regulation in a PA dependent way. Additionally, PA has been implicated in the modulation of TOR-S6K signal pathway, which regulates plant growth and development. In this work we observed that salt stress inhibit primary root growth and promote LR development in a dose dependent way. An increase in *S6K1* and *S6K2* transcript levels (2 and 6 fold respectively) was observed in roots from stressed seedlings. Additionally, *s6k1* and *s6k2* insertional mutant lines shown tolerance to the effects triggered by the osmotic stress condition, reflected as a PR growth increased 18 and 23% respectively and a diminished RLs number compared with the control line. Moreover, the RSA modulation in response to osmotic stress was originated by modulating the polar auxin transport (PAT). Interestingly, alterations in PA production were observed in the mutant lines. Together this data suggest that S6K proteins could positively regulate osmotic stress responses.

6.2.3 INTRODUCCIÓN

Las plantas como organismos sésiles necesitan ajustar su crecimiento y desarrollo en respuesta a las señales ambientales, hormonales y nutricionales. La percepción y transducción de esta información es esencial para la supervivencia (Robert y Offringa 2008). En la naturaleza, el estrés osmótico es representado por una elevada salinidad en el suelo (Vickers *et al.* 2009); en este tipo de estrés ocurren cambios morfológicos característicos como la disminución del área foliar y la modulación del sistema

radicular, entre otros (Xiong y Zhu 2002). Las auxinas juegan un papel central en el crecimiento y desarrollo vegetal (Woodward 2005) y las respuestas a estas en diversos procesos del desarrollo pueden ser reguladas a tres niveles: mediante el metabolismo, el transporte direccional y mediante la vía de transducción de señales (Chapman y Estelle 2009; Petrasek y Friml 2009; Zhao 2010; Ludwig-Müller 2011). El estrés salino, disminuye el crecimiento de la raíz primaria a través de la inhibición de la elongación y la división celular, lo que resulta en la pérdida del meristemo apical radicular (RAM por sus siglas en inglés) (West 2004). Sin embargo, el efecto del estrés salino sobre el desarrollo de las raíces laterales es controversial debido a que se ha descrito la estimulación e inhibición de la emergencia y el crecimiento de raíces laterales a través de la modulación del transporte polar de auxinas (TPA) en *Arabidopsis* (West 2004; Wang *et al.* 2009; Zolla *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2011). Otro de los mecanismos por los cuales las plantas responden al estrés es mediante la modulación de las vías de transducción de señales. Por ejemplo, se ha reportado que en coleóptilos de maíz, las auxinas median sus efectos a través de la producción del ácido fosfatídico (PA por sus siglas en inglés) (Buentello Volante *et al.* 2010). El PA es producido en células vegetales de la raíz a través de la hidrólisis de fosfolípidos como la fosfatidilcolina, catalizada por la fosfolipasa D (PLD), como en células animales, la cual es activada durante el estrés hiperosmótico en *Arabidopsis* generando PA (Munnik *et al.* 1998). La PLDζ2 regula el tráfico vesicular y es requerida en la mediación de la respuesta a auxinas. La sobreexpresión de PLDζ2 estimula el reciclamiento vesicular y el transporte de auxinas en las células de la zona de transición de la RP (Mancuso *et al.* 2007). Adicionalmente, se ha reportado que el PA producido a través de la PLD activa la vía de señalización de TOR-S6K en mamíferos, la cual a su vez regula la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y las respuestas a estrés (Fang *et al.* 2001). TOR juega un papel importante en el crecimiento celular y en la regulación del desarrollo, así como en el estrés hiperosmótico en *Arabidopsis*, (Menand *et al.* 2002; Mahfouz 2006). También se ha observado que la PLDα3 contribuye a la producción basal de PA en *Arabidopsis*, y que las mutantes *pldα3* muestran un mayor grado de sensibilidad al estrés salino el cual correlaciona con el estado de fosforilación de la proteína S6K en respuesta al estrés hiperosmótico (Hong

et al. 2008). Además el nivel de expresión de *S6K1* y *S6K2* es incrementado durante el estrés salino (Mizoguchi *et al.* 1995). Debido a la importancia de la modulación del sistema radicular en la respuesta al estrés osmótico, sería interesante determinar el papel de las proteínas S6K y su posible interacción con la producción de PA durante este tipo de estrés. Para responder esta pregunta se llevaron a cabo estrategias farmacológicas, genéticas y bioquímicas. Se realizó una curva dosis-respuesta al NaCl, en donde se encontró que a 100 mM NaCl, existe una disminución del crecimiento de la raíz primaria y un incremento en la densidad de raíces laterales, y se observó que dicho proceso fué regulado por la modulación del TPA. Se determinó que en raíces de plántulas estresadas con 100 mM NaCl hay un incremento en los niveles de expresión de *S6K1* y *S6K2* de 2 y 6 veces respectivamente. Adicionalmente, plántulas mutantes sencillas en *s6k1* y *s6k2* mostraron tolerancia a los efectos inducidos por el estrés osmótico reflejado por un incremento del crecimiento de la raíz primaria del 18 y 23% respectivamente a 100 mM NaCl y una tolerancia a la inducción de raíces laterales. Debido a que el PA participa en la mediación de las respuestas al estrés osmótico y es capaz de modular la activación de la vía de TOR-S6K, este fue determinado. Se observó que la producción del PA se incrementa hasta 2.37 veces en las raíces de plántulas silvestres estresadas con 100 mM NaCl, mientras que en la condición control ambas mutantes mostraron un incremento de 2.13 veces. Sin embargo, en condiciones de estrés osmótico el nivel de producción de PA en la mutante *s6k1* fué similar a los niveles de PA de la línea *Wt*. Interesantemente, el nivel de producción de PA en la mutante *s6k2* en respuesta al estrés osmótico disminuyó un 50% con respecto a la producción en condiciones control. Estos datos indican que la actividad cinasa codificada por dichos genes regula positivamente la respuesta al estrés osmótico probablemente a través de la regulación diferencial de la producción del PA y que la S6K2 podría ser el principal regulador en este proceso.

6.2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.4.1 Caracterización de las mutantes knockout en *s6k1* y *s6k2*

Líneas mutantes insercionales T-DNA en *s6k1* y *s6k2* fueron obtenidas de la colección SALK de *Arabidopsis thaliana* (SALK_113295 y SALK_013331 o SALK039937, respectivamente). Para identificar las mutantes en *s6k1* y *s6k2* se buscaron alelos insercionales de cada locus entre las líneas de T-DNA. Las líneas insercionales T-DNA homócigas para *S6K1* y *S6K2* se identificaron mediante PCR usando los oligos específicos para *S6K1*: LP 5'-TTTGCATGATGTAAAATTAACTTACG-3' y RP 5'-AAAGGACATGATAAGGCTGCC-3'; para S6K2-039937: LP 5;-TCTGTATCGATTTTTCCCGTG-3' y RP 5'-TTTCAGGTGCCATATACTCCG-3' o S6K2-01331: LP 5´-TCCGATGAAGGAATGATTGAG-3´ y RP 5´-ATGCTGAATACATGAAAGCCG-3´ además de los oligos LBb1.3 FW 5'-CGAAATCGGCAAAATCCCTTA-3' y LBb1.3 RV 5'-CACTGGCCGTCGTTTTACAACG-3' para amplificar el T-DNA. Se realizó la extracción de DNA con la técnica del TRIzol® de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95℃/2 minutos, después a 35 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 95℃/30 segundos (desnaturalización), 60℃/30 segundos (alineamiento), 72℃/1 minutos (po limerización) y un ciclo final de 72℃/5 minutos con el kit de GoTaq®DNA Polimerasa (Promega), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Los ciclos de amplificación se realizaron en el termociclador Px2 ThermalCycler de Thermo electron corporation. Se corrió una electroforesis del producto de PCR para verificar los tamaños de los productos. Una vez realizada la genotipificación de las mutantes se determinó la presencia o ausencia de los transcritos de *S6K1* y *S6K2* empleando el RNA extraído mediante la técnica del TRIzol® de acuerdo a las recomendaciones del proveedor, empleando los oligos ATPK1FW 5'-GGTGCGTTTGGGAAAGTCTACCAGGTG-3', ATPK1RV 5'-GTGGCTTTCCTGTGAGCATCTC-3' y ATPK2AtFW 5' CTTCCAGCTCTATCACCAAGGGC-3', ATPK2AtRV 5'-GCATCAGAGTTGGGACTACTTGCTGG-3', empleando el kit SuperScript®III One Step RT-PCR with Platinum®*Taq* (Invitrogen). La RT-PCR se realizó bajo las siguientes

condiciones: síntesis de cDNA, un ciclo 60 ºC durante 30 min, desnaturalización, un ciclo a 94 ℃ durante 2 minutos, 35 ciclos de amplificación, como se describe a continuación: desnaturalización a 94℃ durante 15 segundos, alineamiento a 60℃ durante 45 segundos y una extensión a 68℃ durante 45 segundos, un ciclo a 68℃ durante 5 minutos. Los productos de PCR o RT-PCR fueron visualizados por tinción con Gel-Red (Norgen) sobre un gel de agarosa al 1.2% después del corrimiento electroforético.

6.2.4.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia Col-O, de la línea transgénica *DR5::uidA* (Ulmasov *et al.* 1997) y de las líneas mutantes insercionales en los alelos de *s6k1*$^{-/-}$ (113295) and *s6k2*$^{-/-}$ (039937). Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con 95% de etanol (v/v) por 5 minutos y con una solución desinfectante (hipoclorito de sodio al 5% y SDS 10%) durante 5 minutos, se lavaron 5 veces con agua destilada y se vernalizaron por 2 días a 4℃. Las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas petri con medio Murashige-Skoog 0.2X (Murashige y Skoog 1962) (MS basal salt mixture, Sigma), adicionado con 0.6% (p/v) de sacarosa (USB), pH 7 con 1% (p/v) de fitoagar (Sigma). Cuatro días después de la germinación (ddg) (Christensen *et al.* 2000), las plántulas fueron transferidas al medio MS 0.2X adicionado con las siguientes formulaciones: 0, 50, 75 100 ó 125 mM NaCl. Las placas fueron incubadas en una cámara de crecimiento para plantas (Lumistell ICP-55) y fueron colocadas verticalmente a un ángulo de ~65° para permitir el crecimiento a lo largo de la superficie del medio bajo un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h obscuridad a 21 ℃. Las plántulas transferidas fueron crecidas durante 8 días después de la transferencia (ddt) y el sistema de la arquitectura radicular, la actividad de la β-glucoronidasa (GUS), los niveles de expresión de *S6K1* y *S6K2* o la producción de PA fueron evaluados.

6.2.4.3 Análisis de la arquitectura del sistema radicular

El análisis de la arquitectura sistema radicular de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* se realizó empleando un estereoscopio (Luxeo 4-D, Labomed). Se evaluó el número de raíces laterales emergidas de la raíz primaria en las líneas silvestres y mutantes con el aumento 4X obteniéndose el número total de raíces en cada plántula; la longitud de la raíz primaria fue obtenida empleando una regla. Se midieron 15 plántulas de 3 experimentos independientes de crecimiento lado a lado.

6.2.4.4 Análisis histológico

Para analizar la actividad de GUS en la línea transgénica de Arabidopsis*DR5::uidA*, las plántulas de cada tratamiento fueron incubadas 4 h a 37 ℃ en el amortiguador de reacción [1.124 mM 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-glucoronido (X-Gluc) en 200 mM de amortiguador de fosfatos pH 7.0]. Las plántulas con la coloración característica fueron sometidas a un tratamiento químico para realizar el clareo de tejidos de acuerdo a Malamy y Benfey (1997). Al menos 20 plántulas de cada tratamiento fueron analizadas, y plántulas representativas fueron seleccionadas y fotografiadas empleando la microscopia de Nomarski en un microscopio Leica DMR.

6.2.4.5 Determinación de los niveles de expresión de los transcritos de *S6K1* y *S6K2* en condiciones de estrés osmótico

Para determinar los niveles de expresión, el RNA total fue extraído mediante la técnica de Trizol® a partir de las raíces de plántulas crecidas en condiciones control y en estrés osmótico (100 mM NaCl). El DNA fue removido del RNA total mediante la digestión con DNasa libre de RNasa de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Invitrogen). El RNA fue empleado como molde para llevar a cabo el RT-PCR con el kit Super Script® III One Step RT-PCR with Platinum® *Taq* (Invitrogen). El nivel de expresión de *S6K1* y *S6K2* fue normalizado con respecto al de *UBQ5*, mediante un análisis densitométrico empleando el programa ImageJ (Schneider 2012). Para llevar a cabo la amplificación de los transcritos *S6K1* y *S6K2* se emplearon las parejas de oligos ATPK1FW, ATPK1RV y ATPK2AtFW, ATPK2AtRV; antes descritos, y para la *UBQ5* se usaron los oligos UBQ5FW 5’-CTTGAAGAC

GGCCGTACCCTC-3' y UBQ5RV 5'-CGCTGAACCTTTCCAGATCCATCG-3'. La RT-PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: síntesis de cDNA, un ciclo a 60 ºC durante 30 min, desnaturalización un ciclo a 94℃ durante 2 minutos, 35 ciclos de amplificación, como se describe a continuación: desnaturalización a 94℃ durante 15 segundos, alineamiento a 60℃ durante 45 segundos y una extensión a 68℃ durante 45 segundos, un ciclo a 68℃ durante 5 minutos.

6.2.4.6 Extracción de lípidos y determinación de ácido fosfatídico

La extracción de lípidos fue realizada de acuerdo a Devaiah (Devaiah *et al.* 2006). Brevemente, las raíces de plántulas crecidas en condiciones control y de estrés (100 mM NaCl) fueron separadas del follaje e inmediatamente se sumergieron en 1.5 mL de isopropanol al 75% adicionado con 0.01% de guaiacol (SIGMA) durante 15 min, después se agregaron 1.5 mL de cloroformo y 0.6mL de agua y se incubaron con agitación por 1 h. Posteriormente, el solvente fue transferido a un tubo limpio. Las raíces fueron re-extraídas con una solución cloroformo:metanol (2:1) cinco veces con agitación constante durante 30 min cada una; los extractos fueron combinados y lavados con 1 M KCl, seguido de otro lavado con agua. El solvente fue evaporado mediante calor hasta sequedad, los lípidos se disolvieron con 2.5 mL de una solución 10 mM Triton X-100 mediante sonicación. Del tejido remanente se obtuvo el peso seco a 50 ℃ hasta peso constante. Se determinó la concentración del PA espectrofotométricamente de acuerdo a Dippe y Ulbrich-Hofmann (Dippe y Ulbrich-Hofmann 2009). Donde, 40 µL del extracto fueron mezclados con 40 µL de 200 mM Mes/NaOH (pH 5.6) y 120 mM $CaCl_2$. Posteriormente se añadieron 200 µL de FeSal (1 mM FeCl3 y 6 mM de salicilato de sodio disueltos en 500 mM HCOOH/NaOH, pH 4.0). La mezcla se incubó por 5 min y se midió la absorbancia a 490 nM. Se realizó una curva de calibración empleando el estándar 3-sn-phosphatidic acid sodium salt from egg yolk lectin (SIGMA) con un grado de correlación de R^2=0.989.

6.2.5 RESULTADOS

6.2.5.1 El estrés osmótico inducido por NaCl estimula la arquitectura del sistema radicular de Arabidopsis.

Para determinar el efecto del estrés osmótico inducido por NaCl sobre la arquitectura del sistema radicular, se empleó un sistema de transferencia. Las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas y germinadas en medio MS 0.2X, se crecieron durante 4 días (ddg) y a este tiempo fueron transferidas a los medios control o suplementados con concentraciones crecientes de NaCl permitiendo el crecimiento por 8 días más (ddt) (Fig. 1). La longitud de la raíz primaria (LRP), el número de raíces (NRL) así como la densidad de las raíces laterales (DRL) fueron determinadas. En la fig. 1 podemos observar el acortamiento de la raíz primaria de manera dosis-dependiente, así como un incremento en la DRL. Para determinar el mecanismo por el cual la ASR es modulada, se eligió la concentración de 100 mM NaCl para experimentos posteriores, debido a que a esta concentración las plántulas mostraron la respuesta característica al estrés osmótico mientras que 125 mM NaCl comprometía el desarrollo de las mismas.

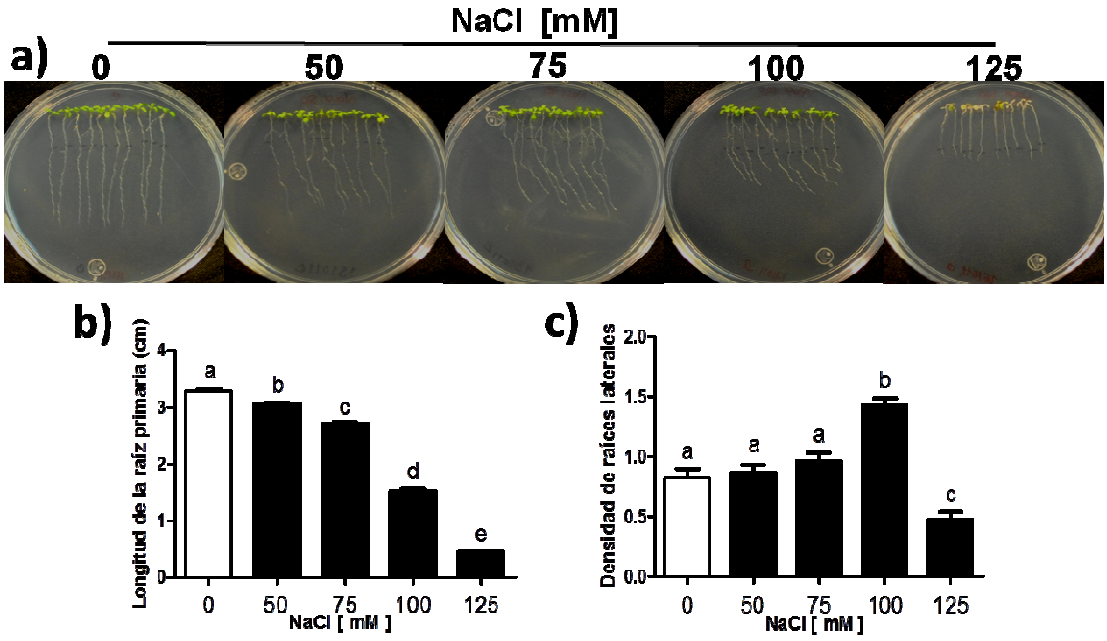


Fig. 1 Efectos del estrés osmótico inducido por NaCl en el desarrollo de plántulas de *Arabidopsis*. Semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 fueron germinadas en medio MS0.2X y a los 4 ddg las plántulas

fueron transferidas a medios control o adicionados con NaCl (**a**), longitud de la raíz primaria (**b**) densidad de raíces laterales (**c**). Las fotografías son representativas de cada tratamiento. Los datos mostrados en **b** y **c** son el promedio ± EE, n=40. Diferentes letras representan tratamientos estadísticamente significativos, Tukey α=0.01. El experimento fue realizado tres veces con resultados similares.

6.2.5.2 *S6K1* y *S6K2* median el desarrollo de raíces laterales en respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl.

Como primera aproximación para determinar el papel de las proteínas S6Ks de *Arabidopsis* sobre la modulación de la ASR en respuesta al estrés osmótico inducido por el NaCl, se empleó el sistema de transferencia antes descrito. Las semillas fueron sembradas y crecidas por 4ddg en medio MS 0.2X y posteriormente fueron transferidas a medio control y uno suplementado con 100 mM NaCl. A los 8 ddt las raíces de las plántulas fueron separadas del follaje y congeladas con nitrógeno líquido, a partir de las cuales se extrajo el RNA total para determinar los niveles de expresión de los transcritos de *S6K1* y *S6K2* mediante RT-PCR de punto final. Como se puede observar en la fig. 2 el estrés osmótico inducido por NaCl estimuló 2 y 6 veces la expresión de los transcritos de *S6K1* y *S6K2*, respectivamente. Estos datos sugirien que la actividad cinasa codificada en dichos genes podría desempeñar un papel en la respuesta al estrés osmótico.

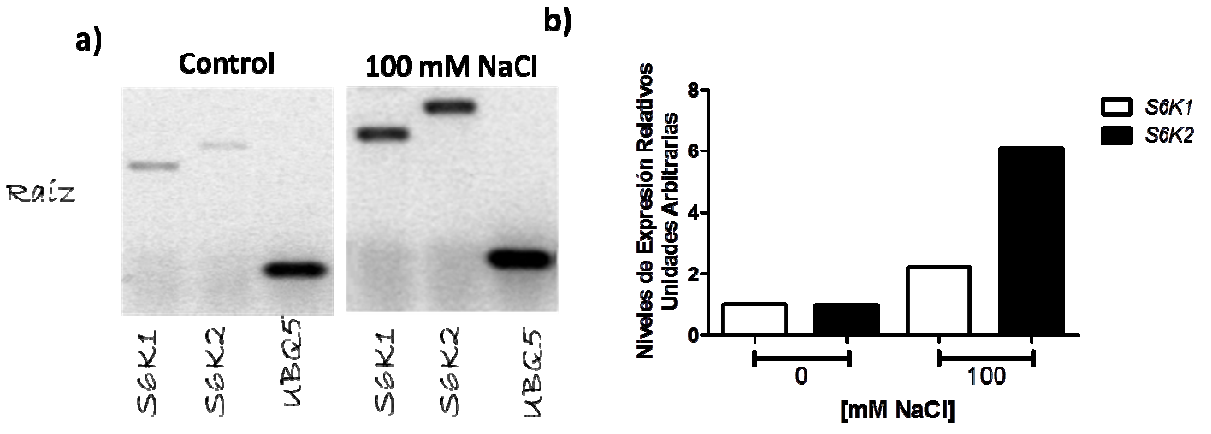


Fig. 2 Efecto del estrés osmótico en la modulación de los niveles de expresión de *S6K1* y *S6K2*. El RNA total fue extraído de raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 a los 8 ddt a condiciones control o de estrés osmótico, para determinar los niveles de los transcritos de *S6K1* y *S6K2* en respuesta al estrés. Los niveles de expresión fueron normalizados empleando los niveles de transcritos de *UBQ5*.

a) Fotografía del corrimiento electroforético de los productos de RT-PCR de raíces de *A. thaliana* Col-0 crecidas en condiciones control y 100 mM NaCl. **b**) Niveles de expresión relativos, las barras blancas representan los niveles de expresión de *S6K1* y las barras negras los niveles de *S6K2*. Los valores mostrados en **b** son el promedio de dos experimentos independientes.

Para determinar el papel de la actividad de la S6K1 y la S6K2 en respuesta al estrés, se analizaron mutantes en los genes codificantes *s6k1* y *s6k2 (Material suplementario 1 y 2)*. Para lo cual se evaluó el desarrollo de la ASR en respuesta al estrés de las líneas mutantes, como se describió anteriormente. Las semillas mutantes knockout en *s6k1*, *s6k2*, así como del fondo genético de las líneas mutantes (*Arabidopsis thaliana* Col-0) fueron crecidas lado a lado en medio MS 0.2X y a los 4 ddg fueron transferidas a medios con concentraciones crecientes de NaCl (0, 50, 75, 100, y 125 mM). A los 8 ddt la ASR fue evaluada. En la fig. 3 podemos observar el acortamiento de la raíz primaria de manera dosis-dependiente en la línea silvestre, y en las mutantes en *s6k1* y *s6k2* se observa la resistencia al acortamiento de la raíz primaria a 50 y 75 mM NaCl, mientras que a 100 mM NaCl mostraron un crecimiento adicional de 17 y 23 % respectivamente, con respecto a la *WT*. Sin embargo, mostraron un fenotipo de sensibilidad a 125 mM NaCl. Además, la línea *WT* mostró un incremento en la DRL a 100 mM que se mantuvo a 125 mM, sugiriendo que se llegó al efecto máximo. Interesantemente, las líneas mutantes en *s6k1* y *s6k2* en condiciones control y en los diferentes medios con NaCl mostraron un menor desarrollo de la DRL, indicando que la actividad cinasa codificada en estos genes es necesaria, al menos en parte, para el desarrollo normal del sistema radicular. Adicionalmente la DRL en respuesta al estrés osmótico en la línea mutante *s6k1* fue dosis-dependiente de 75 a 125 mM NaCl sin alcanzar los valores mostrados por la línea *WT*, mientras que la línea mutante en *s6k2* mostró resistencia a la inducción de la misma a 50 y 75 mM NaCl, mientras que a 100 y 125 mM NaCl alcanzó su valor máximo, que representa el 50% del valor alcanzado por la línea *WT* bajo las mismas condiciones. Al analizar el comportamiento del desarrollo de la DRL en respuesta al estrés osmótico por línea, se observó que ambas mutantes ofrecen resistencia a los efectos inducidos por el estrés osmótico (Fig. 3). Estos datos en conjunto sugieren que ambas cinasas son necesarias en la mediación de la respuesta al estrés osmótico, observándose que la S6K2 posee un papel preponderante.

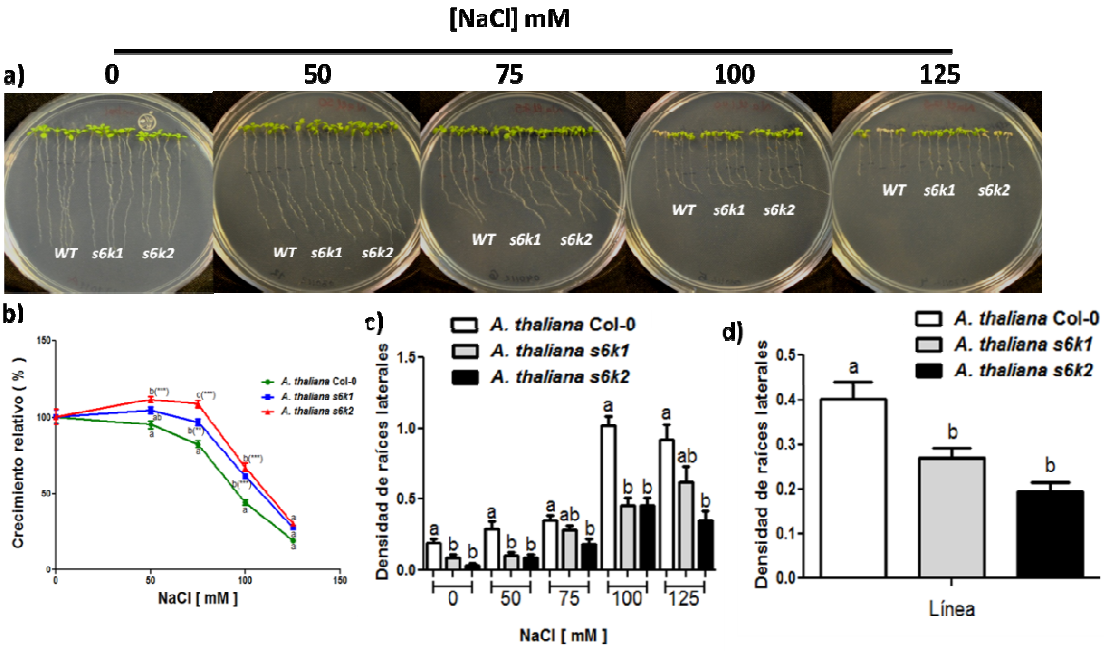


Fig. 3 Efecto del estrés osmótico inducido por NaCl en la arquitectura del sistema radicular de las mutantes en *s6k1* y *s6k2*. Semillas de *A. thaliana* Col-0, *s6k1* y *s6k2* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y posteriormente fueron transferidas a los 4 ddg a medios control o con dosis crecientes de NaCl y a los 8 ddt fueron evaluadas. **a**) Fotos representativas de plántulas *WT*, *s6k1* y *s6k2* crecidas lado a lado en concentraciones de 0, 50, 75, 100 y 125 mM NaCl a los 8ddt. **b**) Crecimiento relativo de la raíz primaria. Anova de dos vías Prueba de Bonferroni ** α=0.01, *** α=0.001, **c**) Densidad de raíces laterales. Anova de una vía seguido por una análisis de Tukey α=0.01 por grupo de tratamiento. **d**) Densidad de raíces laterales. Análisis de Anova de componente principal (por línea), Tukey α=0.01. El experimento fue realizado dos veces con resultados similares. Los valores mostrados son el promedio ± EE (n=40). Diferentes letras representan tratamientos estadísticamente significativos.

6.2.5.3 El estrés osmótico modula el desarrollo de raíces laterales a través de la redistribución de auxinas

Para determinar el mecanismo de la modulación de la ASR en respuesta al estrés, se adicionó 1 µM ANP (ácido naftil ptalámico) un inhibidor del transporte de auxinas, en el medio control o en condiciones de estrés. No se observaron cambios en el crecimiento de la raíz primaria en las plántulas crecidas en el medio control adicionado con el ANP y tampoco hubo cambios en el crecimiento de la raíz primaria crecida en condiciones de estrés con respecto a las crecidas en el medio de estrés adicionado con ANP. Adicionalmente, el ANP fue capaz de disminuir la DRL en el medio control, sin

embargo, fue incapaz de detener los efectos del estrés osmótico inducido por NaCl (Fig. 4). Estos datos sugieren que la modulación de la ASR en respuesta al estrés, ocurre a través de la regulación del TPA.

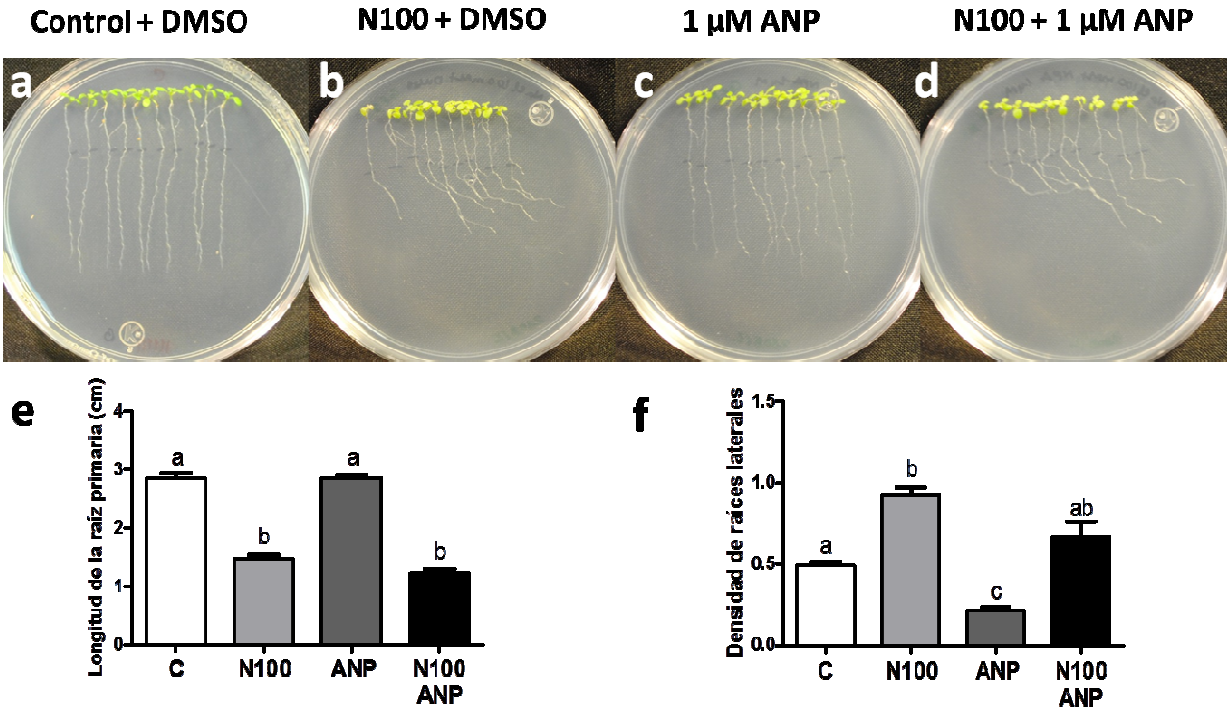


Fig. 4 El estrés osmótico inducido por NaCl media el desarrollo de raíces laterales modulando el transporte polar de auxinas. Semillas de *A. thaliana* Col-0 fueron germinadas en medio MS 0.2X y a los 4 ddg fueron transferidas a medios control + DMSO (**a**) 100 mM NaCl + DMSO (**b**), 1µM ANP (**c**) o 100 mM NaCl + 1µM ANP (**d**), longitud de la raíz primaria (**e**) densidad de raíces laterales (**f**). Las fotografías son representativas de cada tratamiento. Los datos mostrados en **e** y **f** son el promedio ± EE, n=40. C: control, N100: 100 mM NaCl, ANP: 1µM ANP, N100-ANP: 100 mM NaCl + 1 µM ANP. Diferentes letras representan tratamientos estadísticamente significativos, Tukey α=0.01. El experimento fue realizado tres veces con resultados similares.

Para analizar si la redistribución de auxinas mediaba la modulación de la ASR en respuesta al estrés osmótico, se empleó la línea transgénica *DR5::uidA* (Ulmasov *et al.* 1997; Tanaka *et al.* 2006), debido a que la secuencia promotora de DR5 es altamente sensible a auxinas y por lo tanto, la actividad del promotor es un indicador indirecto de los niveles endógenos de auxinas (Tanaka *et al.* 2006). Después del crecimiento en el medio de estrés (8ddt) las plántulas transgénicas *DR5::uidA* fueron sometidas a la tinción de GUS y clarificadas de acuerdo a Malamy y Benfey (1997) en la fig. 5

podemos observar que la actividad de GUS incrementó en la raíz primaria y en las puntas de las raíces laterales con respecto a las crecidas en el medio control, sugiriendo con ello que los efectos inducidos por el estrés osmótico es mediante la modulación del TPA. Adicionalmente, el ANP inhibió el TPA de manera eficiente en las puntas de las raíces primarias y laterales en plántulas crecidas en medio control adicionado con ANP así como en las puntas de las raíces laterales de las plántulas crecidas en condiciones de estrés, sin embargo, fue incapaz de inhibir por completo el TPA en las puntas de las raíces primarias de las plántulas crecidas en condiciones de estrés, como es evidenciado por la presencia del color azul en los haces vasculares de dichas plántulas (Fig. 5). Estos datos sugieren que el estrés osmótico inducido por NaCl modula la ASR de Arabidopsis modulando el TPA.

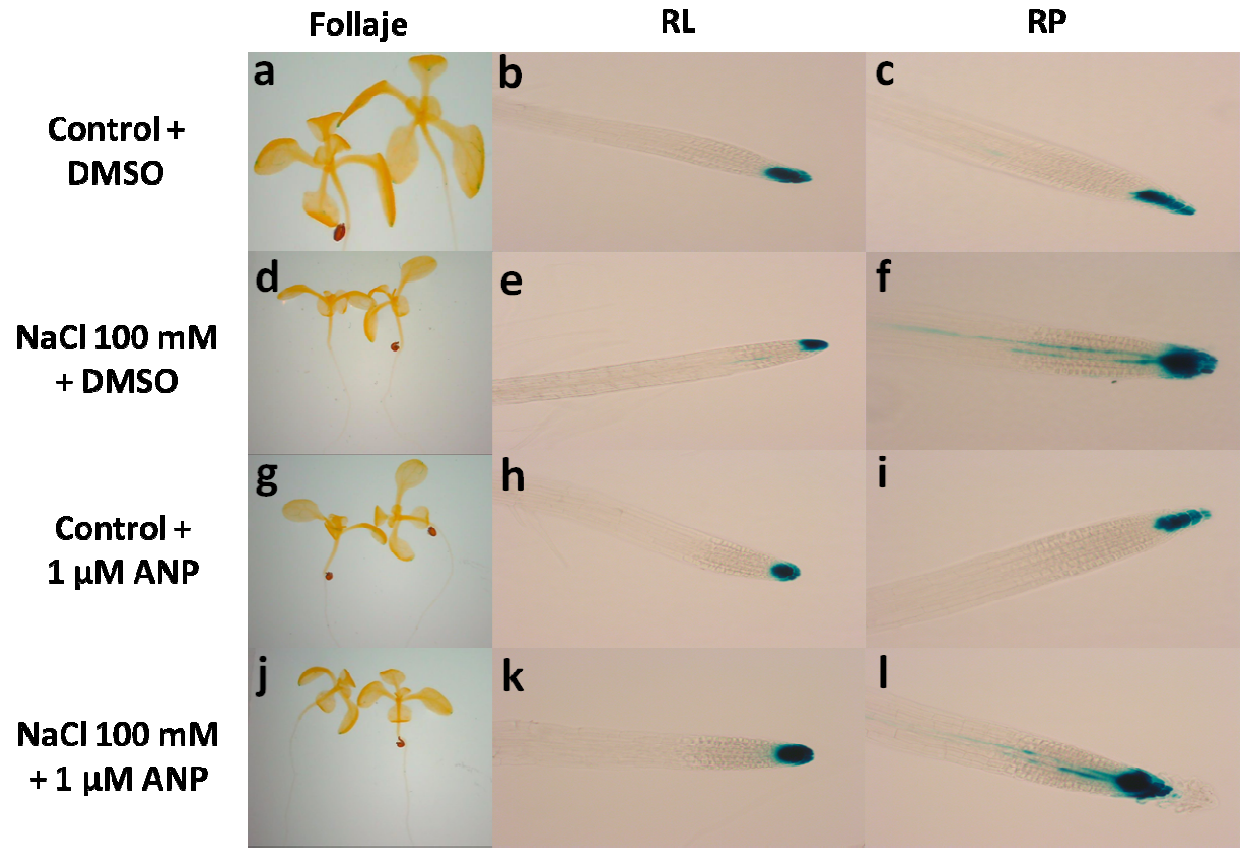


Fig. 5 Regulación del transporte de auxinas en respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl. Semillas de *A. thaliana DR5::uidA* fueron germinadas en medio MS 0.2X y a los 4 ddg fueron transferidas a medios control + DMSO (**a, b, c**), a 100 mM NaCl + DMSO (**d, e, f**), a 1µM ANP (**g, h, i**)o a 100 mM NaCl + 1µM ANP (**j, k, l**). A los 8 ddt las plántulas fueron sometidas a la tinción de GUS y a un

clareo de tejidos para su análisis mediante microscopia. Follaje a 0.8X (**a, d, g, j**), Raíces laterales a 40X (**b, e, h, k**) y Raíz primaria a 40X (**c, f, i, l**). Las fotografías son representativas de al menos 20 plántulas teñidas. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares.

6.2.5.4 Las proteínas S6Ks de *Arabidopsis* modulan la respuesta al estrés osmótico a través de la producción de ácido fosfatídico

El PA en plantas se produce a través de la hidrolisis de fosfolípidos de membranas catalizada por la fosfolipasa D (PLD), como en células animales (Munnik *et al.* 1998). La PLD es activada durante el estrés hiperosmótico en *Arabidopsis* generando PA (Zhu 2002; Bray 2004). Además, se ha demostrado que el PA producido a través de la PLD, es capaz de activar la vía de señalización TOR-S6K (Fang *et al.* 2001). Debido a que se ha sugerido que las auxinas median sus efectos a través de la producción del PA (Buentello Volante *et al.* 2010). En el presente trabajo exploramos si existía una conexión entre la modulación de la ASR a través de la modulación del TPA en respuesta al estrés osmótico y su posible relación con la producción de PA, en el fenotipo de tolerancia de las mutantes *s6k1* y *s6k2*, por lo que se determinó la producción de PA en las raíces de las plántulas crecidas en condiciones control y de estrés osmótico tanto en la línea *WT* como en las mutantes. Para analizar esta posibilidad, se extrajeron los lípidos de las raíces de las plántulas crecidas 8 ddt en condiciones de estrés y el contenido de PA fue determinado. El estrés osmótico inducido por NaCl estimuló la producción de PA 2.37 veces en las raíces de la línea WT, sugiriendo que posiblemente el PA actúa como segundo mensajero en la respuesta al estrés osmótico. Interesantemente, ambas líneas mutantes mostraron el doble de producción de PA en condiciones control con respecto a la silvestre. Mientras que en condiciones de estrés no hubo cambios en la producción de PA en respuesta al estrés en la mutante *s6k1*, en tanto que en la mutante *s6k2* el nivel de producción de PA disminuyó un 50%. Estos datos sugieren que la actividad de la S6K2 desempeña un papel importante en la mediación de las respuestas al estrés osmótico, probablemente a través de la modulación del TPA vía producción de PA.

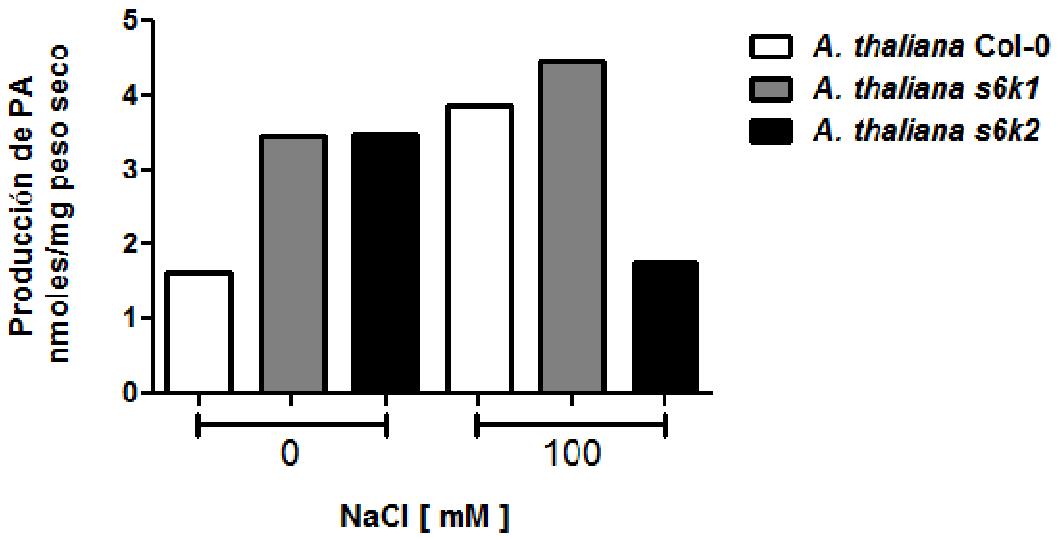


Fig. 6 Efecto del estrés osmótico sobre la producción de ácido fosfatídico en respuesta al estrés osmótico en *A. thaliana* Col-0, *s6k1* y *s6k2*. Se extrajeron los lípidos de las raíces de plántulas silvestres y mutantes crecidas lado a lado, a los 8 ddt a medio control y de estrés. Se emplearon los extractos obtenidos para determinar la concentración del PA. Las barras blancas representan los valores obtenidos de la línea *A. thaliana* Col-0, las barras grises representan los valores obtenidos de la mutante *s6K1,* mientras que las barras negras representan los obtenidos en la mutante *s6k2*. Los valores mostrados son el promedio de dos experimentos independientes con variaciones menores al 20%.

6.2.6 Discusión

6.2.6.1 Efectos del estrés osmótico inducido por NaCl sobre el desarrollo de la arquitectura del sistema radicular.

La modulación de la ASR en respuesta a diversos estímulos juega un papel decisivo en la adaptación de las plantas a las condiciones de estrés, guiando a la respuesta morfogenética inducida por estrés (SIMR por sus siglas en inglés), la cual en la ASR es caracterizada por un acortamiento de la raíz primaria (inhibición de la elongación de la raíz) y una inducción de raíces laterales (RLs) (incremento en el número) (Potters *et al.* 2007). Estudios recientes han aportado grandes avances en la descripción de los mecanismos moleculares y celulares por los cuales las plantas responden al estrés osmótico inducido por NaCl. El estrés osmótico inducido por NaCl inhibe el crecimiento de la raíz primaria (RP) por la disminución en la elongación y la división celular,

generando la pérdida del meristemo radicular (West 2004). Sin embargo, los efectos del estrés sobre el desarrollo de RLs son controversiales, debido a que tanto la inhibición como inducción del desarrollo de RLs han sido descritos en *Arabidopsis* (West 2004; Wang *et al.* 2009; Zolla *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2011). Por lo tanto no es claro si el estrés salino genera una respuesta SIMR característica. En el presente trabajo observamos una disminución del crecimiento de la RP y un aumento en el desarrollo de RLs en plántulas crecidas en 100 mM NaCl (Fig. 1) similar a lo reportado por Wang (2009). Sin embargo, diferentes resultados fueron obtenidos en trabajos previos, probablemente fueron debido a las condiciones del diseño experimental así como a las formulaciones de los medios (West 2004; Wang *et al.* 2009; Zolla *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2011).

6.2.6.2 Papel de las proteínas S6Ks de *Arabidopsis* en la respuesta morfogenética inducida por estrés

En el presente estudio observamos que existe una modulación del desarrollo de la ASR y sobre la regulación de la expresión de los genes *S6K1* y *S6K2* en raíces de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en las condiciones de estrés antes mencionadas. Debido a que se sabe que la vía de señalización TOR-S6K regula la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y las respuestas a estrés en mamíferos (Laplante y Sabatini 2012) y en plantas (Mahfouz 2006; Deprost *et al.* 2007) esta vía podría modular la respuesta a dicho estrés. Como se observó en la fig. 2, existe un incremento en la expresión de los transcritos de *S6K1* y *S6K2,* 2 y 6 veces respectivamente (Fig. 2) en dicho proceso. Estos datos sugirieren que ambas cinasas podrían desempeñar papeles importantes en las respuestas de adaptación al estrés, y que S6K2 podría ser clave en dicho proceso debido a que los niveles de transcritos *S6K2* aumentan tres veces más con respecto a los de *S6K1*. Estos resultados son consistentes con los observados por Mizoguchi et al, (1994) donde observaron que los niveles de expresión de ambos transcritos incrementan marcadamente en respuesta a estrés salino o por frío en plantas de *Arabidopsis*. Adicionalmente, se ha descrito que cuando los cultivos en suspensión de *Arabidopsis* alcanzan la fase estacionaria se estimula la expresión de *S6K2* (Turck 2004), reforzando la hipótesis de que S6K2 podría desempeñar un papel clave en la

mediación de las respuestas a estrés. Sin embargo, Mahfouz et al (2006) reportó que la actividad de S6K1 en hojas transgénicas de tabaco es sensible a estrés osmótico (por tratamiento con manitol). Para determinar cuál sería la participación de las proteínas S6Ks de *Arabidopsis* en la modulación de la ASR en respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl, se analizaron líneas mutantes knockout en *s6k1* y *s6k2* (Fig. S1 y S2). En la fig. 3 se muestra la curva dosis respuesta al NaCl, en donde se observa el acortamiento de la RP y el incremento en el desarrollo de RLs en la línea silvestre, mientras que en ambas mutantes se observa la tolerancia a la inhibición del crecimiento de la RP hasta 100 mM NaCl. Ambas líneas mutantes en condiciones control desarrollan menor cantidad de RLs, lo que sugirie que la función de ambas cinasas es necesaria para el desarrollo normal de la ASR. En los medios adicionados con diferentes concentraciones de NaCl el número de RLs en las mutantes se mantuvo por debajo con respecto a la *WT*, y a 100 mM NaCl solamente se desarrollaron el 50% de la DRLs con respecto a la *WT*. La mutante *s6k1* mostró una tendencia a aproximarse al fenotipo desarrollado por la WT en respuesta al estrés (125 mM NaCl), no siendo así para *s6k2,* la cual alcanzó el efecto máximo a 100 mM NaCl. Interesantemente la línea *WT* mostró un incremento en la DRL que no se observó en el crecimiento individual (Fig. 1), situación que pudo haber sido generada por el crecimiento lado a lado con las líneas mutantes, lo cual pudiera deberse a la densidad poblacional. Aunque mediante el análisis por tratamiento se determinó que ambas mutantes muestran tolerancia a los efectos desencadenados por el estrés, se puede apreciar un comportamiento similar en las tres líneas, por lo que se realizó un análisis de varianza (Anova) de componente principal (por línea) tomando como variable la DRLs para determinar el efecto global de todos los tratamientos sobre el desarrollo de las RLs, encontrándose que ambas mutantes son tolerantes al efecto de inducción de la DRLs antes descrito (Fig. 3). En conjunto, estos datos indican que las proteínas S6K juegan un papel importante en la mediación de la respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl.

6.2.6.3 Papel del transporte polar de auxinas, el ácido fosfatídico y las proteínas S6Ks en la respuesta morfogenética inducida por estrés

Las plantas activan diferentes mecanismos moleculares y fisiológicos para adaptarse al estrés osmótico. Las auxinas son las principales señales intrínsecas que controlan la formación de órganos incluyendo la formación de RLs (Benkova *et al.* 2003; Friml *et al.* 2003). El desarrollo de estas últimas es regulado por la formación de gradientes de auxinas y por el establecimiento de máximos de auxinas en las puntas de las raíces (Casimiro *et al.* 2001; Osmont *et al.* 2007; Péret *et al.* 2009). Con la finalidad de determinar el mecanismo por el cual el estrés osmótico inducido por NaCl media sus efectos, empleamos el inhibidor del transporte de auxinas, el ANP el cual se adicionó al medio control y al de estrés. Observamos que el inhibidor no mostró efectos adicionales en el acortamiento de la RP en ninguna condición. En cuanto a la DRLs se encontró que el ANP fue capaz de disminuir la DRL en condiciones control, sin embargo, cuando fue adicionado al medio de estrés, disminuyó el efecto generado por el estrés aunque no en su totalidad (Fig. 4), indicando que el estrés osmótico revierte el efecto del inhibidor, lo que sugiere que el mecanismo por el cual la ASR es modulada durante el estrés sería a través de la regulación del TPA. Además, empleamos la línea transgénica de *Arabidopsis DR5::uidA* (Ulmasov *et al.* 1997) para determinar si la SIMR inducida por NaCl fue mediada por la redistribución de auxinas. En la figura 5 se muestra que el estrés estimuló la acumulación de auxinas, en los tejidos vasculares en las puntas de las RLs y las RP, la cual es reducida en presencia del inhibidor. Estos datos son consistentes con lo reportado por Wang (2009), quien observó que el contenido de auxinas y su distribución fueron drásticamente afectadas por el tratamiento con NaCl. Por lo que el SIMR inducido por el estrés osmótico desencadena el desarrollo de raíces laterales a través de la modulación del TPA; este hecho es consistente con el trabajo de Zolla (2010) quién observó que la proliferación de RLs es mediada por el estrés salino, promoviendo la acumulación de auxinas en los primordios de RLs.

Los inhibidores del TPA como el ANP afectan el eflujo de auxinas mediante la inhibición del tráfico vesicular (Bailly *et al.* 2008). En este sentido, se ha demostrado que el PA

producido por la PLDζ2 regula el tráfico vesicular requerido para la respuesta a auxinas (Li y Xue 2007; Xue *et al.* 2007). Además se ha reportado que la adición del PA al medio estimula el reciclamiento vesicular y el TPA en la zona de transición de la RP (Mancuso *et al.* 2007). Por tal motivo, decidimos probar si existía un enlace entre la estimulación del TPA mediado por el estrés osmótico con el fenotipo de tolerancia de las mutantes knockout en *s6k1* y *s6k2* descrito con anterioridad en función de la producción de PA. Se determinó la concentración de PA en las raíces de plántulas crecidas 8 ddt en medios con 100 mM NaCl. Interesantemente, encontramos que en ambas mutantes en condiciones control se sintetiza hasta 2 veces más PA con respecto a la línea silvestre. Sin embargo, en condiciones de estrés osmótico inducido por NaCl, la línea silvestre incrementó los niveles de producción de PA en respuesta al estrés. Este dato es consistente con lo reportado por Yu *et al*. en el 2010 (Yu *et al.* 2010), donde observan un incremento en la producción de PA en respuesta al NaCl en hojas de plantas de *Arabidopsis*. Sin embargo, las líneas mutantes muestran un comportamiento diferencial: *s6k1* no presenta cambios en la producción de PA en respuesta al estrés, mientras que *s6k2* disminuye los niveles de PA hasta un 50% con respecto a la condición control. Estos datos sugieren que la S6K2 podría desempeñar un papel preponderante en las respuestas al estrés osmótico inducido por NaCl. Además ambas cinasas podrían modular la producción de PA diferencialmente, ya que en condiciones control la ausencia de cualquiera de ellas estimula la producción de PA, mientras que en condiciones de estrés mostraron un comportamiento diferencial (Fig. 6). Estos datos sugieren que podría existir comunicación cruzada entre la mediación de las respuestas al estrés osmótico, mediado por el incremento en el TPA, y la vía TOR-S6K a través de la producción de PA. En síntesis, el aumento de los transcritos en *S6K1* y *S6K2*, los fenotipos de tolerancia al acortamiento de la raíz primaria y del incremento de la DRL de ambas mutantes, especialmente la *s6k2*, así como los datos de producción del PA sugieren que las proteínas S6K de *Arabidopsis* podrían actuar como reguladores positivos de la respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl.

6.2.6 Referencias

Bailly, A., V. Sovero, V. Vincenzetti, D. Santelia, D. Bartnik, B. W. Koenig, S. Mancuso, E. Martinoia y M. Geisler. 2008. **Modulation of P-glycoproteins by Auxin Transport Inhibitors Is Mediated by Interaction with Immunophilins**. *Journal of Biological Chemistry* 283(31): 21817-21826.

Benkova, E., M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertova, G. Jurgens y J. Friml. 2003. **Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation**. *Cell* 115(5): 591-602.

Bray, E. A. 2004. **Genes commonly regulated by water-deficit stress in Arabidopsis thaliana**. *Journal of Experimental Botany* 55(407): 2331-2341.

Buentello Volante, B., F. Díaz de León-Sánchez, F. Rivera-Cabrera, R. Aguilar Caballero, M. Ponce-Valadez, E. Sánchez de Jiménez, L. J. Pérez-Flores 2010. **Apparent cross-talk of two signaling pathways that regulate Zea mays coleoptile growth**. *Phyton (Buenos Aires)*. 79: 101-108.

Casimiro, I., A. Marchant, R. P. Bhalerao, T. Beeckman, S. Dhooge, R. Swarup, N. Graham, D. Inze, G. Sandberg, P. J. Casero y M. Bennett. 2001. **Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation**. *Plant Cell* 13(4): 843-852.

Chapman, E. J. y M. Estelle. 2009. **Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants**. *Annual Review of Genetics* 43: 265-285.

Christensen, S. K., N. Dagenais, J. Chory y D. Weigel. 2000. **Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID**. *Cell* 100(4): 469-478.

Deprost, D., L. Yao, R. Sormani, M. Moreau, G. Leterreux, M. Nicolaï, M. Bedu, C. Robaglia y C. Meyer. 2007. **The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation**. *EMBO reports* 8(9): 864-870.

Devaiah, S. P., M. R. Roth, E. Baughman, M. Li, P. Tamura, R. Jeannotte, R. Welti y X. Wang. 2006. **Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type Arabidopsis and a PHOSPHOLIPASE Dα1 knockout mutant**. *Phytochemistry* 67(17): 1907-1924.

Dippe, M. y R. Ulbrich-Hofmann. 2009. **Spectrophotometric determination of phosphatidic acid via iron(III) complexation for assaying phospholipase D activity**. *Analytical Biochemistry* 392(2): 169-173.

Fang, Y., M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan y J. Chen. 2001. **Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling**. *Science* 294(5548): 1942-1945.

Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa y G. Jurgens. 2003. **Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis**. *Nature* 426(6963): 147-153.

Hong, Y., X. Pan, R. Welti y X. Wang. 2008. **Phospholipase D 3 Is Involved in the Hyperosmotic Response in Arabidopsis**. *Plant Cell* 20(3): 803-816.

Laplante, M. y D. M. Sabatini. 2012. **mTOR signaling in growth control and disease**. *Cell* 149(2): 274-293.

Li, G. y H. W. Xue. 2007. **Arabidopsis PLDzeta2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response**. *Plant Cell* 19(1): 281-295.

Ludwig-Müller, J. 2011. **Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants**. *Journal of Experimental Botany* 62(6): 1757-1773.

Mahfouz, M. M. 2006. **Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN Interacts with RAPTOR, Which Regulates the Activity of S6 Kinase in Response to Osmotic Stress Signals**. *Plant Cell* 18(2): 477-490.

Mancuso, S., A. M. Marras, S. Mugnai, M. Schlicht, V. Zarsky, G. Li, L. Song, H. W. Xue y F. Baluska. 2007. **Phospholipase dzeta2 drives vesicular secretion of auxin for its polar cell-cell transport in the transition zone of the root apex**. *Plant Signaling & Behavior* 2(4): 240-244.

Menand, B., T. Desnos, L. Nussaume, F. Berger, D. Bouchez, C. Meyer y C. Robaglia. 2002. **Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene**. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99(9): 6422-6427.

Mizoguchi, T., N. Hayashida, K. Yamaguchi-Shinozaki, H. Kamada y K. Shinozaki. 1995. **Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in Arabidopsis thaliana**. *FEBS Letters* 358(2): 199-204.

Munnik, T., R. F. Irvine y A. Musgrave. 1998. **Phospholipid signalling in plants**. *Biochimica et Biophysica Acta* 1389(3): 222-272.

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. **A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures**. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.

Osmont, K. S., R. Sibout y C. S. Hardtke. 2007. **Hidden branches: developments in root system architecture**. *Annual Review of Plant Biology* 58: 93-113.

Péret, B., B. De Rybel, I. Casimiro, E. Benková, R. Swarup, L. Laplaze, T. Beeckman y M. J. Bennett. 2009. **Arabidopsis lateral root development: an emerging story**. *Trends in Plant Science* 14(7): 399-408.

Petrasek, J. y J. Friml. 2009. **Auxin transport routes in plant development**. *Development* 136(16): 2675-2688.

Potters, G., T. P. Pasternak, Y. Guisez, K. J. Palme y M. A. Jansen. 2007. **Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?** *Trends in Plant Science* 12(3): 98-105.

Robert, H. S. y R. Offringa. 2008. **Regulation of auxin transport polarity by AGC kinases**. *Current Opinion in Plant Biology* 11(5): 495-502.

Schneider, C. A., Rasband, Wayne S & Eliceiri, Kevin W. 2012. **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis**. *Nature Methods* 9(7): 671-675.

Tanaka, H., P. Dhonukshe, P. B. Brewer y J. Friml. 2006. **Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development**. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(23): 2738-2754.

Turck, F. 2004. **Phytohormones Participate in an S6 Kinase Signal Transduction Pathway in Arabidopsis**. *Plant Physiology* 134(4): 1527-1535.

Ulmasov, T., J. Murfett, G. Hagen y T. J. Guilfoyle. 1997. **Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements**. *Plant Cell* 9(11): 1963-1971.

Vickers, C. E., J. Gershenzon, M. T. Lerdau y F. Loreto. 2009. **A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress**. *Nature Chemical Biology* 5(5): 283-291.

Wang, Y., K. Li y X. Li. 2009. **Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in Arabidopsis thaliana**. *Journal of Plant Physiology* 166(15): 1637-1645.

West, G. 2004. **Cell Cycle Modulation in the Response of the Primary Root of Arabidopsis to Salt Stress**. *Plant Physiology* 135(2): 1050-1058.

Woodward, A. W. 2005. **Auxin: Regulation, Action, and Interaction**. *Annals of Botany* 95(5): 707-735.

Xiong, L. y J. K. Zhu. 2002. **Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress**. *Plant, Cell & Environment* 25(2): 131-139.

Xue, H., X. Chen y G. Li. 2007. **Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects**. *Current Opinion in Plant Biology* 10(5): 483-489.

Yu, L., J. Nie, C. Cao, Y. Jin, M. Yan, F. Wang, J. Liu, Y. Xiao, Y. Liang y W. Zhang. 2010. **Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in Arabidopsis thaliana**. *New Phytologist* 188(3): 762-773.

Zhao, Y. 2010. **Auxin biosynthesis and its role in plant development**. *Annual Review of Plant Biology* 61: 49-64.

Zhao, Y., T. Wang, W. Zhang y X. Li. 2011. **SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in Arabidopsis**. *New Phytologist* 189(4): 1122-1134.

Zhu, J. K. 2002. **Salt and drought stress signal transduction in plants**. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.

Zolla, G., Y. M. Heimer y S. Barak. 2010. **Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in Arabidopsis thaliana roots**. *Journal of Experimental Botany* 61(1): 211-224.

6.2.7 Material suplementario

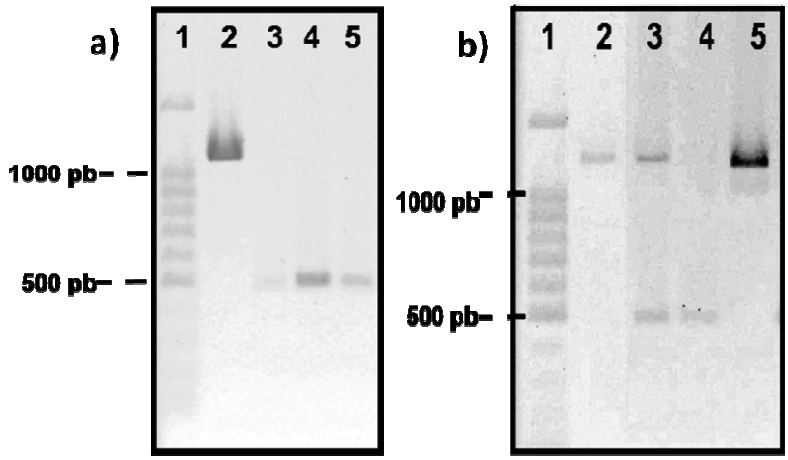


Fig. S1 Genotipificación de la línea mutante insercional en *s6k1* 113295 y la *s6k2* 039937. En las fotografías se muestra el corrimiento electroforético de los productos de PCR con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos. **a**) Carril 1: Marcador de tamaño molecular (MTM), carril 2: Producto de PCR del DNA de *A. thaliana* Col-0 empleando los oligonucleótidos para la línea 113295 (1105 pb). Carril 3, 4 y 5: Producto de PCR del DNA de la línea 113295 empleando los oligonucleótidos para la línea 113295 (1105 pb) y para la sonda (450 pb). **b**) Carril 1: MTM. Carril 2: Producto de PCR del DNA de *A. thaliana* Col-0 empleando los oligonucleótidos para la línea 013331 (1225pb). Carril 3: Producto de PCR del DNA de la línea 039937 empleando los oligonucleótidos para la línea 013331 (1225pb) y para la sonda (450pb). Carril 4: Producto de PCR del DNA de la línea 039937 empleando los oligonucleótidos para la línea 039937 (1184pb) y para la sonda (450pb). Carril 5: Producto de PCR del DNA de *A. thaliana* Col-0 empleando los oligonucleótidos para la línea 039937 (1184pb).

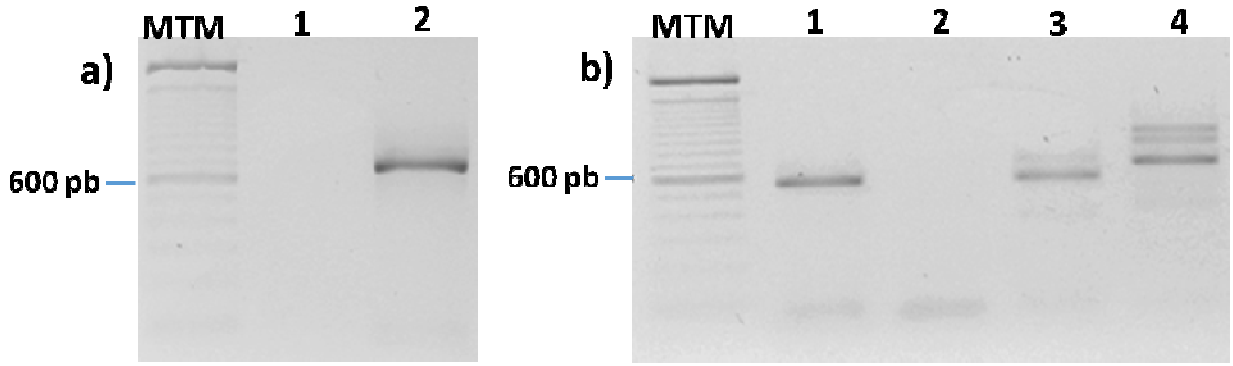


Fig. S2 Análisis de la expresión de *S6K1* y *S6K2*. En las fotografías se muestra el corrimiento electroforético de los productos de las RT-PCR con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos. **a**) Se empleó el RNA total de la mutante en *s6k1* de la línea 113295 como molde para realizar la RT-PCR. Carril 1: Producto de la RT-PCR empleando los oligonucleótidos para el transcrito *S6K1* (562 pb). Carril

2: Producto de la RT-PCR empleando los oligonucleótidos para el transcrito *S6K2* (660 pb). **b**) Se empleó el RNA total de la mutante en *s6k2* de la línea 039937 y el RNA total de *A. thaliana* Col-0 como molde para realizar la RT-PCR. Carril 1: Producto de la RT-PCR empleando los oligonucleótidos para el transcrito *S6K1* (562 pb) y el RNA total de la línea mutante en *s6k2*. Carril 2: Producto de la RT-PCR empleando los oligonucleótidos para el transcrito *S6K2* (660 pb) y el RNA total de la línea mutante en *s6k2*. Carril 3: Producto de la RT-PCR empleando los oligonucleótidos para el transcrito *S6K1* (562 pb) y el RNA total de *A. thaliana* Col-0. Carril 4: Producto de la RT-PCR empleando los oligonucleótidos para el transcrito *S6K2* (660 pb) y el RNA total de *A. thaliana* Col-0. MTM: marcador de tamaño molecular.

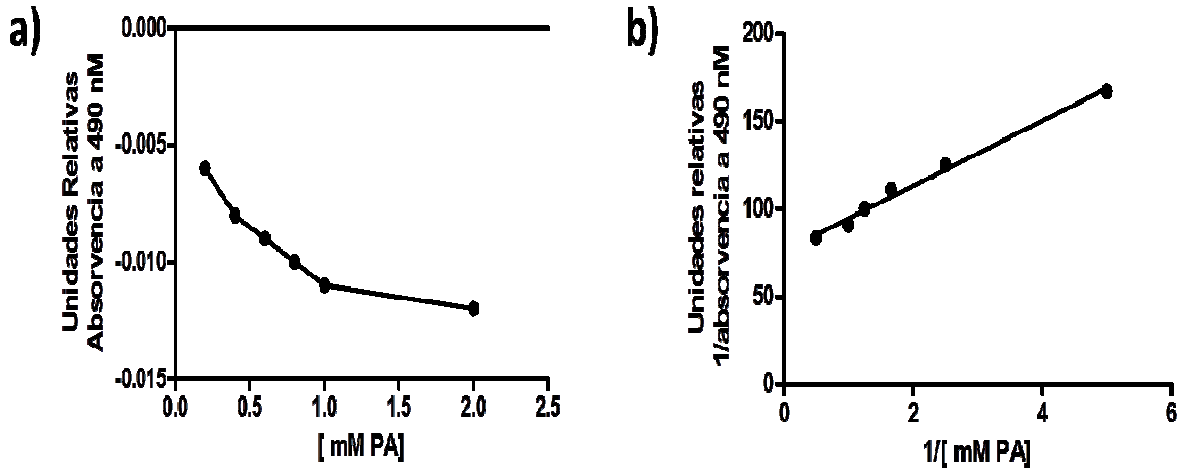


Fig. S3 Curva de calibración de ácido fosfatídico mediante un método espectrofotométrico. a) Gráfico hiperbólico b) Regráfico lineal R^2=0.989

6.3 CAPÍTULO III "The TOR-S6K pathway: Integrating plant growth, development and adaptive responses"

Mauricio N. Chávez-Avilés[1], Tzvetanka Dimitrova Dinkova[2], Estela Sánchez de Jiménez[2], Homero Reyes de la Cruz[1]

[1] *Instituto de Investigaciones Químico Biológica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México C.P. 58030*

[2] *Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, México DF, México C.P. 04510*

Tel: +52 443 326 5788 Ext. 115. Fax: +52 443 326 5790

e-mail: delacruz@umich.mx

ENVIADO PARA SU PUBLICACIÓN A PLANT MOLECULAR BIOLOGY

6.3.1 Resumen

Las plantas como organismos sésiles confrontan varios retos durante su ciclo de vida, por lo que han desarrollado mecanismos de adaptación eficientes para integrar y coordinar las señales para realizar el crecimiento y la reproducción de manera exitosa. La vía de transducción de señales del blanco de la rapamicina (TOR por sus siglas en inglés) es de vital importancia en todos los eucariotes incluyendo a las plantas, evidencia reciente apunta a que esta vía de señalización puede integrar diferentes señales de estrés, optimizando el crecimiento vegetal bajo diferentes condiciones ambientales. Evidencia reciente, también indica que las proteínas cinasas de la proteína ribosomal S6 (S6K) parecen desempeñar un papel clave en los mecanismos de comunicación cruzada entre varios procesos como la expansión, la proliferación y la biogénesis ribosomal, reflejada en cambios fisiológicos y morfológicos en las plantas. En el presente trabajo se discute un amplio escenario de evidencias que indican que las proteínas TOR y S6K desarrollan un papel pivotante en la percepción y transducción de la información durante el crecimiento vegetal, las respuestas de adaptación, así como las respuestas a estrés.

6.3.2 Abstract

Since plants continuously confront several stresses during their life cycle, they must have evolved efficient adaptation mechanisms to integrate and coordinate signals for successful growth and reproduction. Increasing evidences have pointed out that the TOR (Target Of Rapamycin) signaling pathway is known to be of crucial importance for all eukaryotes including plants, since increasing evidence pointed out that this signaling pathway may integrate various stress signals, optimizing plant growth under different environmental conditions. Recent evidence also indicates that plant S6Ks (S6 ribosomal protein kinases) seems to be key proteins in the TOR pathway to achieve the cross-talk between several processes such as expansion, proliferation and ribosomal biogenesis, reflecting such regulation on physiological and morphological changes in the plant. Here, a wide scene of evidences is discussed on this pathway, converging to TOR and S6Ks as pivotal proteins for both, perception and signal transduction during plant growth, adaptation and stress responses.

Keywords: TOR-S6K signaling pathway, Plant Growth, Signal Transduction

Abbreviations: TOR: Target of rapamycin; S6K: S6 protein kinase; S6RP: S6 ribosomal protein; eIF-4E: eukaryotic initiation factor 4E; 4E-BP1: eIF-4E binding protein; TORC: TOR complex; UTR: untranslated region; TOP: Tract of oligopyrimidines; PP2A: protein phosphatase 2A; PA: Phosphatidic acid; PLD: Phospholipase D; GEF: Guanine nucleotide exchange factor; GAP: GTPase activating protein; TCTP: Translationally Controlled Tumor Protein

6.3.3 Introduction

Plant development involves remarkable plasticity and dramatic physiological changes that occur in response to environmental, hormonal and nutritional cues. The modulation of growth rate in response to environmental inputs such as nutrient availability is essential for plant survival. As sessile organisms, plants need to constantly adjust their growth (defined as an increase in organ size) and development (production of new organs) to environmental information such as light, water or ion availability (Robert and Offringa 2008). However, the molecular mechanisms involved in the perception and transduction of this information are so far poorly known.

Plant growth is mainly a post-embryonic event and is affected by environmental factors such as light and nutrients availability. Moreover, it is closely related to the organ source capacity to render assimilates (Ingram and Waites 2006). Such capacity to grow is circumscribed to proliferation cell zones termed meristems. When the cells leave the meristematic zone, leave the cell cycle also, undergoing differentiation accompanied by increase in cell size. In this way, plant growth is determined by two independent processes: i) the proliferative growth, characterized by an increase in cell number through mitosis, and cell growth (mediated by an increase in cytoplasmic volume, metabolism and cell mass through rapid protein synthesis) and ii) post-mitotic growth, which mainly involves cell expansion driven by vacuolar uptake of water and controlled cell wall modifications. It is likely that the proliferative phase of growth is the primary target of developmental and environmental signals that coordinate organ morphogenesis in plants, whereas the post-mitotic phase of growth accounts for most of the mass increase in growing plants, and is associated with endoreduplication and differentiation into specialized cell types (Sugimoto-Shirasu and Roberts 2003; Ingram and Waites 2006). The time expended in the transition between proliferative growth and post-mitotic growth, determinates the cellular number and in consequence the potential organ size.

Recent progress has been made in identifying genetic determinants of final organ size and in characterizing pathways that may link organ growth with the perception and transduction of environmental conditions. Regulation of developmental and

adaptation signals are initiated at the molecular and biochemical levels, and require the coordination of cellular events to ensure that a response is appropriate for a given stimulus. Sophisticated intracellular and intercellular communication networks have therefore evolved in plants to convey information from a perceived stimulus to the cellular machinery mediating the responses (Hong-Bo et al. 2008). Some identified regulatory factors respond to plant hormones, while others appear to be components of novel signaling pathways (Krizek 2009). In this sense the protein kinases and phosphatases are ideal candidates to orchestrate such signal transduction regulation. The evolutionarily conserved protein kinase TOR is encoded by orthologous genes from yeast to plants and humans and likely plays central roles in integrating nutrients and energy availability with other environmental signals to coordinate survival, growth and development (Wullschleger et al. 2006; Dobrenel et al. 2011). In animals, TOR modulates cell growth in relation to nutrient availability by promoting the protein synthesis necessary for G1 to S progression in the cell cycle in at least two ways: i) inactivating the repressor eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) by phosphorylation and then increasing the cap-binding protein eIF4E availability for translation initiation; ii) activating the ribosomal protein S6 kinase S6K (also named p70S6K) by phosphorylation, which in turns activates several protein targets involved in translation (Schmelzle and Hall 2000). Several observations suggest that nutrient perception is the major trigger of TOR activation in the budding yeast and in mammalian cells (Dufner and Thomas 1999). Additionally, it has been shown that this enzyme is tightly controlled by the nutritional (principally amino acids) (Fox et al. 1998) and energetic cellular states (Dennis et al. 2001). Modulation of TOR or S6K protein expression suggests a correlation with the cell and organ size, seed yield, and stress resistance in *Arabidopsis* (Deprost et al. 2007; Hong et al. 2010; Ren et al. 2011), highlighting the central role of this signaling pathway in integrating developmental and adaptive responses.

6.3.4 The TOR-S6K pathway

TOR is a Ser/Thr kinase of the phosphatidylinositol-3-kinase-related kinases (PIKK) family. TOR modulates cell growth in relation to nutrient availability by promoting the

protein synthesis necessary for G1 to S progression in the cell cycle in at least two ways: i) through inactivating the repressor eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) by phosphorylation and then increasing the cap-binding protein eIF4E availability for translation initiation; ii) by activating the ribosomal protein S6 kinase S6K (also named p70S6K) by phosphorylation which in turns activates several protein targets involved in translation. In the first way TOR activates the cap-dependent translation of mRNAs with long and highly structured 5'UTRs, while in the second way it promotes the translation up-regulation of a specific class of mRNAs bearing 5´-terminal oligopyrimidine tracts (5´-TOP mRNAs) that encode translational apparatus components. Thus TOR is also involved in controlling the biogenesis of ribosomes (Schmelzle and Hall 2000). Several observations suggest that nutrient perception is the major trigger of TOR activation, in the budding yeast and in mammalian cells and the activity of mammalian S6K increases in response to diverse stimuli (Dufner and Thomas 1999). Additionally, it has been shown that this enzyme is tightly controlled by the nutritional (principally amino acids) (Fox et al. 1998) and energetic cellular states (Dennis et al. 2001).

TOR protein is found in two multiproteic complexes (TORC1 and TORC2) that differ in their downstream effectors in mammalian cells [Fig. 1 (Martin and Hall 2005; Wullschleger et al. 2006)]. The first complex, TORC1, is integrated by TOR (TOR1/TOR2 in yeast), Regulatory-Associated Protein of TOR (RAPTOR)/KOG1 and mLST8/GβL proteins, while the second complex TORC2 is integrated by TOR (TOR2 in yeast), the rapamycin-insensitive companion of TOR (Rictor)/AVO3 and mLST8/GβL. Activation of TOR kinase in TORC1 is mediated by its interaction with RAPTOR, which is required for the recruitment of substrates (Hara et al. 2002; Kim et al. 2002; Nojima et al. 2003).

TORC1 phosphorylates S6Ks (S6K1 and S6K2) and 4E-BPs (4E-BP1 – 4E-BP3) to promote translation and ribosome biogenesis in a rapamycin-sensitive manner. In mammals, the S6K1/S6K2 Ser/Thr phosphorylation sites are positioned within different subdomains: Thr-229 is in the activation loop and Thr-389 in the hydrophobic carboxy-terminal linker domain of S6K1 (Pearson et al. 1995). Several reports have

shown that Thr-229 phosphorylation is mediated by the phosphatidyl-dependent kinase 1 [PDK1;(Alessi et al. 1998; Pullen et al. 1998)], and it is now generally accepted that the mammalian target of rapamycin (mTOR) is the relevant upstream kinase for Thr-389 (Thomas 2002). TORC2 regulates targets that include the actin cytoskeleton and is not sensitive to rapamycin. The regulatory function of TOR kinase requires various interacting partners (Abraham 2002; Jacinto and Hall 2003).

The TOR pathway is a conserved signaling network in mammals, insects, and yeast that regulates cellular growth in response to environmental cues such as nutrient availability and stress (Laplante and Sabatini 2012). TOR regulates numerous biological processes, including transcription and translation of ribosomal components, and other proteins which collectively contribute to cell growth (Wullschleger et al. 2006). By these means TOR plays a key role in cell growth rate and survival modulation. In mammals, the TOR activity is regulated by growth factors (insulin/insulin-like growth factors), nutrients (amino acids), energy (AMP-activated protein kinase), and stress (hypoxia) (Wullschleger et al. 2006; Laplante and Sabatini 2012).

Protein phosphorylation is a fundamental strategy used in eukaryotes to regulate basic cellular functions; there are common components of signal transduction pathways in all eukaryotes that have been adapted in different species to couple distinct stimuli to specific physiological responses (Turck et al. 1998). However, phosphorylation is a reversible process and the activity of phosphatases also plays important roles in the perception and transduction of developmental and environmental signals. In this sense, dephosphorylation by the Ser/Thr protein phosphatase type 2A (PP2A) regulates many cellular processes, including transcription, translation, cell cycle, metabolism and apoptosis, in most cells. PP2A is a heterotrimeric protein conformed by a catalytic subunit (PP2A-C), the scaffold subunit (PP2A-A) and the regulatory subunit (PP2A-B) (Kerk et al. 2002). In animals, the regulatory B subunits modulate the subcellular localization, substrate specificity, and activity of heterotrimeric PP2As (Gallego and Virshup 2005). While both A and C subunits are highly conserved across all eukaryotes, B subunits are quite diverse,

which is consistent with their regulatory functions. B subunits are further classified into B, B', and B'' based on their molecular weight (Luan 2003). Yeast Tap42 (type 2A-phosphatase-associated protein 42kD) is a regulatory subunit which acts by direct association with the PP2Acatalytic subunit rendering an heterodimer and uncoupling subunits PP2A-A and PP2A-B due to an overlap in the binding sites on PP2A-C. Inhibition of PP2A activity by Tap42 has been also implicated in the TOR signaling pathway in yeast. Under nutrient-rich conditions, active TOR phosphorylates Tap42 and promotes Tap42 association with the PP2A-C (Duvel and Broach 2004). Inactivation of TOR by rapamycin or starvation results in Tap42 dephosphorylation and its dissociation from the Tap42-PP2A-C complex (Urban et al. 2007). These results suggest that TOR regulates protein phosphorylation in yeast cells by indirectly restraining the PP2A activity through Tap42 phosphorylation, although antagonistic elements on the TOR signaling regulation remain unknown.

In yeast, TOR is regulated at transcriptional level through its interaction with the PP2A phosphatase, affecting the phosphorylation status of some transcriptional factors and thereby changing its localization from cytoplasm to the nucleus. Under osmotic stress or nutrient limitation, these transcriptional factors may shuttle into the nucleus to drive the expression of a set of stress-related genes (Beck and Hall 1999; Peterson et al. 1999; Rohde et al. 2001).

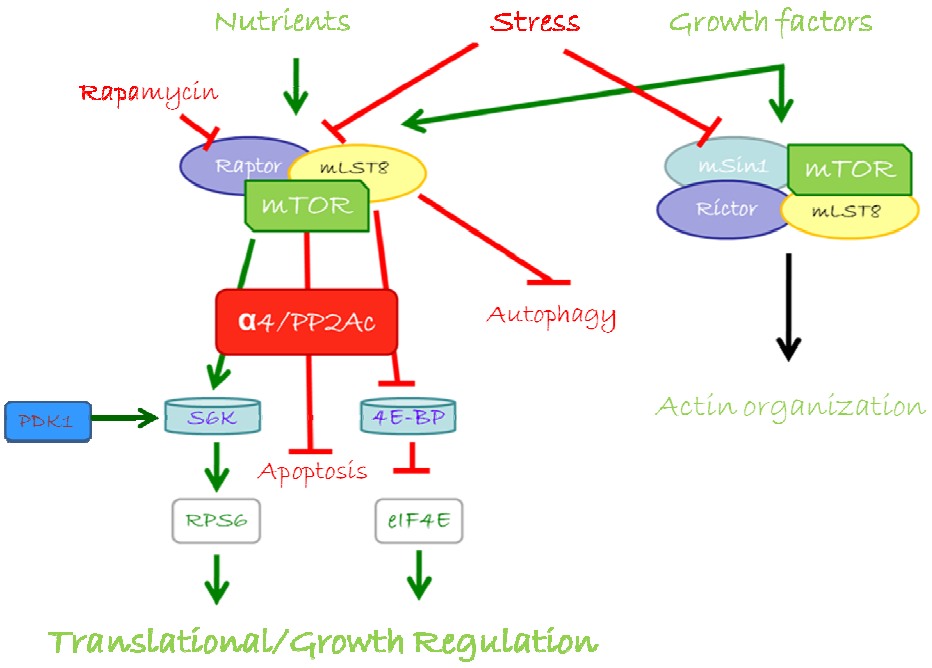


Fig 1. Mammalian TOR-S6K signaling. In mammals, two major complexes of the TOR kinase exist: mTORC1, formed by mTOR, Raptor and mLST8; and mTORC2, formed by mTOR, Rictor, mSin1 and mLST8. Both complexes are activated by growth factors and nutrients and are inactivated by stress, but they have different effectors and final targets. mTORC1 controls cell growth and protein synthesis through the action of S6K and 4E-BP. S6K is phosphorylated by TOR and fully activated by PDK1. This pathway is controlled by α4, the yeast Tap42 homolog in mammals, which interacts with PP2Ac and PP2Ac-like subunits and is also involved in the repression of apoptosis. The mTORC2 complex targets the actin cytoskeleton organization. Modified from Ahn *et al*. 2011.

Upstream of the signaling components before mentioned, in mammals there are other components like the Ras Homolog Enriched in Brain (RHEB) protein (Saucedo et al. 2003; Stocker et al. 2003; Patel and Dinesh-Kumar 2008) and the Translationally Controlled Tumor Protein [TCTP; also called p21, p23, histamine releasing factor and fortilin; (Bommer and Thiele 2004)] that act upstream to repress or activate TOR respectively. TCTP is ubiquitously distributed in eukaryotes and has been proposed as a guanine nucleotide exchange factor (GEF) or guanine nucleotide-free chaperone (Boguski and McCormick 1993; Nuoffer et al. 1997; Pai 1998; Thaw et al. 2001; Itzen et al. 2006). There are several studies in eukaryotes that convey to think in TCTP as a modulator of GTPase activity. GTPases act as molecular switches for a vast number of cellular processes in all eukaryotes (Vernoud et al. 2003).

6.3.5 TOR-S6K pathway Conservation in plants

In plants, the TOR signaling mechanism appears to be conserved since homologs of their components have been identified. Beginning with the trigger of the pathway, in *Zea mays* a 5.7 KDa insulin-related peptide (ZmIGF), sharing epitope homology with mammalian insulin has been isolated (Rodriguez-Lopez et al. 2011), and its expression is related with the onset of fast growth during the germination process (Dinkova et al. 2007). Maize seeds treated with isolated ZmIGF showed increased coleoptiles and root lengths (Sotelo et al. 2010) suggesting that the growth signal perception is conserved in plants.

In the *Arabidopsis* genome, a *TCTP* homolog gene (upstream TOR regulator in animals) has been identified (Berkowitz et al. 2008). This gene is expressed in physiologically active and proliferating tissues as would be expected for a regulatory protein of the TOR pathway. *TCTP* silencing induces slower vegetative development and inhibits leaf expansion due to reduced cell size. Furthermore, the silenced plants show altered root hair development, lateral root formation, and altered auxin perception. These results are consistent with a role of TCTP as an activator of a yet to be identified plant Rheb GTPase (Berkowitz et al. 2008).

It has been shown that *Arabidopsis* TOR operates as a link between nutritional sensing, growth regulation and adaptive responses during different stress stimuli like cold, salinity and drought (Menand et al. 2004). Members of TOR complexes, such as RAPTOR and mLST8/GbL proteins are present in plants (Anderson et al. 2005; Deprost et al. 2005; Díaz-Troya et al. 2008) as well as downstream substrates and regulators (Fig. 2). Such is the case S6K or other AGC kinases (Turck et al. 2004) and PDK1 (Deak et al. 1999; Bögre et al. 2003; Otterhag et al. 2006). Furthermore, it has been reported that *Arabidopsis* PDK1 phosphorylates S6K1 and that, as in animal cells, RAPTOR interacts in vivo both, with S6K and TOR through the HEAT repeats (Mahfouz et al. 2006; Otterhag et al. 2006; John et al. 2011)..

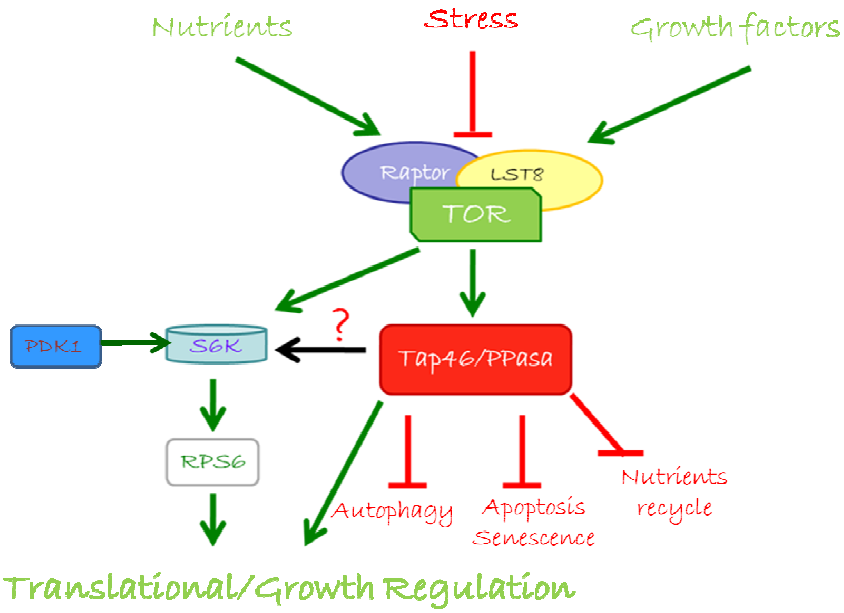


Fig. 2 Plant TOR-S6K signaling. In plants, a TOR complex similar to mTORC1 regulates plant growth, translation, and metabolism in response to growth signals, nutrients, and environmental conditions. The plant TOR complex, likely consists of TOR, Raptor, and LST8. It promotes cell growth and translation through S6K activation and its substrate RPS6 phosphorylation. Similar to mTORC1 signaling, plant S6K requires a second phosphorylation event, which is mediated by PDK. An antagonistic role has been proposed for plant PP2A and the TOR-S6K pathway, suggesting that TOR negatively regulates PP2A activity to promote protein translation and repress autophagy, nutrient recycling, and PCD/senescence. Such action is apparently achieved through Tap46phosphorylation by TOR, allowing its interaction with PP2Ac and PP2Ac-like subunits, preventing the formation of PP2A heterotrimeric protein. Modified from Ahn *et al*., 2011.

Most of the TOR proteins in animals are targets of the antiproliferative drug rapamycin, produced by the bacteria *Streptomyces hygroscopicus* (Cafferkey et al. 1993). The TOR inactivation by rapamycin is mediated by a ternary complex formation, where rapamycin forms non-covalent links between the peptidylprolyl isomerase 12-kDa FK506-binding protein (FKBP12) and the FKBP-rapamycin-binding domain (FRB) of TOR proteins. However, the *Arabidopsis* TOR was found to be insensitive to this drug (Menand et al. 2002). The expression of yeast FKBP12 in *Arabidopsis* lead to rapamycin susceptibility (Sormani et al. 2007), indicating that *Arabidopsis* FKBP12 contains amino acid modifications in the rapamycin interaction region (Sormani et al. 2007). While rapamycin inhibits the growth of the unicellular

alga *Chlamydomonas reinhardtii*, the bryophyte *Physcomitrella patens*, the monocot *Oryza sativa*, and the dicots *Nicotiana tabacum* and *Brassica napus* were insensitive to the drug, suggesting that resistance to rapamycin may be a common feature of land plants (reviewed in Menand et al., 2002). On the other hand, phosphorylation of *Zea mays* S6K (and subsequent phosphorylation of S6) by ZmTOR are stimulated by IGF and insulin, leading to a selective recruitment of mRNAs into polysomes, such effects are rapamycin sensitive (Reyes de la Cruz et al. 2004; Sotelo et al. 2010). Recently, *Arabidopsis* TOR rapamycin sensitivity was demonstrated, although at higher concentration than it was shown in mammalian and yeast cells (100-1000nM versus 10-50 nM respectively), and such inhibition can be further enhanced by overexpressing *Arabidopsis* or human FKBP12 protein (Xiong and Sheen 2012). Furthermore, an *in silico* analysis of FKBP12 rapamycin binding pocket in *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, and *Chlamydomonas reinhardtii*, suggests that the critical binding region to rapamycin in FKBP12, that seems to be not functional in *A. thaliana,* is structured differently in maize with greater similarity to *Chlamydomonas renhardtii* (Agredano-Moreno et al. 2007) indicating that there are unique aspects in the regulation of the pathway depending on the plant species.

6.3.6 Plant growth regulation by TOR-S6K

Plant growth is the result of cell growth coupled with cell division and cell expansion. In meristematic regions, cell growth and division occurs to produce new tissues and organs. Post-mitotic differentiated cells can reach large sizes, such as in the hypocotyls or in mature leaves and roots. Meristem activity and embryonic development depends on nutrients availability provided by other parts of the plant. *AtTOR* expression patterns are mainly found in zones where cell proliferation is coupled to cytosolic growth, such as primary apical and root meristems. This pattern is in contrast with *TOR* expression in mammalian cells and in *Drosophila* larvae, which occurs in all tissues (Brown et al. 1994; Chiu et al. 1994). Because cells from expanding root, leaf and hypocotyl do not express *AtTOR*, the growth process of mature plant cells was attributed to a vacuolar and cell-wall expansion and has been proposed that is not related to the growth process attributed to TOR in other

organism, which involves the synthesis of cytosolic components (Schmelzle and Hall 2000). However, recently was demonstrated that *Arabidopsis* TOR activity is present in non-dividing, fully differentiated and expanded leaf cells (Xiong and Sheen 2012). Additionally, *TOR* expression begins during germination at approximately 12 h and increases to the highest level at 48 h in maize, and *TOR* mRNA is present in all tissues of 13 day-old plants at almost the same level, independently of their development stage (Agredano-Moreno et al. 2007). For all these reasons, is probable that TOR could achieve additional functional roles to synthesis of cytoplasmic components.

Disruption of the *AtTOR* gene leads to embryonic arrest, indicating a crucial role of TOR during early development in *Arabidopsis*, and making the analysis of the TOR pathway functions limited (Menand et al. 2002). Additionally, *Arabidopsis* insensitivity to rapamycin further restricts the functional studies of TOR in plants. Embryos with homozygous *AtTOR* knockout cannot develop beyond the dermatogenic stage but contain cells still undergoing divisions. This result indicates that *AtTOR* disruption by itself does not inhibit cell division. The first cell divisions in the *Arabidopsis* embryo require little or no increase in overall cell mass and lead to a reduction of the cytoplasm relative to the nucleus, supporting the idea that growth arrest occurs in cells as consequence of an incapacity to synthesize cell components during the transition between the two modes of cell division (Menand et al. 2002).

To further understood TOR role in *Arabidopsis* Deprost et al, (2007) describes RNAi lines in which *AtTOR* expression is reduced but not eliminated, demonstrating the key role of this signal transduction pathway in plant organ growth. *AtTOR* RNAi lines produce morphologically normal plants, but with smaller leaves and shorter roots than wild-type plants, while *Arabidopsis AtTOR* overexpressig plants have larger leaves and longer roots than wild-type (Deprost et al. 2007). The altered size of the leaves in *AtTOR* RNAi and *AtTOR* overexpressig lines results from changes in cell size rather than cell number. Reduced protein translation is likely to be the cause of these smaller organs as they contain less soluble protein and have fewer high molecular weight polysomes than wild type plants. Seed production is also higher in the plants

overexpressing *AtTOR*, whereas it is reduced in *AtTOR*-silenced plants. Additionally, the elongation of etiolated hypocotyls of seedlings is not affected by variations in *AtTOR* expression, which suggests that the AtTOR kinase does not control cell elongation, at least in *Arabidopsis* etiolated hypocotyls (Deprost et al. 2007).

RAPTOR plays a key role in mammalian p70S6K (S6K1) regulation and has been shown that directly binds with this protein, as well as it has been suggested to act as a scaffold to facilitate the binding of substrates to TOR, indicating that S6K1 may receive direct signal from TOR (Hara et al. 2002; Kim et al. 2002; Nojima et al. 2003). *TOR* and *RAPTOR* genes were found to be expressed constitutively at low levels in various *Arabidopsis* tissues, and their expression levels did not change significantly during different physiological conditions (Menand et al. 2002; Robaglia et al. 2004; Anderson et al. 2005; Deprost et al. 2005; Mahfouz et al. 2006), indicating that TOR may be regulated by some postranscriptional/translational mechanisms (Robaglia et al. 2004).

The *Arabidopsis* genome contains two *S6K* genes sharing 87% identity, *S6K1* and *S6K2*, originally named *ATPK6* and *ATPK19*, respectively (Mizoguchi et al. 1995; Zhang et al. 1994; Turck et al. 1998). These genes are arranged in tandem duplication on chromosome 3 as direct repeats (Turck et al. 1998; Turck et al. 2004). These genes encode proteins that share high sequence homology with the mammalian ribosomal protein kinases S6K1 and S6K2 (Volarevic and Thomas 2001).

In mammals, activation of S6K1/S6K2 is brought about by ordered consecutive phosphorylations at two distinct site sets. The first set displays Ser/Thr-Pro motifs and is clustered in the carboxyl terminus of mammalian S6K1/S6K2. This site, as well as the entire carboxyl terminus of S6K1/S6K2, is lacking in the *Arabidopsis* homologs. The second set of key regulatory sites, which is perfectly conserved in the plant homologs, is flanked by large aromatic residues (Pearson et al. 1995) and is the target of S6K1 selective dephosphorylation and inactivation by the immunosuppressant rapamycin, as well as the fungal metabolite wortmannin (Pearson et al., 1995).

Arabidopsis S6K2 was suggested to be the ortholog of p70S6K (S6K1) since it was able to phosphorylate the ribosomal S6 protein derived from plants or mammals and to rescue S6 phosphorylation in rapamycin-treated human 293 cells. Furthermore, *Arabidopsis* S6K2 could be activated by the growth hormone insulin, in a TOR dependent manner (Turck et al. 1998; Turck et al. 2004). However, later it was shown that *Arabidopsis* S6K1 could phosphorylate the ribosomal S6 protein also (Mahfouz et al. 2006). These data questioned whether plant S6K2 is the true homolog of p70S6K. Furthermore, it was demonstrated that *Arabidopsis* S6K1 could interact with RAPTOR1, and in turn with the TOR HEAT repeats in vivo. Moreover, cellular localization studies indicated that of plant S6K1 is cytoplasmic, whereas plant S6K2 is nuclear (Mahfouz et al., 2006). Together these data indicated that S6K1 is more likely the plant functional hortolog of mammalian p70S6K.

In spite of some overlapping, AtTOR, S6K1 and S6K2 have distinct expression domains in the root. The highest *AtTOR* expression is found in meristems, whereas the *S6K1* transcript accumulates in the elongation zone, and *S6K2* in the differentiation zone, indicating that S6K1 and S6K2 might regulate the exit from proliferative growth (Winter et al. 2007). In agreement with this, recently it was demonstrated that S6K negatively regulates cell division in plants as part of a signaling pathway connected to the RBR1–E2F transcriptional switch, and its deregulation can influence the polyploidization rate and lead to chromosome instability (Henriques et al. 2010; Shin et al. 2012). However, expression of the cell cycle regulatory genes are increased in *Arabidopsis* protoplasts derived from transgenic plants expressing AtS6K1 under auxin-inducible promoter (Shin et al., 2012), suggesting that different regulatory circuits might be in operation under the control of AtS6K1 upon different physiological or specific cell status. Additionally, S6K could also regulate elongation growth, as suggested by the overexpression of a lily S6K (LS6K1) gene in *Arabidopsis* that resulted in decreased cell elongation in floral organs (Tzeng et al. 2009).

How the S6K activity is regulated in plants under specific conditions represent a very interesting question. In this sense, there are two options: First, such control can be

modulated at the transcriptional level, while the second convey us to think that this regulation could be at the postranslational level, in a way different to phosphorylation. Several signaling pathways in plants operate through the TOR-S6K, and below some of them are depicted.

6.3.7 TOR-S6K signaling regulation throughout positive effectors

The TOR-S6K signal transduction pathway starts with signal perception at membrane level, followed by the activation of protein phosphorylation cascades involving protein kinases and phosphatases that finally target proteins involved in the responses such as regulation of transcription factors that control gene expression.

Since auxins and cytokinins are growth and developmental plant regulators, they represent obvious candidates to convey the TOR-S6K pathway modulation. These hormones enhance S6 ribosomal protein (S6RP) phosphorylation when cell cultures in stationary phase are transferred to fresh medium (Turck et al. 2004). Further, while the *S6K1* transcript level is steady in both starvation and stimulating conditions, the *S6K2* transcript level is downregulated in the stimulating condition and upregulated during starvation (Turck et al., 2004). In addition, the *S6K1* and *S6K2* transcriptional up-regulation was previously evidenced under cold stress conditions in *Arabidopsis* seedlings (Mizoguchi et al. 1995), and these transcripts accumulation was correlated with changes in S6RP phosphorylation and kinase activity. Similar to animals, plant S6RP phosphorylation enhances selective polysomal recruitment of some ribosomal protein mRNAs and thus regulates the switch of translational capacity between growth promoting and stress conditions (Beltrán-Peña et al. 2002; Turck et al. 2004). Additionally S6K phosphorylation and induction of the translational machinery was observed by auxin and insulin treatments in *Zea mays* coleoptiles in a phospahtidic acid (PA)-production dependent way. Effects triggered by insulin were inhibited by rapamycin (Buentello Volante et al. 2010), suggesting that PA could represent an intermediate in the TOR-S6K signaling.

Auxins have been described as growth regulators involving the TOR-S6K pathway in plants (Beltrán-Peña et al. 2002; Turck et al. 2004). However, the exact regulatory

flux of the auxin signal through the pathway is unknown. In *Arabidopsis*, the PINOID protein (PID) is a Ser-Thr kinase involved in the asymmetrical localization of the membrane-associated PINFORMED (PIN) family of auxin transport facilitators. This kinase belongs to a large subfamily of protein kinases termed AGC (cAMP-dependent protein kinase, A/cGMP-dependent protein kinase, G/protein kinase C). The AGC subfamily is subdivided into phylogenetically distinct categories (Bögre et al. 2003). The largest and most diverse of these categories is the subfamily VIII, which contains 23 members. The majority of kinases from the *Arabidopsis* subfamily VIII contain a C-terminal hydrophobic domain similar to that found in the protein kinase A (PKA), which mediates the interaction of the protein with PDK1. PIN proteins mediate the polar efflux of auxins from cells, and their localization determines the direction of local intracellular auxin transport (Wisniewska et al. 2006). PIN localization can be modulated by different cues and their localization depends on its phosphorylation state (Friml et al. 2004). PID is recruited to phospholipid-enriched membrane fractions and activated by phosphatidyl-dependent kinase 1 (PDK1), initiating a signal cascade that leads to membrane localization of a polar auxin transport (PAT) complex, modulating auxin homeostasis. In the TOR-S6K pathway, active TOR phosphorylates S6K, but a second phosphorylation event mediated by PDK1 is required to render the fully active S6K form. Hence a cross-talk regulation between PAT and TOR signaling pathways could exist, but it is still elusive (Fig. 3).

6.3.8 Plant TOR-S6K regulation under abiotic stress

As described above, TOR regulates cellular activities by the phosphorylation of downstream targets, including S6K, which in turn phosphorylates S6RP and some translation factors to promote translation (Beltrán-Peña et al. 2002; Turck et al. 2004; Deprost et al. 2005; Deprost et al. 2007). *Arabidopsis* plants with altered *AtTOR* expression levels are affected in the response to osmotic stress. Particularly, *AtTOR* expression level is inversely correlated with the primary root sensitivity to osmotic stress. *AtTOR*-RNAi plants are hypersensitive to high sugar concentrations, while lines overexpressing (OE) *AtTOR* are less affected by this condition than the control plants (Deprost et al., 2007). Moreover, RNAi lines showing approximately 20%

expression level of the wild type plant *AtTOR* accumulated high concentrations of sugars. These results suggest that TOR activity is necessary for nutrient recycling and its expression level or protein activity can be modulated during the osmotic stress. Other studies have found that the *S6K* expression level is also modulated by osmotic stress in *Arabidopsis* (Mizoguchi et al., 1995) and *AtS6K* overexpressing plants are hypersensitive to osmotic stress (Mahfouz et al. 2006). These results are in agreement with reduced S6K activity and S6RP phosphorylation upon stress in *Arabidopsis* in a RAPTOR level-dependent manner (Mahfouz et al. 2006; Hong et al. 2008; Williams et al. 2003). According to the above evidences, S6K1 and S6K2 are probably regulated transcriptionally and post-translationally to modulate growth in response to a wide variety of environmental and developmental stimuli in plants, through the action of different signal transducers in each case.

Recent studies have provided insights into the molecular and cellular mechanisms by which plants respond to and tolerate salinity and drought stresses. These include the identification and characterization of transporters and channels, as well as signaling components (Apse et al. 1999; Zhu 2002; Chinnusamy and Zhu 2009). Modifications of membrane lipids produce different classes of signaling messengers, such as PA, Diacylglycerol (DAG), DAG-pyrophosphate (DAG-PP), lysophospholipids, free fatty acids (FFAs), oxylipins, phosphoinositides and inositol polyphosphates (Wang 2004; Bargmann and Munnik 2006; Boss et al. 2009). PA is a lipid mediator produced in plant cells through the phospholipase D (PLD)-catalyzed hydrolysis of phospholipids in a similar way as in mammals. PLD-derived mammalian PA has been shown to activate TOR signaling (Fang et al. 2001). In addition to PLD-mediated hydrolysis, PA can also be produced by other reactions, such as phosphorylation of DAG by DAG kinases (DGKs), dephosphorylation of DAG-PP by lipid phosphatase, and *de novo* synthesis (Munnik et al. 2000; Wang et al. 2006). Plant PA has been implicated in many processes including senescence, aging, stress responses and pathogen attack (Munnik et al. 1998). Hyperosmotic stress in *Arabidopsis* (e. g. high-salinity, drought or freezing) generates PA through PLD activation (Zhu 2002; Bray 2004). It was shown that different PLDs have unique and overlapping functions in mediating plant growth and development under prolonged drought, rapid dehydration and different

levels of salinity (Hong et al. 2010). *Arabidopsis* has 12 PLD family members classified as six types: PLDα(1-3), β(1-2), γ(1-3), δ, ε and ζ(1-2) (Qin and Wang 2002; Wang et al. 2006). Recent results also indicate that different PLDs mediate plant stress responses through different molecular and cellular events. In this way, PLDα1 is the most abundant isoform and apparently is responsible for basal PA levels. However, *Arabidopsis pldα3* knockout (KO) line showed decreased PA content in control (80%) as well water deficient (60%) plants suggesting that PLDα3 contributes to basal PA production as well as to stress modulation of this signaling component (Hong et al. 2008). The same KO line showed decreased *AGC2.1* kinase transcript levels only under salt stress, whereas *TOR* expression was affected in both, salt and water deficit conditions. PLDα3 overexpressing (OE) plants did not showed increased PA or *AGC2.1* levels above the WT plants under control, salt stress or water deficient conditions. However, the *TOR* transcript levels were increased in OE plants under both stress conditions. In addition, S6K phosphorylation was decreased in *pldα3* KO as compared with WT under salt or water deficit. Considering all these results together with the previous showing S6K regulation by hyperosmotic stress (Mizoguchi et al 1998; Mahfouz et al., 2006), a cross-link regulation between PLD-derived PA and the TOR-S6K pathway is evidenced in the mediation of stress responses in plants.

Until now, the role of protein kinases in the modulation of cellular responses to stress has been described. However, the circuit of phosphorylation and dephosphorylation must be completed and requires the coordinated control of protein phosphatases. Under this context the PP2A has been implied in stress response in plants (País et al. 2009). The *Arabidopsis* genome encodes five C, three A and 17 B PP2A subunits. Considering different combinations of these subunits, up to 255 different PP2A holoenzymes could be formed (Kerk et al. 2002). In *Arabidopsis*, a PP2A-A mutant (*rcn1*; root curl in naphthylphthalamic acid: NPA) displays tightly curled roots in the presence of the auxin transport inhibitor NPA. Furthermore, mutant plants are more sensitive to NPA (Garbers et al. 1996).

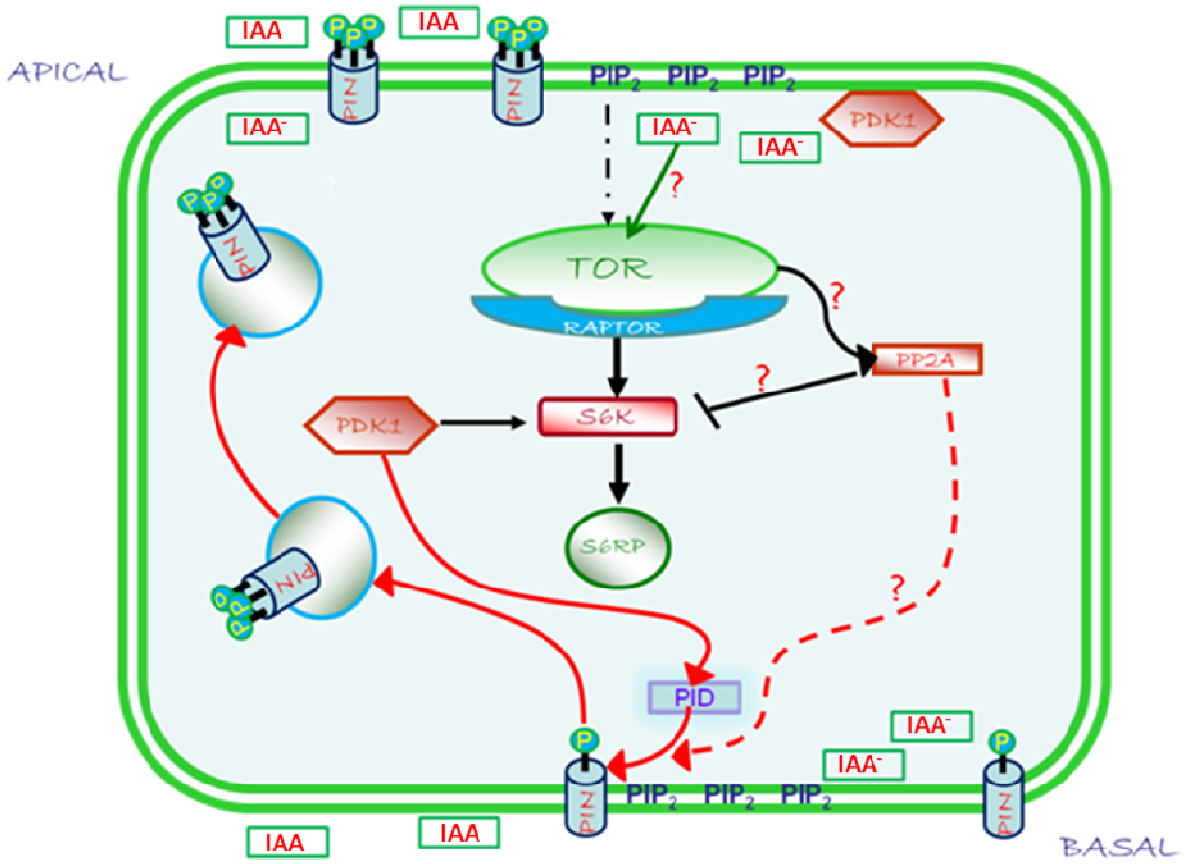


Fig. 3 Cross-Talking between Polar Auxin Transport (PAT) and TOR-S6K signaling pathway. PID protein (considered as auxin efflux protein and whose expression responds to auxin) and PDK1 are recruited to PIP_2 enriched membrane fractions where PID phosphorylates to PIN proteins. Hyperphosphorylated PIN proteins are endocyted and transported from the basal to the apical site of the cytoplasmic membrane; additionally PDK1 could phosphorylate PID enhancing its activity and modulating intracellular auxin concentration. On the other hand, the TOR-S6K pathway, which is activated by auxin together with PDK1, phosphorylates S6K to promote cell growth. PDK1 could represent an intermediate in the cross-talk between TOR-S6K and PAT signaling. In addition, it has been proposed that both, PAT and TOR-S6K pathways are negatively regulated by PP2A, which could dephosphorylate PIN and S6K proteins modulating hence PIN intracellular localization, auxin concentration and cell growth. In this scenario, TOR activation under favorable growth conditions would negatively impact PP2A activity, enhancing in this way cell growth.

There is a scarce knowledge about the regulatory subunits PP2A-B and PP2A-C in plants. Since S6K activity is sensitive to osmotic stress, it has been hypothesized that PP2A might be responsible for S6K regulation in the plant osmotic stress response.

However, in our work group, it was recently demonstrated that PP2A activity is diminished during osmotic stress, at least in root tissues (Chávez-Avilés et al. 2012). Therefore, a missing regulator should cover such action. Moreover, Tap42/α4 homologs are present in plant genomes. The *Arabidopsis thaliana* homolog of Tap42/α4, designated TAP46, was identified through its interaction with the PP2A catalytic subunits in a yeast two-hybrid system and by co-immunoprecipitation (Harris et al. 1999). In a recent report, the functions and phosphatase regulation of plant TAP46 was characterized showing that TAP46 interacted with PP2A and PP2A-like phosphatases PP4 and PP6, modulating PP2A activities (Ahn et al. 2011). Additionally, Tap46 depletion reproduced the phenotype of TOR-RNAi lines including repression of translation, activation of autophagy and nitrogen mobilization. These results indicate that Tap46 could act as a positive effector of TOR signaling in plants.

6.3.9 Autophagy and TOR signaling

Under stress conditions or during senescence, plant cells recycle their cytoplasmic content. This process is called autophagy, which is induced by multiple abiotic and biotic stresses, including nutrient deficiency, oxidative, salt and drought stresses, and pathogen invasion (Liu et al. 2005; Toyooka et al. 2006; Hofius et al. 2009; Shin et al. 2009). In this regard, a recent study in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* showed that autophagy is induced upon rapamycin treatment (Pérez-Pérez et al. 2010). In the budding yeast and mammalian cells, rapamycin also triggers autophagy, indicating that TOR is a negative regulator of this process. The Atg1/Atg13 complex [encoded by *ATG* (*AuTophaGy*) genes] is required at an early stage of autophagy initiation to induce autophagosome formation and has been identified as TOR substrate in metazoans. TOR phosphorylates Atg13 in a nutrient dependent-manner. RNAi-AtTOR lines with decreased *AtTOR* expression have constitutive autophagy and increased expression of some *ATG* genes, even in the absence of stress conditions. Such autophagy is dependent on the autophagy gene *AtATG18a* (Liu and Bassham 2010). These data suggest that TOR might negatively regulate autophagy from photosynthetic unicellular organisms to multicellular plants.

6.3.10 TOR signaling modulation by sucrose

Plant growth critically depends on signaling systems that provide information from the prevailing internal and external conditions. Information of cellular metabolites availability such as sugars and amino acids is of crucial importance for plants, which possess sophisticated signaling systems that respond to metabolite concentrations. Sugar availability is a powerful growth driver since sugars acts both, as immediate substrates for intermediary metabolism and as effective signaling molecules (Smeekens et al. 2010).

In general, sugar availability is linked to growth and development. It is unknown how exactly the sugar availability controls growth because this disaccharide is readily converted into fructose and glucose, and vice versa (Hummel et al. 2009; Smeekens et al. 2010). During the day, plants generate carbon resources by photosynthesis; During the night, carbon is remobilized to support metabolism and growth (Hummel et al., 2009). In recent years important progress has been made identifying the dominant plant growth controlling regulatory systems that receive input from sugars and sugars-derived metabolic signals. These systems are either, growth promoting or growth inhibitory. Systems that promote growth include the hexokinase (HXK) glucose sensor, the trehalose 6-phosphate (T6P) signal, and the TOR kinase system. The growth inhibitory systems are the SNF1-related Protein Kinase1 (SnRK1) and the C/S1 bZIP transcription factor network (Smeekens et al., 2010).

In plants, SnRK1 controls metabolism at different levels. SnRK1 phosphorylates central enzymes involved in primary metabolism usually leading to their inactivation (Polge and Thomas 2007; Halford and Hey 2009). In addition, SnRK1 was shown to be a central integrator of stress and energy signaling in plants, causing extensive reprogramming of gene transcription and controlling plant growth (Baena-Gonzalez et al. 2007). The function of the SNF1/AMPK/SnRK1 gene family seems to be well conserved in plants. In mammals, activated AMPK inhibits TOR kinase by phosphorylating the GAP (GTPase activating protein) TSC2. Phosphorylated TSC2 stimulates Rheb GTPase activity and thereby inhibits TOR, which is only activated in the Rheb-GTP bound state. Moreover, AMPK phosphorylates and inhibits the TOR

activator protein RAPTOR (Gwinn et al. 2008). Recent evidence shows that glucose strongly activates TOR activity in *Arabidopsis* seedlings, promoting vigorous growth. Such effects are strongly delayed by rapamycin treatment (Xiong and Sheen 2012). Therefore, a connection between plant SnRK1 and TOR signaling pathways would be an important area of investigation to pursue in the future.

6.3.11 CONCLUDING REMARKS

The information depicted about the role of TOR-S6K signal transduction pathway in the growth and development in mammals and yeast has been crucial to gain insights about the functions of this signaling pathway in plants. However, due to the plants nature *per se*, the comprehension about perception and transduction of intrinsic and extrinsic signals greatly complicates the interpretation of its physiological and cellular effects. Although several conserved mTORC1 complex components has been described in plants, we are only beginning to understand the functions of the plat TOR and its partners. Moreover, the molecular mechanisms by which they act are poorly understood also and since several components are missing in plant genomes, is logic to consider that plants must be developed alternative mechanisms to cover such functions, and such mechanisms remains to be discovered yet. The scenery described before shown us that the information obtained must be interpreted carefully because there are unique aspects in the regulation of TOR-S6K pathway, depending on the organism and the tissue or cell type. This will lead us to get the most approximated understanding of TOR mechanistic regulation. Hence, we must to have an open perspective to find novel functions developed by the closer components of the plant TOR-S6K signaling.

6.3.12 Aknowledgments

This work was supported by 2012 CIC-UMSNH grant to HRC.

6.3.13 References

Abraham RT (2002) Identification of TOR Signaling Complexes: More TORC for the Cell Growth Engine. Cell 111 (1):9-12. doi:10.1016/s0092-8674(02)01009-7

Agredano-Moreno LT, Reyes de la Cruz H, Martinez-Castilla LP, Sanchez de Jimenez E (2007) Distinctive expression and functional regulation of the maize (Zea mays L.) TOR kinase ortholog. Molecular BioSystems 3 (11):794-802. doi:10.1039/B705803A

Ahn CS, Han J-A, Lee H-S, Lee S, Pai H-S (2011) The PP2A Regulatory Subunit Tap46, a Component of the TOR Signaling Pathway, Modulates Growth and Metabolism in Plants. Plant Cell 23 (1):185-209. doi:10.1105/tpc.110.074005

Alessi DR, Kozlowski MT, Weng Q-P, Morrice N, Avruch J (1998) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. Current Biology 8 (2):69-81. doi:10.1016/s0960-9822(98)70037-5

Anderson G, Veit B, Hanson M (2005) The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. BMC Biology 3 (1):12. doi:10.1186/1741-7007-3-12

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na+/H+ Antiport in *Arabidopsis*. Science 285 (5431):1256-1258. doi:10.1126/science.285.5431.1256

Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. Nature 448 (7156):938-942. doi:10.1038/nature06069

Bargmann BOR, Munnik T (2006) The role of phospholipase D in plant stress responses. Current Opinion in Plant Biology 9 (5):515-522. doi:10.1016/j.pbi.2006.07.011

Beck T, Hall MN (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. Nature 402 (6762):689-692

Beltrán-Peña E, Aguilar R, Ortíz-López A, Dinkova TD, De Jiménez ES (2002) Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. Physiologia Plantarum 115 (2):291-297. doi:10.1034/j.1399-3054.2002.1150216.x

Berkowitz O, Jost R, Pollmann S, Masle J (2008) Characterization of TCTP, the Translationally Controlled Tumor Protein, from *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 20 (12):3430-3447. doi:10.1105/tpc.108.061010

Bögre L, Ökrész L, Henriques R, Anthony RG (2003) Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein kinases. Trends in Plant Science 8 (9):424-431. doi:10.1016/S1360-1385(03)00188-2

Boguski MS, McCormick F (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. Nature 366 (6456):643-654

Bommer U-A, Thiele B-J (2004) The translationally controlled tumour protein (TCTP). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36 (3):379-385. doi:10.1016/S1357-2725(03)00213-9

Boss WF, Lynch DV, Wang X (2009) Lipid-Mediated Signaling. In: Annual Plant Reviews Volume 33: Intracellular Signaling in Plants. Wiley-Blackwell, pp 202-243. doi:10.1002/9781444302387.ch8

Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany 55 (407):2331-2341.

doi:10.1093/jxb/erh270

Brown EJ, Albers MW, Bum Shin T, ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. Nature 369 (6483):756-758

Buentello Volante B, Díaz de León-Sánchez F, Rivera-Cabrera F, Aguilar Caballero R, Ponce-Valadez M, Sánchez de Jiménez E, Pérez-Flores LJ (2010) Apparent cross-talk of two signaling pathways that regulate Zea mays coleoptile growth. Phyton (B. Aires) 79 (1):101-108

Cafferkey R, Young PR, McLaughlin MM, Bergsma DJ, Koltin Y, Sathe GM, Faucette L, Eng WK, Johnson RK, Livi GP (1993) Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. Molecular and Cellular Biology 13 (10):6012-6023. doi:10.1128/mcb.13.10.6012

Chávez-Avilés M, Andrade-Pérez C, Reyes de la Cruz H (2012) PP2A mediates lateral root development under NaCl-induced osmotic stress throughout auxin redistribution in *Arabidopsis thaliana*. Plant Soil:1-12. doi:10.1007/s11104-012-1540-9

Chinnusamy V, Zhu J-K (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. Current Opinion in Plant Biology 12 (2):133-139. doi:10.1016/j.pbi.2008.12.006

Chiu MI, Katz H, Berlin V (1994) RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. Proceedings of the National Academy of Sciences 91 (26):12574-12578

Deak M, Casamayor A, Currie RA, Peter Downes C, Alessi DR (1999) Characterisation of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. FEBS Letters 451 (3):220-226. doi:10.1016/S0014-5793(99)00556-6

Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G (2001) Mammalian TOR: A Homeostatic ATP Sensor. Science 294 (5544):1102-1105. doi:10.1126/science.1063518

Deprost D, Truong H, Robaglia C, Meyer C (2005) An *Arabidopsis* homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. Biochemical and Biophysical Research Communications 326:844 - 850

Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C (2007) The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. EMBO Reports 8 (9):864-870. doi:10.1038/sj.embor.7401043

Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2008) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. Autophagy 4 (7):851-865

Dinkova TD, De La Cruz HR, García-Flores C, Aguilar R, Jiménez-García LF, De Jiménez ES (2007) Dissecting the TOR–S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation. Physiologia Plantarum 130 (1):1-10. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.00862.x

Dobrenel T, Marchive C, Sormani R, Moreau M, Mozzo M, Montane MH, Menand B, Robaglia C, Meyer C (2011) Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. Biochemical Society transactions 39 (2):477-481. doi:10.1042/BST0390477

Dufner A, Thomas G (1999) Ribosomal S6 Kinase Signaling and the Control of Translation. Experimental Cell Research 253 (1):100-109. doi:10.1006/excr.1999.4683

Duvel K, Broach JR (2004) The role of phosphatases in TOR signaling in yeast. Current topics in microbiology and immunology 279:19-38

Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J (2001) Phosphatidic Acid-Mediated Mitogenic Activation of mTOR Signaling. Science 294 (5548):1942-1945. doi:10.1126/science.1066015

Fox HL, Kimball SR, Jefferson LS, Lynch CJ (1998) Amino acids stimulate phosphorylation of p70(S6k) and organization of rat adipocytes into multicellular clusters. American Journal of Physiology-Cell Physiology 274 (1):C206-C213

Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, Ouwerkerk PB, Ljung K, Sandberg G, Hooykaas PJ, Palme K, Offringa R (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. Science 306 (5697):862-865. doi:10.1126/science.1100618

Gallego M, Virshup DM (2005) Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. Current Opinion in Cell Biology 17 (2):197-202. doi:10.1016/j.ceb.2005.01.002

Garbers C, DeLong A, Deruere J, Bernasconi P, Soll D (1996) A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis*. EMBO Journal 15 (9):2115-2124

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. Molecular Cell 30 (2):214-226. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003

Halford NG, Hey SJ (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. Biochemical Journal 419 (2):247-259. doi:10.1042/bj20082408

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. Cell 110:177 - 189

Harris DM, Myrick TL, Rundle SJ (1999) The *Arabidopsis* Homolog of Yeast TAP42 and Mammalian α4 Binds to the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2A and Is Induced by Chilling. Plant Physiology 121 (2):609-618. doi:10.1104/pp.121.2.609

Henriques R, Magyar Z, Monardes A, Khan S, Zalejski C, Orellana J, Szabados L, de la Torre C, Koncz C, Bogre L (2010) *Arabidopsis* S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. EMBO Journal 29 (17):2979-2993. doi:10.1038/emboj.2010.164

Hofius D, Schultz-Larsen T, Joensen J, Tsitsigiannis DI, Petersen NHT, Mattsson O, Jørgensen LB, Jones JDG, Mundy J, Petersen M (2009) Autophagic Components Contribute to Hypersensitive Cell Death in *Arabidopsis*. Cell 137 (4):773-783. doi:10.1016/j.cell.2009.02.036

Hong Y, Pan X, Welti R, Wang X (2008) Phospholipase Dα3 Is Involved in the Hyperosmotic Response in *Arabidopsis*. Plant Cell 20 (3):803-816. doi:10.1105/tpc.107.056390

Hong Y, Zhang W, Wang X (2010) Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. Plant, Cell & Environment 33 (4):627-635. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02087.x

Hong-Bo S, Li-Ye C, Ming-An S (2008) Calcium as a versatile plant signal transducer under soil water stress. BioEssays 30 (7):634-641. doi:10.1002/bies.20770

Hummel M, Rahmani F, Smeekens S, Hanson J (2009) Sucrose-mediated translational control. Annals of Botany 104 (1):1-7. doi:10.1093/aob/mcp086

Ingram GC, Waites R (2006) Keeping it together: co-ordinating plant growth. Current Opinion in Plant Biology 9 (1):12-20. doi:10.1016/j.pbi.2005.11.007

Itzen A, Pylypenko O, Goody RS, Alexandrov K, Rak A (2006) Nucleotide exchange via local protein unfolding[mdash]structure of Rab8 in complex with MSS4. EMBO Journal 25 (7):1445-1455. doi:10.1038/sj.emboj.7601044

Jacinto E, Hall M (2003) Tor signalling in bugs, brain and brawn. Nature Reviews Molecular Cell Biology 4:117 – 126. doi:10.1038/nrm1018

John F, Roffler S, Wicker T, Ringli C (2011) Plant TOR signaling components. Plant signaling & behavior 6 (11):1700-1705

Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Barsam B, Veretnik S, Gribskov M (2002) The Complement of Protein Phosphatase Catalytic Subunits Encoded in the Genome of *Arabidopsis*. Plant Physiology 129 (2):908-925. doi:10.1104/pp.004002

Kim D, Sarbassov D, Ali S, King J, Latek R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini D (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell 110:163 - 175

Krizek BA (2009) Making bigger plants: key regulators of final organ size. Current Opinion in Plant Biology 12 (1):17-22. doi:10.1016/j.pbi.2008.09.006

Laplante M, Sabatini David M (2012) mTOR Signaling in Growth Control and Disease. Cell 149 (2):274-293

Liu Y, Bassham DC (2010) TOR Is a Negative Regulator of Autophagy in *Arabidopsis thaliana*. PloS one 5 (7):e11883. doi:10.1371/journal.pone.0011883

Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP (2005) Autophagy Regulates Programmed Cell Death during the Plant Innate Immune Response. Cell 121 (4):567-577. doi:10.1016/j.cell.2005.03.007

Luan S (2003) Protein phosphatases in plants. Annual Review of Plant Biology 54 (1):63-92. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134743

Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ, Verma DPS (2006) *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN Interacts with RAPTOR, Which Regulates the Activity of S6 Kinase in Response to Osmotic Stress Signals. Plant Cell 18 (2):477-490. doi:10.1105/tpc.105.035931

Martin DE, Hall MN (2005) The expanding TOR signaling network. Current Opinion in Cell Biology 17 (2):158-166. doi:10.1016/j.ceb.2005.02.008

Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:6422 - 6427

Menand B, Meyer C, Robaglia C (2004) Plant Growth and the TOR Pathway. In: Thomas G, Sabatini D, Hall M (eds) TOR, vol 279. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, pp 97-113. doi:10.1007/978-3-642-18930-2_7

Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Kamada H, Shinozaki K (1995) Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 358 (2):199-204. doi:10.1016/0014-5793(94)01423-X

Munnik T, Irvine RF, Musgrave A (1998) Phospholipid signalling in plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1389 (3):222-272. doi:10.1016/S0005-2760(97)00158-6

Munnik T, Meijer HJG, Ter Riet B, Hirt H, Frank W, Bartels D, Musgrave A (2000) Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. Plant Journal 22 (2):147-154. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00725.x

Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K (2003) The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. Journal of Biological Chemistry 278:15461 - 15464

Nuoffer C, Wu SK, Dascher C, Balch WE (1997) Mss4 does not function as an exchange factor for Rab in endoplasmic reticulum to Golgi transport. Molecular Biology of the Cell 8 (7):1305-1316

Otterhag L, Gustavsson N, Alsterfjord M, Pical C, Lehrach H, Gobom J, Sommarin M (2006) *Arabidopsis* PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. Biochimie 88 (1):11-21. doi:10.1016/j.biochi.2005.07.005

Pai EF (1998) The alpha and beta of turning on a molecular switch. Nature structural biology 5 (4):259-263

País SM, Téllez-Iñón MT, Capiati DA (2009) Serine/Threonine Protein Phosphatases type 2A and their roles in stress signaling. Plant signaling & behavior 4 (11):1013-1015

Patel S, Dinesh-Kumar SP (2008) *Arabidopsis* ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. Autophagy 4 (1):20-27

Pearson RB, Dennis PB, Han JW, Williamson NA, Kozma SC, Wettenhall RE, Thomas G (1995) The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. EMBO Journal 14 (21):5279-5287

Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2010) Inhibition of Target of Rapamycin Signaling and Stress Activate Autophagy in Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiology 152 (4):1874-1888. doi:10.1104/pp.109.152520

Peterson RT, Desai BN, Hardwick JS, Schreiber SL (1999) Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12–rapamycinassociated protein. Proceedings of the National Academy of Sciences 96 (8):4438-4442. doi:10.1073/pnas.96.8.4438

Polge C, Thomas M (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? Trends in Plant Science 12 (1):20-28. doi:10.1016/j.tplants.2006.11.005

Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G (1998) Phosphorylation and Activation of p70s6k by PDK1. Science 279 (5351):707-710. doi:10.1126/science.279.5351.707

Qin C, Wang X (2002) The *Arabidopsis* Phospholipase D Family. Characterization of a Calcium-Independent and Phosphatidylcholine-Selective PLDζ1 with Distinct Regulatory Domains. Plant Physiology 128 (3):1057-1068. doi:10.1104/pp.010928

Ren M, Qiu S, Venglat P, Xiang D, Feng L, Selvaraj G, Datla R (2011) Target of Rapamycin Regulates Development and Ribosomal RNA Expression through Kinase Domain in *Arabidopsis*. Plant Physiology 155 (3):1367-1382. doi:10.1104/pp.110.169045

Reyes de la Cruz H, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E (2004) Functional Characterization of a Maize Ribosomal S6 Protein Kinase (ZmS6K), a Plant Ortholog of Metazoan p70S6K. Biochemistry 43 (2):533-539. doi:10.1021/bi035222z

Robaglia C, Menand B, Lei Y, Sormani R, Nicolai M, Gery C, Teoule E, Deprost D, Meyer C (2004) Plant growth: the translational connection. Biochemical Society transactions 32:581 - 584

Robert HS, Offringa R (2008) Regulation of auxin transport polarity by AGC kinases. Current Opinion in Plant Biology 11 (5):495-502. doi:10.1016/j.pbi.2008.06.004

Rodriguez-Lopez DC, Rodriguez-Romero A, Aguilar R, Sanchez de Jimenez E (2011) Biochemical Characterization of a New Maize (Zea mays L.) Peptide Growth Factor. Protein and Peptide Letters 18 (1):84-91. doi:10.2174/092986611794328636

Rohde J, Heitman J, Cardenas ME (2001) The TOR Kinases Link Nutrient Sensing to Cell Growth. Journal of Biological Chemistry 276 (13):9583-9586. doi:10.1074/jbc.R000034200

Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA (2003) Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. Nature Cell Biology 5 (6):566-571. doi:10.1038/ncb996

Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a Central Controller of Cell Growth. Cell 103 (2):253-262. doi:10.1016/S0092-8674(00)00117-3

Shin J-H, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Jeon J-s, An G (2009) OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. Mollecules and Cells 27 (1):67-74. doi:10.1007/s10059-009-0006-2

Shin Y-j, Kim S, Du H, Choi S, Verma D, Cheon C-I (2012) Possible dual regulatory circuits involving AtS6K1 in the regulation of plant cell cycle and growth. Molecules and Cells 33 (5):487-496. doi:10.1007/s10059-012-2275-4

Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. Current Opinion in Plant Biology 13 (3):273-278. doi:10.1016/j.pbi.2009.12.002

Sormani R, Yao L, Menand B, Ennar N, Lecampion C, Meyer C, Robaglia C (2007) Saccharomyces cerevisiae FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. BMC Plant Biology 7 (1):26

Sotelo R, Garrocho-Villegas V, Aguilar R, Calderón ME, Jiménez E (2010) Coordination of cell growth and cell division in maize (Zea mays L.) relevance of the conserved TOR signal transduction pathway. n Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 46 (6):578-586. doi:10.1007/s11627-010-9293-8

Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, Wittwer F, Belawat P, Daram P, Breuer S, Thomas G, Hafen E (2003) Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. Nature Cell Biology 5 (6):559-566. doi:10.1038/ncb995

Sugimoto-Shirasu K, Roberts K (2003) “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. Current Opinion in Plant Biology 6 (6):544-553. doi:10.1016/j.pbi.2003.09.009

Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Craven CJ (2001) Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. Nature Structural Biology 8 (8):701-704

Thomas G (2002) The S6 kinase Signaling Pathway In The Control of Development and Growth. Biological Research 35:305-313

Toyooka K, Moriyasu Y, Goto Y, Takeuchi M, Fukuda H, Matsuoka K (2006) Protein Aggregates are Transported to Vacuoles by Macroautophagic Mechanism in Nutrient-Starved Plant Cells. Autophagy 2 (2):96-106

Turck F, Kozma SC, Thomas G, Nagy F (1998) A Heat-Sensitive *Arabidopsis thaliana* Kinase Substitutes for Human p70s6k Function In Vivo. Molecular and Cellular Biology 18 (4):2038-2044

Turck F, Zilbermann F, Kozma SC, Thomas G, Nagy F (2004) Phytohormones Participate in an S6 Kinase Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis*. Plant Physiology 134 (4):1527-1535. doi:10.1104/pp.103.035873

Tzeng T-Y, Kong L-R, Chen C-H, Shaw C-C, Yang C-H (2009) Overexpression of the Lily p70s6k Gene in *Arabidopsis* Affects Elongation of Flower Organs and Indicates TOR-Dependent Regulation of AP3, PI and SUP Translation. Plant and Cell Physiology 50 (9):1695-1709. doi:10.1093/pcp/pcp114

Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R (2007) Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Cell 26 (5):663-674. doi:10.1016/j.molcel.2007.04.020

Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E (2003) Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of *Arabidopsis*. Plant Physiology 131 (3):1191-1208. doi:10.1104/pp.013052

Volarevic S, Thomas G (2001) Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. Progress in nucleic acid research and molecular biology 65:101-127

Wang X (2004) Lipid signaling. Current Opinion in Plant Biology 7 (3):329-336. doi:10.1016/j.pbi.2004.03.012

Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. Progress in Lipid Research 45 (3):250-278. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.005

Williams AJ, Werner-Fraczek J, Chang I-F, Bailey-Serres J (2003) Regulated Phosphorylation of 40S Ribosomal Protein S6 in Root Tips of Maize. Plant Physiology 132 (4):2086-2097. doi:10.1104/pp.103.022749

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PloS one 2 (8):e718. doi:10.1371/journal.pone.0000718

Wisniewska J, Xu J, Seifertova D, Brewer PB, Ruzicka K, Blilou I, Rouquie D, Benkova E, Scheres B, Friml J (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. Science 312 (5775):883. doi:10.1126/science.1121356

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR Signaling in Growth and Metabolism. Cell 124 (3):471-484. doi:10.1016/j.cell.2006.01.016

Xiong Y, Sheen J (2012) Rapamycin and Glucose-Target of Rapamycin (TOR) Protein Signaling in Plants. Journal of Biological Chemistry 287 (4):2836-2842. doi:10.1074/jbc.M111.300749

Zhang SH, Broome MA, Lawton MA, Hunter T, Lamb CJ (1994) atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*. II. Functional and biochemical analysis of the encoded protein. Journal of Biological Chemistry 269 (26):17593-17599

Zhu J-K (2002) salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology 53 (1):247-273. doi:10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329

VII DISCUSIÓN GENERAL

7.1 Efectos del estrés osmótico inducido por NaCl sobre el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de raíces laterales.

La modulación de la ASR en respuesta a diversos estímulos juega un papel decisivo en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés, generando la respuesta morfogenética inducida por estrés (SIMR por sus siglas en inglés) caracterizada por el acortamiento de la raíz primaria (inhibición de la elongación de la raíz) y una inducción del desarrollo de raíces laterales (incremento en el número de raíces laterales) (Potters *et al.* 2007). Estudios recientes han proporcionado datos sobre los mecanismos moleculares y celulares por los cuales las plantas responden al estrés osmótico generado por una elevada concentración de sales en el medio de crecimiento. El estrés osmótico inducido por NaCl inhibe el crecimiento de la raíz primaria reduciendo la división y elongación celular (West 2004). Sin embargo, las descripciones de los efectos del estrés osmótico inducido por NaCl sobre el desarrollo de RLs son inconsistentes, debido a que se ha reportado tanto la estimulación como la inhibición de la emergencia y crecimiento de RLs en *Arabidopsis* (West 2004; Wang *et al*. 2004; Zolla *et al*. 2010; Zhao *et al*. 2011). Por lo que no ha podido definirse si la salinidad desencadena una SIMR característica. Los resultados del presente estudio, muestran que a 100 mM NaCl, las plántulas exhiben un crecimiento de la raíz primaria disminuido y una estimulación del desarrollo de RLs, similar a lo reportado por Wang *et al*. (2009). Sin embargo, los diferentes resultados que han sido obtenidos en reportes previos, quizás se deba a las diferencias en las condiciones experimentales y formulaciones de los medios (West *et al*. 2004; Wang *et al*. 2009; Zolla *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2011).

7.2 El transporte polar de auxinas está involucrado en la respuesta morfogenética inducida por estrés

Las plantas activan diferentes mecanismos moleculares y fisiológicos para adaptarse al estrés salino y reprogramar su crecimiento. Por otra parte, se sabe que las auxinas son las principales señales intrínsecas que controlan la formación de los órganos, incluyendo las RLs (Benkova *et al.* 2003; Friml *et al.* 2003). El desarrollo de RLs es

regulado por la formación de gradientes de auxinas y el establecimiento de máximos de auxinas en el ápice de la raíz (Casimiro *et al*. 2001; Osmont *et al*. 2007; Péret *et al.* 2009). Para demostrar la participación de estos fitoreguladores en la SIMR inducida por el estrés osmótico empleamos la línea transgénica *DR5::uidA*. El estrés osmótico inducido por NaCl estimuló la acumulación de auxinas activas, observada como un incremento en la actividad de GUS en los tejidos vasculares y en las puntas de las raíces primarias y laterales. Estos resultados son consistentes con los reportados por Wang *et al*. (2009), donde mostraron que el tratamiento con NaCl afectó considerablemente la distribución y el contenido de auxinas. Las alteraciones en la homeóstasis de auxinas observadas durante el estrés osmótico inducido por NaCl pueden ser explicadas principalmente por tres procesos: un incremento en la sensibilidad a las auxinas, un aumento en la producción de éstas o mediante la modulación del TPA. El incremento en la densidad de RLs observada en condiciones de estrés fue casi completamente inhibido por el inhibidor del transporte polar de auxinas, el ácido naftilptalámico (ANP), a pesar de que 1 µM ANP fue capaz de inhibir por completo el TPA. Lo anterior sugiere que la modulación del TPA podría ser el mecanismo mediante el cual se altera la homeóstasis de las auxinas en respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl. Adicionalmente, el ANP tiende a disminuir el número de primordios de RLs (PRLs), los cuales se incrementan durante el estrés osmótico sugiriendo que la inducción del desarrollo *de novo* de PRLs inducido por el estrés osmótico es mediado por un incremento en el TPA. La propuesta de que la SIMR inducida por el estrés osmótico, fue originada por la modulación del TPA el cual desencadenó el desarrollo de PRLs. Esta suposición es consistente con el trabajo de Zolla *et al*. (2010), quienes observaron que la proliferación de RLs es mediada por el estrés salino, promoviendo la acumulación de auxinas en los PRLs en desarrollo.

7.3 La actividad de PP2A y la respuesta morfogenética inducida por NaCl

En el presente trabajo se demostró que el TPA es clave en la SIMR. En el transporte polar de auxinas, el acarreador de eflujo de auxinas PIN2, es distribuído asimétricamente dentro de las células (Ottenschlager *et al*. 2003), dicha redistribución es dependiente de los niveles así como de la localización de las proteínas PIN2 (Paciorek et al. 2005; Wisniewska et al. 2006). La localización de las proteínas PIN es regulado por su estado de fosforilación, dicho proceso es realizado por la Ser/Thr cinasa PINOID, la cual fosforila a las proteínas PIN guiándolas a la parte apical de las células (Christensen et al. 2000; Benjamins et al. 2001), mientras que la defosforilación es realizada por las fosfatasas PP2A generando las formas hipofosforiladas de las proteínas PIN induciéndo su localización basal (Michniewicz *et al*. 2007). La modulación de la ASR durante el estrés osmótico inducido por NaCl fue dependiente de la redistribución de auxinas; por esta razón, se determinó la actividad de la PP2A en raíces de plántulas estresadas, encontrándose una disminución hasta del 60%. Mutantes de *Arabidospis rcn1*, que codifican para la subunidad A1 de la PP2A, mostraron una sensibilidad incrementada al estrés osmótico (Blakeslee *et al*. 2008), sugiriendo que la actividad de la proteína PP2A es requerida para la tolerancia al estrés. Adicionalmente, las mutantes *rcn1* presentan un incremento en el transporte basipetal de auxinas en hipocotilos y raíces (Rashotte *et al*. 2001), el cual correlaciona con el bajo nivel de actividad de la PP2A de la mutante (50% aproximadamente) (Deureré *et al*. 1999). Juntos estos datos, soportan la hipótesis de que la actividad de PP2A es regulada negativamente durante el estrés osmótico y que dicha regulación incrementa el TPA induciendo así el desarrollo de raíces laterales. Para establecer una conección entre la actividad de la PP2A y la modulación de la ARS inducida por el estrés osmótico, analizamos el efecto del inhibidor de la PP2A, el ácido okadaíco (AO) a 1 nM, dosis a la cual se inhiben específicamente las proteínas fosfatasas 2A (Rojo *et al*. 1998). A esta concentración, el AO no induce cambios en la ASR, lo cual puede ser explicado por el hecho de que dicha concentración fue determinada para inhibir el 50% en extractos celulares (Rojo *et al*.1998), así por lo tanto, se requieren dosis más elevadas para producir efectos similares a los del estrés osmótico (Deurere *et al*. 1999). Adicionalmente, observamos un efecto aditivo del AO sobre el acortamiento de la raíz

primaria y un incremento en la densidad de RLs en plántulas crecidas en el medio con el estrés adicionado con el AO. El TPA también incrementó en las RLs y RP en plántulas tratadas con el estrés más el AO. Estos datos apoyan la hipótesis del papel de la actividad de la PP2A durante el estrés salino, indicando que una comunicación cruzada entre las auxinas y la señalización desencadenada por el estrés osmótico, que modula el proceso del desarrollo de las RLs mediante la acumulación y distribución espacio temporal de auxinas.

7.4 Papel de las proteínas S6Ks de *Arabidopsis* en la respuesta morfogenética inducida por estrés

En el presente estudio observamos que existe una modulación del desarrollo de la ASR, por efecto del estrés osmótico inducido por NaCl. Debido a que la vía de señalización TOR-S6K regula la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y las respuestas a estrés en mamíferos (Laplante y Sabatini 2012) y en plantas (Mahfouz 2006; Deprost *et al.* 2007), analizamos la regulación de la expresión de los genes *S6K1* y *S6K2* en raíces de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de estrés. El estrés osmótico inducido por NaCl estimuló 2 y 6 veces la expresión de los transcritos de *S6K1* y *S6K2,* respectivamente; estos datos sugirieren que ambas proteínas podrían estar involucradas en las respuestas de adaptación al estrés, y específicamente S6K2 podría ser un elemento clave en dicho proceso debido a que los niveles de transcritos *S6K2* aumentaron tres veces más con respecto a los de *S6K1*. Estos resultados son consistentes con los observados por Mizoguchi *et al*, (1994) donde observaron que los niveles de expresión de ambos transcritos incrementan marcadamente en respuesta a estrés salino o estrés por frío en plantas de *Arabidopsis*. Adicionalmente, se ha descrito que se estimula la expresión de S6K2 en los cultivos en suspensión de *Arabidopsis* cuando alcanzan la fase estacionaria (Turck 2004), reforzando la hipótesis de que S6K2 podría desempeñar un papel clave en la mediación de las respuestas a estrés. Sin embargo, Mahfouz *et al*. (2006) reportaron que la actividad de S6K1 en hojas transgénicas de tabaco es sensible a estrés osmótico (disminuyendo su actividad cuando son tratadas con manitol). Por lo que para determinar cuál es la participación de las proteínas S6Ks de *Arabidopsis* en la modulación de la ASR en respuesta al

estrés osmótico inducido por NaCl, se analizó el efecto del estrés osmótico en líneas knockout *s6k1* y *s6k2*. Estas mutantes se sometieron a curvas dosis respuesta al NaCl, en donde se observó el comportamiento antes descrito en la línea silvestre, (el acortamiento de la RP y el incremento en el desarrollo de RLs), mientras que ambas líneas mutantes mostraron tolerancia a la inhibición del crecimiento de la RP hasta 100 mM NaCl. Adicionalmente, *s6k1* y *s6k2* en condiciones control desarrollaron menos RLs, indicando que la función de las dos cinasas es necesaria para el desarrollo normal de la ASR. En los medios con diferentes concentraciones de NaCl, el número de RLs en las mutantes se mantuvo por debajo con respecto a la *WT*, y a 100 mM NaCl solamente se observó el 50% con respecto a la *WT*. Por otra parte, la mutante *s6k1* mostró una tendencia a aproximarse al fenotipo desarrollado por la WT en respuesta al estrés (125 mM NaCl), no siendo así para la *s6k2,* la cual mostró el efecto máximo a 100 mM NaCl. Interesantemente, la línea *WT* mostró un incremento en la DRL que no fue observado en el crecimiento individual, situación que pudo haber sido generada por el crecimiento lado a lado con las líneas mutantes y que pudiera haber sido estimulado el desarrollo de RLs por efecto de la densidad poblacional en el medio. Aunque mediante el análisis por tratamiento se determinó que ambas mutantes muestran tolerancia a los efectos desencadenados por el estrés, se puede apreciar un comportamiento similar en la silvestre, *s6k1* y *s6k2*, por lo que se realizó un análisis de varianza (Anova) de componente principal (por línea) tomando como variable la DRLs para determinar el efecto global de todos los tratamientos sobre el desarrollo de las RLs. Se encontró que ambas mutantes son tolerantes al efecto de inducción de la DRLs antes descrito. En conjunto, estos datos sugieren que las proteínas S6Ks podrían estar participando en la mediación de la respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl.

7.5 Papel del transporte polar de auxinas, el ácido fosfatídico y las proteínas S6Ks en la respuesta morfogenética inducida por estrés

Las plantas activan diferentes mecanismos moleculares y fisiológicos para adaptarse al estrés osmótico. Anteriormente fue descrito que la SIMR inducida por NaCl fue dependiente de la redistribución de las auxinas mediante la modulación del TPA y que el ANP inhibía los efectos inducidos por el estrés. Los inhibidores del TPA como el ANP afectan el flujo de auxinas mediante la inhibición del tráfico vesicular (Bailly *et al.* 2008). Sobre este último proceso, se ha demostrado que el PA producido por la PLDζ2 regula el tráfico vesicular el cual es requerido para la respuesta a auxinas (Li y Xue. 2007; Xue *et al.* 2007). Adicionalmente, la adición del PA al medio estimula el reciclamiento vesicular y el TPA en la zona de transición de la raíz (Mancuso *et al.* 2007). Por tal motivo, decidimos probar si existía un enlace entre la estimulación del TPA mediado por el estrés osmótico con el fenotipo de tolerancia de las mutantes knockout en *s6k1* y *s6k2* descrito con anterioridad en función de la producción de PA, por lo que se determinó la producción de PA en las raíces de plántulas crecidas 8 ddt en medios con 100 mM NaCl. Interesantemente, encontramos que ambas mutantes en condiciones control producen hasta 2 veces más PA con respecto a la línea *WT*, sin embargo en condiciones de estrés osmótico inducido por NaCl, la línea *WT* incrementó los niveles de producción de PA en respuesta al estrés. Este dato es consistente con lo reportado por Yu *et al*. en el 2010 (Yu *et al*. 2010), donde se observó un incremento en los niveles de producción de PA en respuesta al NaCl en hojas de plantas de *Arabidopsis*. Sin embargo, en las líneas mutantes se observó un comportamiento diferencial: en la mutante *s6k1* no se observaron cambios en la producción de PA en respuesta al estrés, mientras que en la mutante *s6k2* se disminuyó la producción de PA hasta en un 50% con respecto a la condición control. Estos datos sugieren que la S6K2 desempeña un papel preponderante en las respuestas al estrés osmótico inducido por NaCl. Adicionalmente ambas cinasas podrían modular la producción de PA diferencialmente, ya que en condiciones control la ausencia de cualquiera de ellas estimula la producción de PA, mientras que en condiciones de estrés mostraron un comportamiento diferencial. Estos datos sugieren que podría existir comunicación cruzada entre la

mediación de las respuestas al estrés osmótico, mediado por el incremento en el TPA, y la vía TOR-S6K a través de la producción de PA.

En síntesis, el aumento de los transcritos en *S6K1* y *S6K2*, los fenotipos de tolerancia al acortamiento de la raíz primaria y del incremento de la DRL de ambas mutantes, especialmente la *s6k2*, así como los datos de producción del PA sugieren que las proteínas S6K de Arabidopsis actúan como reguladores positivos de la respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl. Adicionalmente, debido a los eventos fisiológicos que anteriormente fueron descritos, se sugiere que existe una comunicación cruzada en la regulación de las respuestas al estrés osmótico entre la producción del PA, el TPA, la modulación de la actividad de la PP2A así como de la actividad de las S6Ks, dado que la señalización de TOR-S6K es activada por auxinas, estas a su vez inducen el desarrollo de la ASR mediante la regulación negativa de las proteínas PP2A cuya regulación podría ser dependiente de la señalización de auxinas y que a su vez las S6Ks podrían estar modulando la producción de PA, autoregulando mediante un mecanismo de retroalimentación a la vía de señalización TOR-S6K y por ende la actividad de la PP2A.

VIII CONCLUSIONES

Las plantas como organismos sésiles emplean diferentes mecanismos de manera coordinada para confrontar el estrés osmótico y asegurar la supervivencia. Es importante determinar el orden en el que estos eventos ocurren, para poder describir así, los cambios en la fisiología vegetal originados a través de la modulación de los eventos de señalización en respuesta a la percepción de las condiciones ambientales. El objetivo del presente estudio fue tratar de establecer las posibles vías de señalización involucradas en la mediación de las respuestas al estrés osmótico inducido por NaCl. Se encontró que el estrés genera una respuesta morfogenética característica (una disminución del crecimiento de la raíz primaria y una estimulación en el desarrollo de raíces laterales) mediada a través de la regulación del transporte polar de auxinas (TPA). Se observó que durante el estrés osmótico la actividad de fosfatasa de PP2A disminuyó en un 50%, se observó un incremento en los transcritos de *S6K1* y *S6K2* en respuesta a dicho estrés y que la mutación en dichos genes originó un fenotipo de tolerancia al estrés osmótico inducido por NaCl. Adicionalmente, la producción de ácido fosfatídico (PA) incrementa en condiciones de estrés y que en las mutantes en *s6k1* y *s6k2* la regulación de la producción de PA fue alterada diferencialmente. Los datos encontrados sugieren la existencia de un probable mecanismo de retroalimentación mediado a través de la producción del PA. El PA podría desarrollar un papel central en los eventos de señalización que conducen a la modulación de la expresión y/o actividad de las proteínas S6K y PP2A en función de la regulación del TPA. Esta hipótesis surge debido a que nuestros resultados sugieren que la PP2A actúa como un regulador positivo sobre la arquitectura del sistema radicular en la respuesta al estrés osmótico inducido por NaCl sobre la arquitectura del sistema radicular, mediante un mecanismo que involucra la redistribución de auxinas. Dicha redistribución es posiblemente mediada a través del PA producido durante el estrés, el cual podría actuar como un efector positivo en la regulación de la expresión y/o actividad de las proteínas S6K, preponderantemente de la S6K2. Debido a que la expresión de los genes *S6Ks* es inducida por el estrés por NaCl y durante este estrés se incrementa el TPA el cual podría aumentar la actividad de S6K. Por lo tanto las

proteínas S6Ks podrían estar regulando de manera positiva las respuestas al estrés osmótico a través de la regulación diferencial de la producción del PA.

IX PERSPECTIVAS

En el presente trabajo nos permitió plantear una nueva hipótesis acerca del mecanismo de señalización en la mediación de las respuestas al estrés osmótico. Por tanto, es importante tratar de obtener la evidencia que sostenga dicha hipótesis por lo que se plantean las siguientes preguntas.

9.1 Movilización del marcador *DR5::uidA* a las líneas mutantes en *s6k1* y *s6k2*.

Debido a que en el presente trabajo se determinó que la mediación de las modificaciones de la arquitectura del sistema radicular están en función de la redistribución de auxinas es importante determinar el estado del TPA en dichas mutantes.

9.2 Modulación de la actividad de PP2A a través de la producción del PA.

En el presente trabajo se determinó que durante el estrés osmótico inducido por el NaCl existe una disminución marcada en la actividad de PP2A y que se incrementa la producción del PA, por lo que es importante establecer si el PA podría actuar como un regulador de actividad de la PP2A como en las PP2C.

9.3 Papel de los Inositol polifosfatos (IPn) en la regulación de la expresión génica.

En el presente trabajo se determinó que durante el estrés osmótico inducido por NaCl hay un incremento en los niveles de expresión de *S6K1* y *S6K2*. Adicionalmente se ha determinado que la S6K2 es de localización principalmente nuclear, y ya que durante el estrés osmótico se puede generar una disminución de la disponibilidad de fosfato, y bajo estas condiciones la regulación de la expresión de ciertos genes esta en función del sistema de regulación transcripcional *PHO*, por lo que sería interesante determinar si existe una correlación entre la activación de dicho sistema y la regulación de la expresión de la S6K2.

X REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

Bouchard, R., A. Bailly, J. J. Blakeslee, S. C. Oehring, V. Vincenzetti, O. R. Lee, I. Paponov, K. Palme, S. Mancuso, A. S. Murphy, B. Schulz y M. Geisler. 2006. **Immunophilin-like TWISTED DWARF1 modulates auxin efflux activities of Arabidopsis P-glycoproteins**. *Journal of Biological Chemistry* 281(41): 30603-30612.

Dhonukshe, P., F. Huang, C. S. Galvan-Ampudia, A. P. Mahonen, J. Kleine-Vehn, J. Xu, A. Quint, K. Prasad, J. Friml, B. Scheres y R. Offringa. 2010. **Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling**. *Development* 137(19): 3245-3255.

Diaz-Troya, S., F. J. Florencio y J. L. Crespo. 2007. **Target of Rapamycin and LST8 Proteins Associate with Membranes from the Endoplasmic Reticulum in the Unicellular Green Alga Chlamydomonas reinhardtii**. *Eukaryotic Cell* 7(2): 212-222.

Friml, J. 2010. **Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport**. *European Journal of Cell Biology* 89(2-3): 231-235.

Geisler, M. y A. S. Murphy. 2006. **The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development**. *FEBS Letters* 580(4): 1094-1102.

Gout, I., T. Minami, K. Hara, Y. Tsujishita, V. Filonenko, M. D. Waterfield y K. Yonezawa. 1998. **Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70 S6 kinase beta containing a proline-rich region**. *Journal of Biological Chemistry* 273(46): 30061-30064.

Huang, F., M. K. Zago, L. Abas, A. van Marion, C. S. Galvan-Ampudia y R. Offringa. 2010. **Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport**. *Plant Cell* 22(4): 1129-1142.

Lee-Fruman, K. K., C. J. Kuo, J. Lippincott, N. Terada y J. Blenis. 1999. **Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1**. *Oncogene* 18(36): 5108-5114.

Ljung, K., R. P. Bhalerao y G. Sandberg. 2001. **Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth**. *Plant Journal* 28(4): 465-474.

Ljung, K., A. K. Hull, J. Celenza, M. Yamada, M. Estelle, J. Normanly y G. Sandberg. 2005. **Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots**. *Plant Cell* 17(4): 1090-1104.

Ma, X. M. y J. Blenis. 2009. **Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(5): 307-318.

Peer, W. A., J. J. Blakeslee, H. Yang y A. S. Murphy. 2011. **Seven things we think we know about auxin transport**. *Molecular Plant* 4(3): 487-504.

Pende, M., S. H. Um, V. Mieulet, M. Sticker, V. L. Goss, J. Mestan, M. Mueller, S. Fumagalli, S. C. Kozma y G. Thomas. 2004. **S6K1$^{-/-}$/S6K2$^{-/-}$ Mice Exhibit Perinatal Lethality and Rapamycin-Sensitive 5'-Terminal Oligopyrimidine mRNA Translation and Reveal a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent S6 Kinase Pathway**. *Molecular and Cellular Biology* 24(8): 3112-3124.

Petrasek, J. y J. Friml. 2009. **Auxin transport routes in plant development**. *Development* 136(16): 2675-2688.

Petrasek, J., J. Mravec, R. Bouchard, J. J. Blakeslee, M. Abas, D. Seifertova, J. Wisniewska, Z. Tadele, M. Kubes, M. Covanova, P. Dhonukshe, P. Skupa, E. Benkova, L. Perry, P. Krecek, O. R. Lee, G. R. Fink, M. Geisler, A. S. Murphy, C. Luschnig, E. Zazimalova y J. Friml. 2006. **PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux**. *Science* 312(5775): 914-918.

Reinhardt, D., E. R. Pesce, P. Stieger, T. Mandel, K. Baltensperger, M. Bennett, J. Traas, J. Friml y C. Kuhlemeier. 2003. **Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport**. *Nature* 426(6964): 255-260.

Shima, H., M. Pende, Y. Chen, S. Fumagalli, G. Thomas y S. C. Kozma. 1998. **Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase**. *EMBO Journal* 17(22): 6649-6659.

Steinmann, T., N. Geldner, M. Grebe, S. Mangold, C. L. Jackson, S. Paris, L. Galweiler, K. Palme y G. Jurgens. 1999. **Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF**. *Science* 286(5438): 316-318.

Zhang, J., T. Nodzynski, A. Pencik, J. Rolcik y J. Friml. 2010. **PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport**. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107(2): 918-922.