



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“EFECTO DE CICLODIPÉPTIDOS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA S6K
DE MAÍZ (ZmS6K)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Q.F.B. IVÁN CORONA SÁNCHEZ

ASESOR: **D.C. HOMERO REYES DE LA CRUZ**

CO-ASESOR: **D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA**

MORELIA, MICH. FEBRERO 2018

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, bajo la asesoría del D.C. Homero Reyes de la Cruz y co-asesoría del D.C. Jesús Campos García. El sustentante fue beneficiario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca no. 584655

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Homero Reyes de la Cruz, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, así como por la paciencia, la confianza y todo el apoyo que me proporcionó a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Al doctor Jesús Campos García, por sus observaciones y consejos que me ayudaron a salir adelante en este proyecto.

A la doctora Elda Beltrán, así como a los doctores Ernesto García y Daniel Godínez, por formar parte de mi comité evaluador, así como por sus valiosas aportaciones y consejos que me ayudaron a continuar por el camino correcto en este proyecto.

A mis compañeros de trabajo, por su apoyo y compañía, que hicieron más amena la estancia en el laboratorio: César, Omar, Chava, Rosario y Alejandra

A mis compañeros de generación, por todos los gratos momentos que compartimos, por sus consejos y apoyo a lo largo de estos dos años: Alejandra, Elizabeth, Lupita, Alberto, Ricardo y Pedro

A todos los compañeros del instituto de Investigaciones Químico Biológicas con los cuales he tenido la fortuna de encontrarme y compartir alegres momentos.

A mi mamá, Ma Mercedes Sánchez Cruz, por su apoyo total e incondicional, por sus enseñanzas, sus consejos, los bellos momentos que hemos compartido, por su ejemplo y por alentarme a seguir en este camino, aun en los momentos más difíciles.

A mi hermana Belem, mi cuñado Omar y mi sobrina Fernanda, por todo su apoyo, sus consejos, sus palabras de aliento y por todos esos momentos tan agradables que hemos compartido durante estos últimos años.

A mi novia, Belem Vargas Ochoa, por acompañarme en todo momento durante estos dos años, por todo el apoyo, los bellos momentos, los consejos y las palabras de aliento que tanto me han ayudado a salir adelante.

A todos mis amigos, por las palabras de aliento, sus buenos deseos, por los momentos de relajación y mostrarme en todo momento su apoyo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1. Vía de señalización de TOR	6
2.1.1. Perspectiva histórica.....	6
2.1.2. Estructura de la cinasa TOR.....	7
2.1.3. Asociación de TOR dentro de complejos multiproteicos	8
2.1.4. Señalización de TOR en mamíferos (mTOR)	10
2.1.4.1. Señalización de mTOR activada por insulina/IGF.....	10
2.1.4.2. Regulación de la señalización de mTOR en respuesta a los niveles energéticos celulares.....	13
2.1.4.3. Regulación de la señalización de mTOR en respuesta a nutrientes....	13
2.1.4.4. Regulación de la señalización de mTOR en respuesta a estrés	14
2.1.5. Estructura, regulación y función de la cinasa S6K.....	14
2.1.5.1. Estructura de los dominios de S6K	14
2.1.5.2. Regulación de la activación de S6K	17
2.1.5.3. Procesos regulados por la cinasa S6K.....	17
2.1.6. Señalización de TOR en plantas	19
2.1.6.1. Conservación de la estructura y funcionalidad de TOR en plantas.....	19
2.1.6.2. Sensibilidad de las plantas al inhibidor rapamicina.....	21
2.1.6.3. Conservación del complejo TORC1 en plantas.....	22
2.1.6.4. Señalización río arriba de TOR en plantas.....	25
2.1.6.5. Estructura, regulación y funciones de S6K en plantas	29
2.2. La función de las fitohormonas sobre el crecimiento y desarrollo vegetal	30
2.2.1. Participación de las auxinas sobre el crecimiento y desarrollo vegetal....	32
2.2.2. Transporte y señalización de las auxinas	32
2.2.3. Biosíntesis de las auxinas en las bacterias	36
2.3. Sistema de percepción de quórum.....	36
2.3.1. Sistema de percepción de quórum en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
2.3.2. Respuestas a señales de AHL en eucariontes	40

2.3.3. Actividades biológicas sobre eucariontes de las moléculas de QS distintas a las AHL.....	41
2.4. Características de los ciclodipéptidos	42
2.4.1. Biosíntesis de los ciclodipéptidos	42
2.4.2. Efecto de los ciclodipéptidos sobre plantas.....	44
2.5. El Maíz	44
2.5.1. Origen y domesticación del maíz.....	44
2.5.2. Descripción botánica del maíz	45
2.5.3. El sistema radicular del maíz	46
2.5.3.1. Desarrollo del sistema radicular del maíz.....	46
2.5.3.2. La arquitectura de la raíz del maíz.....	47
3. JUSTIFICACIÓN.....	49
4. HIPÓTESIS	49
5. OBJETIVO GENERAL.....	49
6. OBJETIVOS PARTICULARES	50
7. MATERIALES Y MÉTODOS	50
7.1. Material biológico	50
7.2. Preparación de las semillas.....	50
7.3. Extracción de plántulas de maíz y desinfección.....	51
7.4. Condiciones de crecimiento.....	51
7.5. Análisis de crecimiento vegetal.....	52
7.6 Determinación de la fosforilación de la proteína ZmS6K	53
8. RESULTADOS.....	55
8.1 Efecto de los ciclodipéptidos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre el crecimiento de plantas de maíz	55
8. 2 Efecto de los ciclodipéptidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre la fosforilación de la cinasa S6K de maíz	65
9. DISCUSIÓN	69
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIÓN	73
BIBLIOGRAFÍA	74

RESUMEN

La proteína cinasa TOR (Target of Rapamycin) actúa como regulador maestro del crecimiento celular, la cual, al percibir un estatus óptimo de energía/nutrientes del medio ambiente, estimula los procesos anabólicos y suprime los catabólicos. Aunque la mayor parte de los estudios sobre la vía de señalización donde participa TOR se han realizado en mamíferos, en plantas se han reportado algunos componentes que se han conservado, particularmente el complejo TORC1 y la cinasa S6K. Diversos estudios muestran que la vía de señalización de TOR, en plantas, se encuentra involucrada en la regulación de la síntesis proteica y el crecimiento celular. El desarrollo de plantas está sujeto a una regulación química mediada por fitohormonas. Las auxinas son un grupo de fitohormonas ampliamente estudiadas, encargadas de regular diversos procesos del desarrollo vegetal y se ha propuesto que ellas se posicionan río arriba de TOR. Además de ser producidas por plantas, las auxinas pueden ser sintetizadas por diversos géneros bacterianos. *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gram-negativa con capacidad de sintetizar tres ciclodipéptidos [ciclo (L-Pro-L-Val), ciclo (L-Pro-L-Tyr) y ciclo (L-Pro-L-Phe)], los cuales han mostrado activar la respuesta auxínica en líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana DR5:uidA* e incrementar significativamente la formación de raíces laterales. Debido a los efectos promotores del crecimiento vegetal mostrados por los ciclodipéptidos y a la participación fundamental de TOR como regulador del crecimiento celular, en este trabajo se evaluó el efecto de los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de maíz (*Zea mays* L.), así como su efecto sobre la activación de la vía de señalización de TOR-S6K. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 promueven el crecimiento y desarrollo de plantas de maíz a través de la activación de la vía de señalización de TOR-S6K.

Palabras clave: TOR, Ciclodipéptidos, auxinas, maíz, crecimiento

ABSTRACT

TOR (Target of Rapamycin) protein kinase acts as a master regulator of cell growth which upon perceiving an optimal energy/nutrient status of environment stimulates anabolic processes and suppresses catabolites. Although most studies on TOR signaling pathway has been carried out in mammals some components preserved in plants have been reported, particularly a TORC1 complex and S6K protein kinase. Several studies show that plant TOR signaling pathway is involved in regulation of protein synthesis and cell growth. Plant development is subject to a chemical regulation mediated phytohormones. Auxins are a widely studied phytohormones group responsible for regulating various processes of plant development and it has been proposed that they are positioned upstream of TOR. In addition to being produced by plants, auxins can be synthesized by several types of bacteria. *Pseudomonas aeruginosa* is gram-negative bacteria, opportunistic pathogen in humans, with ability to synthesize three cyclic dipeptides [cycle (L-Pro-L-Val), cycle (L-Pro-L-Tyr) and cycle (L-Pro-L-Phe)] which have shown activate auxin response in *Arabidopsis thaliana DR5:uidA* transgenic lines and significantly increase formation of lateral roots. Due to promoter effects of plant growth shown by cyclodipeptides and the fundamental participation of TOR as a regulator of cell growth, in this work we evaluated the effect of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 cyclic dipeptides on maize plants growth and development (*Zea mays* L. var. Chalqueño) as well as its effect on TOR-S6K signaling pathway activation. Results obtained in this work show that *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 cyclic dipeptides promotes growth and development of maize plants through TOR-S6K signaling pathway activation.

1. INTRODUCCIÓN

La coordinación del crecimiento celular ocurre cuando estímulos ambientales favorables, como la disponibilidad de nutrientes, energía y la presencia de factores de crecimiento, promueven la síntesis de macromoléculas que resulta en un incremento de tamaño y masa. Por el contrario, cuando las células son expuestas a distintos tipos de estrés, como un déficit de nutrientes/energía o hipoxia, estas restringen la síntesis de macromoléculas (Wullschlegler *et al.*, 2006). En eucariontes, un elemento clave para la regulación del crecimiento celular es la cinasa TOR (Target Of Rapamycin), que es una proteína evolutivamente conservada, la cual fosforila residuos de serina/treonina de sus proteínas blanco y funciona en la integración de señales ambientales, regulando el crecimiento y el metabolismo. La mayoría de los genomas eucariontes analizados presentan un solo gen para TOR, por lo cual las mutaciones en este gen son letales, causando un arresto en etapas de desarrollo tempranas (Menand *et al.*, 2002; Deprost *et al.*, 2005; Gangloff *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2016). TOR forma parte de dos complejos multiproteicos: TORC1 (TOR Complex 1) y TORC2 (TOR Complex 2), los cuales difieren en función, composición de subunidades y susceptibilidad al inhibidor de TOR, la rapamicina (macrólido antifúngico con potentes propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas) (Vézina *et al.*, 1975; Martel *et al.*, 1977; Eng *et al.*, 1984). De estos dos complejos, TORC2 ha sido considerablemente menos estudiado. Se sabe que TORC2 no es susceptible a la inhibición por rapamicina y su función se ha implicado principalmente en la polarización del esqueleto de actina y la endocitosis (Niles y Powers, 2104; Kamada *et al.*, 2015; Rispal *et al.*, 2015). El complejo TORC1, en cambio, ha sido extensamente investigado durante las dos últimas décadas, debido a que participa en el control de procesos celulares fundamentales como la síntesis de proteínas y la proliferación celular. La desregulación de TORC1 provoca enfermedades graves como el cáncer y desordenes metabólicos (Saxton y Sabatini, 2017). TORC1 es susceptible al inhibidor rapamicina y es el encargado de operar una red de transducción de señales que regula positivamente los procesos anabólicos y suprime los catabólicos. TORC1 regula el crecimiento celular mediante

la integración de cuatro señales principales: Insulina/factores de crecimiento parecidos a insulina (IGF), nutrientes, niveles energéticos y estrés. Los primeros sustratos de TORC1 identificados en metazoarios, que representan sus blancos mejor caracterizados, fueron la proteína 4EBP [la cual se une al factor de iniciación de la traducción eucarionte 4E (eIF4E)] y la cinasa S6K (que fosforila a la proteína S6 de la subunidad pequeña del ribosoma) (Meyuhas y Drazzen, 2009; Fenton y Gout, 2011). La fosforilación de 4EBP mediada por TOR induce su disociación de eIF4E, permitiendo así el inicio de la traducción cap-dependiente. Por otra parte, la fosforilación de S6K mediada por TOR conduce a la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (el primer sustrato identificado de S6K), la cual es esencial para la eficiencia de la síntesis global de proteínas y el control del tamaño celular (Meyuhas, 2015). Sin embargo, se han descubierto otros sustratos de S6K que regulan la traducción, entre los que se encuentran: el factor de iniciación de la traducción eucariótica 4B (eIF4B), la proteína PDCD4 (programmed cell death 4), la proteína SKAR (S6K1 Aly/REF-like substrate), la cinasa eEF2K (Eukaryotic elongation factor-2 kinase), la proteína CCT β (CCT β [chaperonin containing TCP-1 (t-complex protein 1) β]), la proteína CBP80 (Nuclear cap-binding protein subunit 1) y la proteína ribosomal S6 (rpS6) (Magnuson *et al.*, 2012). A la fecha diversas investigaciones muestran la participación de la vía de señalización de TOR-S6K sobre el control de procesos celulares fundamentales que incluyen la traducción, la transcripción, la síntesis de lípidos, el crecimiento/tamaño celular y el metabolismo celular (Magnuson *et al.*, 2012). Respecto a la cantidad de estudios realizados en animales o levaduras, son relativamente escasas las investigaciones sobre la señalización de TOR en plantas, sin embargo, en estas se han identificado componentes conservados de la vía de señalización, con funciones similares a la vía de los mamíferos, como el complejo TORC1 y el sustrato de TOR, la proteína cinasa S6K (Dobrenel *et al.*, 2016). Al igual que en otros organismos, la influencia de TOR sobre el crecimiento de plantas está acompañada por cambios complejos en el metabolismo, como la síntesis de metabolitos intermediarios para el crecimiento, contra los metabolitos de almacenamiento que permiten el crecimiento a largo plazo, así como estrategias reproductivas (Rexin *et al.*, 2015). Por otra parte, las hormonas

vegetales conocidas como las auxinas se han identificado en plantas como reguladores que se localizan río arriba de la señalización de TOR. En *Arabidopsis thaliana* se ha mostrado que las auxinas activan la vía de señalización de TOR-S6K (Schepetilnikov *et al.*, 2013). Las auxinas son moléculas pequeñas encargadas de regular una gran cantidad de procesos del desarrollo vegetal, tales como la división y la elongación celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas trópicas a la gravedad y la luz (Teale *et al.*, 2006). Los mecanismos exactos respecto a la activación de la señalización de TOR-S6K por auxinas son desconocidos, no obstante, un esquema hipotético surgido recientemente sugiere la participación de la GTPasa ROP2, como efector río arriba de la cinasa TOR, donde ROP2 coordina la función de TOR en respuesta a las auxinas (Schepetilnikov *et al.*, 2017). Las auxinas, además de ser sintetizadas por las plantas, también son producidas por diversas bacterias, e incluso se considera que alrededor del 80% de bacterias aisladas de la rizosfera son capaces de sintetizar al ácido indol-3-acético (AIA), la principal auxina natural (Patten y Glick 1996; Khalid *et al.* 2004). En cultivos de *Azospirillum* y *Pseudomonas*, entre otros, ha sido reportada la presencia de las auxinas (Spaepen *et al.*, 2007). Ortiz-Castro *et al.*, 2011, observaron al co-inocular plantas de *Arabidopsis thaliana* con cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mutadas en *lasI* y *lasI/rhlI* (sistemas de percepción de quorum) un incremento en la formación de raíces laterales y en el crecimiento del follaje. Los compuestos responsables de esta actividad promotora del crecimiento vegetal fueron posteriormente identificados como tres ciclodipéptidos: ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe), los cuales además mostraron en líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* DR5:uidA un incremento en los niveles de auxinas, por lo que sería interesante demostrar si la actividad auxínica mostrada por los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* es capaz de activar la señalización de TOR-S6K. Los ciclodipéptidos son péptidos no ribosomales sintetizados por diversos organismos que constituyen una novedosa familia de compuestos heterocíclicos con diversas e importantes actividades biológicas (Belin *et al.*, 2012). Particularmente en plantas, los ciclodipéptidos han mostrado que afectan su desarrollo ejerciendo diversas respuestas que incluyen: la promoción del crecimiento (Cronan *et al.*, 1988;

Degrassi *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 2005), la promoción de la germinación y la inducción de resistencia a estrés hídrico (Ienaga *et al.*, 1990) la inducción de la expresión de genes de resistencia a patógenos (Park *et al.*, 2013) y la promoción de la formación de raíces laterales (Ortiz Castro *et al.*, 2011). En el presente estudio se evaluó el efecto de los ciclodipeptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de maíz (*Zea mays* L.), y se analizó si dichos ciclodipeptidos también activan de la vía de señalización TOR al incrementar la fosforilación de su proteína blanco, la cinasa S6K. El maíz es un cultivo de gran importancia económica, alimenticia y cultural en nuestro país, en el cual se ha documentado la presencia de una vía de señalización de TOR-S6K funcionalmente conservada, con componentes de la vía de mamíferos conservados como, por ejemplo, una proteína cinasa TOR (ZmTOR), una cinasa S6K (ZmS6K) y un factor de crecimiento similar a la insulina (ZmIGF) (García Flores *et al.*, 2001; Reyes de la Cruz *et al.*, 2004; Agredano-Moreno *et al.*, 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1. Vía de señalización de TOR

2.1.1. Perspectiva histórica

En 1964, una expedición canadiense a la isla Rapa Nui (también conocida como Isla de Pascua) recolectó un grupo de muestras de suelo con el objetivo de identificar nuevos agentes antimicrobianos. A partir de estas muestras fue aislada una cepa de *Streptomyces hygroscopicus*, la cual produce un metabolito con potente actividad antifúngica. Este metabolito fue purificado e identificado como un macrólido al que se nombró rapamicina. Posteriormente, se encontró que la rapamicina posee propiedades inmunosupresoras y es capaz de inhibir la proliferación en células de mamíferos (Vézina *et al.*, 1975; Martel *et al.*, 1977; Eng

et al., 1984). El blanco de la rapamicina (o TOR, por sus siglas en inglés) fue identificado en *Saccharomyces cerevisiae*, al observar que mutaciones en los genes *TOR1-1* y *TOR2-1* conferían a las levaduras resistencia a la inhibición del crecimiento por la rapamicina. Este estudio también mostró que la rapamicina forma un complejo, junto con la peptidil-prolil cis/trans isomerasa FKBP12, el cual inhibe a TOR (Heitman *et al.*, 1991). Estudios bioquímicos subsecuentes en células de mamíferos condujeron a la identificación de TOR en mamíferos (mTOR) (Brown *et al.*, 1994; Sabatini *et al.*, 1994; Sabers *et al.*, 1995). A la fecha, la mayoría de los genomas eucariontes analizados poseen al menos un gen *TOR*, mientras que en levaduras se han encontrado dos genes *TOR* y en el parásito *Leishmania major* fueron encontrados tres (Heitman *et al.*, 1991; Crespo *et al.*, 2005; Madeira da Silva *et al.*, 2009; Cornu *et al.*, 2013).

2.1.2. Estructura de la cinasa TOR

TOR es una proteína de gran tamaño (de ~250 kDa), que pertenece a la familia de las proteínas cinasas relacionadas a la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y se encuentra conservada desde levaduras hasta plantas y humanos (Xiong y Sheen, 2014). Las cinasas TOR de diferentes organismos comparten entre un 40 y 60% de identidad en su secuencia primaria (Wullschleger *et al.*, 2006). Hacia la región C-terminal de TOR se localiza el dominio cinasa, responsable de su actividad catalítica. Orientado hacia la región N-terminal del dominio catalítico de TOR se localiza el dominio de unión a rapamicina FRB (FKBP12–Rapamycin-Binding), el cual al formar un complejo terciario con la rapamicina y la proteína FKBP12 (12-kDa FK506-Binding Protein) inhibe la actividad de TOR. Hacia la región N-terminal del dominio FRB se presenta el dominio FAT (FRAP, ATM y ITRAP), y hacia el extremo C-terminal del dominio cinasa se encuentra el dominio FATC (FRAP, ATM y ITRAP C-terminal). Los dominios antes mencionados se presentan en todas las cinasas de la familia PI3K. Finalmente, la región N-terminal de TOR contiene repeticiones en tándem HEAT (llamadas así porque se encuentra en las proteínas Huntingtin, EF3,

Subunidad A de la PP2A y IOR), que participan en las interacciones proteína-proteína (Fig. 1A, B) (Wullschleger *et al.*, 2006).

2.1.3. Asociación de TOR dentro de complejos multiproteicos

TOR se une con diferentes proteínas formando dos complejos; en levaduras, el complejo TORC1 se asocia con LST8 (Lethal with SEC13 protein 8) y KOG1 (Kontroller Of Growth 1) [o RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR) en el complejo TORC1 de mamíferos] (Fig. 1C). Mientras que TORC2 se asocia con LST8, AVO3 (Adheres voraciously to TOR2 protein 3) [o RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mTOR) en el complejo TORC2 de mamíferos (mTORC2)] y con AVO1 (Adheres voraciously to TOR2 protein 1) [o SIN1 (Stress-activated map kinase-interacting protein 1) en el complejo mTORC2] (Fig. 1D). RAPTOR y RICTOR funcionan como proteínas de andamiaje críticas para el control del ensamblaje de los complejos, para la regulación por medio de señales celulares y para la selectividad del sustrato (Magnuson *et al.*, 2012). Se cree que LST8 es necesaria para la activación de TOR, debido a que su superficie de interacción puede influir en la organización del sitio activo de la cinasa (Dobrenel *et al.*, 2016). AVO1 y AVO3 se unen cooperativamente a las repeticiones HEAT amino-terminal en TORC2 y son requeridas para mantener la integridad del complejo (Wullschleger *et al.*, 2006). El complejo TORC1 es sensible a la rapamicina y participa en las respuestas a condiciones favorables de crecimiento, promoviendo procesos anabólicos como la división celular, la traducción y la biosíntesis de ribosomas y, por otra parte, reprime procesos catabólicos como la autofagia. El complejo TORC2 es insensible a la rapamicina y se ha observado que participa en la regulación de la organización de actina y en la endocitosis, la tensión de membrana, la transición G2/M del ciclo celular, la integridad del genoma y los niveles de intermediarios metabólicos de la vía de las pentosas fosfato (Kliegman *et al.*, 2013; Shimada *et al.*, 2013; Gaubitz *et al.*, 2015; Rispal *et al.*, 2015; Eltschinger y Loewith, 2016).

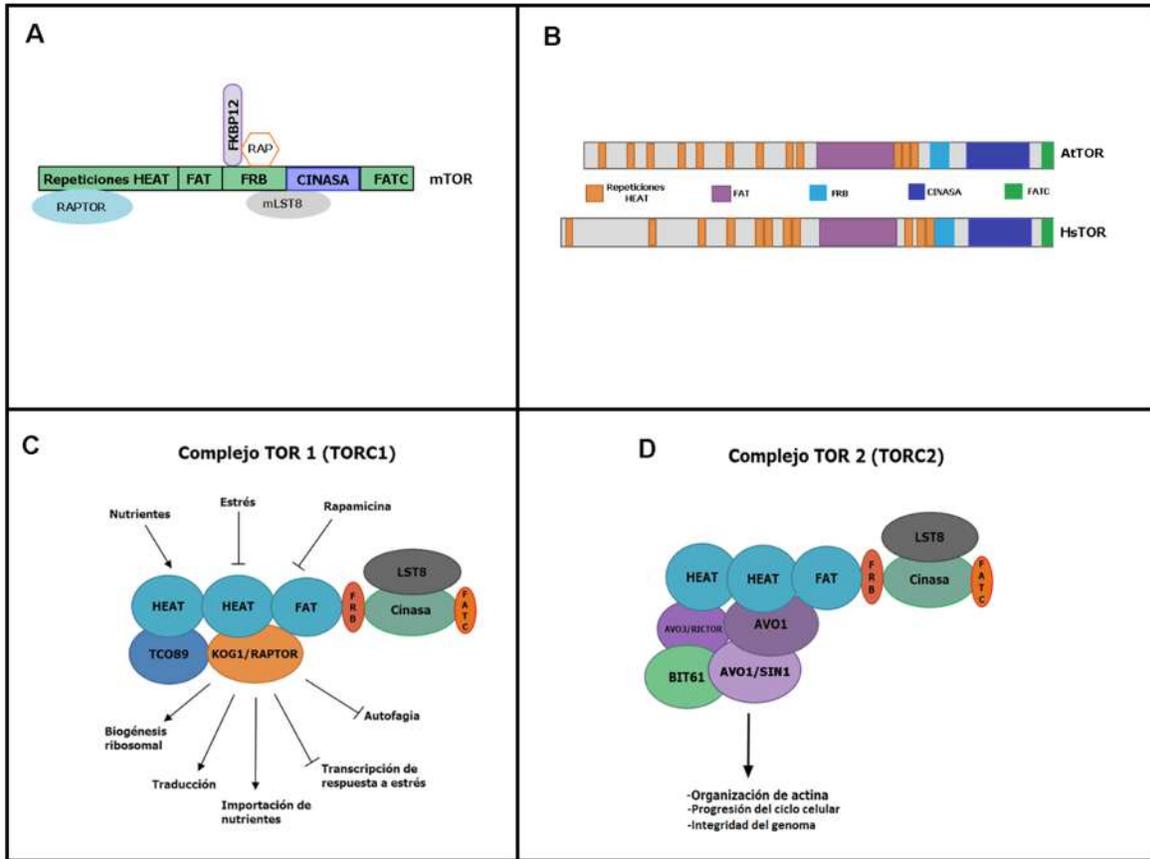


Figura 1. Organización de los dominios de TOR y estructura de los complejos TORC1 y TORC2. **a)** Mapa de interacción entre los dominios de mTOR y RAPTOR, LST8, FKBP12 y la rapamicina (RAP). **b)** Conservación de los dominios de TOR y de componentes del complejo TORC1 en humanos (Hs) y *A. thaliana* (At). **c)** Representación del complejo TORC1 de *S.cerevisiae*, el cual participa en la señalización de TOR sensible a rapamicina. Los estímulos que regulan positivamente al complejo TORC1 y los procesos promovidos por TORC1 son representados con flechas. Señales que regulan negativamente a TORC1 y los procesos negativamente regulados por TORC1 se representan con líneas perpendiculares. **d)** Representación del complejo TORC2 de *S. cerevisiae*, el cual es insensible a rapamicina. La flecha indica los procesos regulados el complejo TORC2. Modificado de Wullschleger *et al.*, 2006; Xiong y Sheen 2014.

2.1.4. Señalización de TOR en mamíferos (mTOR)

TOR regula el crecimiento celular mediante la integración de cuatro señales principales: la insulina o los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), la disponibilidad de aminoácidos, los niveles energéticos y distintos tipos de estrés (como un déficit en los niveles energéticos o de aminoácidos y la hipoxia).

2.1.4.1. Señalización de mTOR activada por insulina/IGF

El receptor para la insulina es una proteína tirosina cinasa tetramérica transmembranal, que consta de dos subunidades α y dos β . La insulina y los IGF son capaces de activar la ruta PI3K/Akt/mTOR al unirse a la subunidad α del receptor de insulina, lo cual provoca una transfosforilación de las subunidades β intracelulares del receptor y un cambio conformacional que incrementa su actividad cinasa, la cual fosforila al sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) (Haselbacher *et al.*, 1979; Kooijman, 2006). La proteína IRS-1 interactúa con la cinasa del 3-fosfatidilinositol (PI3K) (Saltiel y Kahn, 2001), formada por una subunidad regulatoria p85 y otra catalítica p110. Al interactuar IRS-1 con p85, permite que la cinasa PI3K se active y fosforile al lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PIP2), convirtiéndolo en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3, en concentraciones altas, actúa como segundo mensajero que da la señal para que se recluten hacia la membrana plasmática las proteínas cinasas de serina/treonina: PDK1 (proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítidos) y Akt, también llamada PKB (proteína cinasa B), a través de su dominio PH (Pleckstrin Homology) (Saltiel y Kahn, 2001, Jastrzebski *et al.*, 2007, Yang y Guan, 2007). Posteriormente, Akt fosforila en múltiples sitios a la proteína TSC2 (Tuberous sclerosis 2 protein), que en condiciones basales se encuentra unida a la proteína TSC1 (Tuberous sclerosis 1 protein) (Inoki *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2002). TSC2 posee una actividad de proteína activadora de GTPasa (GAP) sobre una pequeña GTPasa: Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain), convirtiéndola de su forma activa (unida a GTP) a su

forma inactiva (unida a GDP), siendo así TSC2 un inhibidor de Rheb (Tee *et al.*, 2003). Por lo tanto, al desacoplar el complejo TSC1/2 se establece la interacción de Rheb en su forma activa con el complejo mTORC1, estimulando la actividad cinasa de mTOR. mTORC1 a su vez fosforila a sus blancos: la proteína de enlace al factor de inicio de la traducción eIF4E (4EBP) y la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) (Manning y Cantley, 2003). Al fosforilar TOR a 4EBP se libera al factor de inicio de la traducción eIF4E del complejo inactivo eIF4E/4EBP, permitiendo con ello que la proteína eIF4E forme el complejo de iniciación de la traducción eIF4F (formado por eIF4A, eIF4E y eIF4G). eIF4E es el factor limitante en el inicio de la traducción dependiente de Cap (m7GpppN) (Gingras *et al.*, 1999). Otro de los blancos de TOR, la proteína cinasa S6K, al ser activada por TOR, fosforila a la proteína ribosomal S6 de la subunidad pequeña del ribosoma. Los ribosomas fosforilados en S6 traducen preferencialmente a los mRNAs que presentan trectos de oligopirimidinas (TOP) en el extremo 5'. Los transcritos con estas características codifican para componentes del aparato traduccional, principalmente para la síntesis de proteínas ribosomales (Meyuhas y Drazzen, 2009). mTORC1 además regula otros blancos involucrados en distintos procesos: regula negativamente a la cinasa ULK1 (Unc-51-like kinase 1) la cual participa en la formación del autofagosoma; regula factores de transcripción que producen respuestas compensatorias en respuesta a estrés mitocondrial; regula negativamente a la proteína fosfatasa PP2A (Protein Phosphatase 2A) cuya función es requerida en las respuestas a distintos tipos de estrés, como el estrés por choque térmico u osmótico, o la inanición de nitrógeno; regula la función de las células β del páncreas por lo que participa en la regulación de la homeostasis de glucosa (Fig. 2) (Santhanam *et al.*, 2004; Saxton y Sabatini, 2017).

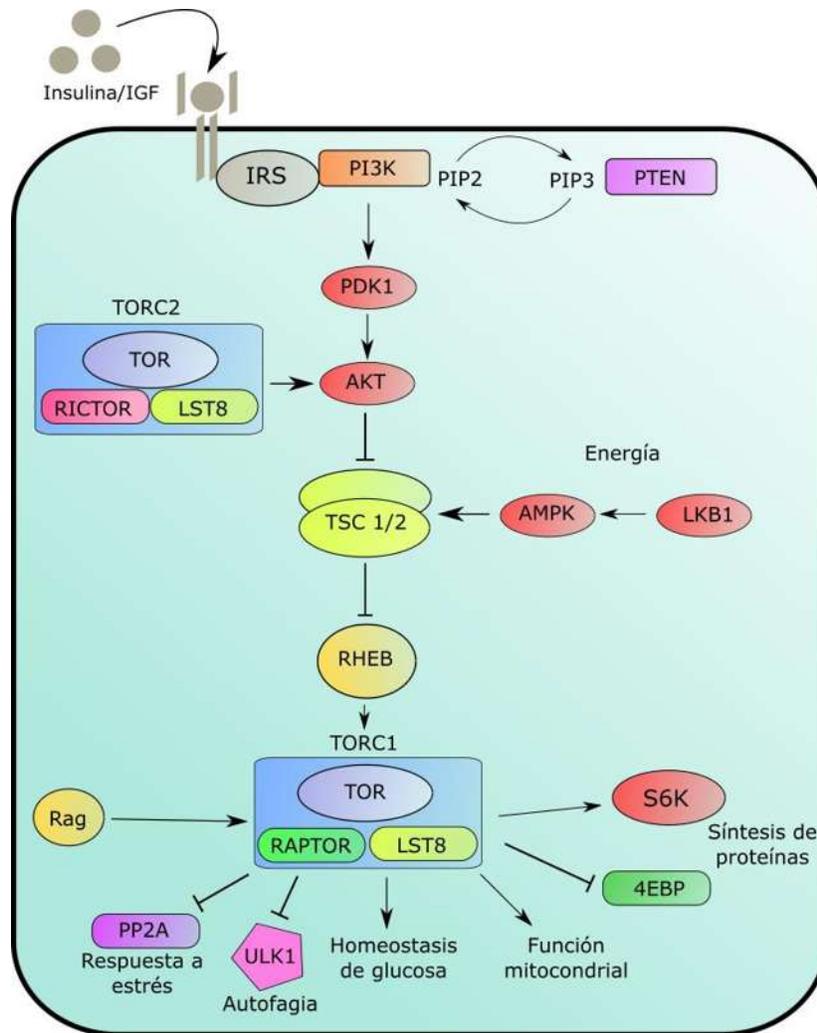


Figura 2. Vía de señalización de TOR en mamíferos. mTORC1 integra diversas vías, las cuales en conjunto determinan el tamaño (masa) celular. Las flechas representan activación mientras que las líneas perpendiculares representan inhibición. Abreviaturas: **Akt/PKB**, Protein Kinase B; **AMPK**, AMP-activated protein kinase; **4EBP**, eIF4E-binding protein; **IRS**, Insulin receptor substrate; **LKB1**, liver kinase B1; **LST8**, lethal with SEC13 protein 8; **PDK**, phosphoinositide-dependent kinase; **PI3K**, phosphoinositide 3-kinase; **PIP2**, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; **PIP3**, Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate; **PP2A**, protein phosphatase 2A; **PTEN**, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; **RAG**, Ras-related GTP-binding; **RAPTOR**, regulatory-associated protein of mTOR; **Rheb**, Ras homologue enhanced in brain; **RICTOR**, rapamycin-insensitive companion of mTOR; **S6K**, ribosomal S6 kinase; **TOR**, target of rapamycin; **TORC**, TOR complex; **TSC**, tuberous sclerosis complex; **ULK1**, unc-51-like -activating kinase 1. Modificado de Rexin *et al.* 2015.

2.1.4.2. Regulación de la señalización de mTOR en respuesta a los niveles energéticos celulares

La ruta PI3K/Akt/mTOR, además de ser activada por señales extracelulares como la insulina y los factores IGF, también recibe señales intracelulares para su activación o inhibición, de acuerdo con nivel energético y la presencia de algunos aminoácidos. Debido a que la biogénesis de ribosomas y la traducción de proteínas son los procesos que principalmente consumen energía celular, mTORC1 debe ser capaz de percibir los niveles de ATP celular y detener la traducción de proteínas cuando sea necesario. Una proteína implicada en estos procesos es la cinasa activada por AMP (AMPK), que monitorea los niveles de AMP/ATP. Cuando los niveles de AMP incrementan por estrés energético, el AMP se une a la AMPK cinasa, esta se activa y fosforila a TSC2, y con ello estimula su actividad GAP hacia Rheb, de tal forma que se desregula a mTORC1, promoviendo a su vez la defosforilación de S6K y 4EBP (Inoki *et al.*, 2003). De manera interesante, en células carentes de AMPK, la privación de glucosa inhibe la señalización de TOR a través de la inhibición de las GTPasas Rag, sugiriendo que mTORC1 es capaz de percibir a la glucosa a través de otro mecanismo (Efeyan *et al.*, 2013; Kalender *et al.*, 2010).

2.1.4.3. Regulación de la señalización de mTOR en respuesta a nutrientes

En respuesta a nutrientes, especialmente a la adición de los aminoácidos arginina y leucina (Hara *et al.*, 1998), se provoca la fosforilación de S6K y 4EBP dependiente de TOR, mientras que la defosforilación de S6K y 4EBP se presenta por una restricción de estos aminoácidos (Hay y Sonenberg, 2004). Las GTPasas de la familia Rag han surgido en años recientes como componentes de la señalización de TOR dependiente de aminoácidos. Dos complejos heterodiméricos de Rag (RagA/C y Rag B/D) se encuentran anclados a la membrana lisosomal a través de su asociación con Ragulator, un complejo pentamérico con actividad de factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) hacia las GTPasas Rag (Bar-Peled

et al., 2012). Cuando hay una falta de nutrientes, TORC1 se encuentra principalmente disperso en el citoplasma. La estimulación con aminoácidos promueve la conformación activa de los heterodímeros Rag, la cual se une a RAPTOR, y así recluta a mTORC1 a la superficie lisosomal, donde se encuentra ubicada la proteína Rheb, permitiendo la interacción entre mTORC1 y Rheb, que es el paso crítico para la activación de mTORC1 (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008).

2.1.4.4. Regulación de la señalización de mTOR en respuesta a estrés

TOR también participa en la respuesta a distintos tipos de estrés; en condiciones de escaso oxígeno la señalización de TOR es inhibida, en parte por la activación de la AMPK y además a través de la activación de REDD (Regulated in DNA damage and development 1), que activa al complejo TSC, dando lugar a una disminución en la síntesis de proteínas (Brugarolas *et al.*, 2004). Daños en el ADN también inhiben la actividad de TOR a través de la inducción de los genes blancos de la proteína p53, la cual es un factor de transcripción que juega un papel crucial en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y en la prevención de la formación de tumores. Los genes blanco de p53 incluyen a la subunidad reguladora de AMPK (AMPK β), la proteína PTEN (Phosphatase and tensin homolog) y el propio TSC2, los cuales incrementan la actividad del complejo TSC (Feng *et al.*, 2007).

2.1.5. Estructura, regulación y función de la cinasa S6K

2.1.5.1. Estructura de los dominios de S6K

S6K es un miembro de la familia de proteínas AGC cinasas [nombrada así por sus tres miembros fundadores: PKA (cAMP-dependent protein kinase), PKG (cGMP-dependent protein kinase) y PKC (protein kinase C)]. En mamíferos S6K es codificada por dos genes: *S6K1* (*RPS6KB1* o *S6K α*) y *S6K2* (*RPS6KB2* o *S6K β*).

Las mutaciones en ambos genes ocasionan letalidad perinatal (Shima *et al.*, 1998; Pende *et al.*, 2004). Cada uno de estos genes codifica dos isoformas de S6K generadas por dos sitios de inicio de la traducción alternativos. S6K1 y S6K2 comparten alrededor de un 83% de identidad en el dominio cinasa, mientras que en los dominios N y C-terminales la similitud es del 43% y del 59% respectivamente (Magnuson *et al.*, 2012). La isoforma de S6K más ampliamente estudiada es la p70-S6K1, formada por 502 aminoácidos. Las diferencias en el sitio de inicio de la traducción generan una isoforma más grande; la p85-S6K1 que contiene 23 aminoácidos adicionales en la región N-terminal (Grove *et al.*, 1991). Por otra parte, S6K2 se encuentra en la isoforma p54-S6K2 con 482 aminoácidos que, al igual que S6K1, genera una isoforma más grande, la p56-S6K2 con 13 aminoácidos adicionales en su región N-terminal, por diferencia del sitio de inicio de la traducción (Pardo y Seckl, 2013). Se han descrito otras isoformas de S6K1 generadas por empalme alternativo; la p31-S6K1 reportada en ratón, mientras que la h6A y h6C son las variantes de humano (Ben-Hur *et al.*, 2013). Estas últimas isoformas más pequeñas se encuentran truncadas en el dominio cinasa, lo que sugiere diferentes funciones para estas variantes de S6K1. Las isoformas más grandes de S6K1 y S6K2 presentan una secuencia de localización nuclear (NLS) en la región N-terminal, mientras que ambas isoformas de S6K2 tienen otra secuencia NLS en su dominio C-terminal. En esa misma región, dichas isoformas presentan un dominio rico en prolina, lo que sugiere que estas proteínas S6K se localizan en el núcleo. Las cinasas S6K1 y S6K2 pueden subdividirse, por la estructura, en dominios regulatorios: I) dominio N-terminal (NTD), el cual contiene el motivo de señalización de TOR (TOS) requerido para la activación de S6K dependiente de TOR; II) dominio cinasa, que contiene el segmento de activación o “bucle T” (T-loop) cuya fosforilación produce cambios conformacionales importantes para la transferencia del fosfato; III) secuencia de enlace, que contiene los sitios de fosforilación TM (turn motif) y HM (hydrophobic motif); IV) una región C-terminal (CTD), que presenta un dominio pseudosustrato autoinhibitorio y un motivo RSPRR que también es autoinhibitorio (Fig. 3) (Magnuson *et al.*, 2012).

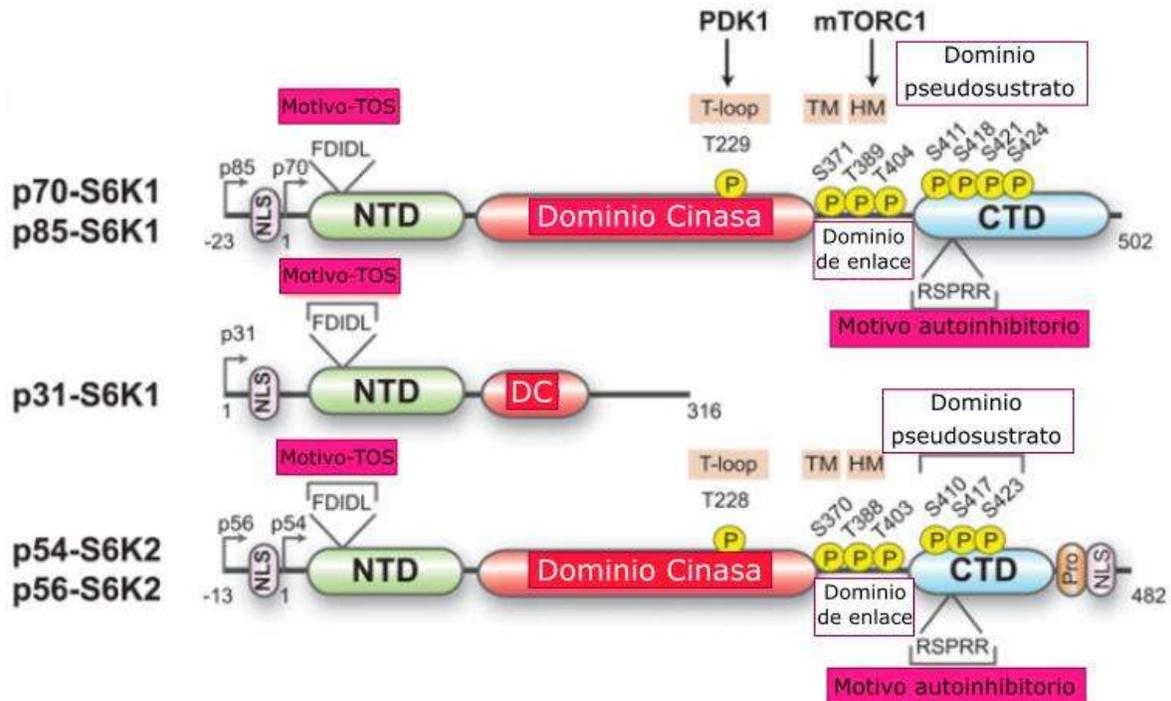


Figura 3: Isoformas, estructura de los dominios y sitios de fosforilación de S6K. Las isoformas de S6K1 incluyen la p70-, p85- y p31-S6K1: una alternación en el sitio de inicio alarga los extremos N-terminales de p85- y p31-S6K1 en 23 aminoácidos (nótese que p31-S6K1 carece de la mayor parte del dominio cinasa). Las isoformas de S6K2 incluyen la p54 y p56 S6K2: la alternación en el sitio de inicio alarga el extremo N-terminal de p56-S6K2 en 13 amino ácidos. El motivo NLS se encuentra dentro de los dominios N-terminales de p85-S6K1 y p56-S6K2, mientras que ambas S6K2 contienen adicionalmente un motivo NLS dentro del extremo C-terminal, así como un dominio rico en prolinas (Pro). Las S6Ks contienen varios dominios: N-terminal (NTD), de cinasa (DC), de enlace y C-terminal (CTD). El dominio NTD contiene el motivo TOS, mientras que el CTD presenta un motivo de pseudosustrato autoinhibitorio y el RSPRR. mTORC1 fosforila a la p70-S6K1 en Thr389, dentro del dominio de enlace, y la cinasa PDK1 fosforila a la Thr229, localizada en el T-loop, dentro del dominio cinasa. Se muestran otros sitios de fosforilación incluyendo la del sitio TM (Ser371). Modificado de Magnuson *et al.* 2012.

2.1.5.2. Regulación de la activación de S6K

Varios estudios se han enfocado en investigar la activación de S6K1, mientras que escasamente se ha descrito la activación de S6K2 (Tavares *et al.*, 2015). En respuesta a insulina, S6K1 experimenta fosforilación en al menos ocho sitios perfectamente localizados (Fenton y Gout, 2011), de los cuales se sabe que para la activación de S6K1 se requiere fosforilación en tres sitios críticos: en los aminoácidos Thr229 en p70-S6K1 y Thr252 en p85-S6K1 en el sitio de activación T-loop; en Ser371 en p70-S6K1 y Thr394 en p85-S6K1 en el sitio TM de la región de enlace; y en Thr389 en p70-S6K1 y Thr412 en p85-S6K1 en la región HM, ubicado también en la región de enlace (Moser *et al.*, 1997; Weng *et al.*, 1998). La vía de activación de S6K mejor estudiada es la activada por la insulina/IGF, en la vía PI3K/Akt/mTOR; al encontrarse activo, mTORC1 fosforila a S6K1 en el residuo Thr389, seguido de una fosforilación por PDK1 de Thr229, localizada en el dominio cinasa, lo que resulta en la activación de S6K1 (Pullen *et al.*, 1988). Se ha reportado que la regulación de S6K2 es similar a la de S6K1, donde mTOR fosforila a S6K2 en Thr388, seguido de la fosforilación en Thr 228 por PDK1, conduciendo así a su activación (Magnuson *et al.*, 2012; Pardo *et al.*, 2013). Los sitios de fosforilación Thr388/389 de S6K son ampliamente utilizados en estudios en sistemas animales y humanos como marcadores de la actividad de la cinasa TOR.

2.1.5.3. Procesos regulados por la cinasa S6K

El principal blanco de la S6K es la proteína ribosomal S6, que forma parte de la subunidad 40S del ribosoma. Tanto la S6K1 como la S6K2 son requeridas para la fosforilación completa de la proteína S6. A pesar de que aún no se conoce del todo el papel de la fosforilación de S6, su activación es esencial para la síntesis de proteínas y la progresión del ciclo celular, de esta forma S6K regula el crecimiento celular al afectar el proceso de traducción (Fig. 4) (Koh, 2013; Chauvin *et al.*, 2014). Durante al menos una década desde el descubrimiento de S6K, la proteína S6 se

mantuvo como su único sustrato identificado, desde entonces han surgido otros sustratos que, además de participar en la regulación traduccional, intervienen en procesos diversos como: el control transcripcional de la biogénesis de ribosomas vía fosforilación del factor de transcripción UBF (Upstream Binding Factor) que conduce a la activación de la transcripción del gen ribosomal 45S; la síntesis de lípidos y diferenciación de adipocitos, mediante la atenuación de factores de transcripción críticos para la adipogénesis; en la respuesta a daños en el ADN S6K fosforila a la proteína Mdm2 (murine double minute 2) bloqueando su capacidad de ubiquitinar a la proteína p53, que es un supresor de tumores, causando un incremento en los niveles de p53 que resulta en un arresto del ciclo celular o apoptosis; S6K fosforila a la proteína FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), una proteína de unión a mRNA que funciona en la represión traduccional y la plasticidad sináptica (la capacidad que tiene el sistema nervioso para cambiar su morfología o funcionalidad a través del desarrollo) (Magnuson *et al.*, 2012). Al estar implicadas en la regulación de procesos moleculares y celulares importantes, anomalías en las distintas isoformas de S6K están asociadas al desarrollo de enfermedades como obesidad, cáncer, diabetes y enfermedades del sistema nervioso. Todos estos datos colocan a las isoformas de S6K como foco de atención para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Tavares *et al.*, 2015).

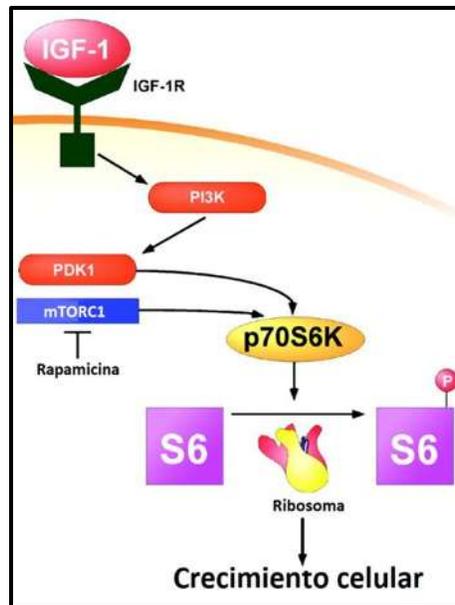


Figura 4. Esquema de la activación de p70S6K por insulina/IGF. S6K requiere ser fosforilada para su activación por mTORC1, seguido de una fosforilación por PDK1. Al estar activa, S6K fosforila a la proteína ribosomal S6, lo cual promueve la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. Abreviaturas: **IGF-1**, Insulin-like Growth Factor-1; **IGF-1R**, IGF-1 Receptor; **PDK-1**, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; **PI3K**, phosphatidylinositol 3-kinase.

2.1.6. Señalización de TOR en plantas

2.1.6.1. Conservación de la estructura y funcionalidad de TOR en plantas

Genes que codifican ortólogos putativos de proteínas TOR han sido identificados en distintas plantas cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, incluyendo *Arabidopsis*, maíz, arroz, álamo, musgos y varias algas rojas y verdes (Moreau *et al.*, 2010). Como en la mayoría de otros eucariontes, parece que TOR es codificada por una única copia de este gen presente en las plantas. Las proteínas TOR de los diversos organismos eucariontes presentan un alto grado de conservación en los dominios cinasa, FRB, FATC y en menor grado en el dominio HEAT. *Arabidopsis thaliana* posee un único gen *TOR* que codifica para una proteína (AtTOR) de aproximadamente 280 kDa (Menand *et al.*, 2002), la cual comparte un 75% de similitud con la proteína TOR de humano, especialmente en el dominio cinasa, sugiriendo posibles propiedades y sustratos similares (Xiong y Sheen, 2014). Las

proteínas TOR de plantas mantienen conservadas la estructura y secuencia de sus dominios. El árbol filogenético de las proteínas TOR evidencia esta conservación a través de diferentes especies, resaltando la importancia general de esta cinasa y, por ende, de la vía de señalización TOR (John *et al.*, 2011).

Al igual que en animales, la vía de señalización TOR en plantas es un regulador maestro del crecimiento. En líneas transgénicas de *Arabidopsis*, caracterizadas por un incremento o disminución de los niveles celulares de TOR, se observó una correlación positiva entre el crecimiento y el nivel de expresión de TOR. Las líneas con una expresión disminuida o aumentada del gen *AtTOR* dan lugar a una disminución o incremento respectivamente en el tamaño celular y de los órganos, en la producción de semillas y la resistencia a estrés osmótico (Deprost *et al.*, 2007). En plantas de *Arabidopsis* se detectó la expresión de TOR en altos niveles en los meristemas primarios y en niveles basales en todos los tejidos (Zimmermann *et al.*, 2004). Mutaciones KnockOut de TOR son letales y causan arresto del desarrollo de la planta en las primeras etapas (Menand *et al.* 2002), mientras que la disminución en la actividad de TOR mediante ARN interferente (ARNi) o inhibición química con rapamicina y Torin2 (inhibidores de TOR) causa severos defectos sobre el crecimiento así como autofagia constitutiva y sobre-regulación de genes requeridos para la autofagia, además de una eficiencia disminuida en la traducción que se refleja en una reducción de la abundancia de polirribosomas de alto peso molecular (un método eficaz para evaluar la asociación de ribosomas con un mRNA dado) y una disminución en la concentración de proteína soluble (Liu y Bassham, 2010; Kim *et al.*, 2011). Un descubrimiento interesante sobre la regulación de la actividad de TOR en plantas fue reportado recientemente, donde se mostró que TOR es activado diferencialmente en los ápices radicular y foliar de plantas de *Arabidopsis*. En este estudio se observó que para crecimiento en el ápice de la raíz sólo se requiere glucosa, mientras que en el ápice foliar las señales de luz y glucosa son esenciales para el crecimiento y el desarrollo de la primera hoja verdadera. En este mismo trabajo se observó, mediante ensayos de inmunodetección con anticuerpos para la S6K fosforilada en Thr449 (sitio fosforilado por TOR en *Arabidopsis*), que la activación de TOR en el ápice foliar requiere los estímulos de luz y glucosa mientras

que en el ápice radicular solo es necesario el estímulo con glucosa para activar a TOR, además de que la aplicación exógena de auxinas es capaz de reemplazar el estímulo de luz en el ápice foliar y promover la formación de la primera hoja verdadera. Este hecho puede estar relacionado con los distintos requerimientos de luz en los ápices radicular y foliar para la síntesis de auxinas, ya que la luz es percibida en el follaje y es en esta región donde principalmente son producidas las auxinas (Li *et al.*, 2017).

En maíz se han descrito y caracterizado ortólogos de las cinasas TOR y S6K, además de un péptido nombrado ZmIGF (*Zea mays* Insulin-like Growth Factor) encontrado en tejidos en crecimiento activo y el cual es reconocido por anticuerpos contra insulina (Reyes de la Cruz *et al.*, 2004; Agredano Moreno *et al.*, 2007; Rodríguez Lopez *et al.*, 2011). El factor ZmIGF y la insulina, son capaces de activar a las cinasas TOR y S6K, así como de acelerar la síntesis de proteínas ribosomales. Además, se ha identificado un receptor putativo del factor ZmIGF, el cual fue reconocido mediante anticuerpos contra el factor IGF de humano en ensayos de inmunoprecipitación a partir de extractos de proteínas de membrana de callos de maíz (Garrocho Villegas *et al.*, 2013). Estos datos muestran que la vía de señalización de TOR se encuentra altamente conservada en maíz.

2.1.6.2. Sensibilidad de las plantas al inhibidor rapamicina

Hasta hace poco, descifrar las funciones de TOR en plantas se había visto obstaculizada por la aparente insensibilidad del modelo *Arabidopsis thaliana* al inhibidor rapamicina. La proteína FKBP12 presentó diferencias en la secuencia de aminoácidos, las cuales afectan la estructura y actividad biológica de la proteína (Xu *et al.*, 1998). En contraste, en la FKBP12 de *Chlamydomona*, homólogo más cercano a humanos y levadura, se localizaron los residuos críticos que le permiten el enlace a la rapamicina y consistentemente una inhibición del crecimiento en presencia del fármaco (Crespo *et al.*, 2005). Al expresar la proteína FKBP12 de humano o levadura en *Arabidopsis*, se restauró su sensibilidad a la rapamicina

(Mahfouz *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2012). Una observación interesante fue que la rapamicina añadida al cultivo de *Arabidopsis* en medio líquido podía afectar el crecimiento de la planta, debido posiblemente a una toma más eficiente o mayor disponibilidad del inhibidor (Xiong y Sheen, 2012). Estudios recientes también han mostrado que inhibidores específicos de TOR (interactúan directamente con el sitio de enlace del ATP a TOR), desarrollados en las investigaciones médicas como Torin1 y AZD-805, restringen el crecimiento de las plantas de una manera altamente eficiente (Thoreen *et al.*, 2009; Montané y Menand, 2013; Dong *et al.*, 2015). En maíz, a diferencia de *Arabidopsis*, la cinasa TOR (ZmTOR) ha mostrado ser susceptible a ser inhibida por rapamicina, ya que anula los efectos estimuladores de la insulina sobre la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (rpS6) y la síntesis de proteínas ribosomales. (Sánchez de Jimenez *et al.*, 1999; García flores *et al.*, 2001; Reyes de la Cruz *et al.*, 2004).

2.1.6.3. Conservación del complejo TORC1 en plantas

El incremento en el número de genomas completamente secuenciados en un amplio rango de eucariontes ha promovido análisis comparativos para comprender la señalización de TOR. En las plantas, estas comparaciones permitieron destacar un considerable grado de conservación entre ciertos elementos de la señalización de TOR, que se han caracterizado funcionalmente en otros modelos eucariontes, así como también mostraron elementos perdidos en dicha vía, cuya ausencia debe reconciliarse con la historia evolutiva única y la estrategia de vida de las plantas (Rexin *et al.*, 2015) (Fig. 5). Entre los componentes importantes de la vía de señalización de TOR de mamíferos cuyas contrapartes en organismos vegetales no se han identificado se encuentran las PI3K de clase I, la proteína cinasa Akt/PKB, la GTPasa Rheb, el complejo TSC y la proteína 4EBP. Aunque las plantas carecen de PI3K de clase I, se ha propuesto que la PI3K de clase III Vps34 (Vacuolar protein sorting-associated protein 34), la cual cataliza la formación de fosfatidilinositol 3-fosfato, puede regular la actividad de TOR, sin embargo, no se ha demostrado una interacción directa entre estas dos proteínas (Backer, 2008). En mamíferos, la

actividad represora del complejo TSC sobre TOR se incrementa en respuesta a la AMPK, sin embargo, ya que las plantas carecen de una contraparte funcional de TSC1/2, se ha sugerido que en estos organismos puede ser la AMPK la encargada de reprimir la actividad de TOR mediante una fosforilación inhibitoria de RAPTOR (Gwinn *et al.*, 2008). Se ha sugerido la posibilidad de que en plantas existan otras GTPasas con actividad similar a la de Rheb capaces de activar a TOR; de acuerdo con un estudio reciente, la GTPasa ROP2 posee algunas características parecidas a las de Rheb en humanos, ya que ambas se unen físicamente a TOR y lo activan en su forma unida a GTP. Sin embargo, ROP2 se une a la región HEAT de AtTOR mientras que en mamíferos Rheb se une directamente al dominio cinasa de TOR (Schepetilnikov *et al.*, 2017).

En términos de la interacción de TOR con otras proteínas para la formación de complejos, las plantas mostraron distinciones: a pesar de la naturaleza esencial de TORC2 en animales y hongos, a la fecha en plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas no se han identificado homólogos de las proteínas específicas de TORC2, tales como RICTOR y Sin1. Debido al papel prominente de TORC2 para mantener el crecimiento polarizado en otros eucariontes, su ausencia en plantas puede deberse a estrategias divergentes que desarrollaron estos organismos para manejar su crecimiento. En contraste, se ha identificado que los genomas de plantas codifican ortólogos de las subunidades RAPTOR y LST8 del complejo TORC1 de mamíferos y levaduras, y se tiene bien documentada la presencia de un complejo TORC1 en algas y plantas terrestres (Robaglia *et al.*, 2012; Maegawa *et al.*, 2015). El complejo TORC1 de plantas muestra un alto grado de conservación funcional en plantas multicelulares y algas unicelulares, lo cual se ha manifestado en experimentos en los que se ha demostrado la interacción entre la proteína RAPTOR de *Arabidopsis* y la región HEAT de TOR; y en *Chlamydomonas* y *Arabidopsis* la proteína LST8 interacciona con el dominio cinasa de TOR como lo hace en otros eucariontes (DíazTroya *et al.*, 2008; Moreau *et al.*, 2012).

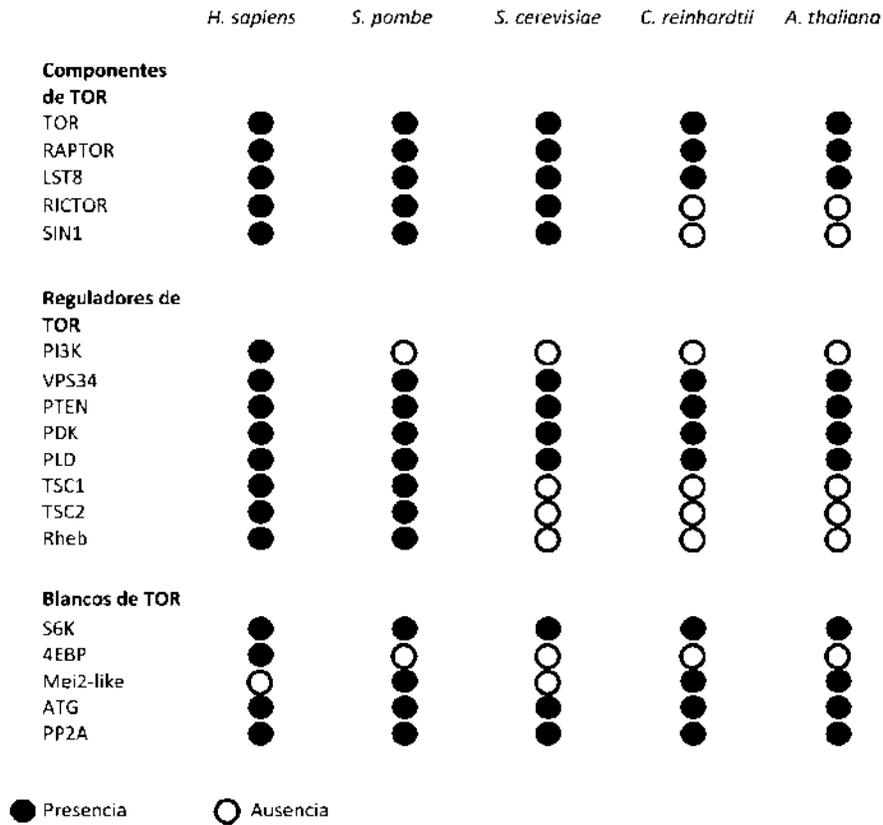


Figura 5. Comparación de los elementos de la señalización de TOR conservados entre distintos modelos eucariontes. Representación de los componentes de la señalización de TOR en *Homo sapiens*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Arabidopsis thaliana*. Modificado de Rexin *et al.* 2015.

2.1.6.4. Señalización río arriba de TOR en plantas

A diferencia de los bien descritos mecanismos moleculares que enlazan a TOR con crecimiento en mamíferos y levaduras, los reguladores importantes río arriba de la señalización de TOR no se han identificado en plantas. Por ejemplo, el complejo TSC1/2, Rheb, PI3K de clase I y II, y AKT. Sin embargo, los descubrimientos más recientes han ampliado nuestra perspectiva sobre las funciones moleculares y la dinámica de los mecanismos de regulación de la cinasa TOR en plantas (Fig. 6) (Xiong y Sheen, 2014). En plantas, la falta de conservación de los reguladores río arriba de TOR en mamíferos sugieren que las plantas pueden haber evolucionado su propia vía de regulación de TOR, con la finalidad de adaptarse mejor a sus características sésiles y fotoautotróficas (Dobrenel *et al.*, 2016).

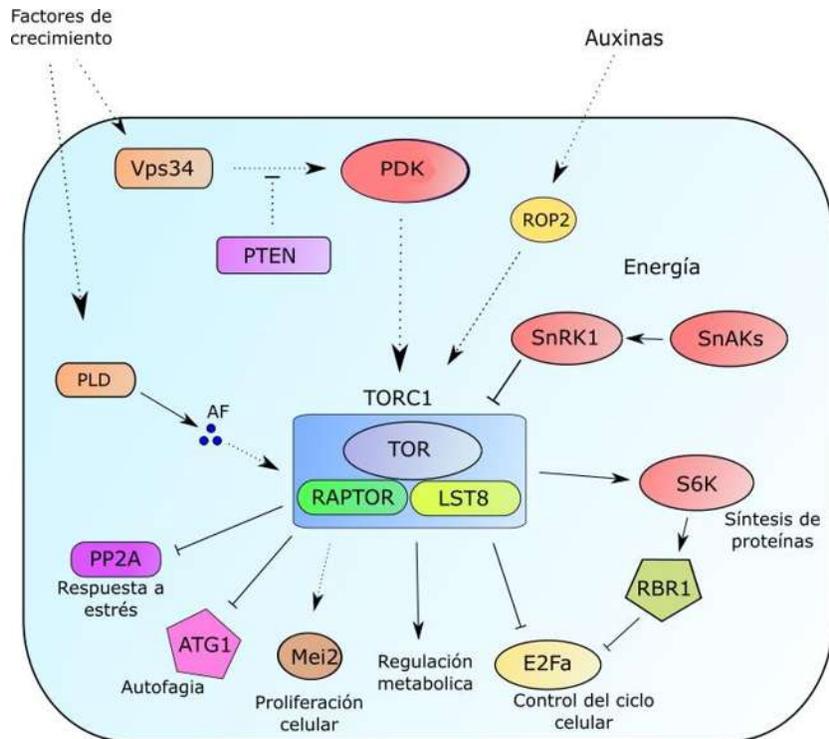


Figura 6. Vía de señalización de TOR en plantas. Elementos importantes de la vía de señalización TOR se encuentran conservados en plantas, los cuales, de manera similar en mamíferos, operan una red de transducción de señales que regula procesos anabólicos y catabólicos de acuerdo con las condiciones ambientales. Las líneas interrumpidas representan una relación hipotética, las flechas representan activación y las líneas perpendiculares representan inhibición. Abreviaturas: **AF**, ácido fosfatídico; **ATG1**, AuTophagy related 1; **E2Fa**, Transcription factor E2FA; **Mei2**, Meiosis protein mei2; **PDK**, phosphoinositide-dependent kinase; **PLD**, phospholipase D; **PP2A**, protein phosphatase 2A; **PTEN**, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; **RBR**, RETINOBLASTOMA-RELATED; **ROP2**, Rho-like GTPase 2; **S6K**, Ribosomal S6 Kinase; **SnAKs**, SnRK1-activating kinases; **SnRK**, Snf1-related kinase; **TORC**, TOR Complex; **Vps34**, vacuolar protein sorting 34. Modificado de Rexin *et al.* (2015).

Debido a que cada aspecto del desarrollo en plantas está regulado por fitohormonas, estas han atraído la atención como reguladores de la actividad de TOR en plantas. Recientemente se ha señalado a las auxinas como reguladores río arriba de la señalización de TOR (Schepetilnikov y Ryabova 2017). En respuesta a auxinas, la señalización de TOR se activa, lo cual se ha manifestado por la fosforilación de la cinasa S6K en el sitio Thr449 (sitio fosforilado por TOR en *Arabidopsis*) y la asociación de TOR activado con polirribosomas, donde fosforila a S6K (Schepetilnikov *et al.*, 2013). Recientemente se reportó que las señales de glucosa y luz, así como la aplicación exógena de auxinas, mostraron ser capaces de activar a S6K en meristemas foliares (Li *et al.*, 2017). Por el contrario, la inhibición de TOR mediante ARNi o inhibidores químicos bloquea el gravitropismo, una respuesta regulada por auxinas (Schepetilnikov *et al.*, 2013). Estudios recientes señalan que las auxinas actúan en conjunto con las GTPasas similares a Rho (ROPs) y la señalización de TOR para contribuir a la regulación de la traducción de mensajeros con marcos de lectura abiertos río arriba (uORF), dentro de la región 5' no traducida (5'UTR). Los uORF pueden controlar la traducción de proteínas críticas (como factores de transcripción, cinasas y factores de crecimiento) al permitir la retención en los polirribosomas de promotores de la reiniciación de la traducción, como el factor de iniciación de la traducción eIF3 (Eukaryotic Initiation Factor 3) (Younk y Wek, 2016). Se ha sugerido que TOR recibe la señal de auxinas vía ROP2 para incrementar la producción de proteínas importantes de forma post-transcripcional, mediante un mecanismo de traducción específico: la reiniciación. En este modelo, la GTPasa ROP2 activa a TOR solamente al estar unida a GTP, de forma similar a la activación de TOR en mamíferos por Rheb (Fig. 7) (Schepetilnikov *et al.*, 2017). Plantas de *Arabidopsis* con altos niveles endógenos de auxinas, o plántulas de *Arabidopsis* tratadas con auxinas o que expresan altos niveles de ROP2 en su forma unida a GTP, se caracterizaron por un incremento en la fosforilación de TOR. La fosforilación de TOR en respuesta a auxinas fue suprimida en plantas de *Arabidopsis* con expresión disminuida de ROP2 mediante ARNi y plantas que expresan constitutivamente ROP2 en su forma unida a GTP son más resistentes a inhibidores de TOR (Schepetilnikov *et al.*, 2017). Entender los roles de

ROP2 en la regulación de TOR requiere mayor investigación, así como identificar otros efectores de la señalización río arriba de TOR en plantas y su participación en la traducción.

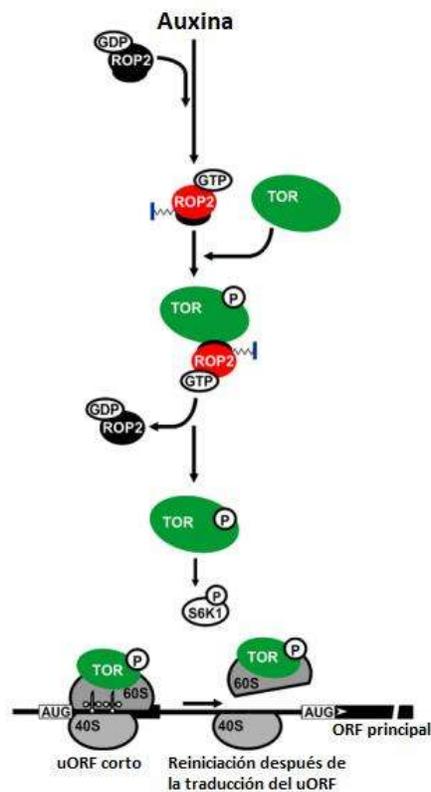


Figura 7. Modelo de la función de ROP2 en la activación de TOR y S6K. La GTPasa ROP2 media la activación de TOR y S6K en respuesta a las auxinas para controlar la abundancia de importantes proteínas de manera post-transcripcional, vía reinitación de la traducción. Las auxinas median el reciclaje de las GTPasas ROP2, de su forma inactiva (unida a GDP), a su forma activa (unida a GTP). ROP2 en su forma unida a GTP interactúa directamente con TOR activándolo. TOR en su forma activa es reclutado al complejo de pre-iniciación y los polirribosomas, donde promueve la reinitación de la traducción de mRNA con uORFs. Modificado de Schepetilnikov *et al.* 2017.

2.1.6.5. Estructura, regulación y funciones de S6K en plantas

De igual forma que en animales, S6K es el sustrato mejor caracterizado de TOR en plantas. La mayoría de los estudios sobre la S6K de plantas se han realizado en *Arabidopsis*, donde se presentan dos formas cercanamente relacionadas, AtS6K1 (At3g08720) y AtS6K2 (At3g08730). A pesar de que las regiones C-terminal y N-terminal de la S6K de plantas son muy divergentes respecto a la de las S6K de animales, el dominio cinasa se encuentra altamente conservado entre estos organismos, e incluso los principales sitios de fosforilación identificados en S6K de humanos se conservan en la S6K de *Arabidopsis* (Turck *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2010; Rexin *et al.*, 2015). Reyes de la Cruz *et al.* (2004), caracterizaron un ortólogo en maíz de la p70-S6K de mamíferos, que presenta una longitud de 488 aminoácidos, una masa molecular teórica de 54.1 kDa y un punto isoeléctrico de 6.19. Esta S6K fue reconocida por anticuerpos contra la p70-S6K de humano y, al igual que en mamíferos, su actividad se incrementa en presencia de insulina y se inhibe con rapamicina. Además, anticuerpos específicos para la S6K de humano fosforilada en Thr389 son capaces de reconocer a las S6K1 y S6K2 de *Arabidopsis* fosforilada en los sitios Thr449 y Thr455, respectivamente (Schepetilnikov *et al.*, 2011; Xiong y Sheen, 2012; Schepetilnikov *et al.*, 2013). Al igual que en animales, S6K presenta funciones importantes en la mediación de las respuestas de crecimiento en plantas, incluyendo a aquellas que involucran las hormonas que promueven el crecimiento como las auxinas y citocininas (Turck *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2016). En plantas, de manera similar a hongos y animales, la activación de S6K mediada por TOR contribuye al crecimiento estimulado por la síntesis de proteínas por varios mecanismos. S6K activada por TOR exhibe un incremento en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 y en plantas este hecho afecta la traducción al promover la reiniciación de la traducción de mRNAs que contienen múltiples uORFs dentro de la región 5'UTR, ya que S6K, activada por TOR, mantiene el estatus de fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF3h (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H), el cual es necesario para la reiniciación de la traducción (Schepetilnikov *et al.*, 2013). El hecho de que

aproximadamente el 35% de los mRNAs de *Arabidopsis* presenten un uORF corriente arriba del codón de inicio sugiere que este mecanismo puede jugar un papel importante en la reprogramación de la traducción dependiente de TOR y el control del crecimiento y desarrollo (Dobrenel *et al.*, 2016). S6K en plantas, al ser uno de los principales sustratos de TOR, ha mostrado su participación en la señalización de TOR mediada por auxinas como se ha demostrado en estudios recientes (Deng *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2015; Schepetilnikov *et al.*, 2017). En respuesta a auxinas S6K es fosforilada por TOR en Thr449, y las señales de glucosa y luz, así como la aplicación exógena de auxinas, mostraron ser capaces de activar a S6K en meristemas foliares como se mencionó previamente (Li *et al.*, 2017).

2.2. La participación de las fitohormonas sobre el crecimiento y desarrollo vegetal

El crecimiento y desarrollo en plantas es determinado por señales endógenas y ambientales que, junto con el programa genético intrínseco, determinarán la forma de la planta. Las hormonas vegetales o fitohormonas son reguladores de crecimiento fundamentales para el crecimiento y desarrollo vegetal (Gray, 2004). Probablemente el término hormona vegetal deriva de las observaciones realizadas por Julius von Sachs entre 1880 y 1893, donde sugirió que las diferencias morfológicas entre los órganos de las plantas se deben a diferencias en el material que los compone y postuló la existencia de sustancias que forman la raíz y la flor, las cuales se mueven en diferentes direcciones a través de la planta (Went y Thimann, 1937). Casi al mismo tiempo, Darwin realizó observaciones sobre el fototropismo en coleóptilos de plántulas de avena, que lo condujeron a postular la existencia de una señal transportada desde la punta del coleóptilo hacia las regiones inferiores de la planta (Darwin, 1880). Sin embargo, fue en 1926 cuando Went logró aislar dicha señal removiendo la punta del coleóptilo de plántulas de *Avena sativa* y colocándola en bloques de agar durante varias horas. Al posicionar los bloques de agar a las plantas decapitadas, observó que éstas restablecían su crecimiento. De

esta forma, Went demostró la existencia de una sustancia química promotora del crecimiento vegetal, sintetizada en la punta del coleóptilo y cuya distribución asimétrica resultó en un doblamiento del coleóptilo opuesto al lugar con mayor concentración. Esta sustancia fue llamada inicialmente Wuchsstoff por Went y posteriormente auxina (del griego auxein, 'crecer o elongarse'). El compuesto finalmente fue identificado como el ácido indol-3-acético (AIA) (Wildman, 1997). Desde la primera discusión sobre el término fitohormona por Julius von Sachs, varios reguladores químicos del crecimiento han sido identificados en plantas. Las plantas usan una gran variedad de hormonas, incluyendo esteroides y péptidos, así como las cinco fitohormonas clásicas: auxinas, ácido abscísico, citocininas, etileno y giberelinas, mientras que los brasinoesteroides, jasmonatos, salicilatos, estrigolactona y el óxido nítrico han sido reconocidos como nuevas fitohormonas. (Santner y Estelle, 2006). A diferencia de sus contrapartes en animales, las hormonas vegetales son moléculas pequeñas relativamente simples, capaces de actuar a bajas concentraciones para regular diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de plantas. Cada aspecto del desarrollo de la planta se encuentra de cierta forma bajo control hormonal. Una sola hormona es capaz de controlar una gran diversidad de procesos de desarrollo, mientras que a menudo, varias hormonas al mismo tiempo regulan un solo proceso (Gray, 2004). Algunos ejemplos bien estudiados del efecto de las fitohormonas sobre procesos de desarrollo vegetal son: la promoción de la maduración del fruto por etileno; la división y elongación celular, la diferenciación vascular y el desarrollo de raíces laterales por el AIA; el ácido jasmónico en el desarrollo del polen y la respuesta a invasión por patógenos; los brasinosteroides en la regulación de la elongación celular y la fotomorfogénesis; las giberelinas en la promoción de la germinación y el florecimiento; el ácido abscísico en la respuesta al estrés hídrico (Gray, 2004). Las fitohormonas pueden ser transportadas a diferentes tejidos de la planta, pero algunas como el etileno pueden actuar directamente sobre las células o el tejido donde es producido. La forma en que las hormonas vegetales afectan el crecimiento y desarrollo vegetal depende de la localización de la fitohormona (que depende de la síntesis y transporte de las mismas), la homeostasis de las fitohormonas (regulada a través

de biosíntesis, degradación y conjugación) y la respuesta del tejido (que involucra la presencia de receptores y componentes de la vía de transducción de señales (Davies, 1995).

2.2.1. Participación de las auxinas sobre el crecimiento y desarrollo vegetal

Las auxinas son un pequeño grupo de moléculas con una gran capacidad para inducir respuestas de crecimiento en plantas, las cuales se han identificado en varios organismos como humanos, animales y microorganismos. El AIA es la auxina predominante en plantas y es una fitohormona indispensable con habilidad de regular múltiples aspectos del desarrollo vegetal (Teale *et al.*, 2006). El efecto de las auxinas sobre el crecimiento de la planta depende del tipo y concentración de la auxina aplicada. Se ha descrito que las auxinas participan en procesos importantes de organogénesis y desarrollo, incluyendo la división y diferenciación celular, las respuestas trópicas a luz y gravedad, el desarrollo vascular, así como la modulación de la arquitectura de la raíz y el follaje (Morquecho-Contreras y López-Bucio, 2010).

2.2.2. Transporte y señalización de las auxinas

El transporte y distribución permite establecer un gradiente de auxinas en las plantas mediante la ubicación específica de transportadores de entrada (influjo) y salida (eflujo) en las membranas celulares (Petrásek *et al.*, 2006). Para transportar a las auxinas recién sintetizadas (producidas principalmente en partes jóvenes en desarrollo como el ápice foliar y las hojas emergentes) las plantas han desarrollado dos tipos de sistemas de transporte: I) a través del floema, denominado transporte no polar o pasivo, y II) célula a célula, conocido como transporte polar de auxinas (TPA) o transporte activo (Michniewicz *et al.*, 2007). En el primero, las auxinas y otros compuestos indólicos, se mueven a larga distancia a través del floema junto con los fotosintatos hacia diversos tejidos blanco (Michniewicz *et al.*, 2007). El TPA,

por otra parte, es fundamental para la distribución de las auxinas a través de distancias cortas y de célula a célula mediante diversos transportadores. Los AUX1/LAX (AUXIN RESISTANT 1/LIKE-AUX1) son transportadores de influjo, mientras que los de eflujo forman dos grupos: los transportadores PIN (PIN-FORMED) y los transportadores ABCB/MDR/PGP (ATP-binding cassette B/Multidrug Resistant/P-glicoproteínas) (Petrásek y Friml, 2009). Tanto los transportadores de influjo como los de eflujo establecen el gradiente de auxinas, el cual es regulado por la expresión y localización subcelular de las proteínas transportadoras en respuesta a señales ambientales (como la luz y la gravedad) y durante el desarrollo (Friml, 2010). Los máximos de auxinas locales y los gradientes de concentración dirigen la diferenciación celular y la embriogénesis. Así, las señales de auxinas son convertidas en respuestas de desarrollo dependientes del contexto ambiental.

La vía de señalización de auxinas mejor caracterizada es la nuclear (Mockaitis y Estelle, 2008). Los componentes clave de esta vía de señalización de auxinas son las proteínas F-BOX TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN), la familia de represores transcripcionales Aux/IAA (AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID) y las proteínas de unión a secuencias específicas del ADN llamadas ARFs (AUXIN RESPONSE FACTORS). Cuando los niveles de auxinas son bajos, los represores transcripcionales Aux/IAA interactúan con los factores ARF, las cuales ocupan específicamente elementos promotores de respuesta a auxinas (AuxREs) en numerosos genes regulados por auxinas. Las proteínas Aux/IAA reprimen la función de los ARF ya sea manteniéndolos secuestradas lejos de sus promotores o mediante el reclutamiento de los co-represores TOPLESS (TPL)/TLP-RELATED (TPR), los cuales conducen a la inactivación de la cromatina y el silenciamiento de los genes blanco de las ARF. Cuando la concentración nuclear de auxinas incrementa, estas son percibidas por un correceptor, formado por TIR1/AFB y Aux/IAA. TIR1/AFB forma parte del complejo de ubiquitina ligasa SCF^{TIR1/AFB} (S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN 1-CULLIN-F-BOX PROTEIN). La formación del complejo ternario TIR1/AFB:Auxina:AUX/IAA permite la poliubiquitinación de los represores Aux/IAA y su subsecuente degradación dependiente del proteosoma 26S (Fig. 8) (Lavy y

Estelle, 2016; Weijers y Wagner, 2016). Dado el profundo impacto de la producción de auxinas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, es necesario que esta producción deba ser balanceada para evitar una respuesta excesiva, por lo cual la vía de respuesta de auxinas implica circuitos de retroalimentación: los ARF activan la transcripción de proteínas Aux/IAA y desencadenan la expresión del micro ARN 847 (*miR847*), el cual inhibe la acumulación de Aux/IAA. Además de la ubiquitinación, al menos otras dos modificaciones postraduccionales alteran la respuesta de las auxinas: TIR1 puede ser S-nitrosilada y la quinasa BIN2 puede fosforilar las ARF para inhibir su interacción con las proteínas Aux/IAA. Otros mecanismos de regulación de la respuesta a las auxinas son: Por autoubiquitinación de TIR1 para controlar los niveles de éste en ausencia de sustrato; por inhibición de TIR1 mediante el micro ARN 393 (*miR393*), el cual es controlado por distintos tipos de estrés y; la vía puede ser secuestrada por *Pseudomonas syringae*, ya que su proteína efectora secretada AvrRpt2 promueve la degradación del represor Aux/IAA (Fig.8).

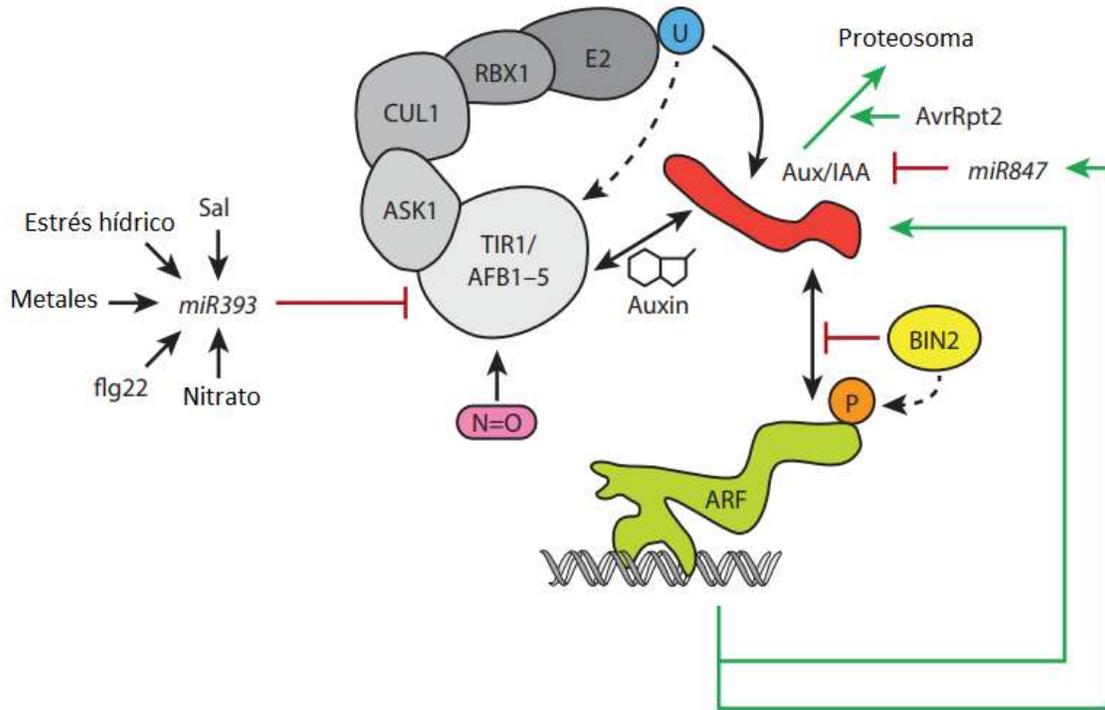


Figura 8. Vía de señalización nuclear de las auxinas. Las auxinas promueven la interacción entre el complejo SCF^{TIR/AFB} (mostrado en color gris) y las proteínas Aux/IAA (rojo), conduciendo a la transferencia de ubiquitina (azul) a estas últimas y su posterior degradación en el proteosoma. Las proteínas Aux/IAA se unen a los factores de transcripción ARF (verde) y los inhiben. Cuando los ARF son liberados de su inhibición, promueven la transcripción de los genes tempranos de respuesta a las auxinas. La respuesta a las auxinas involucra circuitos de retroalimentación, en donde el micro *miR847* inhibe la acumulación de Aux/IAA. TIR1 además de ser susceptible a ser ubiquitinada, es susceptible a ser S-nitrosilada (rosa) y fosforilada (naranja). Otras señales que también regulan la respuesta a auxinas son: la autoubiquitinación de TIR (Flecha punteada); el *miR393* en respuesta a distintos tipos de estrés; la proteína AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae*. Las flechas verdes indican una regulación positiva, y las líneas rojas indican inhibición. Abreviaturas: **ARF**, AUXIN RESPONSE FACTOR; **ASK1**, ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOGUE; **Aux/IAA**, AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID; **BIN2**, BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2; **CUL1**, CULLIN 1; flg22, 22-amino-acid flagellin fragment; **RBX1**, RING-BOX 1; **TIR1/AFB**, TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT 1/AUXIN SIGNALING F-BOX. Modificado de Weijers y Wagner, 2016.

2.2.3. Biosíntesis de las auxinas en las bacterias

La producción del AIA se encuentra ampliamente extendida entre las bacterias que habitan la rizosfera de plantas. Se sospecha que alrededor de un 80% de las bacterias aisladas de la rizosfera son capaces de producir al AIA (Patten y Glick 1996; Khalid *et al.* 2004). Estos microorganismos en su interacción con las plantas pueden interferir con su desarrollo al perturbar su balance de auxinas. Las vías de biosíntesis del AIA en bacterias muestran una similitud con las vías reportadas en plantas, sin embargo, no todos los genes, enzimas o intermediarios bacterianos han sido caracterizados (Patten y Glick 1996; Khalid *et al.* 2004). Se han descrito distintas vías de biosíntesis del AIA dependiente de triptófano en bacterias, dentro de las que se encuentra: I) una dependiente de indol-3-acetamida (IAM); II) otra que depende del ácido indol-3-pirúvico (IPyA); III) una dependiente del indol-3-acetonitrilo (IAN); IV) una dependiente de Indol-3-acetaldehído (IAAld) en la que la triptamina es el precursor y; V) la vía en la que el triptófano es convertido directamente en IAAld y éste es oxidado a AIA como en la vía IPyA (Costacurta y Vanderleyden, 1995). Con respecto a vías de biosíntesis de auxinas independientes de triptófano en bacterias, no se ha encontrado evidencia genética o bioquímica sólida que respalde los modelos propuestos. Un cuerpo creciente de evidencias señala al AIA como una molécula de señalización en las interacciones planta-microorganismos, debido a que estas afectan la expresión de genes en algunos microorganismos (Spaepen y Vanderleyden, 2011).

2.3. Sistema de percepción de quórum

Las bacterias utilizan pequeñas moléculas para la comunicación celular, necesarias para regular una gran variedad de procesos dependientes de la densidad poblacional, tales como virulencia, simbiosis, formación de biopelículas, producción de antibióticos, motilidad y esporulación (Miller y Bassler, 2001). Este mecanismo de regulación de la expresión genética, en coordinación con la densidad

poblacional, es conocido como percepción de quórum o quorum sensing (QS). En él, las bacterias se comunican mediante la producción y excreción de pequeñas moléculas conocidas como autoinductores, que funcionan como señal para inducir la expresión genética colectiva. El primer sistema de percepción de quórum descrito fue el de la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri*, el cual es controlado por las proteínas, Lux-I y Lux-R, encargadas de regular la expresión del operón de la luciferasa (*luxICDABE*). Lux-I es la sintasa del autoinductor, una acil homoserina lactona (AHL), formada por un anillo de homoserina lactona unido a una cadena (N)-acil de ácido graso mediante un enlace amida (Engebrecht y Silverman, 1984). La concentración del autoinductor aumenta cuando crece la densidad poblacional celular. Lux-R es el receptor citoplasmático del autoinductor. Las proteínas Lux-R se unen a moléculas de AHL que han alcanzado una concentración estimuladora mínima, y el complejo Lux-R/autoinductor activa la transcripción de sus genes blanco (Engebrecht *et al.*, 1983; Miller y Bassler, 2001). La bacteria *V. fischeri* coloniza el órgano emisor de luz del calamar *Euprymna scolopes*, donde se multiplica y alcanza una alta densidad poblacional, lo que permite la expresión de los genes requeridos para la luminiscencia. El calamar es beneficiado por la luz que le proporciona la bacteria para ocultarse en la superficie de las aguas y así evitar a sus depredadores (Visick *et al.* 2000). Un gran número de bacterias gram-negativas poseen proteínas tipo LuxI/R y usan moléculas de AHL para regular su sistema de percepción de quórum (Manefield y Turner, 2002).

2.3.1. Sistema de percepción de quórum en *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una especie de bacteria gram-negativa, patógeno oportunista en humanos y plantas. Varios estudios con respecto a los sistemas de QS de *P. aeruginosa* se han realizado, y éstos indican que un 5-20% de sus genes y proteínas están sujetos a regulación por QS (Bauer y Mathesius, 2004). Se han identificado en *P. aeruginosa* dos sistemas de QS interrelacionados: el LasR-LasI regulado por la N-(3-oxodecanoil)-homoserina lactona (OdDHL), y el sistema RhlR-

RhII regulado por (N-butirilhomoserina lactona) (BHL) (Fig. 9) (Lee y Zhang, 2015). Cuando las proteínas receptoras LasR y RhIR se unen a sus respectivos autoinductores, OdDHL y BHL, estas son activadas y forman los complejos: LasR-OdDHL y RhIR-BHL. El complejo LasR-OdDHL activa la transcripción de los genes *rhIR*, *rhII*, *lasI* y otros genes de virulencia, mientras que el complejo RhIR-BHL, de manera similar, activa la expresión de *rhIR* y *rhII*. Ambos sistemas de QS regulan la producción de factores de virulencia que le confieren facilidad de infección afectando los pulmones y las vías respiratorias, las vías urinarias, la piel y los tejidos blandos entre otros (Fig. 9) (Miller y Bassler, 2001; Smith e Iglewski, 2003). La importancia del QS para la patogenicidad de *P. aeruginosa* se ha evidenciado mediante el uso de mutantes defectuosas en los sistemas de QS que muestran virulencia reducida o nula (Loh *et al.*, 2002).

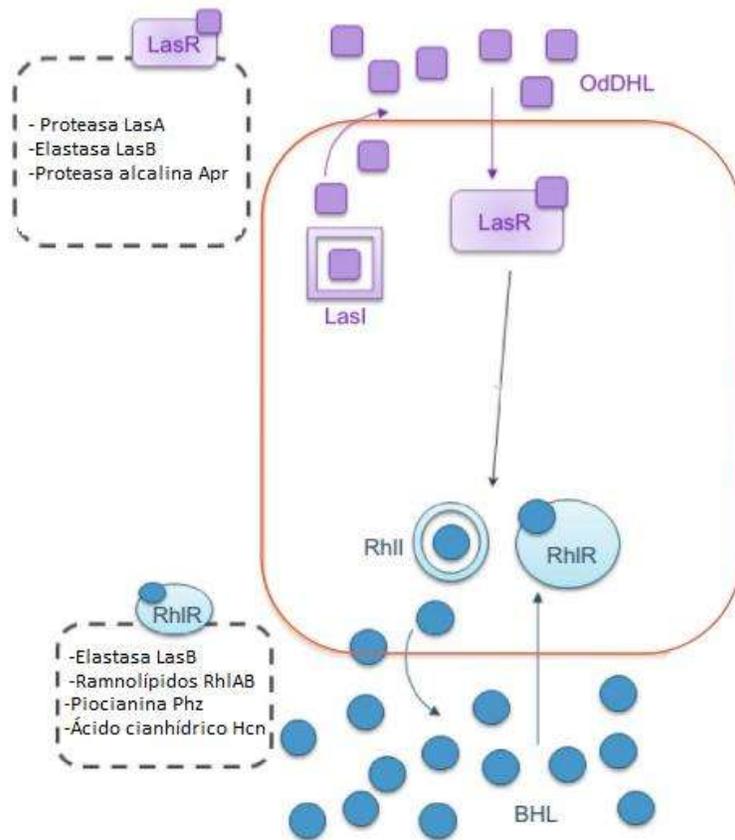


Figura 9. Representación esquemática de los sistemas de QS LasR-LasI y RhIR-RhII de *Pseudomonas aeruginosa*. Las flechas indican un efecto estimulador. Se muestran algunos factores de virulencia regulados por ambos sistemas de QS. Entre los beneficios de estos para *P. aeruginosa* se encuentran: la proteasa LasA participa en la evasión a la respuesta inmune del hospedero y la colonización mejorada; la elastasa LasB participa en la adquisición de hierro extracelular de las proteínas del huésped; La proteasa alcalina Apr participa en la evasión de la respuesta inmune y la colonización del huésped; los ramnolipidos RhIAB participan en la evasión de la respuesta inmune y la formación de biopelículas y; el ácido cianhídrico Hcn participa en la colonización. Modificado de Lee y Zhang (2015).

2.3.2. Respuestas a señales de AHL en eucariontes

Las moléculas de AHL modulan la transducción de señales en animales y en plantas (Telford *et al.* 1998; Mathesius *et al.*, 2003), e incluso las hormonas de los hospederos son capaces de interactuar con las moléculas de QS para modular la expresión de los genes bacterianos (Gao *et al.*, 2003; Sperandio, 2003). Varios estudios han aportado evidencias sobre diferentes respuestas en animales inducidas por AHL bacterianas, como: alteración en la inmunidad, aumento de la bradicardia, inhibición de la contracción en el músculo liso, promoción de la apoptosis y la estimulación de respuestas antiinflamatorias (Bauer y Mathesius, 2004). Las plantas, al estar asociadas con bacterias que se comunican mediante AHL, también perciben estas señales. En *Medicago truncatula* se reportó que la aplicación de AHL ocasiona una acumulación diferencial de proteínas involucradas en diversas funciones: respuestas a estrés y de defensa, metabolismo primario, respuesta a fitohormonas, regulación transcripcional, procesamiento de proteínas y actividad del citoesqueleto. (Mathesius *et al.*, 2003). En plantas de tomate se reportó la inducción, por bacterias productoras de AHL capaces de colonizar la raíz, de las respuestas de defensa dependientes del ácido salicílico y un incremento en la resistencia sistémica (capacidad de las células para dispersar una respuesta de defensa a través de toda la planta) contra el patógeno *Alternaria alternata*. Dicho evento fue confirmado mediante mutantes alteradas en la producción de AHL, las cuales no fueron efectivas en la reducción de los síntomas producidos por *A. alternata* (Schuhegger *et al.*, 2006). En otro estudio, realizado también en tomate, se reportó la inducción de las respuestas de defensa en el follaje después del tratamiento con AHL en las raíces. Esta habilidad de las plantas para percibir AHL en un tejido e inducir respuestas sistémicas puede ser de considerable importancia para potenciar las defensas del hospedero (Hartmann *et al.*, 2004). Otra evidencia de una respuesta sistémica producida por AHL, mostró que la exposición de raíces de frijol a homoserina lactona (uno de los productos de la degradación enzimática de las AHL por bacterias de suelo) produce un incremento del 20-30% en la conductancia estomática y la transpiración en el follaje de la planta (Joseph y

Phillips, 2003). Este incremento en la transpiración, producido por la homoserina lactona, dio lugar a un incremento en el flujo de agua y de nutrientes hacia la rizosfera que puede beneficiar tanto a la planta como a la bacteria. En *Arabidopsis thaliana* se encontró que la aplicación de pequeñas concentraciones de AHL producen cambios importantes sobre la arquitectura del sistema radicular (Ortiz-Castro *et al.*, 2008). Todos estos antecedentes respaldan la hipótesis de la participación de las AHL en las interacciones planta-bacteria.

2.3.3. Actividades biológicas sobre eucariontes de las moléculas de QS distintas a las AHL

Además de las AHL, existen otras moléculas de QS capaces de modular la transducción de señales en mamíferos y plantas. Ortiz-Castro *et al.*, 2011, observaron al co-inocular plantas de *A. thaliana* con cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mutantes en los sistemas de QS *lasI* y *lasI/rhII*, un incremento significativo en la producción de biomasa de hojas y raíces, así como cambios en la arquitectura del sistema radicular, sugiriendo que las sintasas de AHL, LasI y RhII, regulan la producción de compuestos involucrados en la producción de biomasa, la división y la diferenciación celular en la raíz de *A. thaliana*. Los compuestos responsables de dicha actividad fueron posteriormente identificados como tres ciclodipéptidos: ciclo (L-Pro-L-Val), ciclo (L-Pro-L-Tyr) y ciclo (L-Pro-L-Phe). Estos tres compuestos activan la respuesta auxínica en las líneas de *A. thaliana DR5:uidA*, mostrando con esto que existen diversos compuestos de QS capaces de modular el crecimiento vegetal y que se favorece la producción de estos compuestos al regular los sistemas de QS (Ortiz Castro *et al.*, 2011).

2.4. Características de los ciclodipéptidos

Los ciclodipéptidos (CDPs) constituyen una numerosa familia de metabolitos secundarios sintetizados predominantemente por microorganismos. Son pequeñas moléculas cíclicas formadas por dos aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos (Belin *et al.*, 2012). El interés en los CDPs naturales se ha incrementado debido a que estas moléculas han mostrado diversas e importantes actividades biológicas: antibacterianas, antifúngicas, antivirales, inmunosupresoras, antiinflamatorias y antitumorales. Además, se han reportado CDPs obtenidos por síntesis química cuyas actividades farmacológicas se han estudiado extensivamente (Belin *et al.*, 2012). Este amplio espectro de las propiedades biológicas de los CDPs abre sus posibles aplicaciones terapéuticas variadas y debido a que su particular sistema heterocíclico se encuentra en varios productos naturales, lo cual constituye una fuente de nuevos compuestos biológicamente activos (Martins y Carvalho, 2007).

2.4.1. Biosíntesis de los ciclodipéptidos

Los ciclodipéptidos son producidos por una gran variedad de organismos, desde bacterias, hasta hongos y animales. Aunque la función biológica de los CDPs en los microorganismos que los producen permanece poco documentada, datos recientes muestran que los CDPs representan una nueva clase de moléculas de señalización de QS en bacterias y tienen además la capacidad de modular la transducción de señales en plantas y en mamíferos (Belin *et al.*, 2012). Los CDPs pueden ser sintetizados a partir de aminoácidos libres por las péptido sintasas no ribosomales (NRPS) usando aminoácidos libres o bien pueden ser sintetizados por ciclodipéptidos sintasas (CDPSs). Estas últimas utilizan tARNs aminoacilados (aa-tARN) como sustrato (Bonfond *et al.*, 2011). Las CDPSs son enzimas pequeñas (26 KDa aproximadamente) mientras que las NRPS son sistemas multienzimáticos de gran tamaño, aproximadamente 10 veces mayor al de las CDPSs. Esta diferencia

probablemente refleja las diferentes estrategias usadas para la activación del grupo carboxilo del aminoácido que es requerida para la formación del enlace peptídico. Las NRPSs sintetizan péptidos de forma independiente de la maquinaria ribosomal, vía su estructura multi modular, la cual se caracteriza por poseer tres dominios centrales: I) de adenilación (A), responsable de la selección, activación y transferencia del aminoácido; II) de tiolación (T), que une covalentemente al aminoácido al tiol del grupo prostético 4-fosfopanteteína y lo transporta al dominio de condensación; de condensación (C), para la formación del enlace peptídico. La liberación del péptido formado de la NRPS está acompañada de la ciclación, a través de la actividad de un dominio de tioesterasa. Las modificaciones subsecuentes como la metilación, reducción o epimerización, pueden ocurrir durante la síntesis del ciclodipéptido (Miller *et al.*, 2016; Reimer *et al.*, 2016). Con respecto a las vías de síntesis de CDPs dependientes de CDPSs, solo tres se han caracterizado completamente en términos de los CDPs producidos y las enzimas involucradas. Dichas proteínas se han caracterizado experimentalmente y cada una presenta distinta actividad: a) α,β -deshidrogenación, b) oxidación del anillo de dicetopiperazina y c) acoplamiento de anillo C–C. Las CDPSs secuestran a los aa-tARN eliminando así la necesidad de activar los aminoácidos. Por tanto, los sustratos de las CDPSs están restringidos a los 20 L-aminoácidos cargados en los tRNAs, mientras que el rango de sustratos para las NRPSs es más amplio. Adicionalmente, los sustratos de las NRPS pueden ser modificados dentro de la enzima por dominios accesorios al introducir modificaciones químicas mientras que, con las CDPSs, las modificaciones químicas solo pueden suceder después de la formación del CDP. Esto parece dar lugar a una mayor complejidad en los CDPs sintetizados vía NRPS que en aquellos sintetizados por las CDPSs. Es interesante notar que las vías de síntesis de CDPs dependientes de CDPSs se han identificado en bacterias, hongos, protozoarios y animales, mientras que las vías dependientes de NRPS sólo se han identificado en bacterias y hongos. Sin embargo, mientras que la función de los CDPs sintetizados vía NRPS usualmente ha sido identificada (como sideróforos o toxinas involucradas en patogenicidad), se desconocen las funciones de los CDPs sintetizados vía CDPSs (Belin *et al.*, 2012).

2.4.2. Efecto de los ciclodipéptidos sobre plantas

Los CDPs han mostrado actividades biológicas relacionadas al desarrollo en plantas, lo cual muestra su importancia en otras áreas además de la medicina, como en la agricultura. En arroz se reportó que el tratamiento con ciclodipéptidos promueve la germinación de semillas bajo estrés por bajas temperaturas e inducen la resistencia al estrés hídrico (Ienaga *et al.*, 1990). En lechuga se ha reportado una promoción del crecimiento en presencia de ciclodipéptidos extraídos de *Penicillium brevicompactum* y de bacterias marinas aisladas del coral *Phalythoa sp* (Kimura, *et al.*, 2005; Cronan *et al.*, 2006). En fracciones de sobrenadantes de cultivos de la bacteria promotora del crecimiento vegetal, *Pseudomonas putida* WCS358, se observó que los compuestos más abundantes fueron cuatro ciclodipéptidos, lo que sugiere que son estos los responsables del efecto promotor del crecimiento vegetal (Degrassi *et al.*, 2002). También se ha reportado que los ciclodipéptidos pueden controlar enfermedades en plantas al inducir la expresión de genes de resistencia a patógenos, incluso cuando no son usados directamente en el sitio de la lesión, promoviendo así el crecimiento vegetal (Park *et al.*, 2013). Ortiz-Castro *et al.*, 2011, reportaron que los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ciclo (L-Pro-L-Val), ciclo (L-Pro-L-Tyr) y ciclo (L-Pro-L-Phe), incrementan significativamente la formación de raíces laterales en *A. thaliana*. Además éstos tres ciclodipéptidos activan la respuesta auxínica en las líneas de *A. thaliana* DR5:uidA.

2.5. El Maíz

2.5.1. Origen y domesticación del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta anual que pertenece a la familia de las gramíneas, donde se incluye a otros cultivos agrícolas importantes como el trigo, arroz, avena, sorgo, cebada y caña de azúcar. Existen varias teorías sobre el origen del maíz, sin embargo, la evolución progresista del teocinte como el ancestro del

maíz es la que ha prevalecido en la comunidad científica y se ha ido consolidando cada vez más (Doebley, 1990; Matsuoka *et al.* 2002). Con respecto a la domesticación y diversificación del maíz existen dos teorías alternativas: a) la del origen multicéntrico, en la que se propone que existieron varios centros de domesticación a partir de las diferentes poblaciones de teocinte y; b) la teoría de un único centro de domesticación, que propone que las poblaciones del teocinte de la raza Balsas o subespecie (*ssp.*) *parviglumis*, se localizaron en el centro de la cuenca del Balsas (oriente de Michoacán, suroeste del estado de México y norte de Guerrero). En ambas teorías se trata de establecer cómo se originó y diversificó el maíz en sus diferentes formas para adaptarse a las condiciones ambientales y a las culturas específicas (Kato *et al.*, 2009).

2.5.2. Descripción botánica del maíz

La planta del maíz es de porte robusto, de fácil desarrollo y de producción anual. El tallo es simple erecto, de elevada longitud, alcanzando una altura de 1 a 5 metros con pocas ramificaciones. El aspecto del maíz recuerda al de la caña de azúcar por la presencia de nudos y entrenudos y una médula esponjosa. Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo. El maíz es de inflorescencia monoica con los órganos masculino y femenino separados dentro de la misma planta. La inflorescencia masculina, también conocida como panícula (o espiga) es terminal, puede ser de color verde, amarilla, rojiza o morada y posee una cantidad muy elevada de polen, del orden de 20 a 25 millones de granos de polen. Las inflorescencias femeninas se localizan en las yemas axilares de las hojas, son espigas de forma cilíndrica que consisten en un raquis central u olote donde se insertan las espiguillas por pares. La inflorescencia femenina marca un menor contenido en granos de polen, de alrededor de 400 a 1000 granos arreglados en un promedio de ocho a 24 hileras por mazorca. En la mazorca cada grano o semilla es un fruto independiente llamado cariósido que está insertado en el raquis cilíndrico u olote; la cantidad de grano producido por mazorca está limitada por el

número de granos por hilera y de hileras por mazorca. Como cualquier otro cereal, las estructuras que constituyen el grano del maíz (pericarpio, endospermo y embrión) le confieren las propiedades físicas y químicas (cómo el color, la textura, el tamaño, etc.) que han sido importantes en la selección del grano como alimento. Desde que se siembran las semillas hasta la aparición de los primeros brotes, transcurre un tiempo de 8 a 10 días, donde se ve reflejado el continuo y rápido crecimiento de la plántula (Kato *et al.*, 2009).

2.5.3. El sistema radicular del maíz

2.5.3.1. Desarrollo del sistema radicular del maíz

Al igual que en otras plantas, la raíz del maíz participa en la captación de agua y nutrientes del suelo, provee soporte estructural a la planta y es el sitio de interacción con factores bióticos y abióticos, determinantes para la productividad del cultivo. (Liedgens *et al.*, 2000; Hochholdinger *et al.*, 2004a).

El desarrollo del sistema radicular del maíz puede ser embrionario y post-embrionario. El primero ocurre por una serie de divisiones asimétricas en las células del cigoto dando lugar a la formación del suspensor y al embrión. Posteriormente, aparece el eje embrionario formado por el meristemo apical foliar y el radicular en el coleóptilo. Finalmente, se desarrollan las estructuras embrionarias formadas por el primer primordio de la hoja, la raíz primaria y las raíces escutelares seminales (Sheridan y Clark, 1994; Chandler *et al.*, 2008; Nardmann y Werr, 2009). Cuando las condiciones ambientales son favorables comienza la germinación, iniciando así el desarrollo post-embrionario. La germinación se caracteriza por la emergencia de la radícula y avanza con el aporte de nuevas células generadas en el meristemo de la raíz, además de la expansión de las células de la zona de elongación (Ishikawa y Evans, 1995). Más allá de esta región, en la zona de diferenciación ocurre la formación de pelos radiculares (Saleem *et al.*, 2010). En conjunto, los procesos de

división, elongación y diferenciación celular dan como resultado el arreglo tridimensional del sistema radicular que lleva a la conformación de la arquitectura de la raíz (Fig. 10B1).

2.5.3.2. La arquitectura de la raíz del maíz

La raíz del maíz muestra una estructura compleja comparada con el sistema radicular simple de *Arabidopsis*. El sistema radicular de *Arabidopsis* muestra una estructura arbórea jerárquica, con una raíz primaria o principal que produce raíces laterales, las cuales a su vez producen raíces laterales de orden superior (Fig. 10A) (Kellermeier *et al.*, 2014). El sistema radicular del maíz está formado por una raíz primaria y raíces escutelares seminales, que se forman endógenamente en el embrión y aparecen durante la germinación. Tanto la raíz primaria como las raíces escutelares seminales son importantes para la captación del agua y los nutrientes, así como para el establecimiento de la planta en el suelo. Las raíces post-embriónicas se forman después de la germinación y continúan creciendo hasta formar un sistema radicular altamente ramificado en las plantas adultas. El sistema radicular post-embriónico está formado por las raíces de corona, las raíces laterales que emergen de los diferentes tipos de raíces y por las raíces aéreas que surgen tardíamente en los nodos del tallo sobre el nivel del suelo (Fig. 10B1 y 10B2) (Hochholdinger y Feix, 1998; Hochholdinger *et al.*, 2004b; Singh *et al.*, 2010). Las raíces de la corona forman la mayor parte del sistema radicular de la planta adulta y son la base para el soporte de la planta, además de que son las responsables de la mayor parte de la captación de agua a través de sus raíces laterales (Sauer *et al.*, 2006). Las raíces aéreas proveen soporte adicional y mayor superficie de absorción de agua y de nutrientes en las plantas adultas (Feldman, 1994). Las raíces laterales en maíz emergen de los diferentes tipos de raíces, entre los 6 a 8 días de edad, y permiten la construcción del sistema radicular ramificado, que aumenta el área de absorción y el volumen de suelo bajo exploración, haciendo más eficiente la toma de agua y nutrientes (López-Bucio *et al.*, 2003; Grzesiak, 2009).

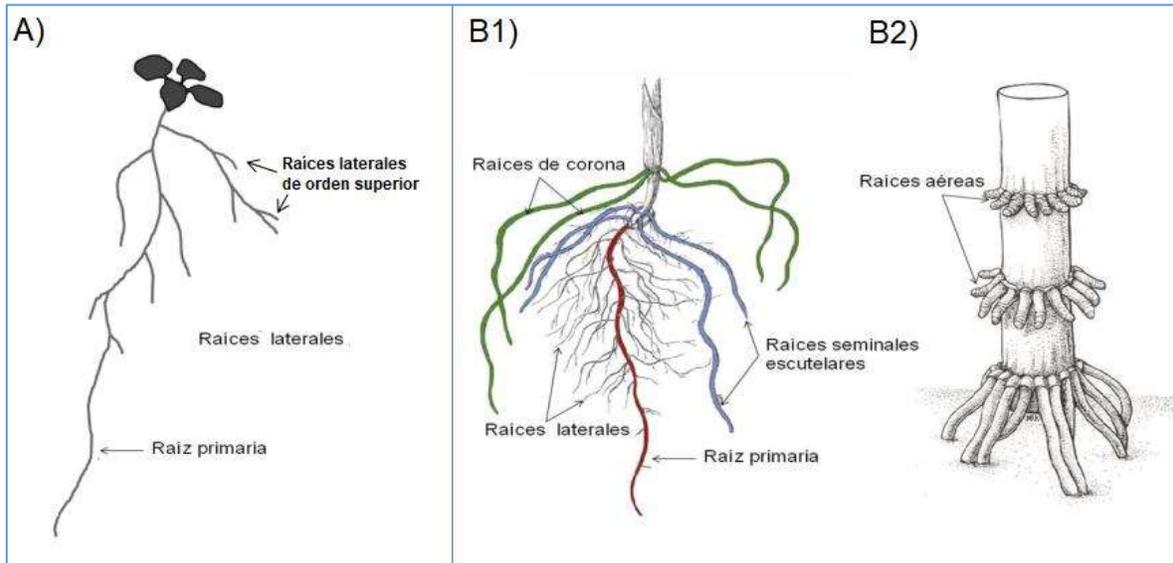


Figura 10. Comparación del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* y del maíz (*Zea mays* L.). **A)** El sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* está conformado por una raíz primaria o principal, las raíces laterales y las raíces laterales de orden superior. **B1)** Planta de maíz de 14 días de edad en la que se muestra la raíz primaria (rojo), las raíces escutelares seminales (azul), las de corona (verde) y las laterales que emergen de los diferentes tipos de raíces. **B2)** Las raíces aéreas del soporte foliar se localizan por arriba del nivel del suelo en una planta de 6 semanas de edad. Modificado de Hochholdinger *et al.*, (2004a); Hochholdinger y Tuberosa (2009a) y Kellermeier *et al.*, (2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* son compuestos capaces de activar la respuesta auxínica y de promover el crecimiento vegetal. Sin embargo, la información respecto a los mecanismos moleculares que subyacen a dichos acontecimientos es limitada, por lo cual es interesante analizar si el efecto promotor del crecimiento de los ciclodipéptidos involucra la participación de la vía de señalización de TOR-S6K en plantas de maíz, la cual se encarga de coordinar el crecimiento celular en respuesta a las condiciones ambientales en eucariontes.

4. HIPÓTESIS

Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* estimulan el desarrollo de plantas de maíz a través de la activación de la proteína S6K del maíz (ZmS6K)

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* sobre el desarrollo de plantas de maíz y la fosforilación de la proteína ZmS6K

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* sobre el crecimiento y el desarrollo del sistema radicular de plantas de maíz
2. Analizar el efecto de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* sobre la fosforilación de la proteína ZmS6K

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material biológico

Para realizar los diferentes diseños experimentales se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) variedad chalqueño, obtenidas de las cosechas 2015/2016, Valle de Chalco, Estado de México, debido a que esta variedad presenta un alto porcentaje de germinación. La mezcla de ciclodipéptidos utilizados en los distintos tratamientos fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.

7.2. Preparación de las semillas

Para cada bioensayo primeramente se sometieron las semillas a una desinfección superficial con una solución de hipoclorito de sodio al 50% v/v y agitación durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de hipoclorito de sodio y se realizaron tres lavados con agua desionizada. Posteriormente, se agregó etanol al 70% v/v y se mantuvo en agitación durante cinco min. Transcurrido este tiempo se retiró el etanol y se realizaron otros tres lavados con agua desionizada. Finalmente, las semillas fueron colocadas en una charola con algodón humedecido con agua

desionizada y se colocaron en una cámara de crecimiento en condiciones de obscuridad a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 h.

7.3. Extracción de plántulas de maíz y desinfección

Transcurrido el periodo de 72 horas, se seleccionaron las plántulas de maíz que presentaron crecimiento homogéneo para proceder a retirar los restos de endospermo con un bisturí, dejando únicamente las plántulas con el escutelo. Posteriormente, en una campana de flujo laminar, se realizó una desinfección, primero con solución de hipoclorito de sodio al 50% v/v por 5 min y, posteriormente, con etanol al 70% v/v durante otros 5 min, realizando 4 lavados con agua desionizada estéril al retirar cada una de estas soluciones.

7.4. Condiciones de crecimiento

Para evaluar el efecto de los ciclodipeptidos sobre el crecimiento del maíz, se utilizó medio MS líquido (Murashige y Skoog, 1962) 1x, suplementado con sacarosa al 2%. Dicho medio contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas. Antes de ser usado en los bioensayos, el pH del medio se ajustó a 6.5 con NaOH 1M y se esterilizó en autoclave. Se utilizaron tubos de crecimiento de 25mm x 150mm, previamente esterilizados en autoclave, colocando dos grupos de tubos en cada experimento: el control, al que se adicionaron únicamente 5ml de medio MS líquido por tubo, mientras que a los grupos con tratamiento se les agregaron 5ml de medio MS líquido con la mezcla de ciclodipeptidos en distintas concentraciones (0.5, 1, 10, 20 y 50 μM). Se colocó una plántula por tubo y estos fueron colocados por 8 días en cámara de crecimiento, con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Transcurridos los 8 días, se realizó el análisis de crecimiento vegetal.

Para evaluar el efecto del tratamiento de plantas de maíz con ciclodipéptidos durante un periodo de exposición más prolongado, se utilizaron semillas de maíz desinfectadas como se describe anteriormente y se colocaron en una charola con algodón humedecido con agua desionizada en obscuridad durante 24 horas a una temperatura 25 ± 2 °C, con el objetivo de estimular y homogenizar la germinación. Transcurrido este periodo, se seleccionaron las semillas que presentaron germinación homogénea y se colocó cada una en una maceta con suelo, previamente esterilizado en autoclave, dejándolas en crecimiento 30 días. Las macetas fueron separadas en dos grupos: el control, cuyo riego se realizó dos veces por semana con agua de grifo esterilizada en autoclave, y el grupo con tratamiento, regado dos veces por semana con agua de grifo estéril, a la cual se le adicionaron los ciclodipéptidos.

7.5. Análisis de crecimiento vegetal

En los ensayos realizados en tubos de crecimiento, transcurrido el periodo del tratamiento de las plantas de maíz con los ciclodipéptidos, se registró la altura de la planta y el crecimiento de la raíz primaria utilizando una regla. El número de las raíces escutelares seminales, de las raíces laterales y de las raíces de corona se determinó mediante el conteo de estas, presentes en cada planta. Para el análisis del crecimiento de las plantas crecidas en suelo, la altura de la planta se registró usando una regla, mientras que la longitud total de la raíz, el número de raíces laterales, el diámetro promedio de las raíces, el volumen de la raíz y el área de superficie fueron obtenidos mediante el análisis con el software Whin-RHIZO Root Imaging Software (Regent Instruments) de las imágenes del sistema radicular de las plantas, tomadas con un equipo Epson Expression 11000XL A3 Flatbed Photo Scanner. El análisis de los datos cuantitativos y las gráficas se analizaron con el programa Graphpad Prism 5 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA) y se realizó un análisis de varianza de una vía con prueba post hoc de Dunnett y una

prueba t-student para muestras independientes. Se utilizaron asteriscos para indicar las medias con diferencia significativa ($P < 0.05$).

7.6 Determinación de la fosforilación de la proteína ZmS6K

Para evaluar el efecto de los ciclodipéptidos sobre la fosforilación de la cinasa S6K del maíz (ZmS6K), a un grupo de semillas previamente desinfectadas y con 22 horas de germinación en las condiciones antes descritas, se le extrajo con un bisturí el eje embrionario. Una vez extraídos estos, estos se colocaron en matraces con medio MS (control) y con medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ciclodipéptidos. Los matraces se mantuvieron en agitación leve durante 2 horas. Los grupos de ejes embrionarios fueron triturados con nitrógeno líquido y se agregó a la muestra un amortiguador para la extracción de las proteínas (pH 7.6, HEPES 50µM, ortovanadato de sodio 1mM, molibdato de sodio 1mM, 1mM EDTA, 1mM benzamidina, 20mM NaF, 80mM beta-glicerofosfato de sodio, 0.2mM PMSF, 2mM DTT). El homogenizado se centrifugó a 9500 rpm durante 30 min a 4°C, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas de acuerdo con el método de Bradford (Bradford, 1976). Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 12%. Posteriormente las proteínas fueron transferidas de los geles a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios: [anti-S6K de maíz (1:1000), anti-p-p70S6K(Thr389) (Santa Cruz biotechnology) (1:1000)], a 4°C y con agitación constante durante toda la noche. Transcurrido este periodo las membranas fueron incubadas con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa) durante dos horas con agitación y finalmente se revelaron mediante el equipo ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Para realizar los ensayos de Western Blot a partir de geles bidimensionales en condiciones desnaturizantes (2D-PAGE), las plantas tratadas y control fueron

diseccionadas en dos partes: raíz y follaje, de las cuales, solo se usó la raíz debido a que en esta zona se observaron efectos por el tratamiento con los ciclodipéptidos. Además, en estos tejidos se logró obtener la mayor concentración de proteínas, permitiéndonos así llevar a cabo adecuadamente los ensayos. Se trituraron los tejidos con nitrógeno líquido y se agregó un amortiguador de extracción junto con una parte igual de solución de fenol (equilibrado con Tris HCl 10mM, pH 8.0, 1mM EDTA). Se homogenizó y se centrifugó a 9000 x g durante 10 minutos. Se recuperó la fase orgánica y se adicionó una cantidad igual de amortiguador de extracción. La muestra se homogenizó y se centrifugó a 9000 x g durante 10 min. Se recupero nuevamente la fase orgánica, a la cual se agregó una solución de precipitación (de acetato de amonio/metanol), para precipitar las proteínas a -20°C durante toda la noche. Transcurrido este periodo, se centrifugó la muestra a 9000 x g durante 10 min, se recuperó el precipitado, el cual se lavó tres veces con solución de precipitación y finalmente con acetona fría al 80%, realizando una centrifugación a 9000 x g durante 5 min entre cada lavado. Las proteínas obtenidas en el precipitado obtenido se disolvieron en buffer de isoelectroenfoque IEF y se cuantificó su concentración de proteínas por el método de Bradford. Se colocó cada muestra de proteínas a una concentración de 150µg totales en tiras de 13 centímetros con un gradiente de pH inmovilizado de 3 a 10 (IPG DryStrip pH 3-10 NL,13 cm, GE Healthcare Life Sciences). Las tiras se dejaron hidratar con las muestras durante toda la noche. La separación de proteínas en la primera dimensión (de acuerdo con su punto isoeléctrico) se realizó con el equipo "Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit". Posteriormente se colocaron las tiras en una cámara de electroforesis con un gel de poliacrilamida al 12% para separar las proteínas en segunda dimensión (de acuerdo con su peso molecular). Finalmente, las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de PVDF para realizar los ensayos de Western Blot con el método antes descrito.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* sobre el crecimiento de plantas de maíz

Para evaluar el efecto del tratamiento de plantas de maíz, durante 8 días, con la mezcla de ciclodipéptidos, se realizaron ensayos aplicando concentraciones de 0.5, 1, 10, 20 y 50 μM de la mezcla de ciclodipéptidos. En ninguno de los casos se observaron cambios ni se encontraron diferencias estadísticamente significativas de la longitud del follaje de las plantas tratadas con ciclodipéptidos o con 12 μM de AIA con respecto al control (Fig. 11).

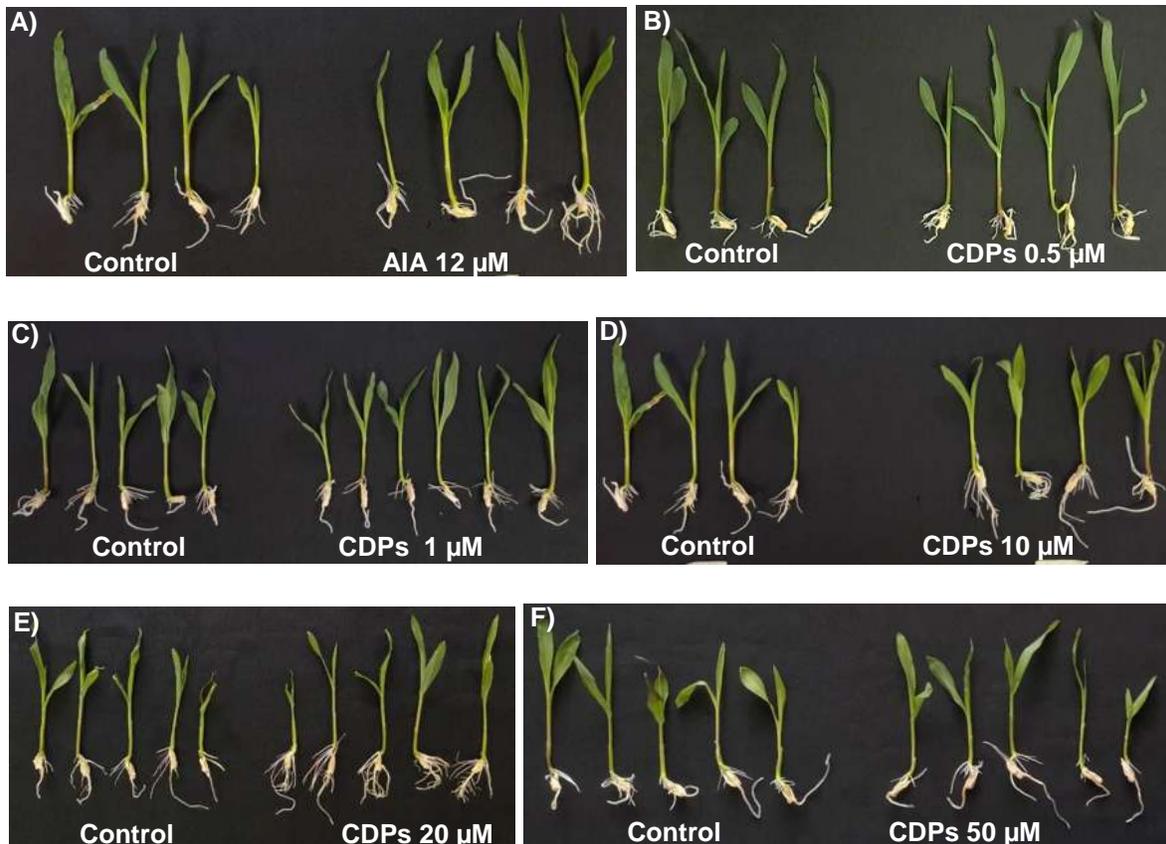


Figura 11. Plantas de maíz tratadas con diferentes concentraciones de ciclodipéptidos. Plantas de 8 días de edad crecidas en medio MS líquido, suplementado con ciclodipéptidos a diferentes concentraciones. **A)** AIA 12 μM , **B)** CDPs 0.5 μM , **C)** CDPs 1 μM , **D)** CDPs 10 μM , **E)** CDPs 20 μM , **F)** CDPs 50 μM . Las fotografías muestran plantas representativas de grupos de por lo menos 8 plantas. Se muestra cada grupo de plantas tratadas comparado con un grupo de plantas control. Abreviaturas: **AIA**, Ácido indol-3-acético; **CDPs**, Ciclodipéptidos.

Con respecto al efecto de los ciclodipéptidos sobre la arquitectura radicular del maíz, únicamente las plantas tratadas con 20 μM de ciclodipéptidos mostraron cambios evidentes sobre el desarrollo de su sistema radicular. Las plantas tratadas con 20 μM de ciclodipéptidos muestran un sistema radicular más desarrollado en relación con los otros grupos tratados con ciclodipéptidos y el control (Fig. 11 E). El análisis estadístico de los parámetros cuantitativos del sistema radicular mostró que el tratamiento con 20 μM de ciclodipéptidos promueve la formación de raíces laterales, de forma similar al tratamiento con 12 μM de AIA (Figura 12 C). Además, se encontró que las plantas tratadas con 20 μM de ciclodipéptidos presentaron un número mayor estadísticamente significativo de raíces seminales con respecto a las plantas control (Fig. 13 D).

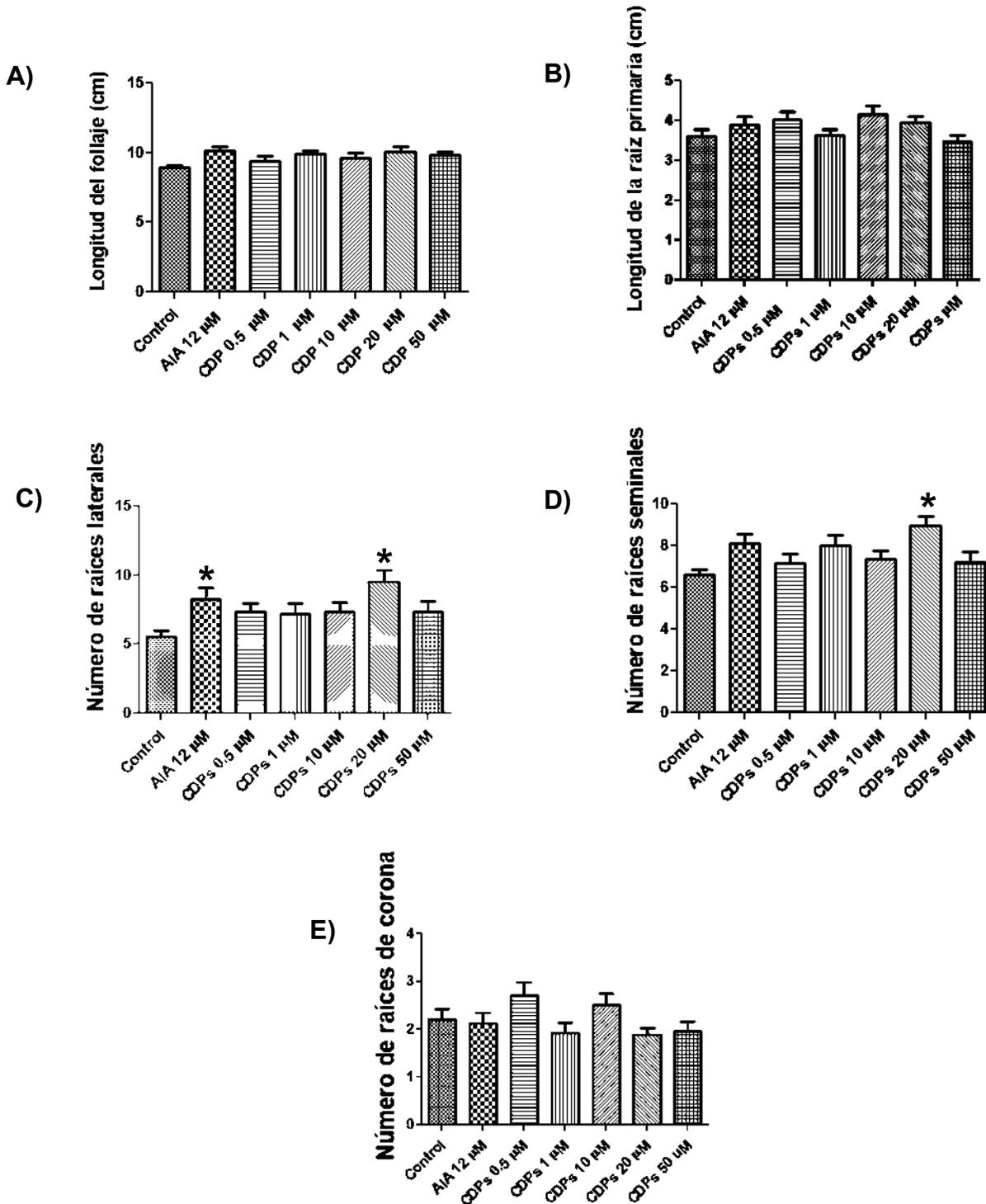


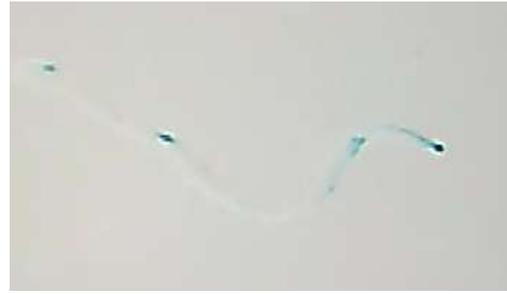
Figura 12. Efecto de los ciclodipeptidos sobre el crecimiento y el desarrollo del sistema radicular de plantas de maíz. A, Longitud del follaje; B, Longitud de la raíz primaria; C, Número de raíces laterales de la raíz primaria; D, Número de raíces seminales; E, Número de raíces de corona. Las columnas con asterisco indican medias que presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de tres experimentos. ($P > 0.05$, ANOVA de una vía; post hoc: prueba de comparación múltiple de Dunnett).

Debido a los resultados negativos sobre la estimulación del crecimiento esperada en las plantas de maíz tratadas con 0.5, 1, 10, 20 y 50 μM de ciclodipéptidos, se evaluó la funcionalidad de la mezcla de ciclodipéptidos en plántulas de *A. thaliana* *DR5:uidA*. Los ciclodipéptidos empleados indujeron la expresión del reportero inducible por auxinas de forma dosis dependiente de acuerdo con lo reportado por Ortiz-Castro *et al.*, 2011 (Fig. 13). Se puede observar, en los distintos tratamientos, un aumento en la expresión del gen *DR5:uidA*, el cual en condiciones control se expresa principalmente en la punta de las raíces (Fig. 13 A), y al incrementar la concentración de los ciclodipéptidos, aumenta la expresión de *DR5:uidA* a lo largo de toda la raíz. Sin embargo, la respuesta auxínica no llega a ser igual, con ninguno de los tratamientos con ciclodipéptidos, a la del tratamiento con 3 μM de AIA (Fig. 13 B, C, D y E)

A) Control



B) CDPs 3 μ M



C) CDPs 12 μ M



D) CDPs 48 μ M



E) AIA 3 μ M

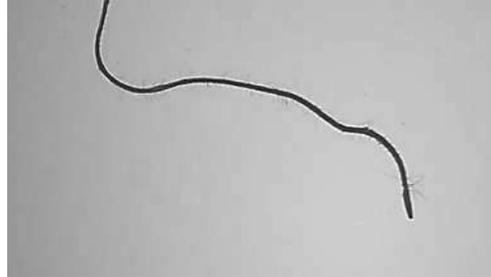


Figura 13. Efecto de ciclodipeptidos sobre la respuesta auxínica en *Arabidopsis thaliana*. A) Control, B) CDPs 3 μ M, C) CDPs 12 μ M, D) CDPs 48 μ M, E) 3 μ M. Imágenes representativas de al menos 30 plantas teñidas.

Debido a los resultados antes mencionados, los siguientes experimentos se realizaron con ciclodipeptidos a concentración de 20 μM . Con la finalidad de evaluar si el tratamiento con 20 μM de ciclodipeptidos, que promueve la formación de raíces laterales y raíces seminales, incide sobre el crecimiento de las plantas a tiempos más prolongados, se evaluó el efecto del tratamiento con ciclodipeptidos en plantas de maíz durante 30 días. Al término del tratamiento se observaron diferencias entre el crecimiento del sistema radicular y el follaje de las plantas tratadas respecto al grupo de plantas control (Fig. 14). El análisis estadístico de los datos cuantitativos sobre la longitud del follaje muestra diferencias significativas de las plantas tratadas con ciclodipeptidos respecto a las plantas control, siendo estas últimas las de menor tamaño (Fig. 16 A).



Figura 14. Plantas de maíz tratadas durante 30 días con ciclodipeptidos. Plantas de maíz de 30 días de edad crecidas en suelo. Durante dicho periodo se adicionaron los CDPs a concentración de 20 μM en el agua de riego, mientras que al grupo control se le aplicó únicamente agua. La imagen muestra un grupo de plantas tratadas con CDPs comparado con un grupo de plantas control. Se muestran plantas representativas de grupos de por lo menos 8 plantas.

Las imágenes obtenidas mediante el escaneo del sistema radicular de las plantas tratadas con 20 μM de ciclodipéptidos, así como de las plantas control, muestran diferencias en la arquitectura de la raíz. Principalmente se puede observar que las plantas tratadas con ciclodipéptidos desarrollaron un mayor número de raíces laterales (Fig. 15 y 16 C).

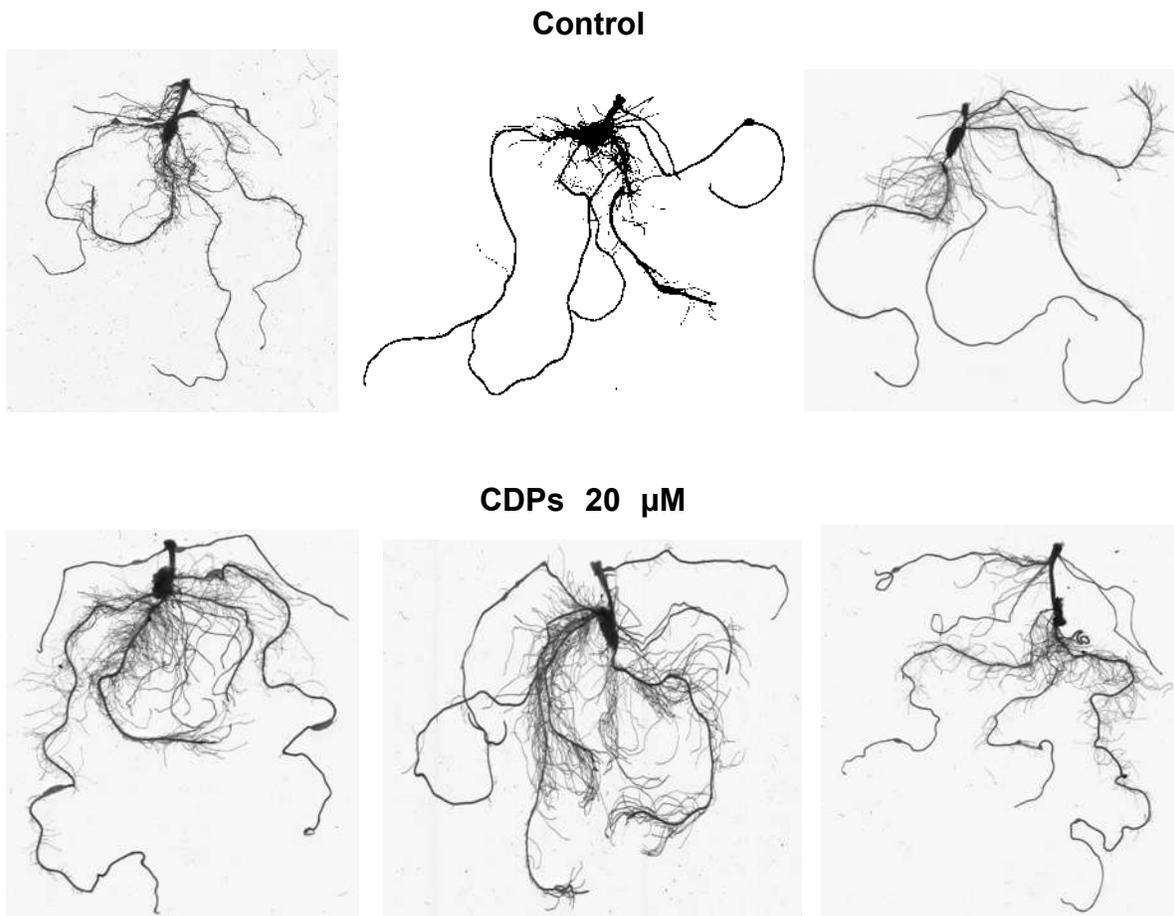


Figura 15. Efecto de los ciclodipéptidos sobre el desarrollo del sistema radicular de plantas de maíz. Imágenes del sistema radicular de plantas de maíz de 30 días de edad. En la parte superior se muestran imágenes representativas del sistema radicular del grupo de plantas control, mientras que en la parte inferior se muestran imágenes del sistema radicular del grupo de plantas tratadas con ciclodipéptidos.

El análisis de los datos obtenidos mediante WinRHIZO sobre el sistema radicular de las plantas de 30 días de edad, mostró que el tratamiento con ciclodipéptidos produce un incremento estadísticamente significativo del número de raíces laterales y del volumen de la raíz con respecto al grupo control (Fig.16 C y E). El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas sobre la longitud total de la raíz, el diámetro promedio de las raíces y el área de superficie radicular de las plantas tratadas con ciclodipéptidos con respecto al grupo control. Sin embargo, en todos los casos se puede observar tendencia a un incremento en los parámetros antes mencionados de las plantas tratadas con 20 μ M de ciclodipéptidos (Fig. 16 B, D y F).

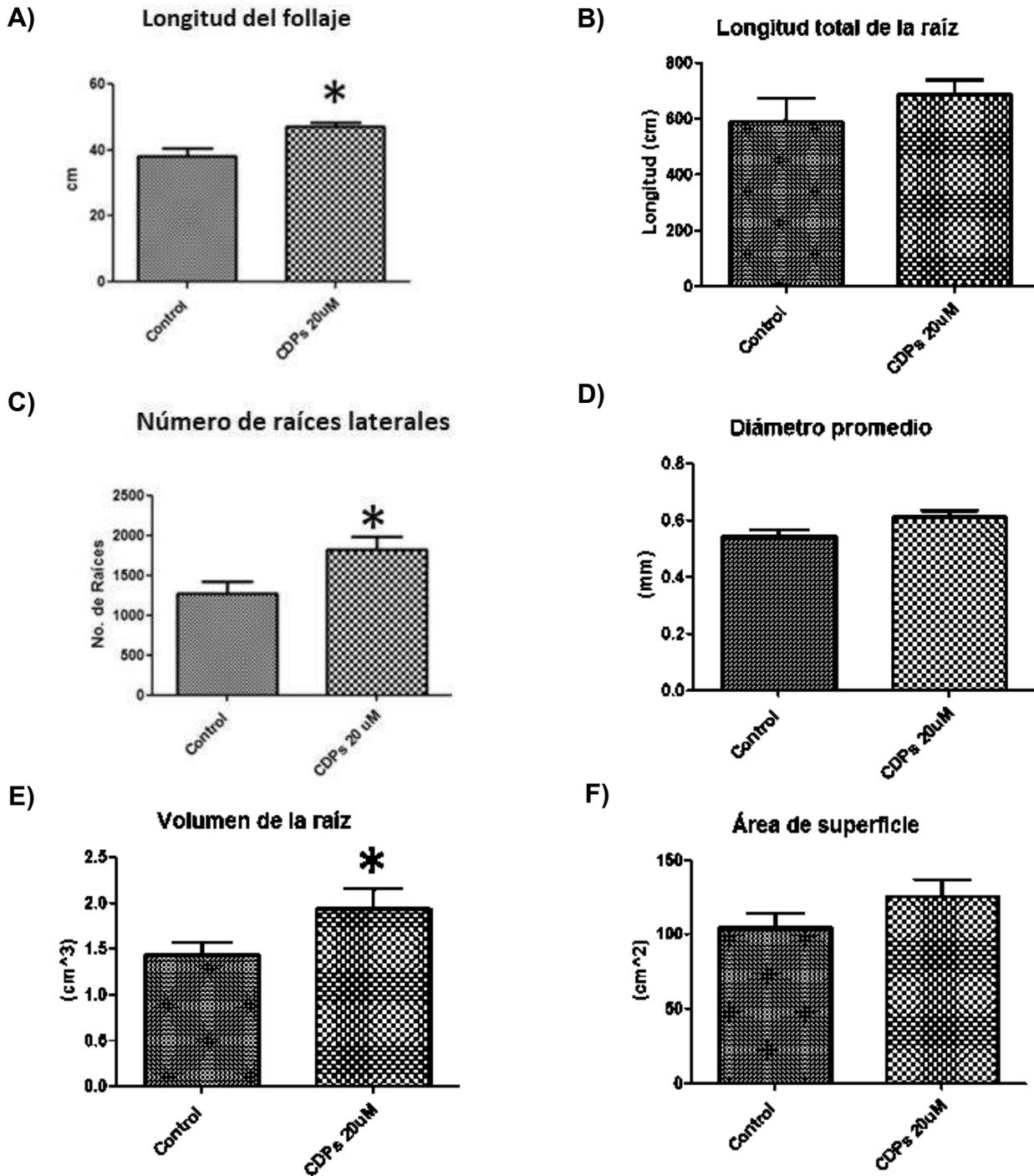


Figura 16. Efecto de ciclodipéptidos a concentración de 20 µM sobre el crecimiento y el desarrollo del sistema radicular de plantas de maíz de 30 días de edad. A) longitud del follaje, B) longitud total de la raíz, C) número de raíces laterales, D) diámetro promedio de la raíz, E) volumen de la raíz, F) área de superficie radicular. Las columnas con asterisco indican medias que presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Las barras representan el promedio ± el error estándar de tres experimentos. (P>0.05, ANOVA de una vía; post hoc: prueba de comparación múltiple de Dunnett).

8. 2 Efecto de los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* sobre la fosforilación de la cinasa S6K de maíz

Para evaluar el efecto de los ciclodipéptidos sobre la fosforilación de la cinasa S6K de maíz (ZmS6K), se realizaron ensayos de Western Blot, a partir de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con ciclodipéptidos produce cambios, dependientes de su concentración, sobre el estado de fosforilación de la proteína ZmS6K, lo cual se pudo observar mediante cambios en la intensidad de las bandas detectadas con anticuerpos contra la p70-S6K de humano fosforilada en Thr389 (p-p70 S6K), que es el sitio fosforilado por TOR, el cual es crítico para la activación de S6K y se encuentra conservado en maíz (Reyes de la cruz *et al.*, 2004) (Fig. 17). Se puede observar que la mayor fosforilación de la cinasa ZmS6K es alcanzada con el tratamiento con 20 μ M de ciclodipéptidos, lo cual correlaciona con los efectos observados en las plantas de maíz tratadas durante 8 y 30 días con 20 μ M de ciclodipéptidos. Estos experimentos también mostraron que la fosforilación de ZmS6K disminuye en el tratamiento con 50 μ M de ciclodipéptidos. Además, la fosforilación de ZmS6K en el tratamiento con 20 μ M, fue mayor incluso que en el tratamiento con 12 μ M de AIA. Mientras que el nivel de la proteína observado con los anticuerpos contra la proteína ZmS6K no se ve afectado en los tratamientos con los ciclodipéptidos, así como con el AIA.

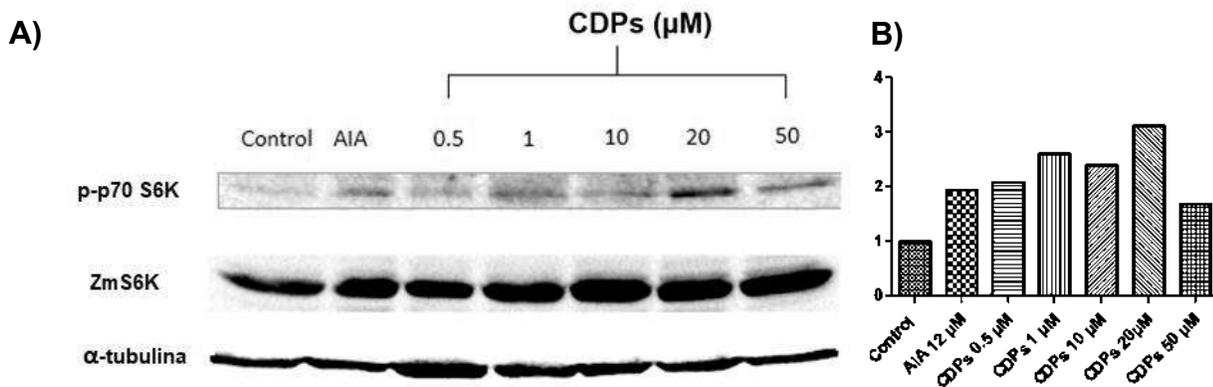


Figura 17. Efecto de los ciclodipéptidos sobre la fosforilación de la ZmS6K. El tratamiento con los ciclodipéptidos mostró inducir la fosforilación de ZmS6K de forma dosis dependiente. **A)** La inmunodetección con anticuerpos contra S6K en su forma fosforilada por TOR (p-p70 S6K) incrementa por el tratamiento con ciclodipéptidos, siendo el tratamiento con 20 μM el que presenta mayor fosforilación con respecto al control y los demás tratamientos. Los niveles de ZmS6K total no cambian por efecto de los ciclodipéptidos. **B)** Cuantificación de la intensidad de las bandas de detección de p-p70 S6K.

Finalmente, se evaluó el efecto los ciclodipéptidos sobre el estado de fosforilación de la proteína ZmS6K en plantas de maíz, mediante ensayos de Western Blot, con anticuerpos contra ZmS6K, a partir de geles bidimensionales (2D-PAGE). Como se mencionó en los antecedentes, S6K es fosforilada en múltiples sitios para su activación. La adición de grupos fosfato añade cargas negativas que producen cambios sobre la movilidad electroforética de ZmS6K, los cuales pueden observarse a partir de ensayos de 2D-PAGE. Los resultados mostraron que el tratamiento con 20 μ M de ciclodipéptidos produce cambios sobre la movilidad electroforética de ZmS6K, los cuales se observan por el desplazamiento de la señal detectada en la región correspondiente a la ZmS6K, ortóloga a la p70 S6K de humano, que es la única caracterizada en maíz (Fig. 18). Un resultado interesante fue la detección de otros puntos de peso molecular más bajo y con distinto punto isoeléctrico respecto a la ZmS6K, los cuales también fueron afectados por el tratamiento con ciclodipéptidos. Se pueden observar los puntos 2, 3, 4 y 6 en el control, cuya intensidad disminuyó con el tratamiento con 20 μ M de ciclodipéptidos. Se observó el caso contrario en el punto 5 en el tratamiento con ciclodipéptidos, cuya intensidad disminuye en el control.

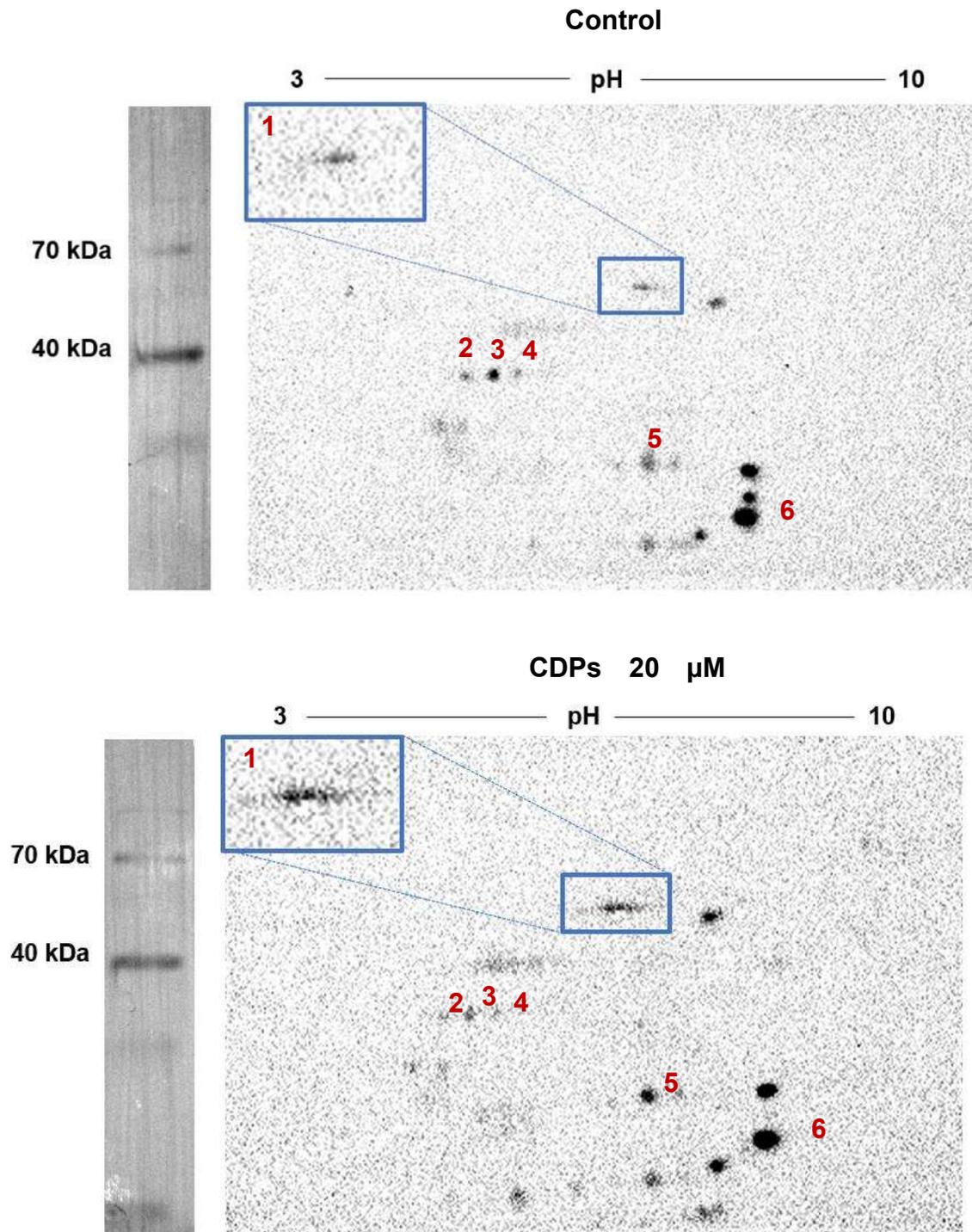


Figura 18. Efecto de los ciclodipeptidos sobre el estado de fosforilación de la ZmS6K. Las fotografías muestran la inmunodetección de la ZmS6K a partir de 2D-PAGE. En la parte superior se muestra el control mientras que en la parte inferior se muestra el tratamiento con ciclodipeptidos a concentración de 20 μM. Los cuadros azules muestran una ampliación de la región correspondiente a la isoforma de ZmS6K ortóloga a la p70-S6K de humano. Los números indican los puntos reconocidos por el anticuerpo contra ZmS6K cuya intensidad cambia en el tratamiento con ciclodipeptidos.

9. DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que el tratamiento de plantas de maíz con los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* durante 8 días, modula la arquitectura de su sistema radicular, promoviendo la formación de las raíces laterales y de las raíces seminales. Este resultado se relaciona con lo reportado por Ortiz-Castro *et al.*, 2011, donde observaron que el tratamiento de plantas de *A. thaliana* de 6 días de edad, con 30 μM de ciclodipéptidos, durante 12 horas, incrementó considerablemente la producción de primordios de raíces laterales. El efecto del tratamiento de plantas de maíz con ciclodipéptidos fue mayor a una concentración de 20 μM , a diferencia de los otros tratamientos, donde no se observaron cambios evidentes. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, respecto al efecto promotor del crecimiento de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* a una concentración de 20 μM sobre plantas de maíz, aportan información adicional a los datos reportados en la patente MX 341145 B, donde se observó que los ciclodipéptidos de *P. aeruginosa* produjeron un incremento significativo en la producción de biomasa en el follaje y la raíz de plantas de maíz en condiciones similares a las empleadas en este trabajo. En dicho trabajo las plantas de maíz fueron crecidas durante 10 días en medio MS líquido al cual se adicionó la mezcla de ciclodipéptidos en concentraciones del rango de 0.1 a 1 μM .

El efecto de los ciclodipéptidos sobre la promoción de la formación de raíces laterales puede estar relacionado con la actividad auxínica de los ciclodipéptidos, ya que la participación de las auxinas ha mostrado ser esencial para la formación de raíces laterales en maíz, lo cual se ha evidenciado mediante ensayos con inhibidores químicos del transporte de auxinas, en los que se muestra que el establecimiento de un máximo de respuesta a auxinas localizado en el floema es crucial para la formación de raíces laterales en maíz, y en cuya ausencia ocasiona divisiones aleatorias de las células del periciclo y la endodermis que no resultan en la formación de nuevos órganos (Jansen *et al.*, 2012). Las raíces laterales son de vital importancia para el desarrollo del maíz dentro de las primeras 2 semanas de

edad, ya que la mayor porción de su sistema radicular está formada por la raíz primaria, raíces seminales y las raíces laterales que emergen de estos. En estas plantas, las raíces laterales han mostrado ser las principales responsables de la absorción de agua en el suelo, mientras que la raíz primaria y las raíces seminales se encargan del transporte de agua hacia la parte aérea de la planta (Ahmed *et al.*, 2015). Se ha reportado que el tratamiento de plantas de maíz con las auxinas ácido indolbutírico (AIB) y ácido 1-naftalenacético (ANA), a concentraciones del rango de 1.5 a 3 μM , promueve la formación de las raíces laterales con acortamiento de la raíz primaria, la cual es un fenotipo de altas concentraciones de auxinas (Martínez de la Cruz *et al.*, 2015). El hecho de que en maíz se requiera una concentración de 20 μM de ciclodipéptidos para observar los efectos promotores de crecimiento sobre el sistema radicular, a diferencia del tratamiento con las auxinas antes mencionadas que requiere concentraciones menores, puede estar relacionado con las observaciones de Ortiz-Castro *et al.*, en 2011, sobre la actividad auxínica de los ciclodipéptidos, evaluada en plantas de *Arabidopsis* con el reportero *DR5:uidA*, ya que en dicho trabajo requirieron concentraciones de ciclodipéptidos más de 20 veces mayores que las de AIA empleadas para observar una expresión del reportero inducible por auxinas similar.

Respecto a la variación en el número de raíces seminales, si bien el número de estas es determinado por el programa de desarrollo intrínseco de la planta de maíz, algunos reportes indican que la iniciación de las raíces seminales se ve afectada por diversos factores, como el nivel de nutrientes (por ejemplo el crecimiento en medio con altos o bajos niveles de fósforo) (Zhu *et al.*, 2006;) y la participación de genes inducidos por auxinas (Taramino *et al.*, 2007), por lo cual los efectos promotores sobre la iniciación de raíces seminales en las plantas tratadas con ciclodipéptidos pueden ser ocasionados por la actividad auxínica de estas moléculas.

La evaluación del efecto de los ciclodipéptidos sobre la formación de raíces de corona no presentó cambios significativos producidos en las plantas tratadas con ciclodipéptidos respecto al control. En arroz, ha sido bien descrita la participación

esencial de las auxinas como reguladores positivos para la formación de las raíces de corona (Inukai *et al.*, 2005) y en maíz se ha reportado que el tratamiento con las auxinas ANA (Ácido 1-naftalenacético) y AIB (Ácido indol-3-butírico), a concentraciones no mayores a 3 μ M, inducen la formación y crecimiento de raíces de corona (Martínez de la Cruz *et al.*, 2015). Probablemente la formación de raíces de corona en los ensayos realizados en este trabajo se vea afectada por el crecimiento de las plantas de maíz en un medio líquido (en el caso de las plantas tratadas durante 8 días), ya que entre las funciones principales de este tipo de raíces se encuentra la de proveer soporte estructural a la planta (Hochholdinger *et al.*, 2004). Si bien se desconoce el cómo las condiciones de crecimiento empleadas en los diferentes experimentos realizados en este trabajo influyen la formación de las raíces de corona, sería interesante evaluar los efectos de los ciclodipeptidos sobre la formación de estas raíces en plantas adultas, cuyo sistema radicular está formado en su mayoría por raíces de corona.

A pesar de que continúa siendo desconocido el mecanismo mediante el cual los ciclodipeptidos promueven el crecimiento vegetal, no se descarta la idea de que estos efectos se deban a que dichas moléculas mimetizan señales tipo auxina. Un análisis computacional de acoplamiento molecular, para evaluar la afinidad de los ciclodipeptidos hacia el receptor TIR1, mostro que los ciclodipeptidos pueden encajar en el bolsillo de unión a auxinas de TIR1, similar a lo mostrado por moléculas con estructura distinta al AIA, capaces de unirse al receptor de auxinas TIR1 de *Arabidopsis* con diferentes afinidades, como el ANA y el 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Ortiz-Castro *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de los ciclodipeptidos sobre la fosforilación de la proteína S6K de maíz (ZmS6K), mostraron que estas moléculas producen cambios sobre la fosforilación de ZmS6K de acuerdo con la concentración utilizada, siendo la concentración de 20 μ M la que produce mayor fosforilación de esta cinasa. Este incremento en la fosforilación de ZmS6K, por efecto del tratamiento con ciclodipeptidos a concentración de 20 μ M, coincide con los efectos observados sobre el crecimiento de la raíz de las plantas tratadas con 20 μ M de

ciclodipéptidos. Los resultados obtenidos al usar anticuerpos contra la proteína ZmS6K total, indican que los cambios en la intensidad de las bandas detectadas por anticuerpos contra la p70S6K en su forma fosforilada, se deben al cambio en la fosforilación de la ZmS6K por efecto del tratamiento con ciclodipéptidos y no a cambios en los niveles de la proteína. Estos resultados muestran la participación de la vía de señalización de TOR-S6K en los efectos promotores del crecimiento vegetal de los ciclodipéptidos. Una observación interesante es que el tratamiento con 20 μM de ciclodipéptidos produce mayor fosforilación de ZmS6K, inclusive que el tratamiento con 12 μM de AIA. Este suceso coincide con los resultados obtenidos sobre el desarrollo del sistema radicular de las plantas de maíz, ya que se encontraron mayores diferencias en los grupos tratados con 20 μM de ciclodipéptidos que en los tratamientos con 12 μM de AIA. Además, se observó que en el tratamiento con ciclodipéptidos a concentración de 50 μM disminuye considerablemente la fosforilación de la cinasa S6K, lo cual puede estar relacionado con los efectos opuestos que ejercen las auxinas a distintas concentraciones. A concentraciones bajas, las auxinas naturales como el AIA estimulan procesos de crecimiento y desarrollo, mientras que al incrementar las concentraciones el crecimiento es interrumpido hasta causar daños letales (Grossmann, 2010).

En concordancia con el resultado anterior, los resultados obtenidos de los ensayos de Western Blot a partir de 2D-PAGE muestran que el tratamiento con ciclodipéptidos a concentración de 20 μM produce cambios sobre la movilidad electroforética de la ZmS6K. Dichos cambios son producidos por la adición de grupos químicos, principalmente la adición de grupos fosfato. S6K es fosforilada para su activación en múltiples sitios, lo cual produce cambios en la movilidad electroforética de la proteína. Cabe mencionar que además de las modificaciones postraduccionales de fosforilación, la proteína S6K es susceptible a otras modificaciones postraduccionales, entre las que se encuentran reportadas la acetilación y ubiquitinación, y cuya función precisa sigue sin ser esclarecida (Panasyuk *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Fenton *et al.*, 2010)

Además de los cambios observados sobre la movilidad electroforética de ZmS6K, se detectaron otros puntos por el anticuerpo contra ZmS6K, los cuales aparentemente sufren cambios en respuesta al tratamiento con ciclodipeptidos. Dichos puntos se encuentran en rangos de pH y peso molecular distintos a la p70S6K, siendo todos de peso molecular más bajo. Puesto que en mamíferos se han reportado distintas isoformas de S6K, incluyendo una variante pequeña (p31-S6K1) que se encuentra trunca en el dominio cinasa (sugiriendo una función independiente a la actividad de cinasa), estos puntos adicionales detectados por el anticuerpo contra ZmS6K que sufren cambios por el tratamiento con ciclodipeptidos posiblemente sean isoformas más pequeñas de S6K aún no identificadas, lo cual constituye una nueva área de investigación de interés, ya que la presencia de otras isoformas de S6K y sus funciones en plantas es un campo aún sin explorar.

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

El tratamiento de plantas de maíz con los ciclodipeptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 durante 8 días promueve el crecimiento vegetal, al modular el desarrollo de su sistema radicular, ya que produce un incremento de las raíces seminales y de las raíces laterales. Mientras que en plantas tratadas con ciclodipeptidos durante 30 días, los ciclodipeptidos promueven el crecimiento del follaje, la formación de raíces laterales y un incremento del volumen de la raíz.

Los efectos promotores del crecimiento de los ciclodipeptidos sobre las plantas de maíz son dependientes de la concentración, siendo el tratamiento con una concentración de 20 μ M el que mostró los mayores efectos sobre el crecimiento, principalmente en la raíz.

Los efectos promotores del crecimiento de los ciclodipeptidos sobre las plantas de maíz involucran la participación de la vía de señalización TOR-S6K. La fosforilación de ZmS6K en respuesta a ciclodipeptidos es dependiente de la dosis, siendo la concentración de 20 μ M de ciclodipeptidos la que produce mayor fosforilación de

ZmS6K. El aumento en la fosforilación ZmS6K, da lugar a que se produzcan las respuestas sobre del crecimiento en las plantas de maíz.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que los ciclodipeptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* promueven el crecimiento de plantas de maíz a través de la activación de la vía de señalización TOR-S6K.

BIBLIOGRAFÍA

Agredano Moreno L T, Reyes de la Cruz H, Martínez Castilla L P, Sánchez de Jiménez E (2007) Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol Biosyst* 11: 794-802

Ahmed M A, Zarebanadkouki M, Kaestner A, Carminati A (2015) Measurements of water uptake of maize roots: the key function of lateral roots. *Plant Soil* 398: 59-77

Backer, J M (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 410: 1–17

Bar-Peled L, Schweitzer L D, Zoncu R, Sabatini D M (2012) Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 150: 1196–1208

Barbosa C, Peixeiro I, Romão L (2015) Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet* 9: e1003529

Bauer W D, Mathesius U (2004) Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr Opin Plant Biol* 7: 429-433

Belin P, Moutiez M, Lautru S, Seguin J, Pernodet J L, Gondry M (2012) The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Nat Prod Rep* 9: 961-979

Ben-Hur V, Denichenko P, Siegfried Z, Maimon A, Krainer A, Davidson B, Karni R (2013) S6K1 alternative splicing modulates its oncogenic activity and regulates mTORC1. *Cell Rep* 3: 103–115

Berkowitz O, Jost R, Pollmann S, Masle J (2008) Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 3430–3447

Bonnefond L, Arai T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Ishitani R, Nureki O (2011) Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(10):3912–3917

Brown E J, Albers M W, Shin T B, Ichikawa K, Keith C T, Lane W S, Schreiber S L (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369: 756–758

Brugarolas J, Lei K, Hurley R L, Manning B D, Reiling J H, Hafen E, Witters L A, Ellisen L W, Kaelin W G, Jr (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 18: 2893–2904

Chandler J, Nardmann J, Werr W (2008) Plant development resolves around axes. *Trends Plant Sci* 13: 78-84

Chauvin C, Koka V, Nouschi A, Mieulet V, Hoareau-Aveilla C, Dreazen A, Cagnard N, Carpentier W, Kiss T, Meyuhas O, Pende M (2014) Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene* 33: 474–483

Cornu M, Albert V, Hall M N (2013) mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 23: 53–62

Costacurta A, Vanderleyden J (1995) Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol* 2: 1-18

Crespo J, Díaz-Troya S, Florencio F (2005) Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 139: 1736–1749

Cronan J M Jr, Davidson T R, Singleton F L, Colwell R R, Cardellina J H II (2006) Plant Growth Promoters Isolated from a Marine Bacterium Associated with *Palythoa* sp. Nat Prod Lett 11:271-278

Darwin C (1880) The power of movement in plants. John Murray, London

Davies P J (1987) The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. En: Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development (Davies P J, Eds). Springer, Dordrecht

Degrassi G, Aguilar C, Bosco M, Zahariev S, Pongor S, Venturi V (2002) Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. Curr Microbiol 45: 250-254.

Deng K, Yu L, Zheng X, Zhang K, Wang W, Dong P, Zhang J, Ren M (2016) Target of rapamycin is a key player for auxin signaling transduction in *Arabidopsis*. Front Plant Sci 7: 1-15

Deprost D, Truong H-N, Robaglia C, Meyer C (2005) An *Arabidopsis* homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. Biochem Biophys Res Commun 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 Rep 8: 864-870

Díaz Troya S, Pérez Pérez M E, Florencio F J, Crespo J L (2008) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. Autophagy 4: 851–865

Dobrenel T, Caldana C, Hanson J, Robaglia C, Vincentz M, Veit B, Meyer C (2016) TOR signaling and nutrient sensing. Annu Rev Plant Biol 67: 24.1–24.25

Doebley J F (1990) Molecular evidence and the evolution of maize. Econ Bot 44: 6-27

Doebley J F (2004) The genetics of maize evolution. Annu Rev Genet 38: 37- 59

Dong P, Xiong F, Que Y, Wang K, Yu L, Li Z, Ren M (2015) Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 6: 1-15

Efeyan A, Zoncu R, Chang S, Gumper I, Snitkin H, Wolfson R L, Kirak O, Sabatini D D, Sabatini D M (2013) Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature* 493: 679–683

Eltschinger S, Loewith R (2016) TOR complexes and the maintenance of cellular homeostasis. *Trends Cell Biol* 26: 148–159

Eng C P, Sehgal S N, Vézina C (1984) Activity of rapamycin (AY- 22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot* 37: 1231–1237

Engbrecht J, Neilson K, Silverman M (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32: 773–781

Engbrecht J, Silverman M (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4154–4158

Feldman L (1994) The maize root. P. 29-37. En: *The maize handbook*. (Freeling M, Walbot V, Eds). Springer, New York: 29-37

Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky A K, Jin S, Lowe S, Levine A J (2007) The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: Stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* 67: 3043–3053

Fenton T R, Gout I T (2011) Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 47–59

Fenton T R, Gwaller J, Ericsson J, Gout I T (2010) Histone acetyltransferases interact with and acetylate p70 ribosomal S6 kinases in vitro and in vivo. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 359–366

Friml J (2010) Subcellular trafficking of PIN auxin efflux in auxin transport. *Eur J Cell Biol* 89: 231-235

Gangloff Y-G, Mueller M, Dann S G, Svoboda P, Sticker M, Spetz J-F, Um S H, Brown E J, Cereghini S, Thomas G, Kozma S C (2004) Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol Cell Biol* 24: 9508-9516

Gao M M, Teplitski M, Robinson J B, Bauer W D (2003) Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 827–834

García Flores C, Aguilar R, Reyes de la Cruz H, Albores M, Sánchez de Jimenez E (2001) A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem J* 358: 95–100

Garrocho Villegas V, Aguilar C R, Sánchez de Jiménez E (2013) Insights into the TOR-S6K signaling pathway in maize (*Zea mays* L.). pathway activation by effector-receptor interaction. *Biochemistry* 52: 9129-9140

Gaubitz C, Oliveira T M, Prouteau M, Leitner A, Karuppasamy M, Konstantinidou G, Rispal D, Eltschinger S, Robinson G C, Thore S, Aebersold R, Schaffitzel C, Loewith R (2015) Molecular basis of the rapamycin insensitivity of target of rapamycin complex 2. *Mol Cell* 58: 977–988

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 Initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68: 913-963

Gray W M (2004) Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *PLoS Biol* 9: e311

Grossmann K (2010) Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action *Pest Manag Sci* 66: 113-120

Grove J R, Banerjee P, Balasubramanyam A, Coffey P J, Price D J, Avruch J, Woodgett J R (1991) Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. *Mol Cell Biol* 11: 5541–5550

Grzesiak M T (2009). Impact of soil compaction on root architecture, leaf water status, gas exchange and growth of maize and triticale seedlings. *Plant Root* 3: 10-16

Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, Mihaylova M M, Mery A, Vasquez D S, Turk B E, Shaw R J (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214–226

Hara K, Yonezawa K, Weng Q P, Kozlowski M T, Belham C, Avruch J (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* 273: 14484–14494

Hartmann A, Gantner S, Schuegger R, Steidle A, Dürr C, Schmid M, Langebartels C, Dazzo F B, Eberl L (2004) N-acyl homoserine lactones of rhizosphere bacteria trigger systemic resistance in tomato plants. En: *Biology of Molecular Plant–Microbe Interactions* vol 4. (Lugtenberg B, Tikhonovich I, Provorov N, Eds) MPMI-Press, St. Paul, Minnesota: 554-556

Haselbacher G N, Humbel R E, Thomas G (1979). Insulin-like growth factor: insulin or serum increase phosphorylation of ribosomal protein s6 during transition of stationary chick embryo fibroblasts into early g1 phase of the cell cycle. *FEBS Lett* 100: 185-190

Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18: 1926–1945

Heitman J, Movva N R, Hall M N (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253:905–909

Hochholdinger F, Feix G (1998) Early post-embryonic root formation is affected in the maize mutant *lrt1*. *Plant J* 16: 247-255

Hochholdinger F, Katrin W, Sauer M, Dembonsk D (2004b) Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific development programmes. *Ann Bot* 93: 359-368

Hochholdinger F, Park W J, Sauer M, Woll K (2004a) From weeds to crops: Genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci* 9: 42-48

Ienaga K, Nakamura K, Kurohashi M, Nakanishi T, Ichii T (1990) Hydroxyproline-containing diketopiperazines inducing drought resistance in rice. *Phytochemistry* 29: 35-39

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K L (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17: 1829–1834

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K L (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nat Cell Biol* 4: 648-657

Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Shibata Y, Gomi K, Umemura I, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2005) Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* 17: 1387-1396

Ishikawa H M, Evans M L (1995) Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol.* 109: 725-727

Jansen L, Roberts I, Rycke R D, Beeckman T (2012) Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize. *Phil Trans R Soc B* 367: 1525–1533

Jastrzebski K, Hannan K M, Tchoubrieva E B, Hannan R D, Pearson R B (2007) Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth Factors* 25: 209-226

John F, Roffler S, Wicker T, Ringli C (2011) Plant TOR signaling components. *Plant Signal Behav* 6: 700-705

Joseph C M, Phillips D A (2003) Metabolites from soil bacteria affect plant water relations. *Plant Physiol Biochem* 41:189-192

Kalender A, Selvaraj A, Kim S Y, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, Kemp B E, Bardeesy N, Dennis P, Schlager J J, Marette A, Kozma S C, Thomas G (2010) Metformin,

independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 11: 390–401

Kamada Y, Fujioka Y, Suzuki N N, Inagaki F, Wullschleger S, Loewith R, Hall M N, Ohsumi Y (2005) Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol* 25: 7239–7248

Kato T A, Mapes C, Mera I M, Serratos J A, Bye R A (2009) Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 116 pp. México, D.F

Kato Y, T A (1984) Chromosome morphology and the origin of maize and its races. *Evol Biol* 17: 219-253

Kellermeier F, Armengaud P, Seditas T J, Danku J, Salt D E, Amtmann A (2014) Analysis of the root system architecture of *Arabidopsis* provides a quantitative readout of crosstalk between nutritional signals. *Plant Cell* 26: 1480-1496

Khalid A, Tahir S, Arshad M, Zahir Z A (2004) Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Aus J Soil Res* 42: 921–926

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld T P, Guan K-L (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 10: 935–945

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13: 132-141

Kimura Y, Sawada A, Kuramata M, Kusano M, Fujioka S, Kawano T, Shimada A (2005) Brevicompanine C, cyclo-(D-Ile-L-Trp), and cyclo-(D-Leu-L-Trp), plant growth regulators from *Penicillium brevicompactum*. *J Nat Prod* 68: 237-239

Kliegman J I, Fiedler D, Ryan C J, Xu Y F, Su X Y, Thomas D, Caccese M C, Cheng A, Shales M, Rabinowitz J D, Krogan N J, Shokat K M (2013) Chemical genetics of rapamycininsensitive TORC2 in *S. cerevisiae*. *Cell Rep* 5: 1725–1736

- Koh P O (2013) Ferulic acid attenuates focal cerebral ischemia-induced decreases in p70S6 kinase and S6 phosphorylation. *Neurosci Lett* 555: 7–11
- Kooijman R (2006) Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine Growth Factor Rev* 4: 305-23
- Lavy M, Estelle M (2016) Mechanisms of auxin signaling. *Development* 143: 3226-3229
- Lee J, Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plant Cell* 6: 26-41
- Li X, Cai W, Liu Y, Li H, Fu L, Liu Z, Xu L, Liu H, Xu T, Xiong Y (2017) Differential TOR activation and cell proliferation in Arabidopsis root and shoot apices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 2765-2770
- Liedgens M, Soldati A, Stamp P, Richner W (2000) Root development of maize (*Zea mays* L.) as observed with minirhizotrons in lysimeters. *Crop Sci* 40: 1665-1672
- Liu Y, Bassham D C (2010) TOR Is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 5: 11883
- Loh J, Pierson E A, Pierson LS III, Stacey G, Chatterjee A (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 5: 285-290
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L. (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6: 280-287
- Madeira da Silva L, Owens K L, Murta S M, Beverley S M (2009) Regulated expression of the *Leishmania major* surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7583–7588
- Maegawa K, Takii R, Ushimaru T, Kozaki A (2015) Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast. *Mol Genet Genom* 290: 2019–2030

- Magnuson B, Ekim B, Fingar D C (2012) Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 441: 1–21
- Mahfouz M, Kim S, Delauney A, Verma D (2006) *Arabidopsis* target of rapamycin interacts with raptor, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18: 477–490
- Manefield M, Turner S L (2002) Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiology* 148: 3762–3764
- Manning B D, Cantley L C (2003) United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling. *Biochem Soc Trans* 31: 573–578
- Martel R R, Klicius J, Galet S (1977) Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 55: 48–51
- Martínez de la Cruz E, García Ramírez E, Vázquez Ramos J M, Reyes de la Cruz H, López Bucio J (2015) Auxins differentially regulate root system architecture and cell cycle protein levels in maize seedlings. *Plant Physiol* 176:147–156
- Martins M B, Carvalho I (2007) Diketopiperazines: Biological Activity and Synthesis. *Tetrahedron* 63: 9923–9932
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe B G, Bauer WD (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1444–1449
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman M M, Sánchez J G, Buckler E, Doebley J (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6080-6084
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6422–6427

Meyuhas O (2015) Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. *Int Rev Cell Mol Biol* 320: 41-73

Meyuhas O, Dreazen A (2009) Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci* 90: 109–153

Michniewicz M, Brewer P B, Friml J (2007) Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book* 5:1-29

Miller B R, Gulick A M (2016) Structural biology of nonribosomal peptide synthetases. *Methods Mol Biol* 1401: 3–29

Miller M B, Bassler B L (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55: 165-199

Mockaitis K, Estelle M (2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 55–80

Montané MH, Menand B (2013) ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *J Exp Bot* 64: 4361–4374

Moreau M, Azzopardi M, Clément G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette M L, Taconnat L, Renou J P, Robaglia C, Meyer C (2012) Mutations in the *Arabidopsis* homolog of LST8/GbL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell* 24: 463–481

Moreau M, Sormani R, Menand B, Veit B, Robaglia C, Meyer C (2010) The TOR complex and signaling pathway in plants. En: *The enzymes*, vol. 27 (Hall M N y Tamanoi F, Eds) Elsevier: 285-302

Morquecho-Contreras A, López-Bucio J (2010) Los reguladores del crecimiento vegetal. En: *Fronteras en la biología del desarrollo de las plantas*. (Beltrán-Peña E, López-Bucio J, Eds). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Moser B A, Dennis P B, Pullen N, Pearson R B, Williamson N A, Wettenhall R E, Kozma S C, Thomas G (1997) Dual requirement for a newly identified phosphorylation site in p70s6k. *Mol Cell Biol* 17: 5648–5655

Nardmann J, Werr W (2009) Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology. En: *Handbook of maize: Its biology* (Bennetzen J L, Hake S C Eds). Springer, New York:105-119

Niles B J, Powers T (2014) TOR complex 2–Ypk1 signaling regulates actin polarization via reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* 25: 3962–3972

Ortiz Castro R, Díaz Pérez C, Martínez Trujillo M, del Río R E, Campos García J, López Bucio J (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 7253-7258

Panasyuk G, Nemazanyy I, Filonenko V, Gout I (2008) Ribosomal protein S6 kinase 1 interacts with and is ubiquitinated by ubiquitin ligase ROC1. *Biochem Biophys Res Commun* 369:339–343

Pardo O E, Seckl M J (2013) S6K2: the neglected S6 kinase family member. *Front Oncol* 3: 191

Park K S, Park J W, Lee S Y, Moon S S, Hong I S (2013) Agricultural agent containing 2,5-diketopiperazine derivative as active ingredient. US 13/810,163. Patent and Trademark Office.

Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian J Microbiol* 42: 207–220

Pende M, Um S H, Mieulet V, Sticker M, Goss V L, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma S C, Thomas G (2004) S6K1- / - /S6K2 - / - mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol* 24: 3112–3124

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

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

Potter C J, Pedraza L G, Xu T (2002) Akt regulates growth by directly phosphorylating TSC2. *Nat Cell Biol* 4: 658-665

Pullen N, Dennis P B, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma S C, Hemmings B A, Thomas G (1988) Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279: 707–710

Reimer J M, Aloise M N, Harrison P M, Schmeing T M (2016) Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase. *Nature* 529: 239–242

Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S, Logan D, Mattoo A, Selvaraj G, Datla R (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 4850–4874

Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B (2015) TOR signalling in plants. *Biochem J* 470: 1–14

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 p70(S6K). *Biochemistry* 2: 533-539

Rispaal D, Eltschinger S, Stahl M, Vaga S, Bodenmiller B, Abraham Y, Filipuzzi I, Movva N R, Aebersold R, Helliwel S B, Loewith R (2015) Target of rapamycin complex 2 regulates actin polarization and endocytosis via multiple pathways. *J Biol Chem* 290: 14963-14978

Robaglia C, Thomas M, Meyer C (2012) Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr Opin Plant Biol* 15: 301-307

Rodríguez López C D, Rodríguez Romero A, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E (2011) Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein Pept Lett* 18: 84-91

Sabatini D M, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder S H (1994) RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78: 35–43

Sabers C J, Martin M M, Brunn G J, Williams J M, Dumont F J, Wiederrecht G, Abraham R T (1995) Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 270: 815–822

Saleem M, Lamkemeyer T, Schutzenmeister A, Madlung J, Sakai H, HansPeter P, Nordheim A, Hochholdinger F (2010) Specification of cortical parenchyma and stele of maize primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin, and cytokinin-regulated proteins. *Plant Physiol* 152: 4-18

Saltiel A R, Kahn C R (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806

Sancak Y, Peterson T R, Shaul Y D, Lindquist R A, Thoreen C C, Bar-Peled L, Sabatini D M (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320: 1496–1501

Sánchez de Jiménez E, BeltránPeña E, Ortiz López A (1999) Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol Plant* 105: 148-154

Santhanam A, Hartley A, Düvel K, Broach J R, Garrett S (2004) PP2A phosphatase activity is required for stress and TOR kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p. *Eukaryot Cell* 3: 1261-1271

Santner A, Estelle M (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* 459: 1071-1078

Sauer M, Jakob A, Nordheim A, Hochholdinger F (2006) Proteomic analysis of shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). *Proteomics* 6: 2530-2541

Saxton R A, Sabatini D M (2017) mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 169: 361-371

Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera Martínez E, Geldreich A, Keller M, Ryabova L A (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J* 32: 1087–1102

Schepetilnikov M, Kobayashi K, Geldreich A, Caranta C, Robaglia C, Keller M, Ryabova L A (2011) Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J* 30:1343–1356

Schepetilnikov M, Makarian J, Srour O, Geldreich A, Yang Z, Chicher J, Hammann P, Ryabova L A (2017) GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *EMBO J* 36: 886-903

Schepetilnikov M, Ryabova L (2017) Auxin signaling in regulation of plant translation reinitiation. *Front Plant Sci* 8:1014

Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmid M, Van Breusegem F, Eberl L, Hartmann A, Langebartels C (2006) Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* 29: 909-918

Sheridan W F, Clark J K (1994) Fertilization and embryogeny in maize. En: *The maize handbook* (Freeling M, Walbot V, Eds). Springer, New York: 1-10

Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma S C (1998) Disruption of the p70s6k/p85s6k gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J* 17: 6649–6659

Shimada K, Filipuzzi I, Stahl M, Helliwell S B, Studer C, Hoepfner D, Seeber A, Loewith R, Movva N R, Gasser S M (2013) TORC2 signaling pathway guarantees genome stability in the face of DNA strand breaks. *Mol Cell* 51 829–839

Singh V, Van Oosterom E J, Jordan D R, Messina C D, Cooper M, Hammer G L (2010) Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. *Plant Soil* 333: 287-299

Smith R S, Iglewski B H (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6: 56-60

Spaepen S, Vanderleyden J (2011) Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a001438

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425–448

Sperandio V, Torres A G, Jarvis B, Nataro J P, Kaper J B (2003) Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8951–8956

Taramino G, Sauer M, Stauffer J L Jr, Multani D, Niu X, Sakai H, Hochholdinger F (2007) The maize (*Zea mays* L.) RTCS gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation. *Plant J* 50: 649-659

Tavares M R, Pavan I C, Amaral C L, Meneguello L, Luchessi A D, Simabuco F M (2015) The S6K protein family in health and disease. *Life Sci* 131:1-10

Teale W D, Paponov I A, Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Rev Mol Cell Biol* 7: 847–859

Tee A R, Manning B D, Roux P P, Cantley LC, Blenis J (2003) Tuberous Sclerosis Complex gene products, tuberin and hamartin, control mTOR signaling by Acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 13: 1259-1268

Telford G, Wheeler D, Williams P, Tomkins P T, Appleby P, Sewell H, Stewart G S, Bycroft B W, Pritchard D I. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 66: 36–42

Thoreen C C, Kang S A, Chang J W, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling R J, Sim T, Sabatini D M, Gray N S (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 284: 8023–8032

Turck F, Zilbermann F, Kozma S C, Thomas G, Nagy F (2004) Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134: 1527-1535

Vézina C, Kudelski A, Sehgal S N (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot* 28: 721–726

Visick K L, Foster J, Doino J, McFall-Ngai M, Ruby E G (2000) *Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *J Bacteriol* 182: 4578–86

Wang M L, Panasyuk G, Gwaller J, Nemazanyy I, Fenton T, Filonenko V, Gout I (2008) Regulation of ribosomal protein S6 kinases by ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 382–38

Weijers D, Wagner D (2016) Transcriptional responses to the auxin hormone. *Annu Rev Plant Biol* 67:539-574

Weng Q P, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb M J, Avruch J (1998) Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific antiphosphopeptide antibodies. *J Biol Chem* 273: 16621–16629

Went F W, Thimann K V (1937) *Phytohormones*. Macmillan, New York

Wildman S G (1997) The auxin-A, B enigma: Scientific fraud or scientific ineptitude?. *Plant Growth Regul* 22: 37-68

Wullschleger S, Loewith R, Hall M N (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484

Xiong F, Dong P, Liu M, Xie G, Wang K, Zhuo F, Feng L, Yang L, Li Z, Ren M (2016) Tomato FK506 Binding Protein 12KD (FKBP12) Mediates the Interaction between Rapamycin and Target of Rapamycin (TOR). *Front Plant Sci* 7: 1746

Xiong Y, Sheen J (2012) Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J Biol Chem* 287: 2836–2842

Xiong Y, Sheen J (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol* 164: 499–512

Xu Q, Liang S, Kudla J, Luan S (1998) Molecular characterization of a plant FKBP12 that does not mediate action of FK506 and rapamycin. *Plant J* 15: 511–519

Yang Q, Guan K L (2007) Expanding mTOR signaling. *Cell Res* 17: 666-681

Zhu J, Mickelson S M, Kaepler S M, Lynch J P (2006) Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. *Theor Appl Genet* 113: 1-1

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136: 2621-2632