



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

**“EFECTO DE LA DEFOLIACIÓN SEVERA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS
REGULADORES MAESTROS DEL METABOLISMO TOR Y SnRK1 EN
AMARANTO DE GRANO DURANTE EL DESARROLLO”**

Tesis que presenta:

IBT. Jonathan José Acosta Bayona

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Biología de Plantas

Director de tesis:

Dr. John Paul Délano Frier

Irapuato, Guanajuato.

Diciembre de 2018

El trabajo aquí presentado fue realizado en el Laboratorio de Fisiología de la Defensa de Plantas, bajo la dirección del Dr. John Paul Délano Frier, del Departamento de Biotecnología y Bioquímica, perteneciente al Cinvestav-IPN, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia de Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto (Beca con número 458182).

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), por la oportunidad de realizar el proyecto.

Al Dr. John Paul Délano Frier, por permitirme trabajar en su laboratorio, por su asesoría, apoyo, enseñanzas, paciencia y diligencia en cuanto a los cuestionamientos del proyecto.

A la auxiliar de Investigación, QFB. Norma Angélica Martínez Gallardo, por su valiosa ayuda y asesoría, en la cuantificación de proteínas total por Bradford, las cinéticas enzimáticas, la preparación de soluciones y las facilidades de reactivos, equipos y espacios en el laboratorio.

A la auxiliar de Investigación, QFB. Barbara Lino, por su entrenamiento y adiestramiento en el protocolo de radiactividad, preparación de soluciones y manejo de equipos especializados en radiactividad, además de proporcionar reactivos y materiales para su desarrollo.

A los doctores sinodales por sus valiosos consejos, aclaraciones y correcciones

Al MC, Ismael Cisneros Hernández

A los compañeros que forman parte del laboratorio, Andrea, Gabriela, Claudia, Ismael, Cecilia, Alessandro que adornaron el ambiente con camaradería y risas.

A mis amigos Moisés, Irving, Paola, Alan, Jorge, Marquitos, Fernando que me acompañaron en estos dos años largos, gracias muchachos, disfrute mucho la compañía.

A los asistentes y encargados del área de administración

A todo el personal del Cinvestav

Y una mención especial para Judith Jazmin Bernal Gallardo, cuya compañía y ayuda marcaron mi vida, dejando un antes y un después, personas que valen la pena, con una increíble personalidad y un amor altruista, muchas gracias por su apoyo y confianza.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	5
3. ANTECEDENTES	7
3.1 ESTRÉS	7
3.1.1 ESTRÉS POR DEFOLIACIÓN	8
3.2 RESPUESTAS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS ANTE EL ESTRÉS POR DEFOLIACIÓN	9
3.3 PERCEPCIÓN DEL DAÑO POR LAS PLANTAS	11
3.4 ONTOGENIA: LAS RESPUESTAS AL ESTRÉS DEPENDEN DE LA EDAD DE LAS PLANTAS	12
3.5 CONSECUENCIAS EN LA DISTRIBUCIÓN Y ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS	15
3.6 REGULADORES MAESTROS DEL METABOLISMO Y EL ESTADO ENERGÉTICO DE LA PLANTA	24
3.6.1 REGULADOR MAESTRO DEL METABOLISMO TOR	26
3.6.2 REGULADOR MAESTRO DEL METABOLISMO SnRK1	34
3.8 EL AMARANTO	43
3.8.1 ANTECEDENTES DEL AMARANTO ANTE EL ESTRÉS POR DEFOLIACIÓN	45
4. HIPÓTESIS	49
5. OBJETIVOS	49
5.1 Objetivo general	49
5.2 Objetivos específicos	49
6. MATERIALES Y MÉTODOS	50
6.1 Material biológico	50
6.2 Obtención de plantas	50
6.3 Experimento de defoliación	51
6.4 Extracción de proteínas para la medición de la actividad cinasa	52
6.6 Síntesis de los sustratos peptídicos para las proteínas cinasas	53
6.7 Ensayo espectrofotométrico de acoplamiento enzimático	54
6.8 Ensayo radiactivo para medir la actividad de las proteínas cinasas	55
6.9 Método de Bradford para cuantificación de proteína total	56
6.10 Análisis estadístico	56

7. RESULTADOS	58
7.1 Síntesis de los substratos peptídicos para las proteínas cinasas	58
7.1.1 AMARA.....	58
7.1.2 PEPTIDO TOR.....	58
7.2 Tiempo de actividad óptimo de las proteínas cinasas SnRK1 y TOR y el ensayo espectrofotométrico de acoplamiento enzimático	60
7.3 Actividad de los reguladores maestros del metabolismo TOR y SnRK1	63
7.4 La máxima actividad de TOR en hoja es en la etapa vegetativa 1	63
7.5 La actividad de TOR en tallo tiende a ser mayor en plantas que sufren tratamiento de defoliación	65
7.6 Los cambios de actividad del complejo TOR en raíces, en respuesta a un estrés por defoliación, son discretos.	67
7.7 La actividad de TOR en panoja aumenta en plantas sometidas a estrés por defoliación	68
7.8 Los cambios en la actividad de SnRK1 en hojas de plantas de amaranto sometidas a defoliación son mínimos	69
7.9 La actividad de SnRK1 sólo se reduce en tallos de plantas de amaranto defoliadas la etapa vegetativa 2.	71
7.10 La actividad de SnRK1 es mayor en raíces de plantas analizadas en etapas vegetativas tempranas, pero no es inducida por el estrés causado por defoliación total	72
7.11 La actividad de la cinasa SnRK1 disminuyó significativamente en panojas de plantas sometidas a estrés por defoliación en la etapa reproductiva EP	74
8. DISCUSIÓN	75
8.1 Actividad del regulador maestro del metabolismo TOR	75
8.2 Actividad del regulador maestro del metabolismo SnRK1	80
9. CONCLUSIONES	87
10. PERSPECTIVAS	88
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo propuesto por Boege y Marquis donde muestra la variación de las respuestas de resistencia o tolerancia a condiciones de estrés, las cuales son dependientes de la etapa ontogénica de las plantas.....	14
Figura 2. Mecanismo general de asimilación y transporte de carbohidratos de órganos fuente a órganos sumideros.....	20
Figura 3. Esquema simplificado de la regulación por fosforilación directa de componentes río abajo por el complejo TOR y sus respectivas funciones.	33
Figura 4. Resumen simplificado de los efectos de SnRK1 sobre procesos celulares, modificados por fosforilación directa de proteínas blanco y su activación por privación de energía.....	42
Figura 5. Árbol filogenético de la secuencia S6K.	59
Figura 6. Cinética de la enzima AMPK en diferentes diluciones por el método espectrofotométrico de acoplamiento enzimático.	61
Figura 7. Gráfica de actividad de la proteína cinasa AMPK homólogo de SnRK1 en mamíferos a través del tiempo.....	62
Figura 8. Gráfica de actividad de la proteína cinasa mTOR a través del tiempo. Grafica de la actividad de cinasa de mTOR a través del tiempo. Se observa un máximo en la fosforilación del péptido mTOR a los 8 min (marcado con puntas de fechas rojas). Este rango de tiempo fue considerado adecuado para medir la reacción.	62
Figura 9. Niveles de actividad de la proteína cinasa TOR en hojas de plantas de <i>A. cruentus</i> sometidas a defoliación total.	65
Figura 10. Niveles de actividad de la proteína cinasa TOR en muestras de tallos de plantas de <i>A. cruentus</i> sometidas a defoliación total.....	66
Figura 11. Niveles de actividad de la proteína cinasa TOR en raíces en plantas de <i>A. cruentus</i> sometidas a defoliación total.	68
Figura 12. Niveles de actividad de la proteína cinasa TOR en muestras de panoja en plantas de <i>A. cruentus</i> sometidas a defoliación total.....	69
Figura 13. Niveles de actividad de la proteína cinasa SnRK1 en hojas de plantas de <i>A. cruentus</i> sometidas a defoliación total.	70
Figura 14. Niveles de actividad de la proteína cinasa SnRK1 en tallos de plantas de <i>A. cruentus</i> sometidas a defoliación total.	72
Figura 15. Niveles de actividad de la proteína cinasa SnRK1 en raíces de plantas de <i>A. cruentus</i> sometidas a defoliación total.	73
Figura 16. Niveles de actividad de la proteína cinasa SnRK1 en panojas de plantas de <i>A. cruentus</i> sometidas a defoliación total.	74

1. RESUMEN

Las plantas, al ser organismos sésiles, se exponen a diversas condiciones de estrés tanto de origen biótico como abiótico. Estas condiciones generan en su metabolismo una serie de consecuencias que alteran su funcionamiento normal, haciendo que la planta cambie sus prioridades funcionales para recuperar su funcionamiento normal. Factores abióticos como sequía, heladas y alta salinidad pueden actuar en combinación con factores de tipo biótico como patogenicidad y herbivoría, generando una condición de estrés más severa, por lo cual la planta debe estar en la capacidad de responder ante estas privaciones energéticas con el fin de sobrevivir. Se ha reportado que a lo largo del tiempo las plantas han desarrollado una serie de respuestas, moleculares, metabólicas y fisiológicas con el fin de superar condiciones de estrés. Se ha encontrado que estas respuestas están orquestadas por dos reguladores maestros del metabolismo, las cuales son proteínas cinasas conocidas como “Sucrose-non-fermenting-1-Related Kinases” o SnRK1 y “Target Of Rapamycin complex” o TOR, que actúan de manera antagonista: una con el fin de preservar energía y mantener homeostasis y la otra para promover el crecimiento y desarrollo. Siguiendo esta línea, la alteración en estos dos reguladores maestros del metabolismo aseguran la supervivencia y el éxito reproductivo, tanto en condiciones de estrés como en condiciones normales.

El Amarantho es una planta dicotiledónea, anual, considerada como un pseudocereal, ya que produce semillas similares a las de cereales, a pesar de no ser una gramínea. Su importancia radica en su alto contenido de proteína total, con un alto valor nutricional, además de que cuenta con alta tolerancia a diferentes tipos de estrés, entre los cuales encontramos la defoliación total. Estudios en plantas de *Amaranthus cruentus* defoliadas, establecieron que éstas recuperan rápidamente su tejido foliar perdido gracias a la activación de meristemas secundarios y metabolización de carbohidratos no estructurales. Lo anterior asegura el éxito reproductivo del amaranto de grano al movilizar las reservas de carbono (C), como el almidón, a órganos menos susceptibles durante condiciones desfavorables. Estas respuestas son dependientes de la etapa de desarrollo, ya que se ha observado que la eficiencia de la respuesta es más alta en etapas tardías del desarrollo vegetativo y en ciertas etapas reproductivas. La evidencia obtenida hasta el momento en amaranto de grano sugiere que la regulación de estos cambios metabólicos no es de origen transcripcional. Por ende, se ha sugerido que esta regulación se da a nivel post-traducciona, con la fosforilación de proteínas claves del metabolismo, como enzimas y/ o factores de transcripción que activan/desactivan genes involucrados tanto en procesos anabólicos como catabólicos.

El objetivo de este trabajo fue dilucidar el comportamiento y las alteraciones en la función de estos reguladores maestros del metabolismo en condiciones de estrés por defoliación total en plantas de *A. cruentus*. El análisis se hizo en diferentes órganos y a través del desarrollo completo de la planta. Los resultados arrojados por análisis de fosforilación con ATP radiactivo de péptidos sintéticos establecieron que la actividad de estos reguladores maestros es dependiente del órgano y la etapa de desarrollo en el cual se produce el estrés por defoliación. La combinación de resultados de este trabajo con aquellos derivados de estudios previos realizados en plantas de amaranto defoliadas sugiere, además, que estos reguladores maestros podrían estar a su vez, regulados por múltiples factores derivados de intrincadas redes de regulación, tanto del anabolismo como del catabolismo, así como por cambios en acumulación de azúcares y relocalización de fotosintatos.

ABSTRACT

Plants are sessile organisms that are exposed to various stress conditions of both biotic and abiotic origin. These conditions generate metabolic changes that trigger a series of responses that alter their normal functioning. Therefore, the plant is forced to change functional priorities to recover its normal operation. Abiotic factors, such as drought, frost, salinity can act in combination with biotic factors such as pathogenesis and herbivory, thereby generating a more severe stress condition. For this reason, the plant must be able to respond to these highly energy depriving alterations in order to survive. It has been reported that plants have developed through time a series of molecular, metabolic and physiological responses in order to overcome these stress conditions. In turn, these responses are orchestrated by two master regulators of metabolism, having protein kinase activity, known as Sucrose-non-fermenting-1-Related Kinases or SnRK1, and Target of Rapamycin complex or TORc, which act antagonistically either to preserve energy and maintain homeostasis or to promote growth and development. Therefore, alterations in these two master regulators of metabolism ensure survival and reproductive success both under stress conditions and under normal conditions.

The amaranth plant is a dicotyledonous annual plant, considered as an alternative cereal crop despite being a pseudocereal. Its main importance lies in the high content of total protein of its seeds, which have a high nutritional value, in addition to having high tolerance to different types of stress. Total defoliation is one of them. Thus, studies in *A. cruentus* defoliated plants, established that these recover rapidly from the loss of leaf tissue by the activation of secondary meristems, and active metabolism and mobilization of non-structural carbohydrates to ensure reproductive success. The latter occurs mostly at the expense of starch reserves, which are re-located to organs less susceptible to unfavorable conditions. Recent studies have found that these responses are dependent on the stage of development, considering that the efficiency of the response has been observed to be higher in late vegetative stages and part of the reproductive stages. So far, all experimental evidence in this respect indicates that the regulation of the metabolic changes is not of transcriptional origin. Therefore, it is considered that it occurs at the post-translational level, partly via the phosphorylation of key metabolic targets, such as enzymes or transcription factors that regulate the expression of their respective genes.

In this work, an attempt was made to elucidate the behavior and alterations in the function of these master regulators of metabolism under stress conditions produced by the total defoliation of *A. cruentus* plants. The activity of these regulators was analyzed in different

organs and measured throughout the complete development of the plant. The results, obtained by analysis of phosphorylation of synthetic peptides using radioactive ATP, provided enough evidence to establish that the activity of these master regulators is dependent on the organ and the stage of development at which the defoliation stress is applied. These results, in combination with additional information obtained from previous defoliation-related studies performed with amaranth plants, suggested that they could also be regulated by multiple factors derived from intricate regulatory networks of both anabolic and/ or catabolic processes, in addition to changes in accumulation of sugars and the relocation of photosynthates.

2. INTRODUCCIÓN

El cambio climático altera la producción de alimentos a nivel mundial, en parte por la incidencia de la contaminación en el ambiente que afectará cultivos que son dependientes del clima, la región y los cambios en los patrones de precipitación, limitando su crecimiento y desarrollo (Parmesan y Yohe, 2003). A pesar de que hay una intención de cambio en cuanto a las emisiones de gases de efecto de invernadero causantes del calentamiento global, es poco probable que se note un cambio de un tiempo para otro, lo cual seguirá afectando el rendimiento de la producción de alimentos, ya que se ha reportado que las variables climáticas que más afectan este rendimiento son la temperatura y la precipitación (Manel et al., 2010). Además se debe tener en cuenta la interacción de organismos patógenos y herbívoros, pues muchos son causantes de grandes pérdidas en el rendimiento de cultivos comerciales, problema que se ha mantenido constante desde inicios de la agricultura (Núñez-Farfán et al., 2007).

La adaptación de los cultivos al cambio climático y la respuesta a factores bióticos representa un reto urgente y de nivel prioritario para la humanidad. Aunque las plantas poseen la capacidad de adaptarse ante variaciones climatológicas, su tolerancia a condiciones de estrés más extremas es discutible. Lo anterior incluye condiciones de estrés que promueven la susceptibilidad a la infestación por organismos patógenos (Hanna et al., 2018). Aunque esta problemática se ha abordado desde hace mucho tiempo con estudios de respuestas de plantas al cambio de temperatura media, precipitación y ataque por bacterias, hongos o herbívoros, poco menos se sabe de la respuesta de éstas a una variabilidad climática y un ataque combinado de condiciones ambientales adversas con enfermedades y plagas. No obstante, gracias a estos trabajos se ha podido encontrar que poblaciones más tolerantes a la variabilidad climática pueden estar asociadas a mecanismos propios de cada variedad de planta apoyados por diferencias genéticas. Por ejemplo, estudios en arbustos, mostraron que estas plantas tienen mayor plasticidad adaptativa a condiciones de escasez de agua (Lázaro-Nogal et al., 2015). En otras plantas, la respuesta al estrés por sequía hace que el ángulo de inclinación de sus hojas cambie, o se enrollen, o que incrementen una relación de peso entre la raíz y la parte aérea. También, hay una inducción de la síntesis de proteínas, que mejora la velocidad de crecimiento, cambios en la transpiración, respiración, fotosíntesis, y distribución de nutrientes, etc. (Quentin et al., 2012). Otras plantas tienen la capacidad de producir ya sean metabolitos secundarios para ahuyentar al herbívoro, “cocteles” antimicrobianos para defenderse de los patógenos e inclusive ser capaces de

generar una muerte celular programada para hacer desistir al atacante, o entorpecer su movimiento desde el sitio e infección. Otras, a su vez, pueden movilizar sus reservas de energía y carbohidratos a órganos menos susceptibles al ataque (Herms y Mattson, 1992). Varios estudios recientes han encaminado la investigación hacia la búsqueda de plantas con respuestas eficientes a variaciones climatológicas y estrés por factores bióticos. Entre éstas puede mencionarse el amaranto, planta cuyo interés agronómico radica, además de la producción de semillas de alto valor nutritivo y el resto de la planta, hojas y tallo, que también contiene alto valor nutritivo, así como, en la tolerancia que muestra ante diversas condiciones de estrés, tanto abiótico como biótico (Rangel et al., 2010).

En este contexto, estudiar los mecanismos de adaptación a condiciones de estrés de origen biótico o abiótico, conociendo las bases moleculares, fisiológicas y bioquímicas, generaría un gran avance en el camino de la aplicación de este sistema a otras plantas de interés agronómico carentes de un mecanismo eficiente de respuesta, lo que impulsaría la supervivencia ante condiciones de estrés severo. Lo anterior tendría el fin de asegurar un rendimiento eficiente y la disponibilidad de alimentos en el futuro.

3. ANTECEDENTES

3.1 ESTRÉS

Las plantas al ser organismos sésiles, se encuentran continuamente expuestas e interaccionando con un amplio rango de factores hostiles, a consecuencia de estas interacciones se desestabiliza el funcionamiento normal de las plantas, generando una serie de cambios metabólicos, fisiológicos y moleculares que tienen como objetivo final recuperar su estado normal y son estos mismos cambios temas de estudio para entender mejor el mecanismo de respuesta de la planta ante estas condiciones (Munns y Tester, 2008; Chinnusamy y Zhu, 2009, Mittler y Blumwald, 2010a). Los tipos de estrés pueden ser clasificados dependiendo de su causalidad. Unos se consideran de tipo abiótico, como por ejemplo la sequía, salinidad, heladas, inundación y alta intensidad de luz (Wang et al., 2003; Agarwal & Grover, 2006; Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Otros son de tipo bióticos, en donde las plantas deben enfrentar la constante amenaza de organismos patogénicos como bacterias, hongos, virus, fitoplasmas, viroides, etc, así como el ataque de insectos herbívoros y otras plagas, como nemátodos (Atkinson y Urwin, 2012). Además, se debe tener en cuenta que también pueden estar expuestas a la combinación de los diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Un ejemplo de esto, lo representa el estudio de Bale et al. (2002), quienes reportaron que el incremento en la temperatura del cultivo facilitó la proliferación de patógenos, demostrándose que la exposición a condiciones de estrés causadas por factores abióticos debilita los mecanismos de defensa de las plantas, incrementando por ende la susceptibilidad de las mismas a la infección (Goel et al., 2008).

Sin embargo, las plantas han desarrollado la habilidad de reconocer y responder específicamente a ciertos tipos de estrés y sus combinaciones. Esto es importante, ya que tanto individual como colectivamente, los tipos de estrés y sus combinaciones, causan efectos negativos sobre el desarrollo y la reproducción de la planta (Suzuki et al., 2014). Muchos estudios se han realizado para conocer los efectos negativos del estrés en el metabolismo de la planta, así como trabajos que describen las consecuencias en la planta con condiciones de estrés combinadas, pero en sí ninguno había podido establecer una relación entre porcentaje de daño y efecto negativo, hasta que un trabajo publicado por Vile et al. (2012) cuantificó estos efectos y los reportó en forma de datos que reflejaron reducciones significativas en la biomasa, peso y número de semillas. Estos resultados fueron congruentes con los publicados previamente por

Prasad et al. (2011). Interesantemente, este trabajo demostró que, aunque todos los tipos de estrés influyen en el desarrollo de la planta, los tejidos reproductivos son los más sensibles al efecto combinaciones de éstos, en contraste con los tejidos vegetativos. Además, se ha visto que cada tipo de estrés tiene un efecto característico en la reproducción de la planta. Éstos pueden afectar desde la fertilidad del polen, el número de granos, el desarrollo del pistilo en las flores, las funciones ovulares, hasta peso y la calidad del grano. (Westgate, 1994; Barnabás et al., 2007).

Cada temporada del año existe el peligro de perder una gran parte del rendimiento del cultivo, como resultado de la devastante exposición, tanto a los diferentes tipos de estrés individuales, como a sus combinaciones. Estas exposiciones van desde condiciones de temperatura extrema hasta la infección por bacterias patógenas (Mittler y Blumwald, 2010b). Y como resultado a esta problemática los efectos causados por estos tipos de estrés están siendo estudiados en laboratorios bajo condiciones controladas, aunque estos trabajos difieren enormemente de lo que ocurre en campo. Aunque se sabe que el rendimiento de un cultivo en campo es muy diferente al obtenido en condiciones controladas, estos estudios nos dan un panorama bastante acertado sobre los mecanismos de respuesta de la planta, lo cual contribuye a revelar que la tolerancia a diferentes tipos de estrés es única y que depende del tipo de planta, su variabilidad genética y su etapa vegetativa. También, generan información útil para diseñar estrategias agronómicamente relevantes con el fin de desarrollar una amplia variedad de cultivos tolerantes al estrés (Pandey et al., 2017).

3.1.1 ESTRÉS POR DEFOLIACIÓN

Las plantas, al ser la principal fuente de alimento para organismos no fotosintéticos, están bajo constante amenaza de invasión o ataque por microorganismos, insectos y/o animales herbívoros (Pandey et al., 2017). En muchos casos, este ataque causa una reducción del área foliar y, por ende, de rendimiento. Las plantas también están expuestas al daño causado por otros animales que aunque no son herbívoros pueden fracturarlas de diferentes formas y a diferentes escalas (Sanson, 2006). En ambos casos se provoca un daño mecánico en las hojas, el cual genera lo que es comúnmente llamado estrés por defoliación. La mayoría de los estudios realizados en este tópico, usan diferentes métodos para causar defoliación y así explorar las asociaciones, diferencias y efectos entre diversos tipos de daño mecánico y de herbivoría por diferentes gremios alimenticios de insectos herbívoros (Matsuki et al. 2004).

El estrés por defoliación no sólo afecta el rendimiento de la planta, como consecuencia de la reducción de su capacidad fotosintética, sino que estudios en árboles, como el pino escocés, demostraron que también tiene un impacto en el ciclado del nitrógeno atmosférico (N₂). También, cambia la proporción en el contenido de ácidos orgánicos en tallo y raíz, pues para compensar la pérdida de biomasa, los árboles incrementan la longitud de sus raíces para la adquisición del nitrógeno necesario para los procesos de crecimiento y biosíntesis (Grüning et al., 2017). Asimismo, en estudios realizados por Saravesi et al. (2008) y Pestaña y Santolamazza-Carbone (2011), se demostró que la escasez de carbohidratos debida a la defoliación temprana resultó en una reducción de biomasa de especies de hongos micorrícicos en semillas de *Pinus sylvestris*. Además de esto, la defoliación incrementó la limitación de carbón en los tejidos sumideros, reduciendo así el crecimiento, independientemente de la reserva de carbohidratos no estructurales (Wiley et al., 2013) y la tasa fotosintética (Pinkard et al., 2011). En plantas monoicas, la defoliación causó efectos asimétricos o morfológicos negativos en la localización de los recursos, limitando así la polinización (Narbona y Dirzo, 2010). Los efectos causados por el estrés por defoliación varían dependiendo de las especies, órgano y distribución espacial del daño dentro de la planta afectada (Maschinski y Whitham, 1989): en algunas especies, la biomasa de la raíz aumenta en plantas que son expuestas a pérdida foliar (Gruner et al., 2008), mientras que en otras, la producción de biomasa de raíz disminuye con el daño foliar debido a la relocalización de nutrientes (Schädler et al., 2004). No se sabe claramente si las plantas pueden superar fácilmente los daños cuando éstos se distribuyen por toda la planta, o cuando están concentrados en un solo órgano (Avila-Sakar y Stephenson, 2006). Por otra parte, se sabe muy bien que la etapa fenológica es un factor crucial en la susceptibilidad de la planta ante el estrés por defoliación (Muro et al., 1998). Teniendo esto en cuenta, los estudios antes vistos se enfocan en obtener un mejor entendimiento de los efectos negativos ocasionados por la defoliación a la planta con el fin de conocer qué factores son claves en la respuesta eficiente de ésta a este tipo de estrés.

3.2 RESPUESTAS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS ANTE EL ESTRÉS POR DEFOLIACIÓN

La defoliación en las plantas, frecuentemente causa impactos que afectan su supervivencia y homeostasis (Lilly Borzak, 2015). Para mitigar tales efectos, han desarrollado una serie de mecanismos compensatorios que les permiten recuperarse

de la pérdida de tejido y daño mecánico (Haukioja y Koricheva, 2000). Que involucran cambios de plasticidad fenotípica en diferentes niveles, que pueden determinar el patrón de cambio en una tasa de crecimiento relativa (la tasa es la cantidad existente de biomasa que puede producir nueva biomasa por tiempo [Tiffin, 2000]). Entre estas respuestas plásticas, se incluye la tasa fotosintética (Quentin et al., 2012), y cambios en la localización de los fotosintatos con el fin de incrementar la producción de nueva área foliar y mejorar el estado de agua de la planta (Camargo et al., 2015). Sin embargo, la respuesta en común de muchas plantas a la defoliación es el aumento en la tasa fotosintética, que es regulada a su vez por otros factores. Para explicar estos factores, se han propuestos dos hipótesis: una de ellas establece que existe cierta relación entre el tejido fuente y el tejido consumidor, donde se sugiere que el incremento de la fotosíntesis es regulada por un balance de los fotosintatos en ambos tejidos (Pinkard et al., 2011). La segunda, implica que la fotosíntesis es regulada por la conductividad hidráulica de toda la planta (Brodribb et al., 2007). Aún no se ha establecido cuál de las dos hipótesis es la más cercana a la regulación de la tasa fotosintética. Sin embargo se puede tener en claro que estos cambios determinan la respuesta general de la planta ante la defoliación, las cuales contribuyen a tolerar los efectos negativos y mantener la homeostasis energética (Núñez-Farfán et al., 2007). Estas respuestas a menudo también están asociadas a otros tipos de estrés que atentan contra la homeostasis de la planta, como en el caso de la sequía (Hatier et al., 2014).

Algunas de las respuestas implicadas en la reanudación del crecimiento después de la defoliación severa, son reguladas por algunas hormonas de crecimiento vegetal. Las giberelinas incrementan el contenido de sacarosa en hoja en etapas tempranas del recrecimiento (Cai et al., 2016). Los jasmonatos ejercen un papel en la identificación de señales y la percepción del daño foliar y se presentan, cambios observados en el tipo y concentración de carbohidratos en las raíces: Ambas respuestas están cercanamente relacionadas a la tolerancia ante la defoliación (Machado et al., 2017).

Las respuestas fisiológicas a la defoliación han sido bien caracterizadas para leñosas y especies perennes. En general, todas involucran la activación de múltiples mecanismos compensatorios que funcionan para el recrecimiento y el aumento de la captación de fotosintatos por medio de la fotosíntesis (Quentin et al., 2010). En árboles, estas respuestas van desde cambios en el crecimiento y grosor de la madera y la anatomía del xilema junto con un aumento del almacenamiento de carbohidratos no-estructurales (Foster, 2017), y la relocalización de nuevos fotosintatos para la producción de nuevas hojas hasta el incremento de la tasa de división celular y de elongación (Borzak et al., 2017). También, se ha encontrado acumulación de compuestos fenólicos en tejidos

foliares residuales del ataque por daño mecánico artificial (Roitto et al., 2008). Experimentos en cultivares de *Vitis vinífera* L. cv Sangiovese, determinaron respuestas comunes en diferentes genotipos ante la defoliación, tales como crecimiento de brotes y cambios en la morfología del fruto en comparación con los controles, además de un incremento en el contenido de azúcares y antocianinas totales (Pastore et al., 2013; Zenoni et al., 2017).

Actualmente, el conocimiento de genes específicos cuya expresión cambia en respuesta a la defoliación y daño mecánico, es muy poco. Sólo unos pocos genes han sido reconocidos como factores que influyen en la regeneración de tejidos de la planta después de la defoliación (Chen et al., 2014). Uno de los genes reportados, relacionado con la respuesta a varios tipos de estrés, entre ellos el daño mecánico, es el gen *Ah24* de función desconocida, aislado de hojas de plantas de amaranto de grano. Este gen se encontró expresado en altos niveles en respuesta a defoliación por insectos masticadores, daño mecánico y la aplicación de ácido jasmónico (JA), la hormona vegetal que regula las respuestas a estos estímulos, entre otros (Sánchez-Martínez, 2015). Por dicho motivo, fue considerado como un posible candidato o indicio para explicar los posibles mecanismos genéticos que controlan las respuestas a estrés por defoliación en amaranto.

3.3 PERCEPCIÓN DEL DAÑO POR LAS PLANTAS

Generalmente, un ataque de insectos o incluso de microorganismos comúnmente induce a la planta a recurrir a defensas químicas para repeler el ataque. De modo que excretan componentes que pueden actuar como repelentes, factores antinutricios o causar efectos tóxicos en el atacante; todos ellos se conocen como componentes de la llamada respuesta de defensa directa (Kessler et al., 2004). No obstante, estas respuestas requieren de nutrientes y energía que no se pueden dar el lujo de gastar en caso de defoliación por daño mecánico. Por lo tanto, surge la siguiente pregunta: ¿Cómo es que las plantas logran diferenciar entre un ataque por herbivoría y el daño mecánico? Con el fin de no emplear más recursos de lo estrictamente necesario, la planta tiene la capacidad de reconocer variables que se encuentran en la alimentación de un insecto y que son carentes en la defoliación por daño mecánico. Una de éstas es la intensidad y extensión del daño, ya que cada ataque por herbivoría posee un patrón de alimentación y en este contexto el patrón de alimentación de una oruga no será el mismo de un pulgón y, muy posiblemente, no será similar al daño mecánico causado por rozamiento con

animales terrestres grandes. Además de esto, la segunda variable le proporciona a la planta moléculas señalizadoras comúnmente conocidas como patrones moleculares asociados a herbivoría (o “herbivore-associated molecular patterns”, o HAMPs, por sus siglas en inglés) o compuestos orgánicos volátiles (O VOCs, por sus siglas en inglés) en el caso de microorganismos (Spiteller et al., 2001; Schmelz et al., 2001). Los “HAMP” son compuestos excretados por cada insecto o microorganismo, que inducen una serie de genes responsables de activar ciertas estrategias de defensa, pero también actividades de sobreexpresión y sobrecompensación encaminadas a cambiar el metabolismo primario (Zhu et al., 2000). Al ser la pérdida de tejido foliar una consecuencia común tanto de la herbivoría como del daño mecánico, los cambios en el metabolismo primario siempre van a mantenerse activos con el fin de mantener la homeostasis, a diferencia del mecanismo de defensa contra herbivoría, que requiere moléculas señalizadoras o patrones de daño determinados por el tipo de alimentación de cada gremio de insecto herbívoro. De esta manera, al no tener recepción de inductores, es concebible que la planta pueda diferenciar entre la pérdida de tejido vegetal causado por herbivoría o por daño mecánico (Mithöfer et al., 2005; Mithöfer y Boland, 2008).

3.4 ONTOGENIA: LAS RESPUESTAS AL ESTRÉS DEPENDEN DE LA EDAD DE LAS PLANTAS

Como todos los seres vivos, las plantas nacen, crecen, se reproducen y mueren. Durante este tiempo, atraviesan una serie de etapas comúnmente conocidas como ontogenia. Estas etapas son predecibles y reconocibles por sus cambios fisiológicos, metabólicos y morfológicos, ya que reflejan el desarrollo. La ontogenia comienza con la germinación de la semilla; la plántula germinada luego sufre transiciones que van desde la emergencia de cotiledones hasta etapas vegetativas tempranas y tardías, hasta alcanzar una madurez que da paso al comienzo de la reproducción y, posteriormente, a la etapa de senescencia. Cada etapa se caracteriza por ciertos cambios en factores determinantes del desarrollo (Barton y Koricheva, 2010). Por ejemplo, la movilización continua de las reservas de carbono encaminadas a asegurar el éxito reproductivo (Hanley et al., 2004). El estrés por defoliación causa efectos negativos para la homeostasis de la planta, ya que altera el equilibrio entre la asimilación y distribución de los fotosintatos del tejido fuente al tejido consumidor, efectos que se ven reflejados en la movilización de reservas de carbono y que a su vez varían con la etapa de desarrollo

de la planta, induciendo diferentes cambios y limitando otros procesos. Se ha reportado que la localización de las fuentes de carbono es un factor determinante que restringe tanto el desarrollo como la respuestas de defensa de la planta (Weiner, 2004). Por tal motivo, se ha establecido considerar el rol de la ontogenia, pues tiene una gran influencia en la medida de la localización de estos recursos, lo que influirá en la disponibilidad de recursos que afectará la eficiencia de la respuesta ante la defoliación (Boege y Marquis, 2005).

El rol de la etapa de desarrollo es una variable clave, ya que la planta debe balancear la respuesta al estrés con la disponibilidad de sus recursos, de manera que no sufra una alteración en sus procesos y su homeostasis energética, ya que cambios en la tolerancia de la planta a través de su desarrollo pueden variar como consecuencias de factores tanto ecológicos como evolutivos (Ehrlén, 2002). Hay dos principales procesos que están asociados a la ontogenia y pueden influir en la localización de recursos: 1) El permanente incremento del tamaño de la planta y el cambio a prioridades funcionales como lo es el desarrollo o la reproducción (Weiner, 2004). La principal variación es el constante incremento del tamaño de la planta, ya que éste requiere de una mayor adquisición de recursos por parte de los órganos, como la raíces y el área foliar, con el fin de seguir aumentando la biomasa. Durante este proceso normalmente se genera un decrecimiento en la actividad metabólica que no esté implicada directamente en el crecimiento activo de la planta (Farnsworth, 2004). 2) El segundo proceso se presenta cuando la planta entra en la etapa reproductiva. En ésta, los órganos, como flores y frutos, exigen más recursos, tomando los fotosintatos almacenados en tallos y raíces, posponiendo otras funciones como la defensa o el mismo desarrollo y crecimiento. Lo anterior será muy dependiente de la estrategia reproductiva de cada especie. En resumen, las prioridades funcionales tales como crecimiento, resistencia, almacenamiento y reproducción también cambian con el desarrollo de la planta, y esos cambios inevitablemente van a influir en la localización de los recursos de la planta y por ende en la disponibilidad de recursos destinados a la respuesta (Zhang y Jiang, 2002).

En este contexto, una vez que el daño por defoliación es percibido, la planta está habilitada para tolerar este daño a diferentes grados, ya que los cambios ontogénicos en la arquitectura de la planta definitivamente influyen en localización de sus recursos y por ende en sus estrategias de respuesta y tolerancia. El estudio más completo en este contexto concluyó que los cambios en la tolerancia de la planta a través del desarrollo no son lineales en cada etapa ontogénica (Boege y Marquis, 2005). En este estudio se incluyeron 5 etapas ontogénicas, usando como modelo pastos perennes conocidos por

ser altamente tolerantes a la pérdida del tejido foliar por daño mecánico artificial. Se encontró que las etapas intermedias son más vulnerables que las etapas tempranas y tardías; debido a que en etapas intermedias estos pastos no cuentan con una reserva de recursos que sustente una respuesta positiva a la tolerancia por defoliación, como sí ocurre en las etapas tempranas, que pueden usar reservas aun presentes en las semillas, y las tardías que pueden usar las reservas ubicadas en tallos y raíces como compensación de la disminución de la fotosíntesis. Otros estudios han confirmado esta tendencia en ciertos árboles, donde se ha reportado que la tolerancia decrece en las etapas tardías de la germinación, debido al agotamiento de las reservas almacenadas en los cotiledones (Weltzin et al., 1998). Resumiendo, la tolerancia de la planta al daño parece ser alta en etapas tempranas, a nivel de emergencia del cotiledón, luego declina en la medida que las reservas de la semilla se van agotando hasta llegar un punto mínimo, desde donde empieza a incrementarse en etapas vegetativas jóvenes que pueden empezar a almacenar carbohidratos, hasta alcanzar un pico en la madurez, para posteriormente ser agotadas una vez más, al alcanzar la etapa reproductiva (Figura 1) (Boege y Marquis, 2005).

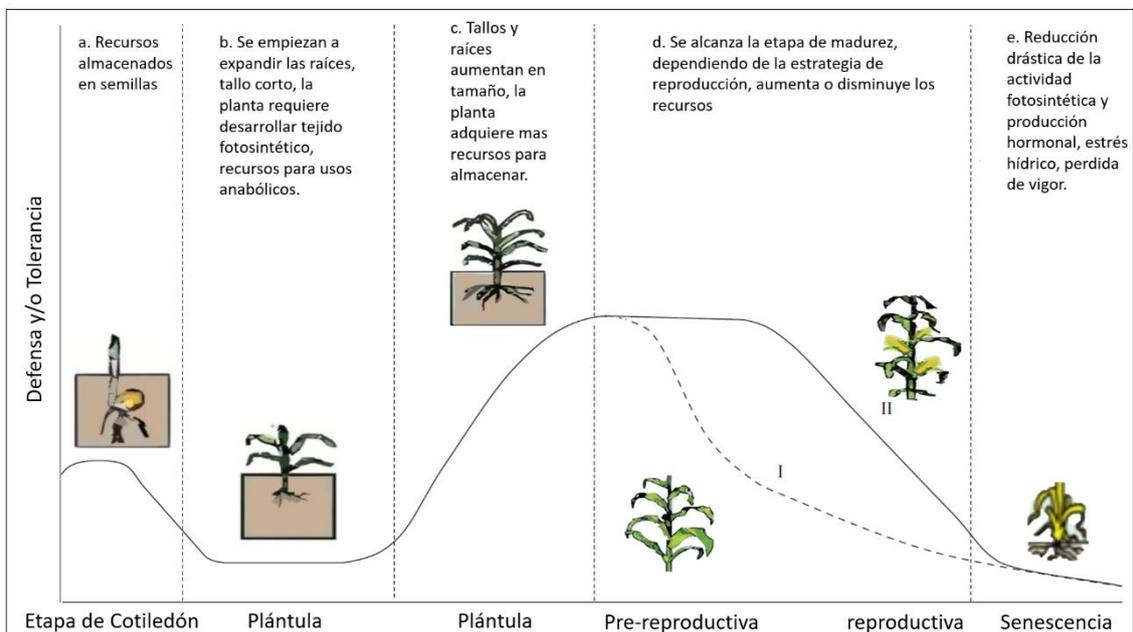


Figura 1. Modelo propuesto por Boege y Marquis donde muestra la variación de las respuestas de resistencia o tolerancia a condiciones de estrés, las cuales son dependientes de la etapa ontogénica de las plantas.

Figura modificada de Boege y Marquis (2005).

Existen dos hipótesis para sugerir los diferentes mecanismos que hay detrás de estos patrones ontogénicos en la respuesta a la pérdida de tejido foliar. La primera, conocida

como la hipótesis del balance entre el crecimiento y la diferenciación, predice que son los factores intrínsecos, como la adquisición y la localización de los recursos, los que limitan la respuestas de la planta al estrés (Herms y Mattson, 1992). En contraste, la segunda, conocida como la hipótesis de defensa óptima, predice que son los factores extrínsecos, como la selección de la planta joven por los herbívoros, los que conducen a altos niveles de respuesta al daño en la madurez, lo que hace a la planta menos susceptible a futuros ataques (Goodger et al., 2006). Muchos estudios han apoyado, por igual, ambas hipótesis, pero sin llegar a determinar cuan cerca está cada una de poder explicar el patrón de regulación por ontogenia. Sin embargo, ciertos estudios revelan algunos factores que sí influyen en la variabilidad en la tolerancia de las plantas al estrés durante su desarrollo. Entre estos factores hay uno en los que la mayoría de los estudios coinciden: la duración de la etapa juvenil. Por ejemplo, ciertas plantas leñosas son capaces de sobrevivir frecuentemente por muchos años en la etapa juvenil, antes de que los recursos que limitan el desarrollo les permitan crecer y madurar. Factores que pueden variar entre especies, ya que no todas tienen alta respuesta en la etapa juvenil, como en el caso de hierbas y pastos que germinan en grandes comunidades donde el rápido crecimiento es esencial para el éxito de su supervivencia. Entonces, su limitado crecimiento de las raíces y tallos limita la localización y los recursos para la respuesta de la planta ante el estrés, esperando a que su respuesta de tolerancia sea más fuerte a medida que avanza de etapa ontogénica. En la madurez, donde ya está establecida su maquinaria fotosintética, podría solventar con más éxito el daño foliar causado (Hanley y Fegan, 2007; Hanley et al., 2004; Haukioja y Koricheva, 2000).

3.5 CONSECUENCIAS EN LA DISTRIBUCIÓN Y ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS

La vida en la tierra depende de la fijación fotosintética del carbono con la energía de la luz del sol que es contenida en los carbohidratos por las plantas. Los carbohidratos, que son moléculas ricas en energía, son las primeras fuentes de carbono y energía para la mayoría de las células. Por ello, han adquirido importantes roles fisiológicos a través de la evolución como controladores del metabolismo, resistencia a estrés, crecimiento y desarrollo, Su regulación está determinada por los constantes cambios en su ambiente (Rolland et al., 2006). Por tal motivo, el metabolismo de los azúcares es un proceso muy dinámico con un flujo de concentración que se altera durante todo el desarrollo y en respuestas a condiciones desfavorables del ambiente, como estrés biótico y abiótico,

hasta cambios circadianos con fases diurnas y nocturnas (Blasing et al., 2005). Una función esencial para organismos sésiles y fotosintéticos, como las plantas, es la integración de señales ambientales. Esta función es altamente regulada de una manera compleja en conjunto con las hormonas de la planta, las cuales integran una intrincada red de señalización causada por factores externos y la percepción de azúcares, en los tejidos fotosintéticos (Price et al., 2004). Tales actividades, como la fotosíntesis, movilización de nutrientes y exportación de azúcares, son a su vez sobrerreguladas bajo condiciones de escasez de azúcares. En contraste, las actividades en tejidos consumidores tales como crecimiento y almacenamiento son sobrerreguladas cuando las reservas de carbono son abundantes y están disponibles, ya que la planta debe mantener una relación estricta entre la fotosíntesis y la demanda consumidora. El mantenimiento de esta relación involucra regulación metabólica y mecanismos de señalización regulados por azúcares (Smeekens et al., 2010).

La sacarosa representa la mayor forma de transporte de carbohidratos desde tejidos fotosintéticamente activos como las hojas maduras a los órganos no fotosintéticos como las flores, frutos, semillas y raíces. Pero su función no se limita al transporte únicamente; también, contribuye en gran medida a la fuerza osmótica que permite su translocación a través del floema y sirve, también, como una señal para activar o reprimir genes. El floema, aunque es la principal forma de transporte de sacarosa, no es la única; existen también proteínas que actúan como transportadores de sacarosa, en donde estudios fisiológicos y moleculares muestran que los transportadores de sacarosa se encuentran altamente regulados en múltiples niveles de organización biológica y que depende de las fluctuaciones en la concentración de sacarosa (Lalonde et al., 1999). La sacarosa también se ha visto implicada como carbohidrato de señalización, función que ha resultado difícil de distinguir, debido a la cantidad de procesos fisiológicos reguladas por ésta; como, por ejemplo, la síntesis de polisacáridos usados como bloques de construcción para carbohidratos de reserva y/o estructurales, durante los cuales su rol como molécula de señalización es ignorado (Horacio et al., 2016).

Algunos estudios de la señalización por sacarosa han establecido su rol como el carbohidrato que inicia la cascada de inducción de síntesis de fructanos (Tognetti et al., 2013). También, puede activar y sobrerregular los genes implicados en la vía de síntesis de almidón, como *GBSSI* (de "*Granule-Bound Starch Synthase I*") y β -amilasa en patata dulce y *Arabidopsis thaliana* (Nagata et al., 2012). Otros reportes la han involucrado, también, en el control de la clorofila y síntesis de pigmentos no fotosintéticos, ya que un medio *in vitro* suplementado con sacarosa prevenía la acumulación de clorofila en callos de zanahoria (Horacio et al., 2016), al afectar la síntesis de precursores del ácido

aminolevulínico. Asimismo, regula la inducción de la síntesis de antocianinas, ya que la mayoría de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de antocianinas y flavonoides se encuentran reguladas por este azúcar (Prasad et al., 2011). En forma similar, se ha demostrado la importancia de su rol en el metabolismo del nitrógeno, regulando el balance entre asimilación y transporte del este nutriente primario, pues algunos estudios revelan que los evocadores de la sacarosa incrementan la enzima nitrato reductasa en plantas de *A. thaliana* adaptadas a oscuridad, aumentando su actividad y activación postraducciona (Tognetti et al., 2013). Otros estudios en *A. thaliana* han concluido que la sacarosa mejora la expresión de los genes codificantes para ciclina B y D, además de promover la síntesis ribosomal (Kojima et al., 2007). Reportes recientes también establecen que la sacarosa regula el reloj circadiano en *A. thaliana*, pues se encontró que el oscilador circadiano GIGANTEA es parte de la vía de señalización de sacarosa (Dalchau et al., 2011).

El balance entre la asimilación y distribución de carbohidratos en la planta es la que regula en gran medida el metabolismo central de éstos, ya que factores como la actividad fotosintética (fijación de carbono), el balance entre la síntesis de almidón en el cloroplasto, la síntesis de sacarosa y su transporte y almacenamiento en la vacuola son los que determinan la homeostasis energética del metabolismo del carbono en las plantas. Si estos factores son alterados, se convierten en un limitante en el crecimiento vegetal pues éste requiere de una óptima asimilación desde órganos fuentes a los órganos sumideros y distribución a través del floema para su desarrollo (Lemoine et al., 2013). El metabolismo de los carbohidratos comienza con la fijación de CO₂ durante el día en los cloroplastos de las hojas, donde se fija el C en forma de triosas fosfato que luego serán exportadas para la síntesis de sacarosa como carbohidrato de transporte o de almacenamiento, a la vacuola, o para la síntesis de almidón, como carbohidrato de reserva, en los cloroplastos y/o los amiloplastos (Sage y Zhu, 2011). En la noche, la movilización de almidón proporciona el sustrato para la biosíntesis de sacarosa en forma de glucosa, derivada del rompimiento amilolítico del almidón y liberado por transportadores de hexosas (Wintery Huber, 2000). La biosíntesis de sacarosa está regulada por múltiples factores, como la modulación de luz/oscuridad (la cual ajusta la tasa de fotosíntesis), las bajas temperaturas y el estrés osmótico; siendo regulada en cada una de estas situaciones por fosforilación en sitios específicos de serina de cinasas claves (Winter y Huber, 2000). Cuando las hojas alcanzan la madurez, son capaces de exportar los carbohidratos generados por la fotosíntesis. Se ha reportado que más del 80% del carbono fijado puede ser exportado; de esta manera, las hojas maduras se convierten en órganos fuentes y empiezan a distribuir carbohidratos hacia los órganos

no fotosintéticos que demandan carbohidratos, conocidos como órganos sumideros (Sturm y Tang, 1999). La distribución de estos carbohidratos es un mecanismo altamente dependiente del tipo de especie vegetal, etapa de desarrollo y condiciones ambientales (Turgeon & Medville, 1998). La sacarosa proveniente de las células del mesófilo (CM) es el resultado de la madurez de las hojas. Una vez que su consumo local es suplido, empieza la distribución hacia los órganos no fotosintéticos (Braun et al., 2014). Para ello, la sacarosa debe alcanzar los tubos cribosos (TC) del floema (F), para luego transportarse en forma simplástica a través de los plasmodesmos (P) que permiten su difusión pasando por las células del parénquima (CP) y las células acompañantes (CA). También la sacarosa puede ser distribuida por otro mecanismo, llamado apoplástico. Por esta vía, la sacarosa alcanza las CP a través de los plasmodesmos, donde es cargada y acumulada en el floema pasando por medio del apoplasto entre las CP y las CA. Para entrar en el apoplasto de estas células, la sacarosa requiere de transportadores de sacarosa de la familia SWEET y es acumulada en las CA por la acción de un cotransportador H⁺/sacarosa. Una vez aquí, en el TC se genera una mayor presión hidrostática producto del paso de agua desde el xilema al floema. Gracias a este gradiente de presión, la sacarosa pasa a los TC. Cuando la sacarosa está en los TC la planta tiene la capacidad de cambiar su sistema de distribución ya sea de una manera apoplástica o simplástica. Cuando el mecanismo apoplástico es el elegido, la sacarosa es llevada hasta los órganos sumideros mediante proteínas transportadoras específicas de sacarosa o hexosas localizadas en la membrana celular. Una vez llega allí, la sacarosa es usada para diversos fines, como crecimiento del órgano o como almacenamiento. La sacarosa ya sea para transporte, uso o almacenamiento requiere ser hidrolizada. La sacarosa sintasa (SUSY) es una glicosil-transferasa la cual la convierte reversiblemente, en la presencia de UDP, a UDP-glucosa y fructosa. Ésta, junto con las enzimas invertasas, también conocidas como β -fructofuranosidasas, son conocidas por catalizar el rompimiento de la sacarosa en glucosa y fructosa en una forma irreversible. Las invertasas son una de las más antiguas enzimas conocidas en la enzimología clásica y están bien estudiadas en términos de su bioquímica y propiedades fisiológicas en numerosas plantas (Cheng, 1996). Sobre la base de su localización subcelular, las invertasas pueden ser clasificadas en 3 subgrupos: las invertasas citosólicas (IC) invertasas vacuolares (IV) y las invertasas de pared celular (IPC), además de las sacarosa sintasas (SUSY), ya mencionadas (Figura 2) (Lemoine et al., 2013; Rennie y Turgeon, 2009; Cisneros-Hernández, 2016).

Además de proporcionar energía a múltiples procesos celulares, la actividad hidrolítica de las invertasas determina el grado de demanda y la tasa de consumo de los

carbohidratos en los órganos no fotosintéticos. Su expresión y actividad están reguladas a su vez por procesos metabólicos centrales en la planta. Así pues, se ha determinado que las IPC y las IV, se encuentran implicadas en la expansión y desarrollo de los tejidos regulando la relación órgano productor-sumidero (González et al., 2005). Las IC han sido implicadas en el desarrollo celular en los meristemos radiculares y apicales, así como el establecimiento de la floración y la fertilidad del polen (Welham et al., 2009). A su vez, SUSY está relacionada con la tasa de síntesis de celulosa y almidón en los órganos sumidero y de almacenamiento (Ruan et al., 2003). De esta manera se regula la sacarosa en las diferentes vías bioquímicas como la respiración, biosíntesis de pared celular, almacenamiento, respuesta de defensa, expansión celular, expresión en respuesta a bajas temperaturas y anaerobiosis (Sturm y Tang, 1999).

El metabolismo de los carbohidratos es, también, un regulador directo del crecimiento, desarrollo en embriones y desarrollo de la semilla, ya que estos procesos dependen críticamente de los sistemas de señalización que les proporcionen información de las condiciones externas e internas, procesos que fueron clasificados en leguminosas y constan de transiciones metabólicas. Por ejemplo, en la primera etapa de desarrollo de la semilla se han encontrado altos niveles de actividad de invertasas de pared celular que generan altos niveles de hexosas, los cuales promueven el crecimiento por división celular (Borisjuk et al., 1998).

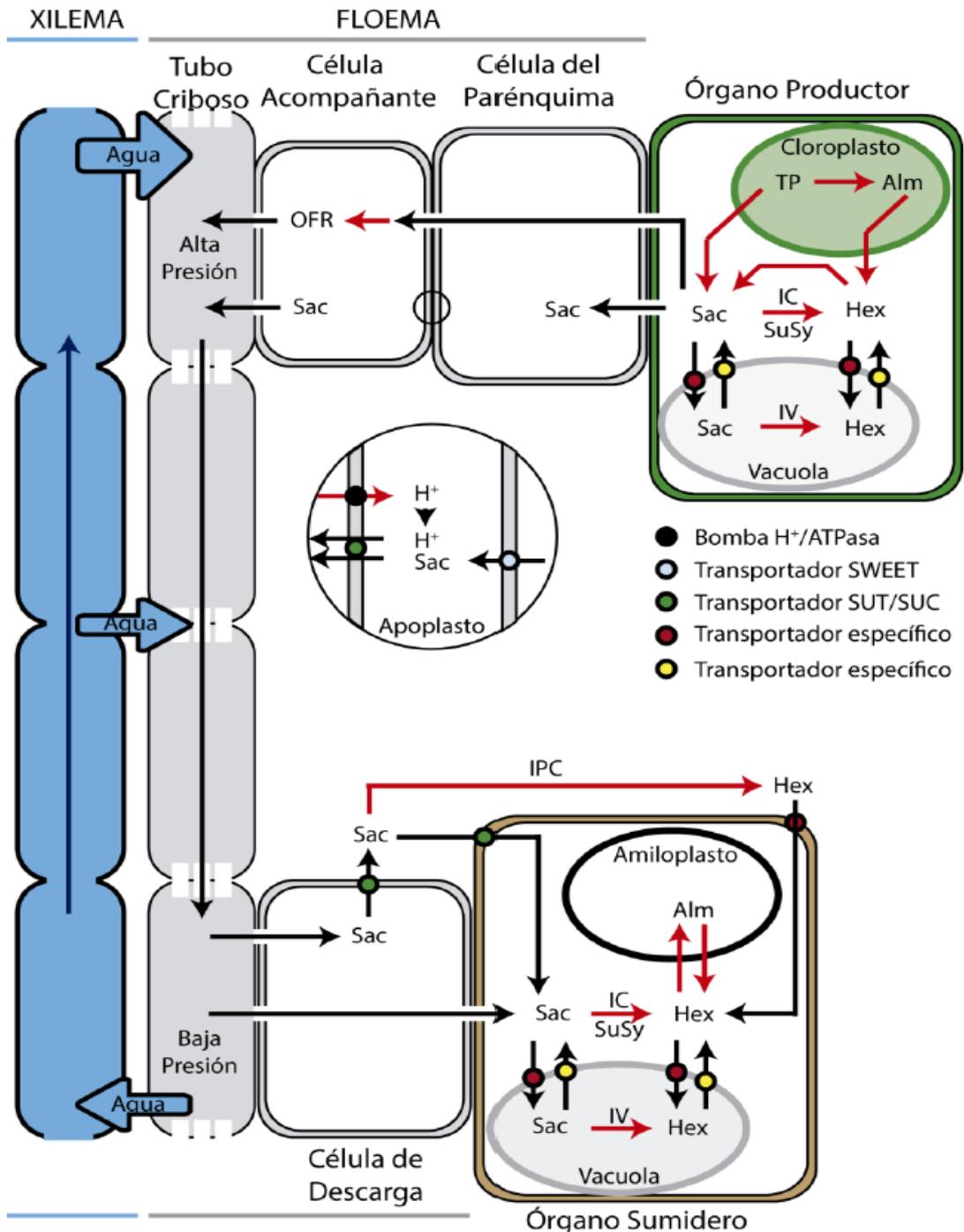


Figura 2. Mecanismo general de asimilación y transporte de carbohidratos de órganos fuente a órganos sumideros.

Sac, Sacarosa, Hex, Hexosas; TP, Triosas Fosfato; Alm, Almidón; OFR, Oligosacáridos de la Familia de la Rafinosa; IC, Invertasa Citosólica; IV, Invertasa Vacuolar; IPC, Invertasa de Pared Celular; SuSy, Sacarosa Sintasa. Las flechas negras representan difusión o transporte. Las flechas rojas representan una o más reacciones enzimáticas. Figura tomada de (Lemoine et al. 2013) y modificada por Cisneros-Hernández (2016).

Los carbohidratos además tienen actividades similares a hormonas que modulan muchos procesos esenciales, como formación de la semilla, crecimiento vegetativo,

reproducción y senescencia (Yanagisawa et al., 2003). Además, se han encontrado interacciones positivas entre niveles de azúcar y ácido abscísico (ABA). Estos casos se dan en etapas tempranas del desarrollo de la semilla, donde ABA media el desarrollo post-germinación reprimiendo el punto de control que habilita la germinación del embrión en condiciones adversas (Gibson, 2005). Similarmente durante el desarrollo temprano de la semilla en *Arabidopsis*, se han encontrado altos niveles de azúcar exógeno que reprimen la elongación del hipocótilo, el desarrollo del cotiledón y el brote (Arenas-Huertero et al., 2000). Otra hormona que también se ha demostrado que interacciona con los azúcares es el etileno. Una unión molecular entre glucosa y la señalización por etileno fue demostrada por Yanagisawa et al. (2003) donde ambas regulan, en forma antagónica la estabilidad del factor de transcripción EIN3 (del inglés, Ethylene Insensitive 3), suprimiendo su actividad a través de la ubiquitinación. Algunos estudios recientes también ponen en evidencia que la biosíntesis de las auxinas es estrechamente dependiente del nivel de glucosa endógena (Baroja-Fernández et al., 2003). También hay una relación positiva entre el azúcar y la señalización por citocininas, que retrasan la senescencia de la hoja por expresión de invertasas de pared celular dependientes de citocininas en hojas de tabaco (Corbesier et al., 1998). Resumiendo: es posible que exista un patrón con una relación sinérgica indirecta del azúcar por medio de la actividad de invertasas con hormonas relacionadas al crecimiento. De modo que, por medio de esta misma vía, puede haber una relación negativa con hormonas que promueven senescencia, ya que se ha propuesto que para el desarrollo normal del fruto y la semilla se requiere de una inducción de respuesta de auxinas, giberelinas y citocininas, así como una represión en las respuestas de etileno y ABA (Roldán et al., 1999).

En la actualidad, se han dado progresos importantes que permiten dilucidar el sistema por el cual la planta regula su desarrollo. Estos sistemas actúan ya sea promoviendo o inhibiendo el crecimiento de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes que tengan. Como sistemas que promueven el crecimiento se han reportados las hexocinasas (HXK) sensoras de glucosa, la trealosa 6-fosfato (T6P) que es una molécula señal y el complejo cinasa blanco de rapamicina (TOR) de la cual se hablará más adelante. Empezando por la hexocinasa, ésta ha sido identificada como un sensor de glucosa, independiente de su rol enzimático. Su regulación está implicada en múltiples procesos de la planta, ya que mutantes de HXK1 en *Arabidopsis* mostraron reducción en crecimiento de raíces y tallo, retraso en la floración y senescencia y también alteraron su sensibilidad a las hormonas del crecimiento como las auxinas y citocininas (Lastdrager et al., 2014). En cuanto a la trealosa 6-fosfato (T6P), éste es un azúcar fosforilado sintetizado de glucosa

6-fosfato y UDP-glucosa por la trealosa 6-fosfato sintasa (TPS). Luego, es convertido a glucosa por la acción conjunta de trealosa 6-fosfato fosfatasa (TPP) y trehalasa. T6P es una molécula de señalización que interactúa con CDKA (proteína cinasa dependiente del ciclo celular) y la KCA (quinesina), encargadas en la regulación del ciclo celular (Luan, 2009). Su importancia fue demostrada en mutantes de *Arabidopsis* del gen *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE (ATTPS1)*, que codifica a la trealosa fosfato sintasa (TPS), cuya falta de función causa letalidad embrionaria y retardo de desarrollo de la planta (Vandesteene et al., 2012).

Se ha observado los roles del metabolismo de carbono y la acumulación de azúcar en el crecimiento vegetativo y el desarrollo reproductivo. Por ejemplo, que las hexosas estimulan la división celular, mientras que la sacarosa promueve la acumulación de almidón en cotiledones (Weber et al., 1996). Particularmente los reportes más destacados pertenecen a varias líneas que evidencian el punto crucial de este metabolismo en ambos procesos. De modo que se ha encontrado una regulación espacial de la expresión de genes que codifican para proteínas del metabolismo del carbono tales como SUSY, ADP-glucosa pirofosforilasa o AGPasa, que es la enzima que cataliza la conversión de glucosa 1-fosfato y ATP a ADP-glucosa y pirofosfato inorgánico, el cual es el primer paso en la vía de síntesis de almidón en meristemas apicales de tomate, donde funcionan como marcadores tempranos del desarrollo de la hoja (Pien et al. 2001; Tiessen et al. 2002). También, se observó que la expresión de un factor de transcripción tipo cremallera de leucina ATHB13, es dependiente del nivel de azúcares y este, a su vez, controla el desarrollo del cotiledón y la forma de la hoja por medio de la expansión de células epidermales (Hanson et al., 2001). Los carbohidratos también poseen una función en la transición de la etapa vegetativa a reproductiva en meristemas apicales en los fotoperiodos de especies que desencadenan un estímulo floral, aunque no se conoce muy bien el estímulo. En este sentido, se ha proporcionado evidencia de que la sacarosa es un componente temprano y esencial de estos estímulos en la mayoría de las especies. Corbesier et al. (1998) reportó, por ejemplo, que los niveles de sacarosa y azúcares solubles en el floema se incrementaron antes de la inducción floral en el fotoperiodo en días largos y cortos. El papel de los carbohidratos no termina en la transición e inducción de la etapa reproductiva, ya que reportes adicionales han revelado el rol del metabolismo de los carbohidratos en los tejidos reproductivos jóvenes como en el caso de los frutos y las semillas. En condiciones óptimas, estos tejidos poseen menos poder de adquisición en comparación con los tejidos vegetativos. Lo anterior podría deberse a diferentes factores, entre los que se podría mencionar la distancia a la que se encuentran de los órganos fuentes, la baja

tasa de transporte y la baja actividad de las invertasas (Ruan et al., 2012); convirtiéndose en un factor limitante para el desarrollo de frutas y semillas. Bajo condiciones de estrés, la situación se agrava, ya que se ha reportado en algodón que el mal suplemento de sacarosa y hexosas limita la tasa de crecimiento de los tubos de polen en el pistilo (Snider et al., 2011). En maíz, causa aborto masivo en los ovarios (McLaughlin & Boyer, 2004). Bajo estas condiciones también se genera un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), como superóxidos (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Como consecuencia de la acumulación de ROS, hay daño de ADN, proteínas y lípidos (Smirnova et al., 2009). Esto con el transcurso del tiempo lleva a la muerte celular programada y aborto de fruto y semilla.

Los azúcares solubles como la glucosa y la sacarosa se han encontrado como candidatos efectivos para el control de problemas oxidativos en tejidos expuestos a un amplio rango de ambientes desfavorables. Por ejemplo, la disponibilidad de estos azúcares, que alimentan la vía de pentosa fosfato oxidativa, pueden desencadenar la remoción de las especies reactivas de oxígeno, catalizando la primera reacción de esta vía, que se ha encontrado afectada en el balance redox en el cloroplasto, así como la capacidad de desintoxicación por ROS (Debnam et al., 2004). En este contexto, los efectos positivos de los azúcares solubles relacionados al estrés oxidativo han sido considerados como efectos indirectos de la señalización y metabolismo de azúcares (Van Den Ende y Valluru, 2009).

Una vez que la etapa de reproducción concluye, se presenta la senescencia. Se sabe que éste es un proceso altamente regulado, ya que se han encontrado coincidencias entre este proceso con el declive de la clorofila en hojas y la falta de fotosíntesis. Como consecuencia, la escasez de los azúcares puede activar genes asociados a senescencia, conocidos como *Sag/ Sen*, que son inducidos en incubación oscura (Buchanan-Wollaston et al., 2005). Además, se sabe que existe una correlación entre la expresión de hexocinasas y la tasa de senescencia de la hoja (Moore et al., 2003). La hexocinasa (HXK), es la enzima que cataliza la fosforilación de los azúcares hexosas en el primer paso de la vía glucolítica y ha sido demostrado, como se mencionó anteriormente, que es un sensor de niveles de glucosa en plantas (Zhou et al., 1998).

A pesar de que las vías de señalización y percepción de carbohidratos, así como sus efectos indirectos han sido bien detallados y largamente estudiados en glucosa y sacarosa. También se han hecho estudios de otros azúcares tales como fructanos, implicados como agentes protectores contra el estrés (Pollock y Cairns, 1991), ya que se ha encontrado que estos interaccionan fuertemente con las membranas celulares

directamente con enlaces de hidrogeno, estabilizándolas durante el estrés (Hincha et al., 2002). Esta interacción es más fuerte que con trealosa, sacarosa y glucosa, ya que su interacción es más eficiente, previniendo la condensación lipídica y el cese de la fase de transición de los grupos lipídicos (Vereyken et al., 2003). Los oligosacáridos de la familia de las rafinosas (RFOs por sus siglas en inglés), también se han encontrado con funciones similares de los fructanos en las plantas, como reserva de carbohidratos, estabilizadores de membrana y mediadores de tolerancia a estrés, además de estar involucrados en la tolerancia a la desecación en semillas. Recientemente, algunos estudios apuntan a su función como contribuyentes a la homeostasis general de ROS por medio de una expulsión específica de éstos cerca de las membranas de organelos, especulando una posible teoría de pequeños fructanos y RFOs que actúan como componentes de señalización que se mueven a través del floema bajo condiciones de estrés (Ende, 2013).

3.6 REGULADORES MAESTROS DEL METABOLISMO Y EL ESTADO ENERGÉTICO DE LA PLANTA

Mantener un balance entre la energía y la homeostasis metabólica, es un reto para todos los organismos vivos, en especial para las plantas que, al ser organismos sésiles, tienen que desarrollar ciertos mecanismos que le ayuden a sobrevivir a condiciones desfavorables a las que están expuestas. Las plantas, al poseer la habilidad de percibir el nivel de carbohidratos y optimizar su uso, también deben tener la capacidad de enfrentar la escasez de éstos. Esta capacidad radica en mantener la íntima relación entre la disponibilidad de energía y la tolerancia al estrés, que determinan en mayor grado su supervivencia, crecimiento celular y desarrollo. La escasez o agotamiento de energía es una condición inherente al estilo de vida de las plantas pues es una consecuencia común de cualquier tipo de estrés. En la mayoría de los casos, hay reducción de la fotosíntesis y por ende reducción en los fotosintatos, lo que resulta en la limitación de recursos que en última instancia estaban destinados al crecimiento y desarrollo (Baena-González y Sheen, 2008). Cuando esto ocurre, se crea una competencia por los productos de la fotosíntesis entre los tejidos consumidores como las semillas y los frutos (Smith y Stitt, 2007).

Esto trae como consecuencia una serie de cambios fisiológicos, metabólicos y moleculares, que van desde el cese de crecimiento hasta la activación de vías catabólicas, para de esta manera proporcionar fuentes alternativas de nutrientes,

metabolitos y energía. En estas condiciones, la planta induce la desactivación de las actividades anabólicas para preservar energía y recursos (Morkunas et al. 2012). Asimismo, los perfiles transcriptómicos específicos en condiciones de oscuridad o limitación de carbono, no sólo han revelado los efectos sobre los genes específicos, sino que han dilucidado redes metabólicas compuestas por cientos de genes que trabajan en conjunto con los requerimientos de la planta (Price et al., 2004). Otro hallazgo interesante es la capacidad de la planta para responder ante las fluctuaciones de energía; ya que el mecanismo de respuesta es desencadenado antes del completo agotamiento de energía. Las tasas de degradación de almidón son incluso adaptadas al periodo de estrés, ajustando de manera directa su crecimiento, almacenamiento y la movilización de carbono con el fin de evitar consecuencias de deterioro en el contexto de la autofagia (Smith y Stitt, 2007). Por otro lado, el crecimiento en organismos vivos no sólo consiste en consumir la energía y recursos, sino que es un proceso altamente regulado por fluctuaciones que aseguran la supervivencia y las estrategias reproductivas, integrando de manera eficiente la información de estímulos externos que le permitan el desarrollo sin limitaciones. Además, muchas respuestas a ciertos tipos de estrés requieren de la sobrecompensación del metabolismo, inducción de crecimiento y relocalización de nutrientes (Rexin et al., 2015).

En resumen, la escasez de carbohidratos induce genes involucrados en la suplementación de fuentes alternativas de nutrientes y energía. Se ha podido determinar que en *Arabidopsis* hay por lo menos 165 genes identificados como genes de respuesta, que incluyen, entre otros, factores de transcripción, reguladores redox, componentes del proteasoma, y genes involucrados en el metabolismo de la trealosa y autofagia (Osuna et al., 2007). En este sentido, la reducción en la disponibilidad de energía lleva a la activación de la autofagia vacuolar, que es un proceso selectivo por el cual la célula degrada contenido citosólico que da lugar al reciclado de nutrientes, acompañado de la formación de dobles membranas en las estructuras, en donde el autofagosoma, secuestra y transporta porciones del citoplasma a la vacuola para su degradación (Bassham et al., 2006). En otro contexto, la disponibilidad de nutrientes induce la señalización por azúcares, activación del anabolismo y promueve el crecimiento y desarrollo. Pero esta compleja remodelación del metabolismo está regulada por proteínas cinasas que juegan un papel antagónico, regulando de manera positiva o negativa procesos que se ven reflejados en cambios bioquímicos, metabólicos y moleculares, como la transcripción de genes y la fosforilación de proteínas claves. Estas proteínas cinasas son llamados “reguladores maestros del metabolismo”, entre las que

encontramos a SnRK1 y TOR, que como se ha mencionado, poseen un papel clave en el desarrollo de la planta.

3.6.1 REGULADOR MAESTRO DEL METABOLISMO TOR

TOR es una proteína cinasa que actúa como regulador maestro debido a la capacidad de percibir el nivel de disponibilidad de nutrientes e inducir el anabolismo promoviendo el desarrollo. Estas proteínas fueron inicialmente reportadas en levadura, cuando se buscaban mutaciones que conferían resistencia dominante a la rapamicina. La rapamicina es un producto bacteriano que muestra propiedades antifúngicas e inmunosupresoras, reprimiendo el fenotipo G1 (crecimiento celular) en el ciclo celular (Stan et al., 1994). En condiciones *in vivo* la inactivación por rapamicina del complejo TOR, es mediada por la formación de un complejo ternario, donde la rapamicina se une de forma no covalente con la subunidad FKBP12 (una peptidil-prolil isomerasa) y el dominio de unión a la rapamicina en las proteínas del TOR (FRB) (Menand et al., 2002).

Se han realizado estudios en *Saccharomyces cerevisiae* donde se ha tratado de describir su función, reportándose que dos genes *TOR1* y *TOR2* están implicados en el efecto de la inhibición del crecimiento de la levadura por rapamicina, ya que removiendo cualquiera de los dos genes, se presentaba el mismo efecto. Las proteínas codificadas por estos dos genes, *TOR1P* y *TOR2P* son componentes de un mecanismo de señalización que controla el crecimiento celular en circunstancias de disponibilidad de energía. Estas proteínas son parte de la familia de cinasas relacionadas a fosfatidilinositol cinasa-3, debido a su alta homología en el dominio catalítico. Se ha reportado que esta familia actúa como reguladora de diferentes procesos celulares, incluyendo control del crecimiento celular, regulación del ciclo celular y puntos de revisión de daño de ADN (Inoki et al., 2005). La mayor parte de las funciones las ejerce TOR2P, la cual es una proteína esencial que regula el proceso de crecimiento celular de dos formas. La primera, actúa como una cascada de señalización en la que involucra la proteína TOR1P, que tiene por objetivo la regulación del proceso de síntesis de proteína necesaria para la progresión de la etapa G1 a S en el ciclo celular, activando el factor de iniciación de traducción eIF4F y las ARN polimerasas I y III. La segunda, TOR2P, es un componente requerido para la reorganización celular, que depende de la activación de procesos asociados al citoesqueleto (Kunz et al., 2000). Un estudio de localización subcelular de estas dos proteínas reveló que TOR1P actúa como proteína periférica a la membrana y TOR2P esta mediada por motivos repetidos HEAT que han

sido reportados previamente por estar involucrados en las interacciones entre proteínas. De esta manera, forman parte de un complejo proteínico asociado a la membrana (Kunz et al., 2000). La pérdida de la actividad de estas dos proteínas en levadura, confirmó su función, al mostrar una dramática reducción de la iniciación de la traducción, y mostró todas las características de células sin fuentes de carbono, incluyendo detención del crecimiento, acumulación de carbohidratos de almacenamiento, degradación de aminoácidos y cambios morfológicos y transcripcionales (Heitman et al., 1991).

Esta vía de señalización se encuentra evolutivamente conservada. En mamíferos su homólogo es mTOR también conocido como FRAP/ RAFT1/ RAPT1, el cual está altamente conservado en su subunidad catalítica y actúa como un blanco sensible regulado por la rapamicina. Una particularidad de este complejo es que su señalización se activa en respuesta a disponibilidad de aminoácidos (Stan et al., 1994). La diferencia de esta proteína en mamíferos comparada con la de las levaduras, es que las proteínas SpTOR en mamíferos no son redundantes y son resistentes a la rapamicina. Son activadas para la síntesis de proteínas en respuesta de disponibilidad de nutrientes. Regulando el crecimiento de al menos dos formas: 1) por medio del secuestro del factor de iniciación de la traducción eIF4E (del inglés, "Eukaryotic translation initiation factor 4E"), y 2) por la activación de la traducción, a través de una proteína ribosomal S6K cinasa (también llamada p7026k).

En células de mamíferos, las proteínas TOR forman un complejo, con GBL y RAPTOR, la cual es una proteína asociada a TOR; sus homólogos en levaduras son LST8 y KOG1 respectivamente. La regulación de la última subunidad se da en ambos casos por medio de la interacción con TOR, ya que RAPTOR es la encargada de reclutar substratos para TOR, contribuyendo a la capacidad antes mencionada de fosforilar S6K cinasa y eIF4E-BP (Anderson et al., 2005). La proteína RAPTOR se encuentra conservada en todos los eucariotes. En su estructura se encontraron repetidos WD40 en el extremo C-terminal, lo que es indicio de la formación de complejos proteicos reversibles. Interesantemente, posee 3 repetidos centrales HEAT, mismos que tiene la proteína TOR, por lo cual se le atribuye el papel de interaccionar con dicha cinasa. Esta interacción es la encargada de la regulación del crecimiento por medio de la percepción de nutrientes, y esta misma interacción es disgregada por rapamicina, inhibiendo de esta manera la actividad de TOR (Dorothee et al., 2005). También se ha reportado una última posible función de RAPTOR, la cual ha sido muy discutida, y que consiste en la capacidad de regular negativamente a TOR mediante la fosforilación de fosfatasas tipo 2 (PP2A) que se

encargan de inactivar TOR, mientras que la rapamicina las activa *in vivo* (Inoki et al., 2005).

En mamíferos, se ha reportado la formación de un segundo complejo en el cual participan otras proteínas que se encargan de regular el citoesqueleto por medio de la interacción con TOR. De esta manera, TOR no solo regula el aprovechamiento de energía celular, metabolitos, biomasa y la maquinaria del ciclo celular sino que se le han atribuido otras regulaciones como el balance de reacciones de oxidación-reducción (redox) la proliferación y crecimiento a través de los nutrientes en un coordinado desarrollo organelar (Xiong et al., 2013). En este contexto TOR es activado por señales externas, como la disponibilidad de aminoácidos o la presencia de hormonas. Una vez que es recibida, la señal en cuestión desencadena una serie de procesos de salida, entre los que se pueden contar la transcripción de ácido desoxirribonucleico (ARN), traducción, biogénesis ribosomal, translocación de proteínas regulatorias, autofagia y almacenamiento de componentes de reserva (Dobrenel et al., 2013). Y en un intento de describir el posible mecanismo utilizado por el complejo de proteínas TOR para regular las diferentes respuestas celulares frente a la disponibilidad de nutrientes, se ha encontrado que la actividad cinasa del complejo TOR, controla la asociación al factor Tap42p con fosfatasa tipo 2 para formar un heterodímero inactivo. Esta inhibición de las fosfatasas previene la acumulación nuclear de nutrientes que son regulados por este factor de transcripción, causando una inhibición de transportadores de aminoácidos mediante su degradación y regulando positivamente la traducción a través de la modulación de la fosforilación de efectores río abajo (Dobrenel et al., 2016).

El complejo TOR se encuentra estructuralmente conservado: una serie de repeticiones que comienzan en el extremo N-terminal por el dominio de repeticiones HEAT, están implicadas en la interacción entre proteínas y asociaciones a membranas. Junto a este dominio, se encuentra el dominio FAT, que también posee repeticiones HEAT y TPR, que se piensa están involucradas en interacciones entre proteínas que promueven la activación del dominio cinasa; esto, en conjunto con el dominio FATC del extremo C-terminal. Después, se encuentra el dominio de unión a rapamicina FRB y entre este dominio y el dominio FATC se encuentra el dominio de fosforilación Ser/ Tre cinasa del complejo. Esta estructura se ha descrito para los dos complejos proteicos formados en levaduras y animales, TORC-1 y TORC-2, uno formado por TOR, RAPTOR (del inglés *Regulatory Associated Protein of TOR*) y LST8 (del inglés, *Lethal with Sec-Thirteen protein 8*) y el otro por TOR, RICTOR (del inglés, *Rapamycin Insensitive Companion of TOR*) y LST8. En plantas, sólo se ha reportado el primer complejo, TORC-1 (Robaglia et al., 2012).

En plantas, más específicamente en *A. thaliana*, se encontró que posee un solo gen TOR, llamado *AtTOR*. La disrupción de este gen por inserción reportó una represión en el desarrollo del endospermo y el embrión. La fusión de este gen con un gen reportero GUS, reveló que *AtTOR* es expresado en meristemos primarios, embriones y endospermo, pero no en células diferenciadas (Menand et al., 2002). Además, el genoma de esta planta reveló que posee dos genes que codifican para dos enzimas RAPTOR y dos genes más que codifican para subunidades LST8. En plantas, se le ha dado cierta relevancia a las interacciones de estas proteínas con TOR, en especial a la que involucra a RAPTOR, ya que con ésta ha evolucionado desde un rol ancestral en la percepción de nutrientes y la regulación del crecimiento celular (Anderson et al., 2005). Sin embargo, también se ha investigado el rol de LST8 en *Arabidopsis*, ya que ésta también posee 9 repetidos de regiones WD40 para interactuar con la proteína TOR. Estudios con mutaciones de LST8 mostraron que afecta el crecimiento y desarrollo. Además, impide a la planta realizar adaptaciones transcriptómicas y metabólicas en condiciones de días largos, por lo cual se concluyó que esta subunidad se encarga de adaptar el metabolismo y desarrollo a señales de condiciones externas y senescencia prematura (Moreau et al., 2012).

Otros estudios en plantas con *AtTOR*, el homólogo de TOR en plantas, lo han identificado como crítico para el desarrollo, ya que una inserción con T-DNA a este gen condujo a una prematura represión de la embriogénesis y el desarrollo del endospermo (Menand et al., 2002). Este efecto letal en el embrión imposibilitó su estudio en plantas. Por ende Deprost et al. (2007), redujo su expresión por medio de silenciamiento génico, con el fin de analizar su función en la planta, encontrando una represión en la acumulación de varios metabolitos, incluyendo almidón, triacilglicéridos y aminoácidos e intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico. Además de efectos en el transcriptoma, como la reducción de la abundancia del polisoma y la fosforilación de la cinasa ribosomal S6 (S6K). Usando el mismo procedimiento en arroz, se reportó el aborto de semilla y la pérdida completa de desarrollo embrionario en etapas tempranas (Deprost et al., 2005). También se observó la acumulación de metabolitos en todos los tejidos y una fusión con GUS reveló traducción en tejidos meristemáticos y células adyacentes en inmediata expansión (Menand et al., 2002). TOR también está presente a lo largo del desarrollo del embrión en etapa globular, aunque la expresión de TOR disminuye con cada avance del embrión, persiste en la etapa corazón de la embriogénesis y en la etapa torpedo, aunque su máxima expresión se encontró en los meristemos de plantas maduras, ya que es predominante en zonas que se encuentren en proliferación celular y que estén acopladas al crecimiento citosólico, manteniendo un nivel basal de expresión en todos

los tejidos (John et al., 2011). Lo anterior fue apoyado por reportes de estudios en *Arabidopsis* donde se demostró que el promotor de TOR está activo en raíces y meristemas apicales, embriones y endospermo, pero no lo está en hojas fuentes o células diferenciadas (Menand et al., 2002).

Como se describió previamente la mutación del gen TOR en plantas es letal ya que causa un bloqueo temprano en el desarrollo del embrión. En este contexto, un estudio comparativo de secuencias de aminoácidos de los dominios de unión a rapamicina entre *Chlamydomonas reinhardtii* que es susceptible a la rapamicina y *A. thaliana* que no lo es, proporcionó una característica útil para el estudio de la actividad del TOR en etapas tempranas del desarrollo del embrión, revelando que la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a rapamicina (FKBP12) en *Arabidopsis* contenía reemplazos en aminoácidos claves para la unión a la rapamicina, sugiriendo que la susceptibilidad se perdió durante la evolución de la planta para promover la formación del complejo TOR, pero que podría ser restaurada con la expresión de una proteína FKBP heteróloga. De esta manera, se logró la inhibición por rapamicina, permitiendo analizar los efectos en el desarrollo completo de la planta (Sormani et al., 2007). Sin embargo, se ha revelado que la aplicación de altas dosis de rapamicina, afecta efectivamente la cinasa inhibiendo su actividad y de esta manera consiguiendo un retardo en el desarrollo y una masiva reprogramación de perfiles transcripcionales en la planta (Zhang et al., 2013).

Otros estudios en *Arabidopsis* concluyeron que los niveles de expresión de TOR están cercanamente relacionados con el crecimiento de raíz y tallo, ya que reportaron que líneas sobreexpresantes de TOR, presentaron una correlación entre el tamaño celular y el rendimiento de semilla. Además, se encontró mayor acumulación de biomasa en hojas y raíz (Deng et al., 2017). Estas líneas mostraron mayor cantidad de semillas y mayor tolerancia al estrés. A su vez, el silenciamiento de TOR con ARN de interferencia mostró crecimiento reducido de órganos, una temprana senescencia y severos defectos a nivel transcripcional y metabólico, incluyendo la acumulación de azúcares y aminoácidos, confirmando de esta manera la correlación entre el crecimiento de la planta y el niveles de expresión de TOR (Dobrenel et al., 2011). También se ha demostrado que TOR actúa sobre la regulación del ciclo celular en meristemas de raíces de *Arabidopsis* por fosforilación directa del factor de transcripción E2Fa, que regula la fase S, la cual es la replicación y síntesis de ADN (Xiong y Sheen, 2013). Esta función fue confirmada mediante la inhibición química de TOR, lo cual mostró una reducción en la longitud de la zona meristemática de la raíz y la división celular (Dobrenel et al., 2011). Otros estudios reportaron que su mutante exhibe niveles reducidos de expresión de ARN 5.8S, 18S y 25S en embriones, mientras que su sobreexpresión eleva

significativamente la expresión de ARN ribosomal (Ren et al., 2011). Lo anterior desencadena la expresión de genes involucrados en la estructura de la cromatina, metabolismo de las hormonas, señalización y procesos relacionados al estrés (Xiong y Sheen, 2012). La subregulación de la expresión de TOR también activa algunos genes que codifican para proteínas de choque térmico, proteínas relacionadas a patogénesis y proteínas de resistencia a enfermedades (Caldana et al., 2013). De esta manera la señalización en plantas por TOR, activa vías anabólicas y biosintéticas y regula negativamente genes asociados a procesos catabólicos (Xiong & Sheen, 2014). Su rol en el desarrollo postembrionario es esencial, debido a que la sobreexpresión del dominio FKBP12 indujo la desregulación en la expresión de TOR, retardando fuertemente muchos aspectos claves en el desarrollo: en la semilla después de la germinación, en la expansión del cotiledón, en el desarrollo de hoja verdadera, la elongación del peciolo y crecimiento de pelos radiculares (Xiong y Sheen, 2012). Asimismo, líneas mutantes de *Ist8* y silenciamiento de TOR por ARNi, mostraron senescencia prematura y retraso en la floración (Deprost et al., 2007). Esto fue confirmado por líneas de sobreexpresión de TOR que mostraron anomalías durante el desarrollo, defectos y estructuras cortas y compactas en hipocótilos, peciolos y hojas de las rosetas (Xiong y Sheen, 2014).

Su posición en la célula le permite establecer una serie de interacciones con moléculas señalizadoras, como azúcares y hormonas. En este sentido, estudios con sistemas de expresión transitoria con construcciones fusionadas con GFP en células del epidermis de cebolla, reveló que la proteína TOR se encuentra presente en el citoplasma y el núcleo (Ren et al., 2011). Esta posición le proporciona la capacidad de modular los reguladores de la actividad meristemática de la raíz, sobrerregulando factores de transcripción (e. g., del tipo RGF6/ 9) que controlan el crecimiento radicular y genes implicados en la vía de síntesis de glutatión. En contraste, también desregulan genes UPB1 que codifican para un factor de transcripción básico hélice-bucle-hélice (bHLH), encargado de la diferenciación radicular (Xiong y Sheen, 2013). Además, estudios recientes, han proporcionado evidencia que apoya que esta señalización también regula la elongación del hipocótilo a través de la vía de brasinoesteroides (BR), específicamente por el factor de transcripción BZR1 (Zhang et al., 2016). Esta vía de activación por parte de la glucosa se ha reportado que está desacoplada de la percepción por hexocinasa1 (Moore et al., 2003). Este estudio sugiere un papel de TOR en el desarrollo de pelos radiculares asociados con la señalización de especies reactivas de oxígeno (Zhang et al., 2013). Se ha reportado un posible mecanismo de acción donde el complejo TOR puede fosforilar de manera directa o indirecta enzimas involucradas en el metabolismo del almidón. Un posible blanco sería SnRK1, la cual regula enzimas

implicadas en el metabolismo de la sacarosa (Dobrenel et al., 2016). También se han encontrado evidencias de la influencia del complejo TOR en el metabolismo de la rafinosa, ya que niveles de transcritos de rafinosa sintasa, MIPS1 (mioinositol 1- fosfato sintasa) y galactinol sintasa fueron reducidos en líneas mutantes de *LST8*, inhibición química de TOR y tratamiento con sobredosis de rapamicina. Todos estos efectos fueron observados en *Arabidopsis*. TOR está, además, implicado en el incremento de triacilglicéridos, especialmente aquellos con largas cadenas de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que la reducción de lípidos neutros también proporciona energía y reservas de carbono (Caldana et al., 2013). TOR también es inducido por auxinas, que a su vez regulan la traducción de genes de respuesta a auxinas. La reducción en su expresión también resultó en una severa disminución del crecimiento con plantas que mostraban un decaimiento general en el tamaño celular, mientras que su sobreexpresión en *Arabidopsis* aumentó el crecimiento en tallo y raíz (Deprost et al., 2007).

Como se ha mencionado antes, los primeros análisis propusieron el rol de TOR en el crecimiento, mostrando que embriones homocigotos perdían el desarrollo en etapas tempranas debido a una inserción en los genes *AtTOR* (Menand et al., 2002). Esto fue apoyado por la expresión de una línea reportera *TOR: GUS* que demostró que se encuentra en tejidos de crecimiento vegetativo, jugando un rol postembrionario. Esta función fue confirmada en años subsiguientes mediante diversos estudios que ya relacionaban la actividad de TOR con tasas de crecimiento en raíces, tallo y tamaño celular. De tal forma, se encontró que TOR no sólo tenía un importante rol en el crecimiento, sino que también mostró tener una influencia en el metabolismo, ya que se encontró que su actividad regulaba la producción de metabolitos al mismo tiempo que reprimía su almacenamiento y promovía el crecimiento mientras que regulaba negativamente estrategias de reproducción (Rexin et al., 2015). Además, otras importantes funciones que le han sido atribuidas son la regulación de la actividad mitocondrial, la producción de ROS (que tiene un gran impacto en estrés oxidativo) y la extensión de la pared celular, la cual coincidió con la desregulación de los niveles de expresión de varias expansinas y extensinas en plantas con deficiencia de TOR (Zhang et al., 2013). Este hallazgo confirmó análisis previos que habían mostrado que TOR tiene la capacidad de modificar la pared celular y sus componentes, otorgándoles ciertas propiedades de percepción, debido a la interacción con proteínas transmembranales, asociadas a la membrana y cinasas asociadas a la pared celular (Leiber et al., 2010). También se ha reportado que el complejo TOR, es regulador negativo de la autofagia, ya que se demostró que *ARNi-AtTOR* no redujo la expresión constitutiva e incrementaba

la expresión de algunos genes *ATG*, incluso en ausencia de condiciones de estrés en plantas (Liu y Bassham, 2010). Además, la interacción observada con TAP46, una proteína asociada a PP2A, llevó a la activación de enzimas encargadas de la removilización de nitrógeno, como la glutamina sintetasa y la inhibición de enzimas involucradas en la asimilación de nitratos (Ahn et al., 2011). Grandes incrementos en los niveles de aminoácidos libres se han observado con el decaimiento de la actividad de TOR. Se considera que estas funciones pueden tener dos consecuencias: la primera, una reducción en la tasa de biosíntesis y, la segunda, un incremento en el reciclado de las proteínas a causa de la desregulación de la autofagia (Xu et al., 1998). Su control traduccional ha sido confirmado con inhibición química, que conduce a un decremento en la fosforilación de S6K, que es el mediador para las respuestas de crecimiento en varios niveles en plantas (Schmelzle et al., 2004). Además, su interacción con fosfatasas tipo 2A (PP2A) ha sido demostrada con la inhibición de RNAi de TAP46, que produce una serie de respuestas muy similares a la inhibición de la actividad del TOR (Schmelzle et al., 2004). Su control transcripcional lo ejerce de manera directa con la fosforilación de E2Fa el cual juega un rol esencial que promueve la proliferación celular (Xiong et al. 2013). La disponibilidad de nitrógeno es la condición más estrechamente relacionada con la regulación de TOR (Figura 3) (Ren et al., 2012).

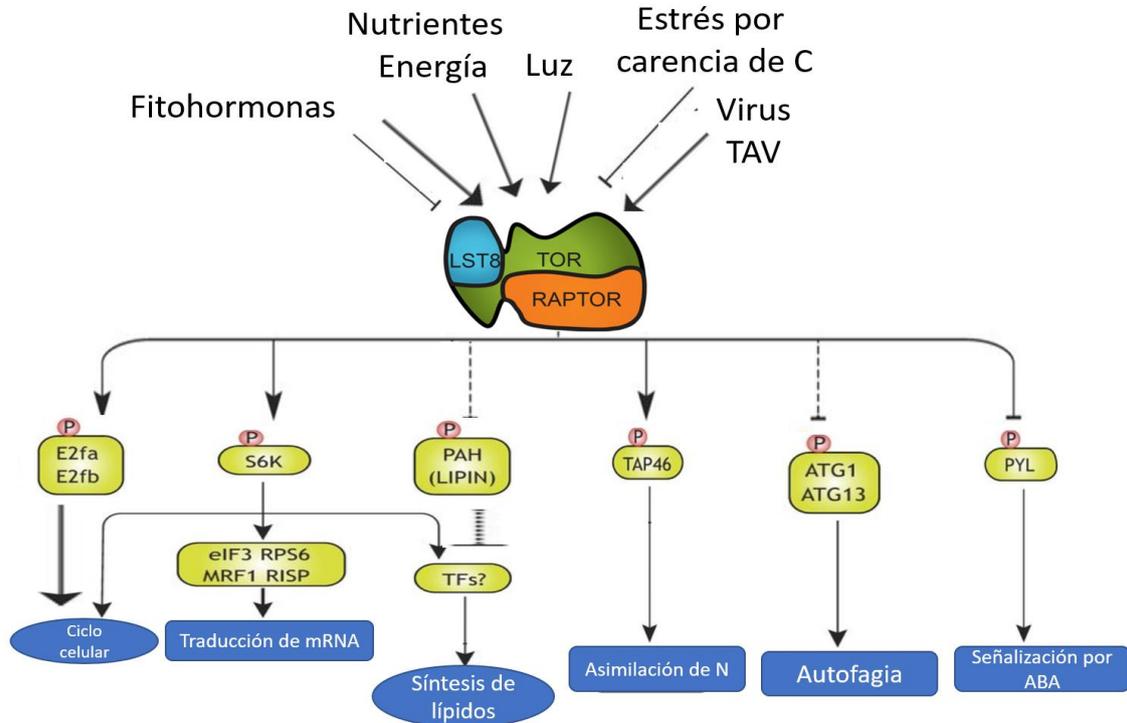


Figura 3. Esquema simplificado de la regulación por fosforilación directa de componentes río abajo por el complejo TOR y sus respectivas funciones.
Figura tomada de Deng et al. (2017).

En resumen, en las plantas, la percepción de nutrientes destinados para el crecimiento o desarrollo directamente conduce a la activación de la proteína cinasa TOR. Ésta, a su vez, controla el crecimiento, desarrollo y la senescencia de la planta. Ya que su complejo está involucrado en la regulación de la biogénesis ribosomal, traducción y metabolismo primario, además de ser un factor clave en el ciclo celular, expansión celular y crecimiento citoplasmático, no resulta sorprendente que también sea el responsable de la activación de crecimiento en los meristemas en respuesta al nivel de azúcares proporcionados por tejidos fotosintéticos (Xiong y Sheen, 2013; Soulard et al., 2009). El complejo TOR es un miembro de la familia de las fosfatidil inositol cinasas, la cual se encuentra estructural y funcionalmente conservada en todos los organismos eucariotas. Su mecanismo de señalización ha sido bien estudiado en hongos y animales, estableciendo un papel central en el crecimiento celular y el metabolismo, pues integra las respuestas de factores de crecimiento celular, nutrientes, energía y estrés (Corbesier et al., 1998). Coordina, además, el desarrollo con la disponibilidad de nutrientes en los que se incluyen los carbohidratos. Este complejo está conservado en plantas, levaduras y probablemente todos los organismos eucariotas. En plantas, la actividad de TOR ha sido relacionada al tamaño de células y órganos, rendimiento de la semilla y resistencia al estrés (Ren et al., 2011). Esto ha sugerido su rol como regulador del metabolismo del carbono y el crecimiento, interactuando con SnRk1 de forma opuesta en la regulación de procesos que involucren nutrientes (Dobrenel et al., 2016). Aunque la primera interacción que se ha reportado ha sido con AMPK homólogo de SnRK1 en mamíferos, ésta se produce debido a que TOR también responde a los cambios de energía dentro de la célula los cuales son influenciados por la presencia de nutrientes como la glucosa. Una caída de la energía celular se refleja, también, en el aumento de la tasa de AMP/ ATP la cual desencadena una serie de señales que terminan activando a AMPK, que a su vez reduce la actividad de TOR por medio de una fosforilación directa (Kapahi et al., 2011). Se ha demostrado que RAPTOR es fosforilado directamente por AMPK en células animales, en dos residuos conservados de serina, uno de ellos conservado en *Arabidopsis* (Dobrenel et al., 2011). En esta situación SnRK1 reprime todo el proceso que requiera de demanda de energía, tal y como el anabolismo o la división celular, los cuales son regulados positivamente por TOR, concluyendo así que los procesos controlados por TOR son regulados por SnRK1 de forma opuesta (Dobrenel et al., 2016).

3.6.2 REGULADOR MAESTRO DEL METABOLISMO SnRK1

Hace pocos años, dos cinasas de *Arabidopsis*, KIN10 y KIN11, también conocidas como AKIN10 y AKIN11 recibieron atención especial, debido a que fueron identificadas como reguladores centrales del transcriptoma en respuesta a jornadas de oscuridad y múltiples tipos de estrés, proporcionando nuevos niveles de regulación en el intrincado mecanismo de balance de energía y señalización (Baena-González et al., 2007). Estas dos cinasas resultaron ser ortólogos, en *Arabidopsis*, de SNF1 (del inglés, *Sucrose Non-Fermenting 1*) en levaduras y de AMPK (del inglés *AMP-activated protein Kinase*) en mamíferos. En plantas, esta familia de cinasas, son actualmente identificadas como SnRK1 (del inglés *Sucrose non-Fermenting Related Kinase 1*), que son miembros de la familia de las serina/ treonina cinasas y que constan de 3 subfamilias en plantas donde, AKIN10 y AKIN11 pertenecen a la familia 1 que corresponde a SnRK1, la cual es la más cercana en cuanto a secuencias de sus ortólogos en levaduras y mamíferos, mientras que las otras dos familias, i. e., SnRK2 y SnRK3, comprenden más de 38 enzimas cinasas involucradas en respuestas al estrés y señalización por ABA (Halford et al., 2003). Los grupos de SnRK2 y SnRK3 se caracterizan por ser únicos en las plantas.

Las cinasas SnRK2 son, en promedio, de 140 a 160 aminoácidos más cortas que SnRK1, promediando 40 KD en tamaño. De los 10 genes que codifican para este grupo, sólo uno ha sido bien caracterizado, el *SnRK2.6*. Éste está expresado en células del sistema vascular y sus mutantes alteran el cierre de estomas en respuesta a ABA. De los otros genes, al menos 4 de ellos se sabe que son inducidos por estrés hiperosmótico (Hrabak et al., 2015). Otros reportes en los cuales se describen mutantes de *SnRK2*, encontraron que en éstos se reduce ampliamente la tolerancia a sequía en la etapa vegetativa, la cual es regulada directamente por señalización dependiente de ácido abscísico (ABA): la hormona que controla las respuestas de estrés por sequía (Fujita et al., 2009). La sobreexpresión de *SnRK2* mejora el potencial osmótico, mejorando la tolerancia a sequía, salinidad y heladas (Vile et al., 2012). Además, está involucrado en los cambios en la expresión génica mediados por ABA (Hrabak et al., 2015). Reportes adicionales muestran expresión inducida de transcritos de los 10 miembros de este grupo en células y semillas de *Arabidopsis* y arroz en condiciones de estrés hiperosmótico, estrés salino y tratamiento exógeno de ABA, lo cual confirma su papel en la respuestas a estos tipos de estrés (Boudsocq et al., 2004; Kobayashi et al., 2004). Poco se sabe en cuanto a la función de la cinasa SnRK3, aunque un estudio reportó que está involucrada mayormente en conferir tolerancia al estrés por salinidad (Liu et al., 2000).

Los genes que codifican a *SnRK1* han sido identificados y caracterizados en muchas especies de plantas. Se ha reportado que esta familia génica está compuesta por 3 genes en *Arabidopsis*, denominados *SnRK1.1*, *SnRK1.2* y *SnRK1.3*. Este último es considerado un pseudogen no expresado, mientras que los otros dos fueron caracterizados por medio de sobreexpresión, donde se vieron cambios en la reprogramación del metabolismo en *Arabidopsis* en cuanto al retraso en floración y senescencia (Baena-González et al., 2007). El primer gen es expresado constitutivamente en toda la planta y es más similar a *SnRK1* en dicotiledóneas. A su vez, el segundo se ha caracterizado por ser expresado en altos niveles en la semilla, aunque bajos niveles de expresión pudieron ser detectados en toda la planta. También se distingue por ser el único detectado hasta el momento en monocotiledóneas (Purcell et al., 1998). Además, se ha reportado que *SnRK1* regula el desarrollo post-embriionario a través de la regulación de la biosíntesis y señalización de hormonas. Análisis de los genes *SnRK1.1* y *SnRK1.2* en líneas mutantes, mostraron un menor desarrollo de semillas en condiciones de baja disponibilidad de recursos y energía. Otro estudio mostró que la sobreexpresión de estos genes tuvo un impacto positivo sobre la regulación de la señalización por ABA, debido a que *SnRK1.1* y *SnRK1.2* interactúan con dos proteínas fosfatasa de tipo 2C que reprimen la vía de señalización por ABA. *SnRK1.1* y sus isoformas se encuentran localizadas tanto en el núcleo como en el citoplasma. Algunas también han sido identificadas en pequeños puntos de origen desconocido. Curiosamente, estos puntos son estimulados por daño mecánico o muestras sometidas previamente a estrés, indicando que la isoforma *SnRK1.1* es dinámica y se mueve dentro de la célula (Williams et al., 2014). También se encontró evidencia de que *SnRK1.1* interactúa con FUS3, que es un factor de transcripción que regula la transición de la fase de embrión a la vegetativa y de la vegetativa a la reproductiva. Se sabe, además, que la sobreexpresión de FUS3 retrasa el crecimiento vegetativo y la floración, incrementando los niveles de ABA, mientras reprime la biosíntesis de ácido giberélico y etileno (Williams et al., 2014).

Al ser proteínas cinasas que regulan el metabolismo a través de fosforilación, el estudio de su actividad se ha basado en la utilización de péptidos sintéticos. Uno de los primeros en ser utilizado fue el péptido SAMS, cuya secuencia es similar a la secuencia alrededor del sitio de fosforilación de acetil-CoA carboxilasa de rata, la cual es blanco de AMPK (Mackintosh et al., 1992). Sin embargo, la eficiencia para la medición de la actividad cinasa usando el péptido SAMS como sustrato no resultó ser tan alta. Por consiguiente, se diseñó un péptido con residuos de serina para su fosforilación en la posición -5 y residuos hidrofóbicos en +4. Además, se movió una arginina a la posición -3 y se

reemplazaron la mayoría de los aminoácidos de SAMS por aminoácidos neutros de cadenas pequeñas como la alanina, además de agregarle 3 argininas adicionales en el extremo C-terminal. De esta manera, se pudo diseñar un mejor sustrato y obtener más eficiencia con el nuevo péptido, el cual fue llamado AMARA (nombre derivado del inicio de su secuencia total, AMARAASAAALARRR; (Dale et al., 1995). Estos nuevos sitios de reconocimiento convirtieron al péptido AMARA en un sustrato ideal para medir la actividad de fosforilación Ser/ Tre, específicamente de SnRK1 y sus homólogos. La identificación de un mejor sustrato para SnRK1 permitió medir la actividad usando ensayos con radiactividad. Se esperaba que tanto SnRK2 y SnRK3 pudieran reconocer los mismos sustratos de fosforilación, no existen hasta la fecha reportes de la medición de su actividad enzimática de estas dos cinasas usando el péptido AMARA (Barker et al., 1996). De esta manera se considera que tanto SAMS como AMARA son sustratos específicos para SnRK1, sugiriendo que las otras dos familias, requieren diferentes secuencias de reconocimiento.

La SnRK1 es una cinasa que forma complejos heterotriméricos, compuestos por una subunidad alfa (α), una subunidad beta (β) y una subunidad gamma (γ). La subunidad α está conservada entre todos los eucariotas. Ésta consta de 3 dominios; en el extremo N-terminal se encuentra el dominio cinasa, donde se ubica el residuo treonina que una vez fosforilado activa la proteína cinasa (Shen et al., 2009). Luego de este dominio, se encuentra la región AIS, que puede tener interacciones con la subunidad γ , y bajo ciertas condiciones, la subunidad β interactúa con un dominio (β -SID) que se encuentra debajo de la región AIS en la subunidad α (Polge et al., 2008). En el extremo C-terminal, se encuentra una secuencia de exportación nuclear, o NES. En cuanto a las otras dos subunidades del complejo, éstas han tenido variaciones como resultado de la separación de los eucariotas a lo largo de su evolución, pero conservan aun, las regiones que les permiten interactuar con la subunidad catalítica (Polge y Thomas, 2007).

Estas proteínas cinasas están involucradas en regular aspectos claves de la función celular, incluyendo división celular, metabolismo y respuesta a señales externas (Hrabak et al., 2015). Su primer paso es regular enzimas claves del metabolismo, por fosforilación directa. Más adelante, estas cinasas desencadenan una masiva reprogramación transcripcional, la cual es lograda por activación, inactivación, control y relocalización de varios factores de transcripción (Ghillebert et al., 2011). Estas cinasas tienen como función principal activar el mecanismo de respuesta a la limitación de glucosa, ya que en levadura la SNF1, ortólogo de SnRK1 y AMPK, se requiere para la expresión de genes de respuesta a la privación de glucosa (Celenza y Carlson, 1986).

Además, se conoce por tener genes blancos en el metabolismo de fuentes alternativas de carbón, respiración, gluconeogénesis, transporte de nutrientes y meiosis (Hedbacker y Carlson, 2008). En mamíferos, la AMPK es activada por hipoxia, isquemia, choque térmico y actividad física, con el incremento de tasas de AMP/ ATP, que funciona como un interruptor para encender o apagar procesos de consumo de energía y activación del catabolismo (Hardie, 2007).

En plantas, los estudios en SnRK1 se han centrado en la regulación enzimática y recientemente se han empezado a esclarecer los genes blancos de ésta. Esta habilidad le confiere la capacidad de controlar el metabolismo a diferentes niveles, pues SnRK1 puede fosforilar enzimas centrales involucradas en el metabolismo primario (Polge et al., 2008). Estudios de purificación de SnRK1 en hoja de espinaca mostraron que esta cinasa es capaz de fosforilar e inactivar HMG-CoA reductasa, nitrato reductasa y sacarosa fosfato sintasa *in vitro* (Sugden et al., 1999). Estas enzimas catalizan pasos claves en la biosíntesis de isoprenoides, asimilación de nitrógeno y biosíntesis de sacarosa respectivamente. Además, la subunidad catalítica de SnRK1 en *Arabidopsis*, conocida como AKIN10, se caracteriza por fosforilar IDD8 (del inglés *INDETERMINATE DOMAIN8*) en el núcleo, el cual regula el tiempo de floración en respuesta a la represión de carbono. Esta fosforilación puede inactivar o retrasar del proceso de floración, sobre todo bajo condiciones de estrés abiótico (Jeong et al., 2015).

La actividad de SnRK1 es requerida para la expresión normal de sacarosa sintasa en tubérculos de papa, mostrando claramente que SnRK1 está involucrada en el control del metabolismo de los carbohidratos a través de la regulación de su expresión génica (Zhang et al., 2001). La expresión en antisentido de una secuencia de SnRK1 en cebada mostró un desarrollo anormal en el polen; lo anterior debido a la influencia de la cinasa sobre el metabolismo de los carbohidratos, el cual juega un rol importante en el llenado de grano de polen y la acumulación de almidón. Se sabe que SnRK1 juega un papel importante en la defensa de la planta, ya que estudios previos demostraron que proteínas de geminivirus, como AL2 y L2, son capaces de interactuar e inactivar a SnRK1 en *Arabidopsis*, lo que incrementa la susceptibilidad a la infección. Además, se produce una alteración del metabolismo como resultado de la infección viral, lo que indica que SnRK1 es un blanco clave para promover la infección (Hao, 2003). Otros estudios también han demostrado que la doble mutante de *SnRK1a/SnRK1b* incapacita al musgo *Physcomitrella* de sobrevivir a ciclos normales de día y noche, ya que no le permite realizar cambios metabólicos para permitirle adaptarse a las horas sin luz, tiempo en el cual la movilización de almidón es un factor importante para la supervivencia. No sorprende, entonces, que estas enzimas sean mayormente

expresadas durante la noche, lo cual es otra prueba de la regulación de enzimas implicadas en el metabolismo del almidón y el carbono por SnRK1 (Thelander et al., 2004). Ya que SnRK1 regula el metabolismo del almidón, ha sido manipulada en tubérculos de papa para mejorar la acumulación de almidón y reducir el nivel de glucosa, que es el causante del ennegrecimiento de este tubérculo, obteniendo mejores productos desde un punto de vista comercial. De esta manera, plantas de papa transgénicas sobreexpresantes de la subunidad catalítica de SnRK1 mostraron un incremento de almidón del 30% y niveles de glucosa reducidos de hasta un 83% (McKibbin et al., 2006). También, se ha demostrado que está involucrada en el cambio de la proliferación celular a la diferenciación durante las etapas de transición. Asimismo, su represión por secuencias antisentido causó defectos en la maduración; similares a los fenotipos insensibles a ABA en semillas de plantas transgénicas de chícharo, lo que llevó a la conclusión de que SnRK1 regula la maduración del embrión mediante la interacción indirecta con ABA (Radchuk, 2005). Una subunidad de este complejo, la proteína GAL83, regula el almacenamiento de recursos en la raíz, que luego serán dirigidos hacia los meristemas para iniciar el proceso de crecimiento. Lo anterior fue medido en un experimento en el cual se determinó la homeostasis de recursos y energía de la planta en presencia de atacantes herbívoros, relacionando de esta manera al complejo de SnRK1 con la tolerancia por herbivoría y defoliación la cual se asoció a una movilización de las reservas de carbono hacia sitios menos vulnerables al daño por insectos folívoros, como las raíces (Schwachtje et al., 2006).

Su papel como regulador maestro fue establecido por primera vez en un estudio transcriptómico, donde se detectó un amplio rango de cambios en los transcritos inducidos por SnRK1. Los genes activados por esta cinasa representaban proteínas involucradas en una amplia variedad de vías catabólicas, en procesos de degradación de la pared celular, y en cambios en los niveles de almidón, sacarosa, aminoácidos, lípidos y proteínas, las cuales podrían considerarse como fuentes alternativas de energía. También indujo la expresión en genes implicados en la autofagia. Contrariamente, se encontró que los genes reprimidos estaban implicados en rutas dependientes de un consumo de energía y recursos, y de 87 genes más, involucrados en el anabolismo. Este estudio reveló, además, interacciones con factores de transcripción, de remodelación de cromatina y componentes de traducción de señales. Los tratamientos a los que las plantas fueron sometidos para este análisis transcriptómico fueron hipoxia, oscuridad y condiciones de carencia de carbohidratos (Baena-González et al., 2007). Tiempo después se encontró que SnRK1 también induce la expresión de genes de respuesta ante el estrés, a través de su asociación directa con

la región promotora de ciertos genes blanco en la cromatina, incrementando de esta manera la tolerancia de la planta al estrés (Cho et al., 2012). Estudios adicionales reportaron la interacción de SnRK1 con miARNs que, al parecer, le permiten desregular la expresión de algunos genes implicados en la respuesta de la planta ante el estrés. Además, algunos de estos miARNs son posibles genes blanco de esta cinasa, como parte de la percepción y señalización de los niveles de energía (Confraria et al., 2013). Esta interacción también favorece procesos catabólicos, como degradación de carbohidratos, lípidos y proteínas, esta última libera gran cantidad de aminoácidos, lo que contribuye a sostener los niveles de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Tomas et al., 2014). De esta manera, se ha podido establecer que SnRK1 es un sensor metabólico que puede descodificar señales de deficiencia de energía e inducir una reprogramación metabólica drástica. Para este fin, SnRK1 interactúa con factores de transcripción y con genes localizados río abajo, que activan la programación de ahorro de energía en varios niveles, desde la transcripción pasando por la traducción hasta la fosforilación directa (Baena-González et al., 2007).

Algunos estudios demuestran que SnRK1 puede ser regulada de dos formas, por fosforilación reversible en la treonina dentro del bucle T, que es la treonina 175 o por desfosforilación e inactivación asociada a bajas concentraciones de AMP. También, se ha encontrado regulación por parte de la glucosa 6-fosfato, la cual inhibe la actividad catalítica de SnRK1 realizando pequeños cambios conformacionales en la cinasa (Toroser et al., 2000). Estudios en papa evidenciaron una regulación transcripcional diferencial de la expresión génica de SnRK1, donde se mostraron altos niveles de expresión en estolones cuando éstos empezaron a desarrollarse en tubérculos, la cual disminuyó con el tiempo a medida que los tubérculos maduraban, mientras que su más bajo nivel de expresión se encontró en hojas. Experimentos en este mismo modelo evidenciaron una regulación post-transcripcional, la cual se determinó con la medición de su actividad a través del péptido SAMS en minitubérculos. Estos estudios revelaron que su actividad fue más alta que en tubérculos maduros, mientras que los niveles de transcriptos se mantenían sin cambio, además de tener dos niveles de regulación (Man et al., 1997). De lo anterior se puede deducir que la regulación observada probablemente ocurrió por medio de un evento de fosforilación de la cinasa. Esta deducción se confirmó en un estudio realizado en espinaca, donde se observó que SnRK1 es regulada *in vitro* por fosforilación de un residuo de treonina (Sugden et al., 1999). Se ha reportado, también, que se encuentra regulada por N-miristoilación durante el desarrollo del tallo en *Arabidopsis*, siendo principal blanco de esta modificación postraduccional (Pierre et al., 2007). También, se ha demostrado que SnRK1 es

regulada por diferentes tipos de azúcares señalizadores en trigo, entre los que se encontraron T6P, glucosa 6-fosfato (G6P), glucosa 1-fosfato (G1P), fructosa fosfato, UDP-glucosa y ribosa 5-fosfato (R5P). Se cree que T6P, G1P y G6P inhiben la actividad del complejo separando los factores intermediarios del complejo, restándole estabilidad. A su vez, R5P y UDP-glucosa consumen ATP en su conversión a ribulosa-bis-fosfato (RuBP), el cual es uno de los principales limitantes de la actividad de SnRK1 (Nunes et al., 2013). Interacciones regulatorias por parte de fosfatasas, también han sido reportadas como inhibitorias de la actividad de SnRK1. Entre éstas pueden mencionarse factores como ABI1 y PP2CA que inactivan SnRK1 por desfosforilación directa de la subunidad catalítica del complejo (Rodrigues et al., 2013). Se ha indicado también que la presencia de almidón puede inhibir la actividad de SnRK1, ya que su unión a este polímero cambia la conformación del sitio activo del complejo, impidiéndole la fosforilación del péptido AMARA (Avila-Castañeda et al., 2014). Para su activación, SnRK1 requiere fosforilación, pero a diferencia de su ortólogo en mamíferos, se ha demostrado que ésta no es activada alostéricamente por AMP. Sin embargo, sí se conoce que la desfosforilación necesaria para su inactivación en el *T-loop* es inhibida por bajas concentraciones de AMP (Sugden et al., 1999). Otra gran diferencia, es que los receptores de cinasas en plantas fosforilan los residuos de treonina y serina a diferencia de los receptores en los animales, que fosforilan residuos de tirosina (Hrabak et al., 2015). Otros estudios han demostrado que el complejo SnRK1 es sumoilado por la acción de SiZ1 E3 SUMO ligasa, resultando en su posterior degradación por el proteasoma. Se ha propuesto que el mecanismo anterior opera como un punto de seguridad para evitar la activación de respuestas de estrés en condiciones normales (Figura 4) (Crozet et al., 2016).

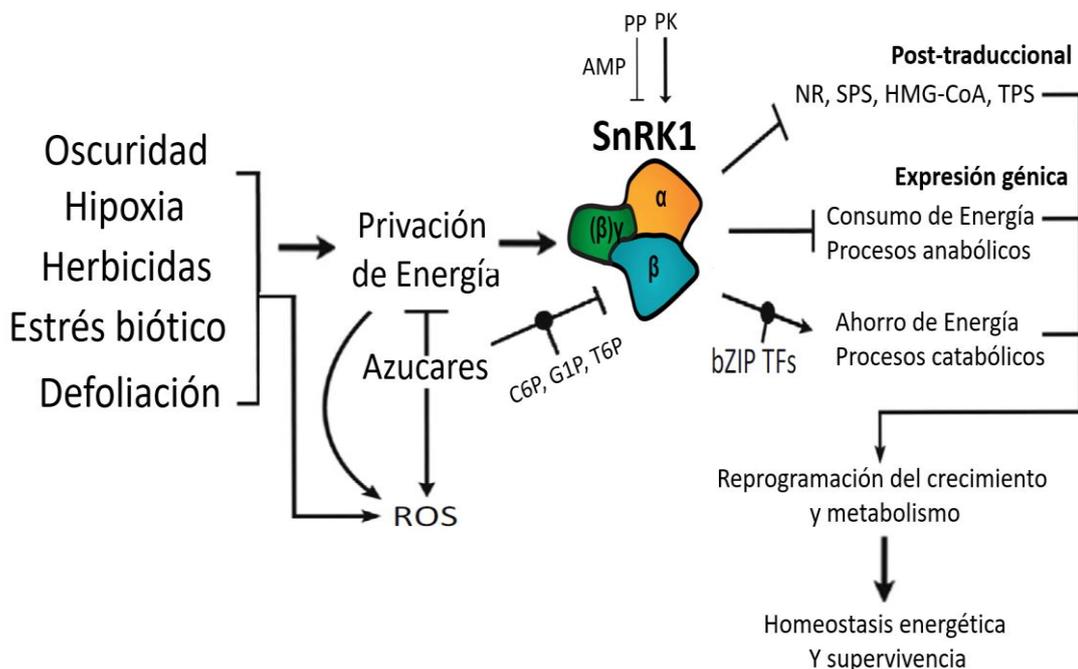


Figura 4. Resumen simplificado de los efectos de SnRK1 sobre procesos celulares, modificados por fosforilación directa de proteínas blanco y su activación por privación de energía.

El complejo heterotrimérico SnRK1 es activado por diversas condiciones de estrés que causan privación de energía. Una vez activada SnRK1, ésta regula post-traduccionamente enzimas claves del metabolismo tales como sacarosa fosfato sintasa (SPS), nitrato reductasa (NR), 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA) y trealosa fosfato sintasa (TPS). SnRK1 también es un regulador a nivel transcripcional, reprogramando la expresión mediante la asociación a factores de transcripción bZIP. Además, puede ser activada por proteína cinasas (PK) actuando río arriba. En condiciones normales, SnRK1 es, a su vez, inhibida alostéricamente por azúcares fosforilados como glucosa 6-fosfato (G6P), glucosa 1-fosfato (G1P) y trealosa 6-fosfato (T6P). Además, la regulación redox también está involucrada en el control de SnRK1, mientras que el AMP inhibe la desfosforilación e inactivación de la subunidad catalítica inhibiendo la actividad de fosfatasas específicas (PP). Figura tomada de Hulsmans et al. (2016).

Una de las funciones de SNF1 en levaduras, es la regulación transcripcional de genes. Se intuye, entonces que, al ser conservada en todos los eucariotas, SnRK1 cumple con la misma función en plantas. Para estudiar esta función se han expresado secuencias antisentido de SnRK1 en plantas de papa, tanto en sus tubérculos como en sus hojas. Con estos experimentos, se encontraron cambios en la regulación de la actividad de sacarosa sintasa, además de cambios en la expresión de genes que codifican para invertasas y represión de la actividad del promotor de la α-amilasa (Halford et al., 2003). Se ha reportado, también, que SnRK1 interactúa con varias proteínas dentro de las que se encuentran el proteasoma 26s, sus subunidades y proteínas tirosinas fosfatasas (Farras et al., 2001). Otra interacción que se ha reportado es con la región WD40 de

una mioinositol polifosfato 5-fosfatasa que interacciona con SnRK1. Usando sistemas de doble híbrido, se encontró que esta interacción difiere con la disponibilidad de nutrientes, ya que funciona como un regulador positivo del metabolismo cuando hay bajos niveles de nutrientes y azúcares, mientras que actúa como un regulador negativo cuando hay carencia de ellos. Estos resultados están apoyados por el papel crucial que tienen varias vías de señalización dependientes de SnRK1 en las respuestas estrés severo, en el desarrollo y en procesos fisiológicos (Ananieva et al., 2008). También, el factor de transcripción bZIP11 se ha reportado anteriormente como parte de la compleja red molecular que percibe el estado de los niveles celulares de azúcar para regular el metabolismo y el crecimiento, procesos en los cuales se encuentra implicado SnRK1. El factor de transcripción bZIP11 es un miembro de la familia de genes del mismo nombre, y pertenece al grupo S1, que está compuesto por bZIP1, 2, 44 y 53. Estos se expresan en todo el ciclo de vida de la planta, especialmente en los tejidos vasculares, tales como el floema y las células acompañantes. Están involucrados en una multitud de procesos celulares, como proliferación celular y diferenciación, metabolismo, respuesta al estrés y apoptosis. Su regulación por SnRK1 se produce cambiando su preferencia de unión, la cual altera su nivel de dimerización con la adición de un grupo fosfato tomado del ATP (Mair et al., 2015). Otros estudios que mostraron que regula directamente el metabolismo de los aminoácidos, junto con análisis transcriptómicos adicionales, establecieron firmemente su rol como regulador del metabolismo, ya que la inducción de su presencia nuclear reprograma drásticamente el metabolismo de los carbohidratos, promoviendo cambios metabólicos semejantes a escasez de estos. Además, hay indicios de que induce, también, la actividad de la trealasa, con consecuentes cambios en la concentración de T6P, inhibidor de SnRK1 (Ma et al., 2011).

3.8 EL AMARANTO

El género amaranto, consiste en alrededor de 70 especies herbáceas dicotiledóneas anuales, no gramíneas, consideradas como pseudocereales por producir semillas semejantes a cereales. Son de metabolismo C4, lo que les permite una fijación eficiente de CO₂ bajo altas temperaturas, luz intensa y humedad variable. Pertenecen a la familia *Amaranthaceae*, en las que también se incluyen la remolacha dulce o betabel, la espinaca y varias halófitas (Castrillón-Arbeláez et al., 2012). Son cultivadas como vegetales o cultivos productores de grano; las plantas crecen con un tamaño de 0.5 a

3.0 metros de altura, con raíces profundas y extensas, tallos erectos ramificados y simples, con hojas membranáceas con notoriedad en las venas del envés con margen entero, ligeramente sinuadas y con base atenuada (Espitia-Rangel et al., 2010). Tiene un gran interés agronómico debido a su resistencia a insectos plaga y patógenos, así como a condiciones de estrés abiótico, tales como sequía, calor y salinidad excesiva (Huerta-Ocampo y Barba De La Rosa, 2011). Las especies de amaranto de grano son *Amaranthus caudatus*, *A. cruentus*, y *A. hypochondriacus*. Estos cultivos tienen un gran potencial nutricional por su alto contenido de fibra soluble, una amplia variedad en lípidos, que van desde ácidos grasos palmítico, oleico y linoleico, hasta hidrocarburos insaturados como el escualeno. También se ha reconocido su alto contenido de vitaminas y minerales, como la riboflavina, niacina, ácido ascórbico, calcio y magnesio, así como altos y equilibrados niveles de aminoácidos, incluyendo lisina y metionina en hojas y, sobre todo, en semillas. La calidad nutricia de las semillas de amaranto supera con creces a cualquier otro cereal o leguminosa. Estas propiedades le han permitido ser reportadas como benéficas para el hombre por su influencia positiva sobre el sistema inmune, por su efecto antitumoral, por su regulación de los niveles de glucosa en la sangre y de la función del hígado, por el control de la hipertensión, y por sus actividad antianémica y antioxidante (Caselato-Sousa y Amaya-Farfán, 2012).

Los amarantos de grano han sido consumidos a través de la historia, por las civilizaciones Inca, Maya y Azteca. Son de origen americano, domesticadas en las regiones del norte y centro de México y en Sudamérica. Estos cultivos pueden tener varios usos, ya sea como suplemento alimenticio por la alta calidad en sus granos y/ o de sus hojas, las cuales son utilizadas, también, como alimento o como forraje. Además, las inflorescencias de muchas especies poseen una atractiva y vistosa coloración que ha promovido su cultivo como planta ornamental, aunque el principal uso en la actualidad es obtener productos libres, o con bajo nivel, de gluten (Venskutonis y Kraujalis, 2013). Con la llegada de los españoles este cultivo declinó. Diversas teorías han señalado que la razón de su declive en época de conquista española, se debió a que esta planta era usada para preparar un tipo de pan especial usado en ceremonias religiosas propias de las tribus precolombinas las cuales fueron prohibidas por los españoles en su afán de evangelizar el nuevo continente (Sánchez-Hernández et al., 2004). Irónicamente, fue gracias a los españoles que el grano de amaranto llegó a Europa, África y Asia (Brenner, 2000). Su papel como un cultivo de cereal alternativo fue aumentando debido a su capacidad para rendir aún bajo condiciones infértiles y semiáridas, así como frente a diferentes plagas herbívoras, lo que le permitió una exitosa introducción en varios países de Europa (Sánchez-Hernández et al., 2004). Es

necesario señalar que dentro de esta familia también se encuentran plantas consideradas como malezas agresivas, como *A. retroflexus*, L., *A. hybridus* L., *A. powellii*, y *A. spinosus* L. Estas plantas poseen, además, un crecimiento óptimo a temperaturas entre 15 y 35°, en climas tropicales, templados y cálidos. Los suelos adecuados para su cultivo son suelos bien drenados, francos y con pH neutro a alcalino. En cuanto a su ciclo de vida, éste depende de la especie, la temperatura y el fotoperíodo a la cual esté expuesta, y puede variar entre 70 a 240 días, lo que valida su distribución geográfica, que incluye prácticamente los 5 continentes (Espitia-Rangel et al., 2010).

El amaranto ha recibido cierta atención debido a una serie de proteínas de función defensiva que se han encontrado en sus semillas y hojas, cuyo nivel puede ser mejorado por aplicaciones de metil-jasmonato exógeno (MeJA) y ABA (Délano-Frier et al., 2004). Entre éstas se encuentran los inhibidores de tripsina y de alfa-amilasa, así como proteasas, proteínas de almacenamiento y otros agentes protectores contra insectos y microorganismos (Valdés-Rodríguez et al., 1993). En este contexto, estas propiedades podrían ser candidatos atractivos para el mejoramiento de otros cultivos en respuesta a estrés biótico. Se ha reportado, además, que su capacidad para sobrevivir bajo un ambiente de sequía, así como su tolerancia a condiciones de alta salinidad, está muy relacionada con el uso eficiente de agua, que se ha encontrado ser superior a cultivos como la cebada, el maíz, algodón y sorgo (Délano-Frier et al., 2011). Además, cuenta con hábitos de floración indeterminados, con una amplia red de raíces laterales, acumulación de solutos compatibles y expresión de genes de respuesta al estrés (Massange-Sanchez et al., 2015). Se reconoce entonces al amaranto como cultivo de alto interés agronómico, cuya relevancia radica predominantemente en la adaptación a diferentes ambientes. La palabra amaranto viene del griego *amarantos*, que significa “El que no se marchita”. Dicho nombre hace justicia fielmente a su capacidad de sobrevivir a condiciones hostiles, tanto abióticas como bióticas, lo que le valió para ser reconocida por la Academia Nacional de Ciencias de los EUA, como uno de los cultivos más promisorios (Park y Nishikawa, 2012).

3.8.1 ANTECEDOS DEL AMARANTO ANTE EL ESTRÉS POR DEFOLIACION

El primer estudio de la tolerancia del amaranto a la defoliación fue realizado evaluando la respuesta, a nivel metabólico, causada por daño mecánico y por herbivoría de insectos folívoros. Estas respuestas mostraron plasticidad metabólica, ya que se

evidenció que, en tratamiento de recortes de tallo en diferentes proporciones, se produjeron, como respuesta, cambios morfológicos y relocalización de fotosintatos. cuyo fin se interpretó como un mecanismo para recompensar las pérdidas causadas por el daño al follaje. Estos cambios fueron significativos cuando fueron comparados con plantas control. La compensación observada se manifestó como un incremento en biomasa foliar, que se encontró mayor en plantas en las que les había sido removido el 10% de este tejido. Este dato indicó que la capacidad de tolerancia al daño por defoliación en amaranto de grano estaba determinada por la cantidad de daño provocado a la planta. También, se mostró un efecto negativo en las plantas dañadas respecto a la producción de ramificaciones primarias y secundarias, lo que no afectó el rendimiento de semilla producido por plantas de *A. cruentus* (Moreno et al., 1999). La tolerancia a la defoliación del amaranto se manifestó no sólo por mantener su equilibrio reproductivo, sino, también, por incrementar la biomasa y el rendimiento de grano (Moreno et al., 1999). Estos resultados en campo fueron confirmados posteriormente con estudios realizados en invernadero, en los cuales plantas de *A. cruentus* de 4 semanas de edad, fueron sometidas a una pérdida de 30 % de su tejido foliar. Este tratamiento no tuvo efectos significativos negativos a largo plazo, como el rendimiento de semilla, que se mantuvo similar en comparación con las plantas control. Sin embargo, se observaron efectos más inmediatos, como una disminución significativa de diferentes actividades sacarolíticas, encargadas de regular la demanda de azúcares entre órganos consumidores y los órganos fuente, en hojas, y en menor grado en raíz y tallo, en plantas defoliadas analizadas 24 h después de la pérdida de tejido foliar (Vargas-Ortiz, 2009). En este contexto, se puede considerar a la plasticidad con la cual la planta de amaranto redistribuye sus fotosintatos como uno de los factores determinantes de su tolerancia ante el estrés por defoliación, la cual se ocurre sin alterar su éxito reproductivo.

Adicional a estos estudios metabólicos, un análisis transcriptómico del amaranto bajo diferentes tipos de estrés tanto de tipo biótico como abiótico, proporcionó las bases para análisis moleculares de las respuestas de tolerancia de amaranto (Délano-frier et al., 2011). De esta manera, el mecanismo de tolerancia del amaranto ante condiciones de defoliación se siguió reforzando con estudios como el siguiente: donde plantas de *A. cruentus* de 4 semanas fueron expuestas a la pérdida de alrededor un 30% en área foliar. Este estudio mostró una rápida movilización de las reservas de almidón, con el fin de recuperar los niveles reducidos de los carbohidratos no estructurales como glucosa, sacarosa y fructosa. Lo anterior para apoyar la respuesta de tolerancia a la defoliación del amaranto de grano, sin alterar el crecimiento de la planta y el equilibrio reproductivo. Resultados que fueron congruentes con análisis enzimáticos, que mostraron la

correlación en el comportamiento de fotosintatos con los niveles de actividad de enzimas sacarolíticas y amilolíticas (Castrillón-Arbeláez et al., 2012).

La habilidad del amaranto de grano de metabolizar las reservas de carbono en forma de almidón de tejidos fuente y sumidero con el fin de recuperarse después de la defoliación, parece ser un factor clave en la tolerancia de éste al estrés. Otro estudio que comprobó la validez de la anterior hipótesis fue realizado con plantas de *A. cruentus* de 30 días sometidas a diferentes grados de defoliación: es decir, 20, 50 y 100% de pérdida de tejido foliar por daño mecánico. En este estudio se encontró que no hubo diferencias significativas en cuanto a peso fresco del vástago, raíz y altura de la planta, en los primeros 30 días después del tratamiento, con excepción de una leve reducción en la planta que fue 100% defoliada. No obstante, pasados los 110 días después del tratamiento, las plantas no reflejaron cambios e incluso mejoraron en ciertos parámetros de crecimiento, como el peso de la panoja, producción y calidad de semillas en comparación con las plantas control. Este comportamiento también se vio reflejado en el nivel de carbohidratos no estructurales. Sin embargo, análisis en las actividades de enzimas sacarolíticas mostraron que las reservas de carbono ubicadas en tallo y raíz solventaban la mayor parte de la recuperación en defoliación parcial. De modo que en respuesta a la defoliación total en plantas de amaranto de grano, se produce una reprogramación del metabolismo de las mismas, que convierte los órganos residuales, como tallo y raíz, en órganos fuente capaces de mantener el desarrollo y la reproducción de la planta (Vargas-Ortiz et al., 2013).

Además de la capacidad del amaranto de metabolizar sus reservas de carbono, otro factor clave de la tolerancia a la defoliación, es la capacidad de reprogramar y redirigir los fotosintatos acumulados en las reservas de carbono con el fin de mantener la homeostasis energética. Este último mecanismo es muy dependiente de la etapa de desarrollo en la cual la planta de amaranto es defoliada, premisa que fue analizada con otro estudio, donde se realizó un tratamiento de defoliación acumulativa por daño mecánico en plantas de *A. cruentus* en 4 etapas ontogénicas diferentes. Éstas se denominaron como; “Vegetativa 1” (en plantas de 5 semanas de edad); “Vegetativa 2” (en plantas de 7 semanas de edad); “Emergencia de Panoja” (en plantas de 10 semanas de edad) y “Floración” (en plantas de 12 semanas de edad). En este estudio se observó que la defoliación total afectó drásticamente la biomasa del vástago y la producción de semilla sólo en la etapa de floración, otro efecto observado en esta etapa fue que el 50% de las plantas defoliadas murió a causa del estrés, ya que fueron incapaces de activar meristemos laterales para la generación de nuevo tejido fotosintético, como ocurrió en otras etapas como la “Vegetativa 2” y la de “Emergencia de Panoja” (Vargas-

Ortiz et al., 2015). Sobre la base de estos datos, este estudio concluyó que la tolerancia a la defoliación del amaranto depende de la etapa ontogénica en la que se encuentre al ser defoliado, siendo más alta en aquellas donde los niveles de carbohidratos en raíces y tallos sean más altos. Se concluyó que una abundancia de reservas le confiere a la planta la capacidad de relocalizar y metabolizar rápidamente los fotosintatos necesarios, ya sea para la activación de meristemos y/ o para mantener el desarrollo y asegurar el éxito reproductivo.

Partiendo de los análisis bioquímicos y metabólicos realizados para lograr un mejor entendimiento de la respuesta de tolerancia de amaranto ante el estrés por defoliación, se realizó un estudio adicional, a nivel molecular, para complementar las conclusiones obtenidas anteriormente, La premisa de este estudio fue que los reguladores maestros del metabolismo como TOR y SnRK1 serían los encargados de la regulación transcripcional de las respuestas a la defoliación en amaranto, debido a sus nexos con el metabolismo de los carbohidratos y su relación con la homeostasis de la planta. En este estudio se evaluaron los efectos de la defoliación acumulativa a lo largo de 3 días por daño mecánico sobre la expresión de genes que codifican para enzimas sacarolíticas y para los reguladores del metabolismo SnRK1 α y TOR en 4 órganos (i.e., raíz, tallo, hojas y panículas) y a lo largo de su desarrollo, de “Vegetativa 1” a “Floración”. Los resultados mostraron patrones de expresión únicos para cada órgano y etapa de desarrollo para los genes codificantes de enzimas sacarolíticas. En cuanto a los genes codificantes de los reguladores maestros del metabolismo, no se modificó la abundancia relativa de transcritos en ningún órgano y etapa de desarrollo, aunque hubo una leve inducción de la expresión en tallo y raíz para SnRK1 (Cisneros-Hernández 2016). Este comportamiento sugirió la posibilidad de que el mecanismo encargado de controlar la fuerte reprogramación del metabolismo en respuesta al estrés por defoliación se produjera a nivel post-traducciona, es decir, a través de una cascada de cinasas, capaces de la activación o desactivación, por fosforilación/ desfosforilación, de los reguladores maestros del metabolismo. De esta posibilidad parte la justificación del presente trabajo y el sustento de su hipótesis.

4. HIPÓTESIS

La defoliación total en amaranto de grano (*Amaranthus cruentus*) causará la disminución del nivel de actividad cinasa del complejo TOR, generada en respuesta a una limitación de nutrientes, mientras que aumentará el nivel de actividad cinasa de SnRK1 como respuesta a la deficiencia de carbono. Estas respuestas antagónicas al estrés por defoliación se producirán para mantener la homeostasis energética y dependerán del órgano y la etapa de desarrollo en la que se encuentren cuando sean expuestas a la pérdida total de tejido foliar.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la actividad de cinasa de proteínas *in vitro* de TOR y SnRK1 en respuesta a la defoliación severa en *A. cruentus* var. Tarasca en diferentes órganos y diferentes etapas de desarrollo.

5.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar péptidos sustratos específicos para cada una de las proteínas cinasas, teniendo en cuenta sus secuencias de reconocimiento y sus sitios de unión al complejo.
2. Estandarizar un protocolo de medición basado en el uso de sustratos fosforilados con ATP radiactivo, diseñados para determinar la actividad de fosforilación de las dos proteínas cinasas en estudio: TOR y SnRK1.
3. Determinar la actividad de TOR y SnRK1 en respuesta a la defoliación severa en diferentes órganos y etapas de desarrollo, por medio de métodos estandarizados previamente,

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

En el desarrollo experimental del proyecto aquí mencionado se usaron plantas de *Amaranthus cruentus* var. Tarasca. Las semillas fueron proporcionadas por el Dr. Eduardo Espitia Rangel del INIFAP, Unidad Experimental Estado de México. Esta planta ofrece tallo y forraje de un color verde con tonos rosados. La panoja es roja-violácea y de crecimiento indeterminado. Con un tiempo de maduración de aproximadamente 140 días, el cual es relativamente insensible al fotoperiodo (Cineros-Hernández, 2016).

6.2 Obtención de plantas

Las plantas se obtuvieron de la siguiente manera, las semillas de *A. cruentus* var. Tarasca fueron sembradas en charolas de germinación de poliestireno de 60 cavidades proporcionadas por el cuarto de siembra. Éstas se llenaron previamente con una mezcla de proporción 1:1 de pasta de coco con mezcla general (pajote de jardín, limo, "Sunshine Mix 3", vermiculita y perlita en relación 2:1:3:1:1). Las charolas se llevaron a un cuarto de crecimiento con una temperatura determinada de 26 °C, con una humedad relativa del 75% y un fotoperiodo de luz de 16 h luz/ 8 h oscuridad. Las plántulas con dos hojas verdaderas (hv) (3 semanas después de la germinación, sdg) fueron llevadas a un invernadero comercial (modelo baticentral, ACEA, México) con condiciones de temperatura entre 15.5 °C y 38.5 °C (mínima nocturna promedio y máxima diurno promedio, respectivamente), con una humedad relativa promedio de aproximadamente 55%. En estas condiciones, se trasladaron a macetas de polietileno de baja densidad (LPDE) de 18 L de capacidad previamente llenadas con mezcla general antes mencionada. Las plantas permanecieron en este sitio hasta el tiempo de su colecta. Durante el transcurso de cada experimento, las plantas fueron fertilizadas 2 veces con 400 ml de una disolución al 0.2% (p/v) del fertilizante 20-10-20 (Peters Professional, Everris, Headquarters, EUA). Es decir, el día del trasplante a la maceta y en la etapa de emergencia de panoja. Las plantas fueron regadas constantemente con el fin de evitar el estrés hídrico. Para el control de plagas, se aplicó Basudin 600EC (Syngenta, Basilea, Suiza) (Vargas-Ortiz et al. 2013, Cisneros-Hernández 2016).

6.3 Experimento de defoliación

El tratamiento de defoliación fue realizado con plantas de *A. cruentus* var. Tarasca, crecidas del modo descrito. El experimento tuvo un diseño factorial. El primer factor correspondió al grado de defoliación de las plantas, con dos niveles: sin defoliación, correspondientes a “plantas control” y defoliación total, correspondientes a “plantas tratadas o defoliadas”. El segundo factor correspondió a la etapa de desarrollo de las plantas, en donde se establecieron cuatro etapas para realizar la defoliación: “Vegetativa 1 (V1)”, realizada con plantas de 6 a 8 hojas verdaderas (hv) y 4 a 5 semanas después de la germinación (sdg); “Vegetativa 2 (V2)”, en plantas con 14 a 16 hv y 6 a 7 sdg; “Emergencia de Panoja (EP)”, en plantas que mostraban la incipiente aparición de inflorescencias, 9 a 10 sdg y “Floración (FL)”, en plantas con alrededor del 50% de anthesis y 11 a 12 sdg. Un tercer factor correspondió al órgano analizado (Cisneros-Hernández, 2016; Vargas-Ortiz et al., 2015). Para cada intersección de los primeros dos factores, se destinaron 9 plantas, divididas en 3 “grupos” de 3 plantas cada una, de las cuales se colectaron raíces, tallos y hojas para el caso de las etapas V1 y V2, y raíces, tallos, hojas y panojas para el caso de las etapas EP y FL. Se hizo, además, una repetición biológica adicional de todo el experimento.

El tratamiento de defoliación fue realizado en todas las hojas de las “plantas defoliadas” con una perforadora metálica para papel, evitando dañar la nervadura principal. Una vez que el grupo de plantas destinadas a la defoliación alcanzó la etapa ontogénica predeterminada, se realizó el tratamiento de defoliación con la perforadora. La pérdida de tejido foliar se realizó gradualmente durante tres días consecutivos hasta alcanzar la defoliación total. El primer día se perforó aproximadamente el 33% de la superficie foliar, el segundo día el otro 33% de las hojas, y al tercer día se separó la hoja parcialmente defoliada, de la planta, con ayuda de unas tijeras metálicas para papel. Las hojas fueron congeladas con nitrógeno líquido inmediatamente después de haber sido separadas de la planta y se almacenaron en un ultra-congelador Revco (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, EUA) donde se mantuvieron a una temperatura de -80 °C hasta su análisis. Las plantas defoliadas en su totalidad permanecieron un día adicional al tercero y después de este tiempo se recolectaron los demás órganos; es decir, las raíces y tallos para V1, V2, EP y FL. La panoja se recolectó sólo en las etapas de EP y FL. También estas muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas en el Revco a -80°C. En el mismo día se recolectaron los mismo órganos de las “plantas control” no defoliadas, y se congelaron en nitrógeno líquido siendo almacenados igualmente en el Revco a -80°C (Cisneros-Hernández, 2016; Vargas-Ortiz et al., 2015).

6.4 Extracción de proteínas para la medición de la actividad cinasa

La proteína total soluble de cada una de las muestras de plantas se extrajo a partir de 50 a 100 mg de tejido fresco, (dependiendo de la cantidad de la muestra) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, resuspendido en 150 a 300 μ l de buffer de extracción frío compuesto por 100 mM de tricina ajustado a pH 8 con NaOH, homogenizado con 25 mM de fluoruro de sodio, 5 mM de Ditioneitol, 2 mM de pirofosfato tetrasódico, 0.5 mM de ácido etilendiaminotetraacético, 0.5 mM de ácido etilenglicoltetraacético, 1 mM benzamidina, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonil, 1 mM de un "coctel" de inhibidores de proteasa y de inhibidores de fosfatasas, 2.5 μ M de ácido okadaico y 2% w/v de polivinilpirrolidona y se dejó en agitación por 15 min a 4°C. Luego, este homogenizado fue centrifugado a 15,000 gs y 4 °C, durante 20 min. Cumplido este tiempo, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 ml, del cual se realizó la medición de las proteínas cinasas y la cuantificación de proteína total por el método de Bradford (Zhang et al., 2009).

6.5 Obtención de los controles positivos

Para las pruebas de los ensayos de espectrometría de acoplamiento enzimático y radiactividad, se usaron enzimas de casas comerciales como controles positivos, AMPK homólogo de SnRK1 en mamíferos y mTOR que se encuentra conservado en todos los eucariotas, ambas enzimas fueron adquiridas de (Millipore; Burlington, Massachusetts, EUA). AMPK (α 1, β 1, γ 1) recombinante de humano, comprende la longitud total del extremo N-terminal marcado con histidina de AMPK α 1, la longitud total sin marcar de AMPK β 1 y la longitud total sin marcar de AMPK γ 1. Expresada en células de *E coli* y activada "in vivo" se purificó usando agarosa Ni²⁺/ NTA, con una pureza de 59.1% por SDS-PAGE y azul de Comassie, el peso molecular de cada subunidad es de AMPK α 1= 64 kDa, AMPK β 1= 30 kDa y AMPK γ 1= 38 kDa con una actividad específica de 2831 Unidades/ mg, donde una unidad de AMPK es definida como 1 nmol de fosfato incorporado en 50 μ M del péptido AMARA, por minuto a 30°C. Para TOR, se usó mTOR, recombinante de humano, con el extremo N-terminal marcado con FLAGTM, expresada por baculovirus en células de insecto, purificada usando agarosa FLAGTM, con una pureza de 56.4% por SDS-PAGE y azul de Comassie, cada subunidad tiene un peso molecular de 137.3 kDa, con una actividad activa de 317 Unidades/ mg, donde una

unidad de mTOR es definida como 1 nmol de fosfato incorporado en 2 mg/ ml del sustrato de TOR por minuto a 30 °C.

6.6 Síntesis de los sustratos peptídicos para las proteínas cinasas

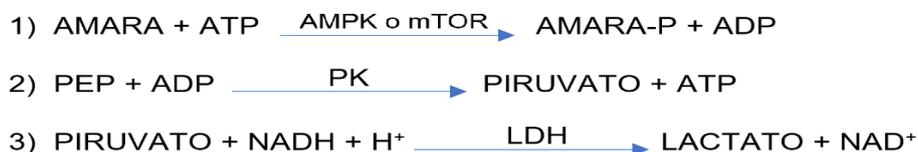
Reportes previos sobre la medición de la actividad AMPK, el homólogo de SnRK1 en mamíferos, describen el uso de un péptido sintético llamado AMARA (AMARAASAAALARRR), que funciona para todos los ortólogos de esta enzima que comparten el dominio cinasa (Dale et al., 1995). Por consiguiente, para nuestros análisis de SnRK1, con el dominio catalítico conservado, se infirió que también serviría para la medición de su actividad. Este péptido, diseñado por Dale et al. (1995), fue sintetizado con algunas consideraciones: i) la serina destinada a la fosforilación se ubicó en la posición -5 y residuos hidrofóbicos en la posición +4; ii) otros residuos fueron retenidos en la misma posición que SAMS, péptido que hasta el momento se había utilizado para la medición de la actividad de AMPK; iii) se cambiaron algunos aminoácidos por alaninas, con el fin de evitar complicaciones observadas en otros péptidos sintéticos, y iv) se le agregó 3 argininas en el extremo C-terminal para facilitar el ensayo basado en el uso de radiactividad. Sobre la base de lo anterior, el péptido fue adquirido de un catálogo comercial de la empresa Peptide 2.0 (<https://www.peptide2.com/>).

Reportes previos sobre la medición de TOR, conservado en todos los eucariotas, describen el uso de ensayos de inmunofluorescencia, con péptidos sustratos marcados con un fluorocromo y anticuerpos de fosfoacetil-CoA marcados con Europio (Eu), que son medidos por la técnica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET); la cual es una técnica costosa. Teniendo esto en cuenta, se desarrolló un protocolo de radiactividad para medir la actividad de TOR, el primer paso fue diseñar un sustrato idóneo para este protocolo. Para el sustrato de TOR, se diseñó un péptido “*de novo*”. Para ello se tomó la secuencia consenso del sitio de fosforilación de TOR de la proteína S6K (del inglés, Ribosomal protein S6 Kinase) y se hizo un alineamiento con el programa MUSCLE (del inglés, Múltiple sequence alignment by log-expectation) de la plataforma MEGA7 (Edgar, 2004). Las secuencias alineadas se seleccionaron de aquella conservadas en todos los organismos eucariotas examinados (e. g., *A. thaliana*, *A. hypochondriacus*, *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *R. norvegicus*, *C. elegans* y todas las especies de plantas que han reportado genomas en la plataforma de phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>). Una vez hecho el alineamiento, se establecieron los

aminoácidos conservados y se prosiguió a elegir la secuencia conservada. Algunos aminoácidos fueron cambiados por alanina y también se le agregaron 3 argininas en el extremo C-terminal con el fin de propiciar la interacción electroestática necesaria para la utilización del protocolo de radioactividad. El péptido diseñado posee la siguiente secuencia de aminoácidos: AFAGFTYVAPRRR y fue sintetizado, también, por la empresa comercial Peptide 2.0.

6.7 Ensayo espectrofotométrico de acoplamiento enzimático

Las proteínas cinasas, que ha sido descritas en eucariotas y procariontes, catalizan la transferencia de un grupo fosfato de ATP o GTP a residuos específicos de aminoácidos contenidos en proteínas sustratos, usando este principio, se intentó un ensayo enzimático con los péptidos sustratos ya sintetizados descritos anteriormente y los controles positivos. Las proteínas usadas para este ensayo fueron controles positivos obtenidos de casas comerciales, AMPK homólogo de SnRK1 en mamíferos y el complejo recombinante de mamíferos mTOR, el ensayo espectrofotométrico consta de 3 reacciones:



La reacción 1, catalizada por la proteína cinasa, fosforila el péptido sustrato, en este caso AMARA, produciendo el péptido fosforilado más ADP, luego es acoplada en presencia de piruvato cinasa (PK), que usa como sustrato fosfoenolpiruvato (PEP) y el ADP producido en la primera reacción, produciendo piruvato más ATP, luego el piruvato es tomado por la lactato deshidrogenasa (LDH) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida (NADH) para producir lactato y oxidar el NADH a NAD⁺: reacción 3. La oxidación del NADH (reacción 3), se midió directa y continuamente su absorbancia en una placa microtituladora de ELISA de 96 pozos a 30 °C con una longitud de onda de 340-374 nm en el “xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer” (Hercules, California, EUA). La muestra fue extraída como se mencionó anteriormente en la sección 6.4, pero para la reacción, se usó otro buffer, un buffer de reacción que fue reportado por Zhang et al. (2009). Este buffer estaba compuesto por 40 mM de HEPES ajustado a pH 7.5 con NaOH, 5 mM de Ditiotreitól, 1 uM Ac okadaico, 1 uM de Pepstatina A, 10 uM de E64, 7 uM de Quimostatina, 5 mM de

Cloruro de Magnesio, 200 uM de ATP, 235 uM de fosfoenolpiruvato (PEP), 6.33 uM de NADH, 3.1 unidades de Lactato deshidrogenasa (LDH), 3.1 unidades de Piruvato quinasa (PK), 200 uM del sustrato ya sea "AMARA" o "FLGFTYVAP" y por último 2 unidades de los controles positivos "AMPK" o "mTOR". El volumen total en la placa fue de 150 ul y el orden de adición de los reactivos, fue el buffer de reacción, NADH, LDH, PK, PEP, ATP; el péptido sustrato y por último se disparó la reacción con la enzima cinasa (Technikova-Dobrova et al., 1991).

6.8 Ensayo radiactivo para medir la actividad de las proteínas cinasas

Se colocó 1 ul del extracto crudo de proteína total extraído por el método antes descrito y se almacenó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml donde se mezcló con 19 µl del buffer de reacción, compuesto por Hepes, 40 mM, ajustado a un pH de 7.5 con NaOH que contiene, además, 5 mM de cloruro de magnesio, 200 uM de [γ - 32 P] ATP (3.77 TBq mol $^{-1}$), 200 µM del péptido AMARA (Ala-Met-Ala-Arg-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-Ala-Leu-Ala-Arg-Arg) o S6K (Ala-Phe-Ala-Gly-Phe-Thr-Tyr-Val-Ala-Pro-Arg-Arg-Arg)) según sea el caso, 5 mM DTT, 1 uM de ácido okadaico, 1 uM pepstatina A, 10 uM de E64 y 7 µM de quimostatina. Esta mezcla se dejó incubando por 10 min a temperatura ambiente. Cumplido este tiempo, la reacción se detuvo en piezas de papel de fosfocelulosa, sobre los cuales se realizaron 3 lavados con 75 mM de ácido fosfórico (H $_3$ PO $_4$); el primero, de 15 min, y los últimos dos, de 10 min cada uno, en agitación. Se descartó el líquido de cada lavado con ayuda de una bomba de vacío adaptada para este fin. Luego, se realizó un último lavado con 1 ml de EtOH (grado molecular) y se agitó durante 5 min. Pasado el tiempo, las piezas de papel de fosfocelulosa se secaron a temperatura ambiente durante 10 a 15 min. Paralelo a esto, se realizaron los totales; éstos constaron de 4 piezas de papel de fosfocelulosa que no se sometieron al proceso de lavado, en donde 2 tuvieron 2.5 µl (0.5 nmol de [γ - 32 P]ATP) y otros 2, 5.0 µl (1 nmol de [γ - 32 P]ATP) que fue tomado del buffer de reacción restante. La radiactividad localizada en el péptido fosforilado por la actividad de la cinasa de la muestra se midió en las piezas de papel de fosfocelulosa, donde se inmovilizó debido a una interacción electroestática con las cargas positivas de sus residuos de arginina. Luego, se sumergieron en líquido de centelleo contenido en un vial y se midió la radiactividad con ayuda de un equipo contador de centelleo Beckman 5000CE (Brea, California, EUA). La actividad cinasa fue

calculada basada en estas mediciones y en la concentración de proteína total determinada de cada muestra por el método de Bradford (Zhang et al., 2009).

6.9 Método de Bradford para cuantificación de proteína total

Se cuantificó la proteína total por el método de Bradford, ya que presenta ciertas ventajas, como: i) el fácil uso para un gran número de muestras; ii) alta sensibilidad, gracias al alto coeficiente de extinción (Intensidad que tiene una sustancia de absorber la luz a determinada longitud de onda) del complejo de colorante-proteína, y iii) rapidez, pues el proceso de unión entre el colorante y la proteína dura aproximadamente 2 min. La cuantificación se realizó en placas microtituladoras de ELISA de 96 pozos, donde se colocó una curva estándar de concentración de albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine serum albumin*) (Sigma) previamente diluida en 0.15 M NaCl, a diferentes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ mL de 10 μ l, contenidas, cada una, en un pozo de la placa. Luego, se prosiguió a hacer la primera dilución de la muestra (1: 10 v/v) de la cual se tomaron 10 μ l y se colocó justo al lado de la curva estándar de BSA, repitiéndose así para todas las muestras. Inmediatamente, se le agregó 200 μ l del colorante azul brillante de Coomassie y se esperó 10 min para que se formara el complejo colorante-proteína. Pasado el tiempo, la placa con la muestra y la curva se llevó a el "xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer" (Hercules, California, EUA), para medir la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Los datos fueron exportados y analizados en el paquete de Microsoft Office Excel (Bradford, 1976).

6.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó, primero, en el paquete de Microsoft Office, Excel, donde primero se calculó la actividad. Aquí, el dato arrojado por el contador de centelleo se dividió entre la radiactividad promedio de 1 nmol de [γ -³²P]ATP. Éste, a su vez, se dividió entre el volumen de la reacción, luego entre el tiempo y se normalizó con el dato de proteína total, determinada por el método de Bradford. Una vez calculada la actividad, se usó el programa de lenguaje de programación R (<https://cran.r-project.org>) para graficar los resultados. La versión usada fue la 3.5.0 y se descargaron sus respectivos paquetes de análisis estadístico, los cuales fueron ejecutados en el ambiente de desarrollo integrado (IDE, por sus siglas en inglés) RStudio (Rstudio inc.

2018, versión 1.1.453 (<https://www.rstudio.com>). Para el análisis estadístico, se usó una prueba Anova Tukey con un valor de $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Síntesis de los sustratos peptídicos para las proteínas cinasas

7.1.1 AMARA

Para el análisis de la actividad de SnRK1 en plantas de amaranto, por medio de radioisometría se utilizó el péptido sintético AMARA, el cual ha sido un excelente sustrato para la medición de la actividad cinasa de estas proteínas en muestras de plantas. Las condiciones de diseño proporcionaron cierta ventaja en la tasa de fosforilación y el motivo de reconocimiento del sustrato, además de la especificidad a SnRK1, ya que este péptido fue diseñado teniendo en cuenta los dominios cinasas y los sitios de reconocimiento de la proteína. Siguiendo esta línea, la secuencia consenso utilizada para el diseño de este péptido cumplió con la función deseada y se recomienda su uso para posteriores análisis de SnRK1 en cualquier tejido. También para el uso en otras proteínas que tengan conservado el dominio de fosforilación y los requerimientos de reconocimiento del sustrato, como sus ortólogos presentes en levaduras o mamíferos (Dale et al., 1995).

7.1.2 PEPTIDO TOR

Para la medición de la actividad cinasa del complejo TOR, el péptido sintético sustrato de TOR fue diseñado “*de novo*”, a partir de la secuencia consenso establecida de S6K (Figura 5B). El péptido, cuya secuencia es AFAGFTYVAPRRR (Figura 5A), resultó ser eficiente para la medición de la actividad de TOR en plantas. Las consideraciones hechas en el diseño, como el cambio de aminoácidos conservados en todas las especies por aminoácidos neutros, no afectaron la fosforilación ni los sitios de reconocimiento de la cinasa. Asimismo, las 3 argininas agregadas en el extremo C-terminal, permitieron la fijación electrostática al papel de fosfocelulosa, que es parte del ensayo de radiactividad. En resumen, se describe por primera vez este sustrato como secuencia de reconocimiento para medir la actividad del complejo TOR de proteína total en muestras de plantas. Además, el reporte de los motivos de reconocimiento de la cinasa en el péptido sintético puede ser de utilidad para mediciones de otras proteínas que compartan similitud con los dominios cinasa de este complejo.

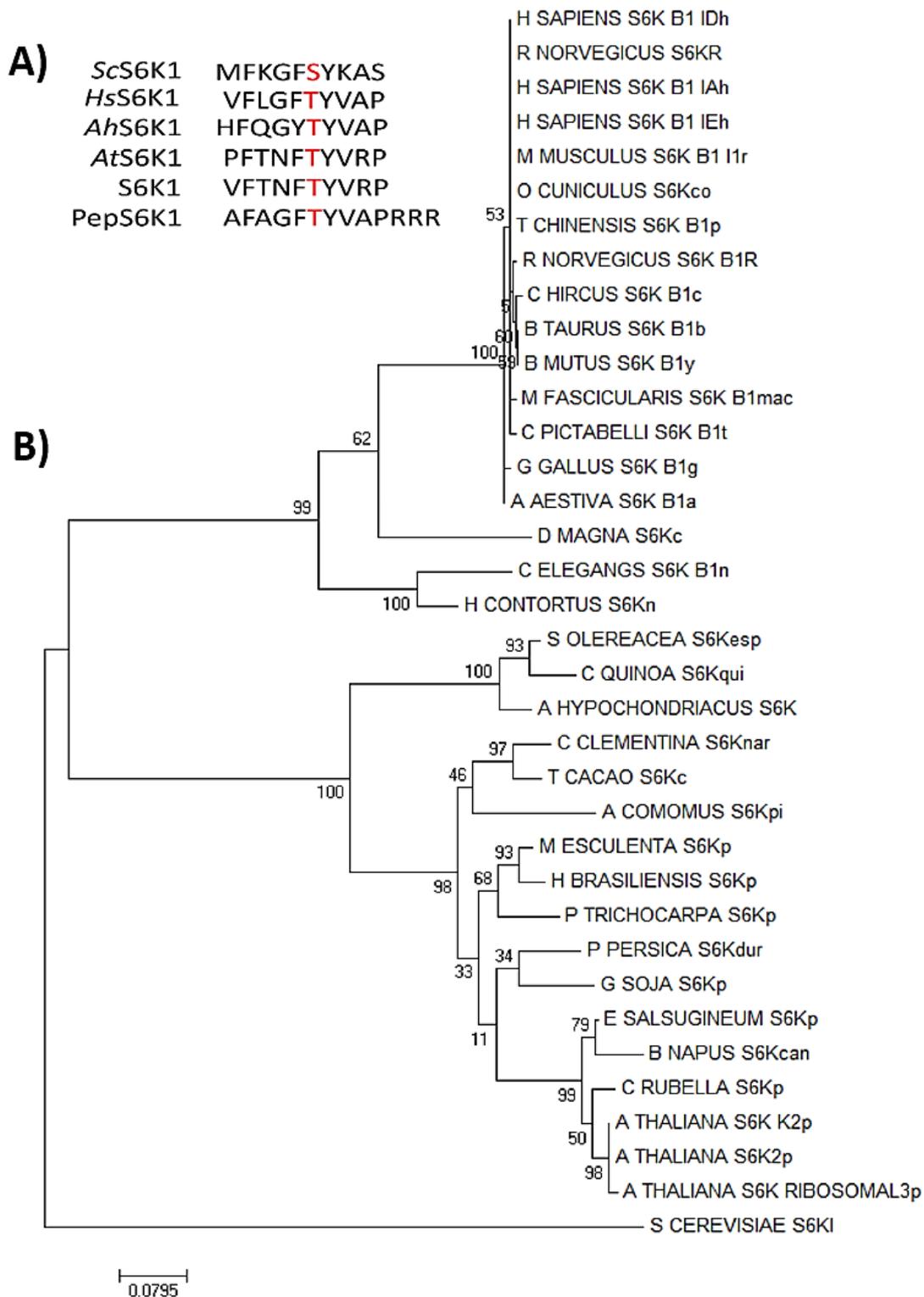


Figura 5. Árbol filogenético de la secuencia S6K.

A) Secuencias consenso de *Sc* (*Sacharomyces cerevisiae*), *Hs* (*Homo sapiens*), *Ah* (*Amaranto hypochondriacus*), *At* (*Arabidopsis thaliana*). B) La secuencia esta conservada en todos los eucariotas examinados, desde levaduras hasta mamíferos. El árbol filogenético fue realizado en la plataforma MEGA 7, con el algoritmo de Maximun Composite Likelihood con el método de fiabilidad "Boostrap" de 2000 replicaciones.

7.2 Tiempo de actividad óptimo de las proteínas cinasas SnRK1 y TOR y el ensayo espectrofotométrico de acoplamiento enzimático

El método usado es el de radiactividad debido a que el método de espectrofotometría por acoplamiento enzimático no fue muy sensible, por lo cual requería grandes cantidades de la enzima para ver una diferencia significativa, además de que las diferencias entre las enzimas y los blancos requerían de observaciones subjetivas para ver una diferencia entre ellas, era muy impreciso y podría dar falsos positivos, para demostrar esto se realizó un experimento con una enzima comercial, que fue usada como estándar AMPK (ortólogo de SnRK1), primero se realizaron varias diluciones y se les hizo una medición en la concentración de la actividad en unidades, los resultados de cada dilución se muestran en la siguiente tabla:

Dilución	Radiactividad	Actividad
1x	2100	1.4 u
10x	1616	1 u
100x	1428	0.928 u

Tabla 1. Actividad medida en unidades de las diluciones hechas de la enzima comercial AMPK.

Una vez obtenidos los datos de la actividad por el método radioisométrico de cada dilución se procedió a comparar las mismas diluciones con el método espectrofotométrico de acoplamiento enzimático, donde la diferencia de la caída de absorbancia de cada dilución por duplicado era reemplazada en la siguiente fórmula $ABS = E.C.L$, donde E, es el coeficiente de extinción del NADH, C, es la concentración de la enzima y L, la longitud del paso de luz. La cinética se realizó por duplicado para cada dilución, con 3 diferentes blancos, el primero únicamente constaba del amortiguador de pH, Hepes, el segundo eran toda la reacción sin AMPK y el último NADH para ver la degradación en el tiempo, el orden de adición de cada reactivo para comenzar la reacción fue primero la enzima diluida, Hepes y AMP (regulador alostérico de esta proteína), luego NADH, ATP y por último el péptido sustrato para dar comienzo al acoplamiento enzimático, los resultados se muestran en la siguiente gráfica:

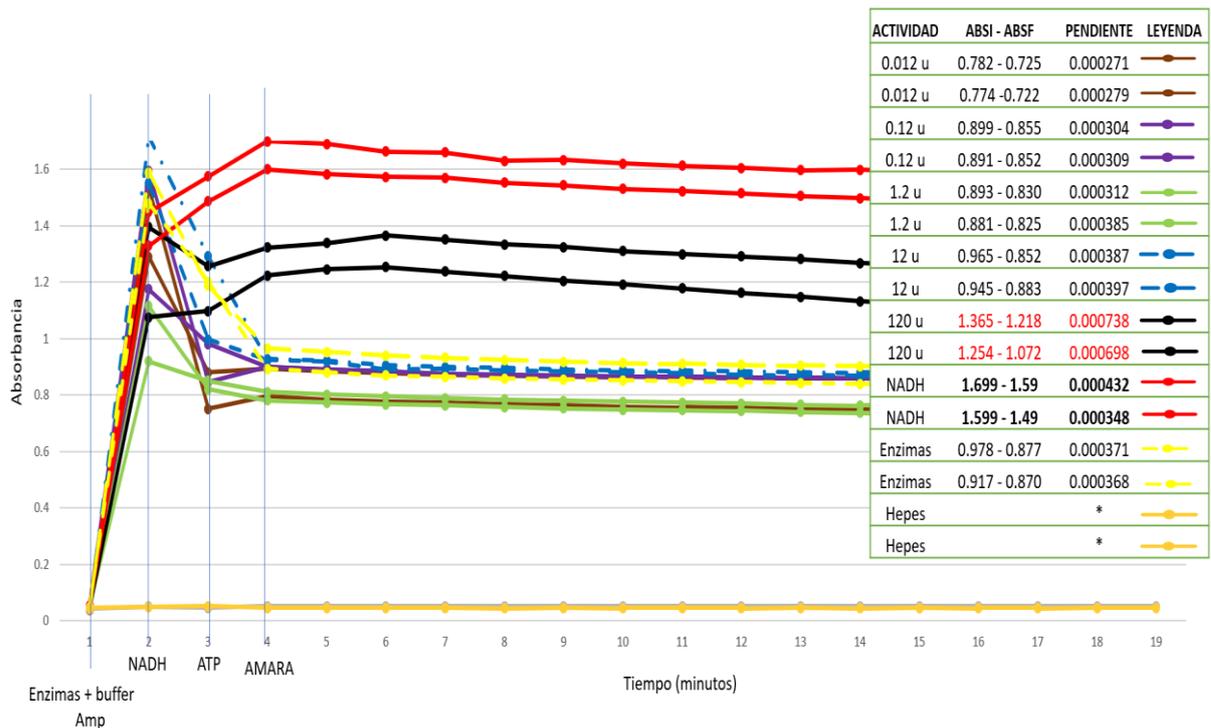


Figura 6. Cinética de la enzima AMPK en diferentes diluciones por el método espectrofotométrico de acoplamiento enzimático.

Cada dilución y blanco, tiene una clave de color descrita en la misma gráfica, donde la única diferencia significativa se puede observar en la dilución de 120 unidades (Color negro), lo cual es bastante alta y aun así la caída y diferencia de pendientes no es tan alejada de la degradación en el tiempo del NADH (Color rojo), por lo cual se concluyó que el método de acoplamiento enzimático por espectrofotometría, era poco eficiente debido a la baja sensibilidad y a las mediciones subjetivas pues la caída de la absorbancia sigue siendo una medida muy subjetiva debido al nivel de variación, por lo cual se optó por medir la actividad cinasa de cada muestra por el método radioisométrico.

Antes de realizar el método radioisométrico, se determinó el tiempo ideal para la reacción de fosforilación de cada cinasa con su respectivo péptido sustrato. Para ello se utilizó el mismo procedimiento, con la diferencia de que estos análisis se realizaron con enzimas estándar obtenidas directamente de una casa comercial: i) AMPK (Millipore; Burlington, Massachusetts, EUA) y mTOR (Millipore). En ambas se usaron las mismas condiciones, a diferentes tiempos, es decir a 4, 8, 12 y 20 min. Se cuantificó la proteína total con el método de Bradford y estos resultados fueron utilizados para la normalización de la actividad de ambas cinasas. Para la cinasa SnRK1, la actividad aumentó respecto al tiempo. Se dejó hasta ese tiempo debido a que la proteína estándar

no contenía impurezas que pudieran degradar o interrumpir la fosforilación. De tal modo que el tiempo determinado de reacción fue de 10 min. Éste se eligió debido a que fue el menor tiempo en donde se observó una clara diferencia de actividad (Figura 6).

Para la cinasa mTOR, se realizó el mismo procedimiento. Su nivel de actividad no fue tan alto como el de SnRK1 debido al tipo de tejido que se utilizó, ya que TOR se expresa mayormente en tejido meristemático. Sin embargo, se logró observar el máximo pico de actividad a los 8 min de iniciar la reacción, la cual luego disminuyó. Al igual que SnRK1, el tiempo de reacción que se determinó fue de 10 min, como, para manejar en ambas mediciones las mismas condiciones y tiempos de reacción (Figura 7).

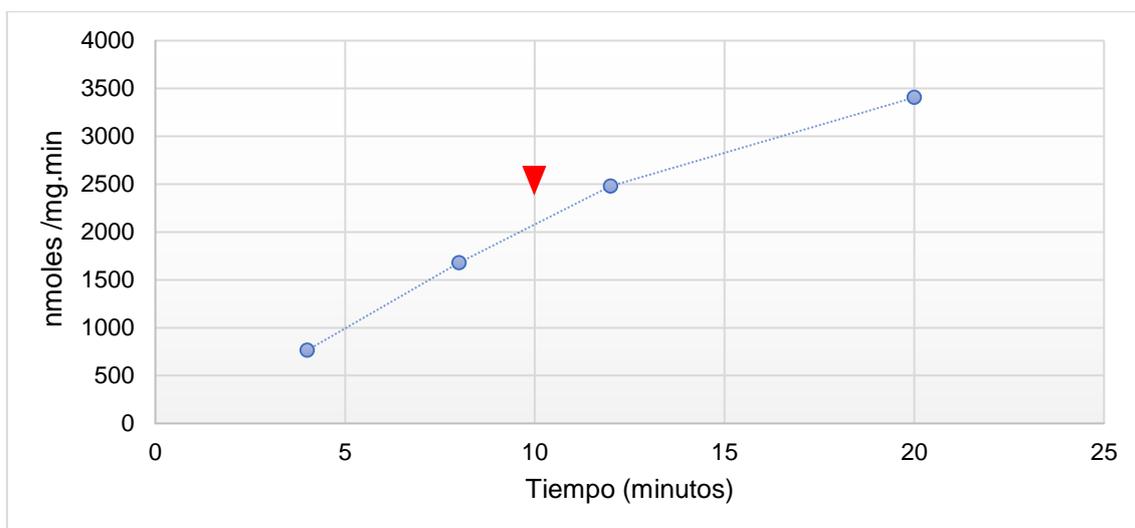


Figura 7. Gráfica de actividad de la proteína cinasa AMPK homólogo de SnRK1 en mamíferos a través del tiempo.

Gráfica de la actividad fosforilasa de AMPK a través del tiempo. La fosforilación de AMARA se mantuvo lineal hasta los 10 min, tiempo ideal para medir la reacción (marcado con puntas de flecha rojas).

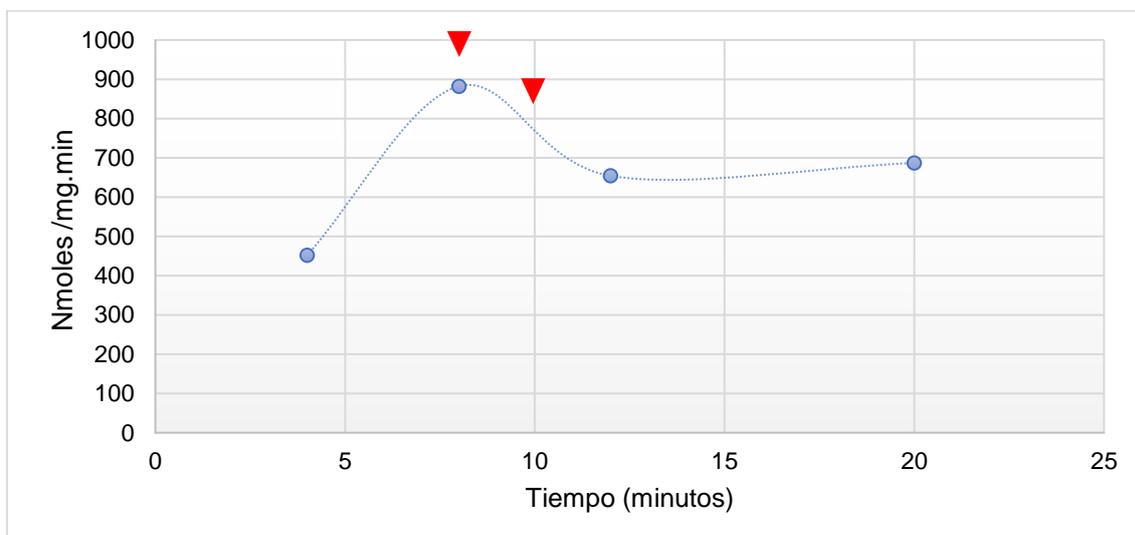


Figura 8. Gráfica de actividad de la proteína cinasa mTOR a través del tiempo. Grafica de la actividad de cinasa de mTOR a través del tiempo. Se observa un máximo en

la fosforilación del péptido mTOR a los 8 min (marcado con puntas de fechas rojas). Este rango de tiempo fue considerado adecuado para medir la reacción.

7.3 Actividad de los reguladores maestros del metabolismo TOR y SnRK1

El efecto del tratamiento de estrés por defoliación acumulativa de 3 días sobre la actividad del regulador maestro TOR, fue determinado primeramente en muestras de hoja. La medición de la actividad corresponde a las hojas colectadas al tercer día, cuando la defoliación por daño mecánico, equivalente a una pérdida de 67% del área foliar) requería la eliminación de la hoja completa. Los niveles de actividad cinasa del complejo TOR y la cinasa SnRK1 se determinaron de la siguiente manera:

Las cuatro etapas de desarrollo analizadas fueron abreviadas de la siguiente manera para las siguientes gráficas: “Vegetativa 1” (V1), “Vegetativa 2” (V2), “Emergencia de Panoja” (EP) y “Floración” (FL). Asimismo, los tratamientos fueron diferenciados por letras donde las plantas de muestras analizadas que fueron expuestas al tratamiento de defoliación se referenciaron con la letra (T) y las plantas a las cuales se compararan, las que no fueron expuestas al tratamiento por defoliación, se reconocieron como plantas control (C). Los resultados son mostrados en gráficos tipo “Boxplot”. Los valores representados en este tipo de gráficos comparan los valores obtenidos de cada muestra con el control y muestran las diferencias significativas con comparación de medias a través del análisis estadístico de Anova-Tukey con un valor de $p \leq 0.05$. En el eje X de cada gráfica se muestran las etapas, ya sea en plantas (T) o (C), y en el eje de las Y se muestra la actividad encontrada, expresada en $\frac{\text{nmoles de fosfopéptido}}{\text{mg} \times \text{min}}$.

7.4 La máxima actividad de TOR en hoja es en la etapa vegetativa 1

En hojas, el estrés por defoliación total en etapas tempranas modificó la actividad del regulador maestro el TOR. De modo que se observó una diferencia significativa en la actividad de la etapa V1, ya que la muestra V1_C presentó una actividad más alta en comparación con la muestra V1_T (Fig. 8A). En contraste, la etapa v V2 (V2_T) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras C y T (Figura 8A). En etapas reproductivas más tardías, como EP, no se observaron diferencias en la actividad TOR entre plantas T y C (Fig. 8B). No obstante, se observó un incremento

significativo en la actividad de TOR en hojas de plantas defoliadas en la etapa de floración (FL_T) (Figura 8B). Los niveles de actividad más altos de TOR (entre 0.01 y 0.08 nmoles/ mg/ min) fueron detectados en hojas de plantas jóvenes, no defoliadas, en la etapa V1, los cuales fueron disminuyendo gradualmente con el desarrollo de las plantas hasta valores que inferiores a 0.02 nmoles /mg/min (Fig. 8C).

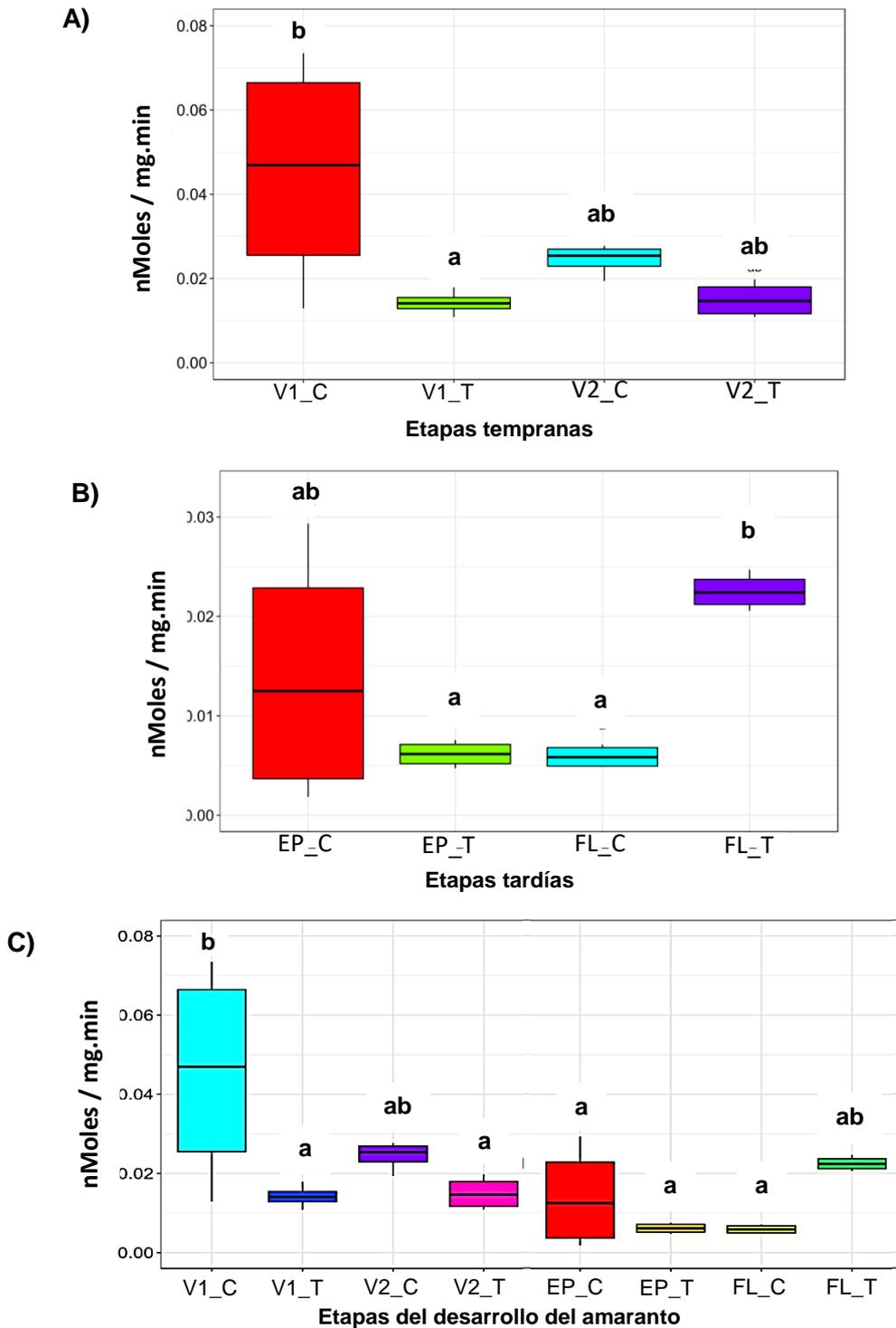


Figura 9. Niveles de actividad de la proteína cinasa TOR en hojas de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación total.

La gráfica muestra los niveles de fosforilación del péptido sintético (AFAGFTYVAPRRR) por el complejo TOR. A) Gráfico de la actividad del complejo TOR en etapas tempranas, V1 y V2. B) Gráfico de la actividad del complejo TOR en etapas tardías, EP y FL. C) Gráfica del comportamiento de la proteína TOR a lo largo del desarrollo en amaranto bajo estrés por defoliación. Las etapas de desarrollo son representadas por "Vegetativa 1" (V1), "Vegetativa 2" (V2), "Emergencia de panoja" (EP) y "Floración" (FL). Las plantas sometidas a un estrés de defoliación se representan con la letra "T" y los controles, no defoliados, con la letra "C". Las muestras tomadas de plantas defoliadas se representan con la letra "T", mientras que aquellas tomadas de plantas control, no defoliadas, con la letra "C". Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey con un valor de $p \leq 0.05$. Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas en los niveles de actividad TOR en hojas de plantas "T" y "C" en cada una de las etapas de desarrollo del amaranto analizadas.

Cabe resaltar que, de todos los órganos analizados, las hojas tuvieron la menor actividad cinasa tipo TOR.

7.5 La actividad de TOR en tallo tiende a ser mayor en plantas que sufren tratamiento de defoliación

El análisis de muestras de tallo indicó que la actividad TOR se indujo, en general, en tallos de plantas defoliadas, excepto por aquellas analizadas en la etapa V2 (Fig. 9), cuya actividad no fue diferente a la detectada en tallos de plantas C. Lo anterior debido a los altos niveles basales de actividad TOR detectados en los tallos de estas plantas (Fig. 9A). En éstas, la menor actividad TOR se detectó en la etapa FL (Fig. 9B). En general, se observó que TOR es inducida en tallos de plantas defoliadas y que el efecto fue máximo en tallos de plantas analizadas en etapa V2. Los niveles de inducción en tallos de plantas T medidos en todas las otras etapas fueron similares, aunque mayores a los detectados en las plantas C (Fig. 9C).

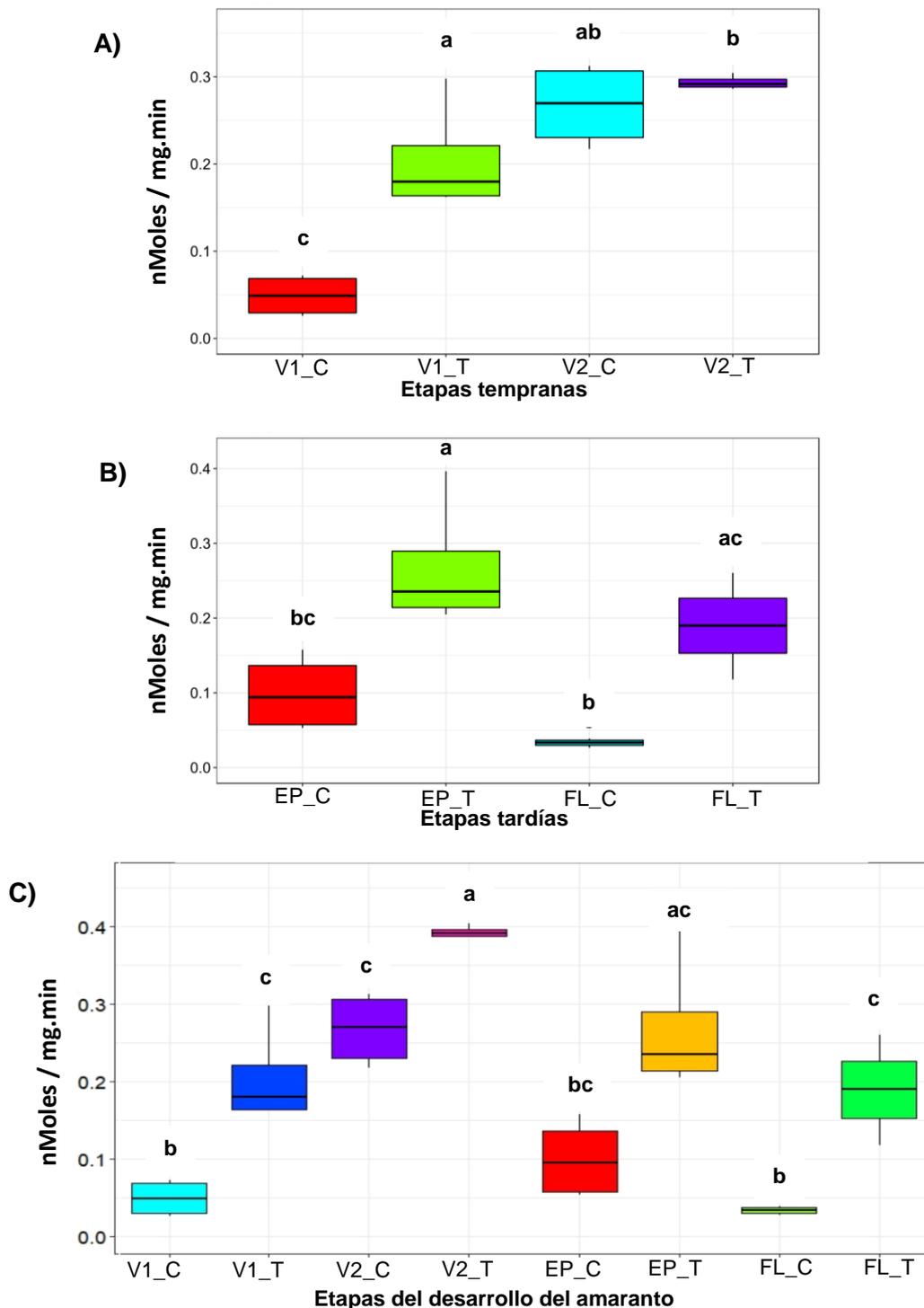


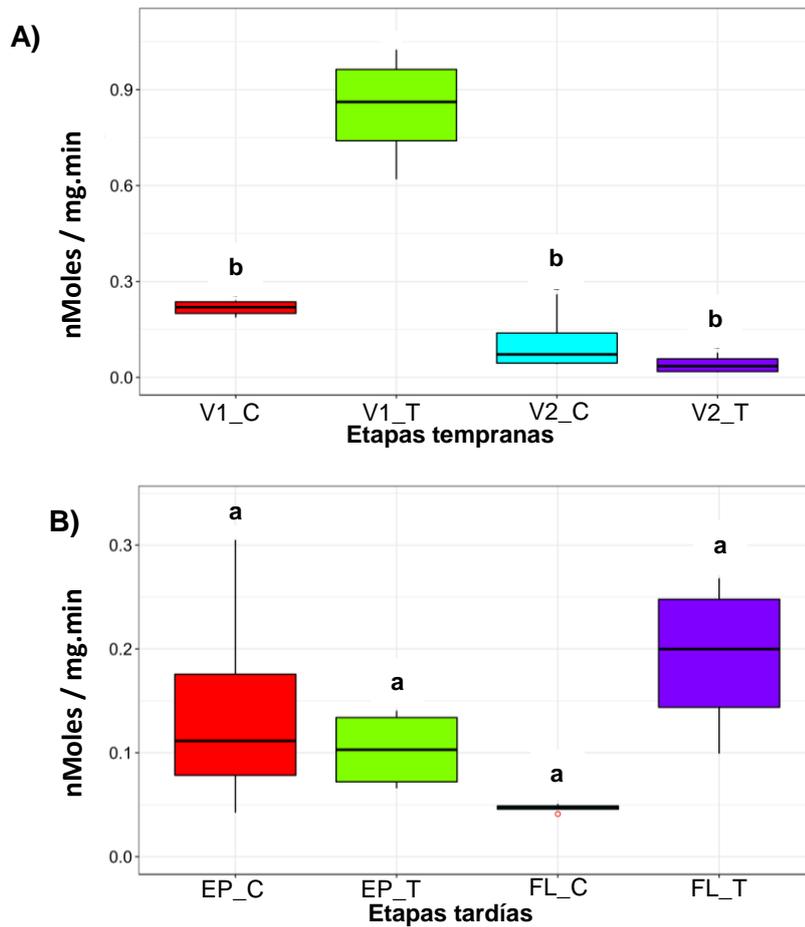
Figura 10. Niveles de actividad de la proteína cinasa TOR en muestras de tallos de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación total.

Esta grafica muestra los niveles de fosforilación del péptido sintético AFAGFTYVAPRRR, por parte del complejo TOR. **A)** Actividad del complejo TOR en etapas vegetativas tempranas, V1 y V2. **B)** Actividad del complejo TOR en etapas reproductivas tardías, EP y FL. **C)** Variación de los niveles de actividad de TOR a lo largo del desarrollo, en plantas amaranto control (C) o sometidas a estrés por defoliación (T). Las etapas de desarrollo son representadas por “Vegetativa 1” (V1), “Vegetativa 2” (V2), “Emergencia de panoja (EP)” y “Floración” (FL). Las muestras tomadas de plantas defoliadas se representan con la letra “T”, mientras que aquellas tomadas de plantas control, no defoliadas, con la letra “C”. Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey con un valor de $p \leq 0.05$. Letras diferentes sobre

las barras representan diferencias significativas en los niveles de actividad TOR en tallos de plantas "T" y "C" en cada una de las etapas de desarrollo del amaranto analizadas.

7.6 Los cambios de actividad del complejo TOR en raíces, en respuesta a un estrés por defoliación, son discretos.

En raíces, la actividad cinasa TOR no varió en respuesta a defoliación, excepto por la fuerte inducción observada en plantas T analizadas en la etapa V1 (Figs. 10A y 10C). Obviando V1-T, tampoco se observó una variación en la actividad de TOR durante el desarrollo (Fig. 10C).



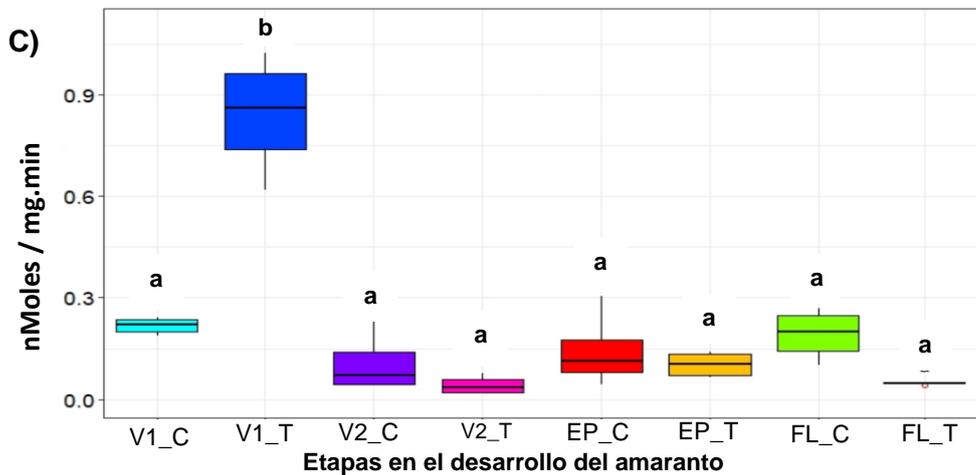


Figura 11. Niveles de actividad de la proteína cinasa TOR en raíces en plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación total.

Esta gráfica muestra los niveles de fosforilación del péptido sintético AFAGFTYVAPRRR, por el complejo TOR. **A)** Actividad del complejo TOR en etapas vegetativas tempranas, V1 y V2. **B)** Actividad del complejo TOR en etapas reproductivas tardías, EP y FL. **C)** Comportamiento de la proteína TOR a lo largo del desarrollo en raíces de plantas de amaranto sometidas a estrés por defoliación. Las etapas de desarrollo son representadas por “Vegetativa 1” (V1), “Vegetativa 2” (V2), “Emergencia de panoja” (EP) y “Floración” (FL). Las muestras tomadas de plantas defoliadas se representan con la letra “T”, mientras que aquellas tomadas de plantas control, no defoliadas, con la letra “C”. Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey con un valor de $p \leq 0.05$. Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas en los niveles de actividad TOR en raíces de plantas “T” y “C” en cada una de las etapas de desarrollo del amaranto analizadas. Círculos rojos representan datos fuera de rango.

7.7 La actividad de TOR en panoja aumenta en plantas sometidas a estrés por defoliación

Finalmente, la actividad cinasa tipo TOR aumentó significativamente en panojas de plantas de amaranto sometidas a estrés por defoliación. El efecto fue más evidente en la etapa reproductiva EP (Fig. 11). El nivel de actividad de cinasas tipo TOR en panoja se mantuvo dentro del mismo rango que el observado en tallo y raíz; es decir, entre 0.1 hasta 0.3 nmoles/mg/min. Cabe resaltar que la máxima actividad cinasa TOR fue detectada en este estudio se presentó en raíces de plantas de amaranto defoliadas totalmente en la etapa V1 alcanzando un nivel de actividad de 0.9 nmoles de ATP/ mg/ min.

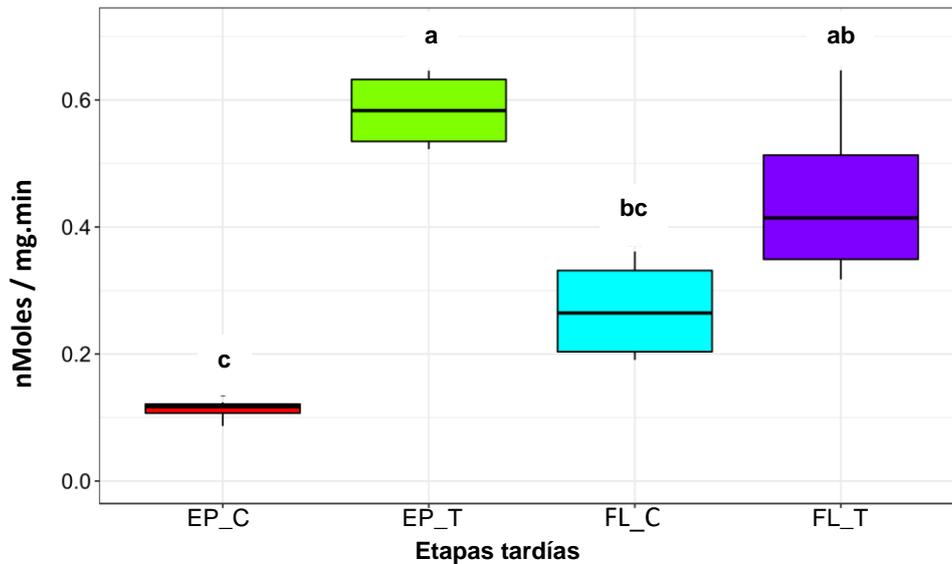


Figura 12. Niveles de actividad de la proteína cinasa TOR en muestras de panoja en plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación total.

La gráfica muestra la actividad cinasa del complejo TOR en la fosforilación del péptido sintético AFAGFTYVAPRRR en panojas colectadas en etapas reproductivas tardías, IEP y FL. Las muestras tomadas de plantas defoliadas se representan con la letra “T”, mientras que aquellas tomadas de plantas control, no defoliadas, con la letra “C”. Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey con un valor de $p \leq 0.05$. Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas en los niveles de actividad TOR en panojas de plantas “T” y “C” en cada una de las 2 etapas reproductivas del amaranto analizadas.

7.8 Los cambios en la actividad de SnRK1 en hojas de plantas de amaranto sometidas a defoliación son mínimos

El regulador maestro del metabolismo SnRK1, contrastante con TOR, fue medido con el mismo método de radiactividad, pero utilizando el péptido sintético AMARA. En hojas, no se observaron diferencias significativas en la actividad de SnRK1 entre plantas “T” y “C” en cada una de las etapas de desarrollo analizadas (Figs. 12A y 12B). Sin embargo, se observó una gradual y significativa reducción en la actividad de SnRK1 conforme avanzó el desarrollo de la planta, siendo máxima en la etapa V1 y mínima en FL (Fig. 12C) Estos resultados sugieren que la actividad de SnRK1, en hojas, no responde al estrés por defoliación, independientemente de la etapa de desarrollo en la que sea evaluada.

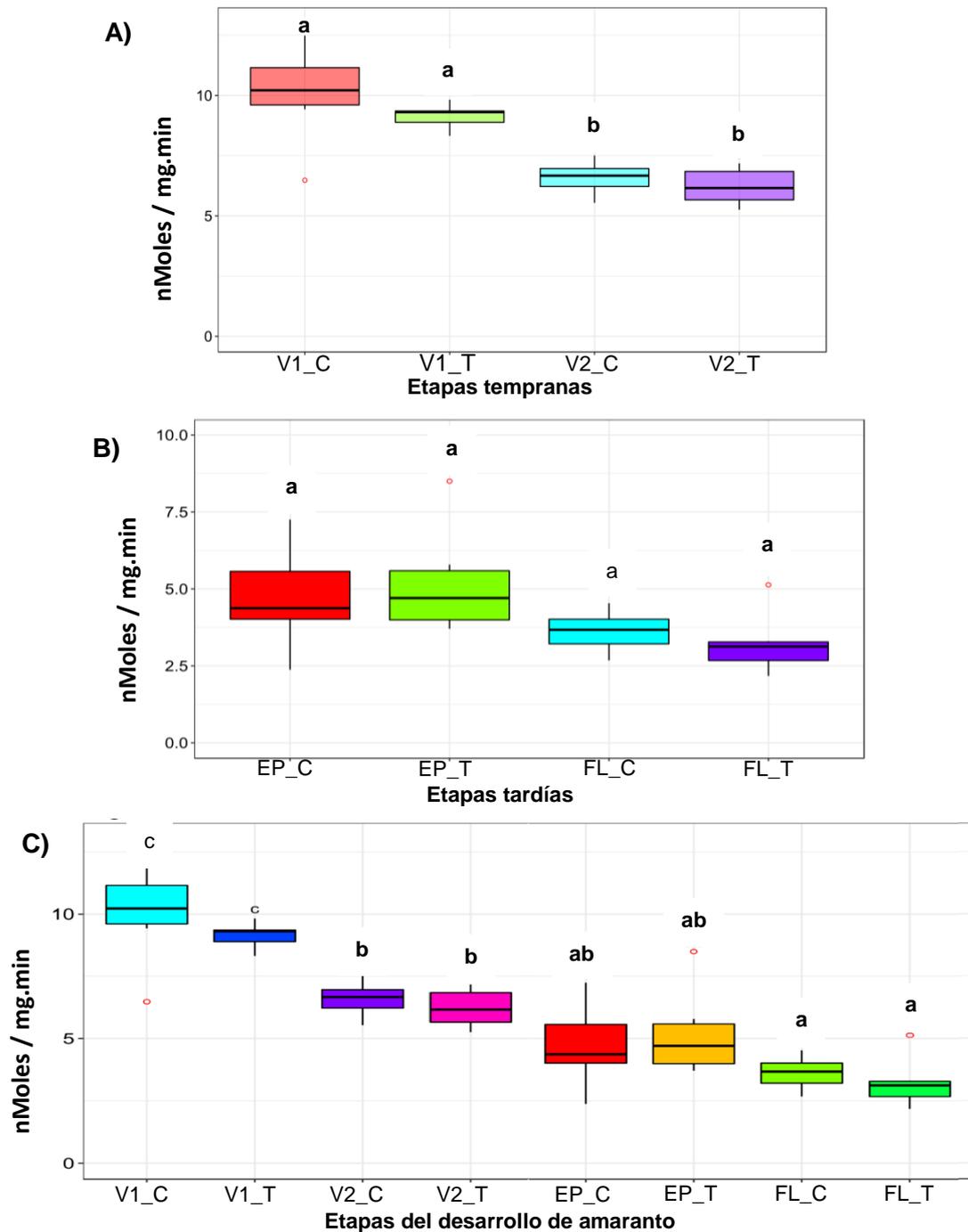
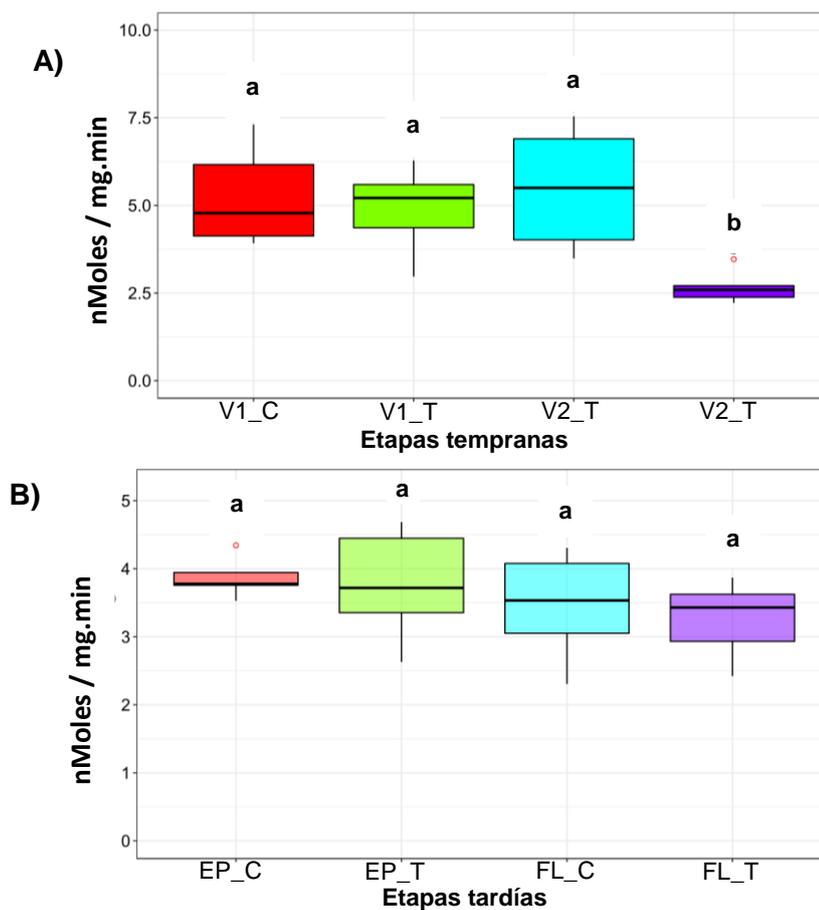


Figura 13. Niveles de actividad de la proteína cinasa SnRK1 en hojas de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación total.

Esta gráfica muestra los niveles de fosforilación del péptido sintético AMARAASAAALARRR, generados por la cinasa SnRK1. **A)** Niveles de actividad del complejo SnRK1 en etapas vegetativas tempranas, V1 y V2. **B)** Niveles de actividad del complejo SnRK1 en etapas reproductivas tardías, EP y FL. **C)** Comportamiento de la proteína SnRK1 a lo largo del desarrollo en hojas de plantas de amaranto control ("C") o sometidas a estrés por defoliación total ("T"). Las etapas de desarrollo son representadas por "Vegetativa 1" (V1), "Vegetativa 2" (V2), "Emergencia de panoja" (EP) y "Floración" (FL)". Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey con un valor de $p \leq 0.05$. Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas en los niveles de actividad SnRK1 en hojas de plantas "T" y "C" en cada una de las etapas de desarrollo del amaranto analizadas. Los círculos rojos representan datos fuera de rango.

7.9 La actividad de SnRK1 sólo se reduce en tallos de plantas de amaranto defoliadas la etapa vegetativa 2.

En tallo, la actividad de SnRK1 en plantas defoliadas totalmente, solo fue significativamente diferente de las plantas control, no defoliadas, en la etapa V2 (Figura 13A). Ni en la etapa V1 ni en las etapas reproductivas tardías EP y FL, se observó un cambio en la actividad de SnRK1 en respuesta a la defoliación total (Figs. 13A y 13B). Al igual que en hoja, la actividad basal de SnRK1 disminuyó en forma paralela al desarrollo, siendo máxima en V1 y mínima en FL (Fig. 13C):



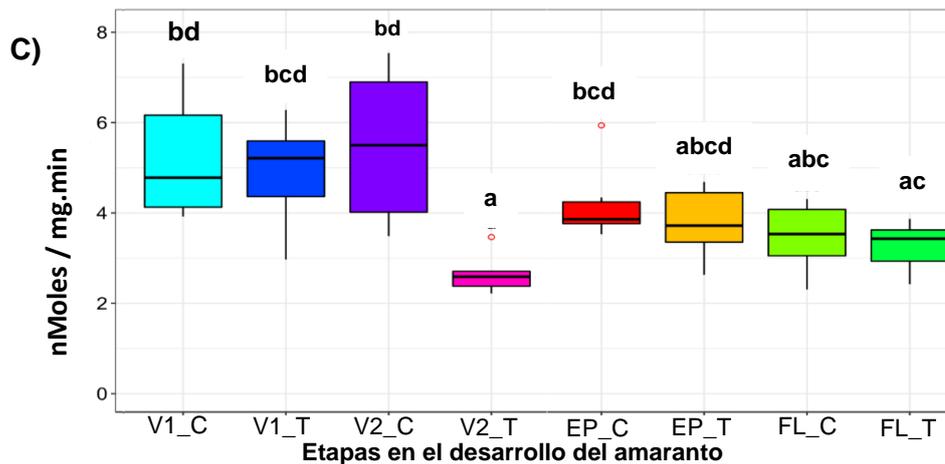


Figura 14. Niveles de actividad de la proteína cinasa SnRK1 en tallos de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación total.

Esta gráfica muestra los niveles de fosforilación del péptido sintético AMARAASAAALARRR, generados por la cinasa SnRK1. **A)** Niveles de actividad del complejo SnRK1 en etapas vegetativas tempranas, V1 y V2. **B)** Niveles de actividad del complejo SnRK1 en etapas reproductivas tardías, EP y FL. **C)** Comportamiento de la proteína SnRK1 a lo largo del desarrollo en tallos de plantas de amaranto control (“C”) o sometidas a estrés por defoliación total (“T”). Las etapas de desarrollo son representadas por “Vegetativa 1” (V1), “Vegetativa 2” (V2), “Emergencia de panoja” (EP) y “Floración” (FL)”. Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey con un valor de $p \leq 0.05$. Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas en los niveles de actividad SnRK1 en tallos de plantas “T” y “C” en cada una de las etapas de desarrollo del amaranto analizadas. Los círculos rojos representan datos fuera de rango.

7.10 La actividad de SnRK1 es mayor en raíces de plantas analizadas en etapas vegetativas tempranas, pero no es inducida por el estrés causado por defoliación total

No se observaron diferencias significativas entre raíces de plantas defoliadas y raíces de plantas control, intactas. El efecto fue independiente de la etapa de desarrollo analizada (Figs. 14A y 14B). Sin embargo, al igual que hoja y tallo, se observó una gradual y significativa disminución de la actividad de SnRK1 en raíces a medida que las plantas avanzaron en su desarrollo, de V1 a FL (Fig. 14C).

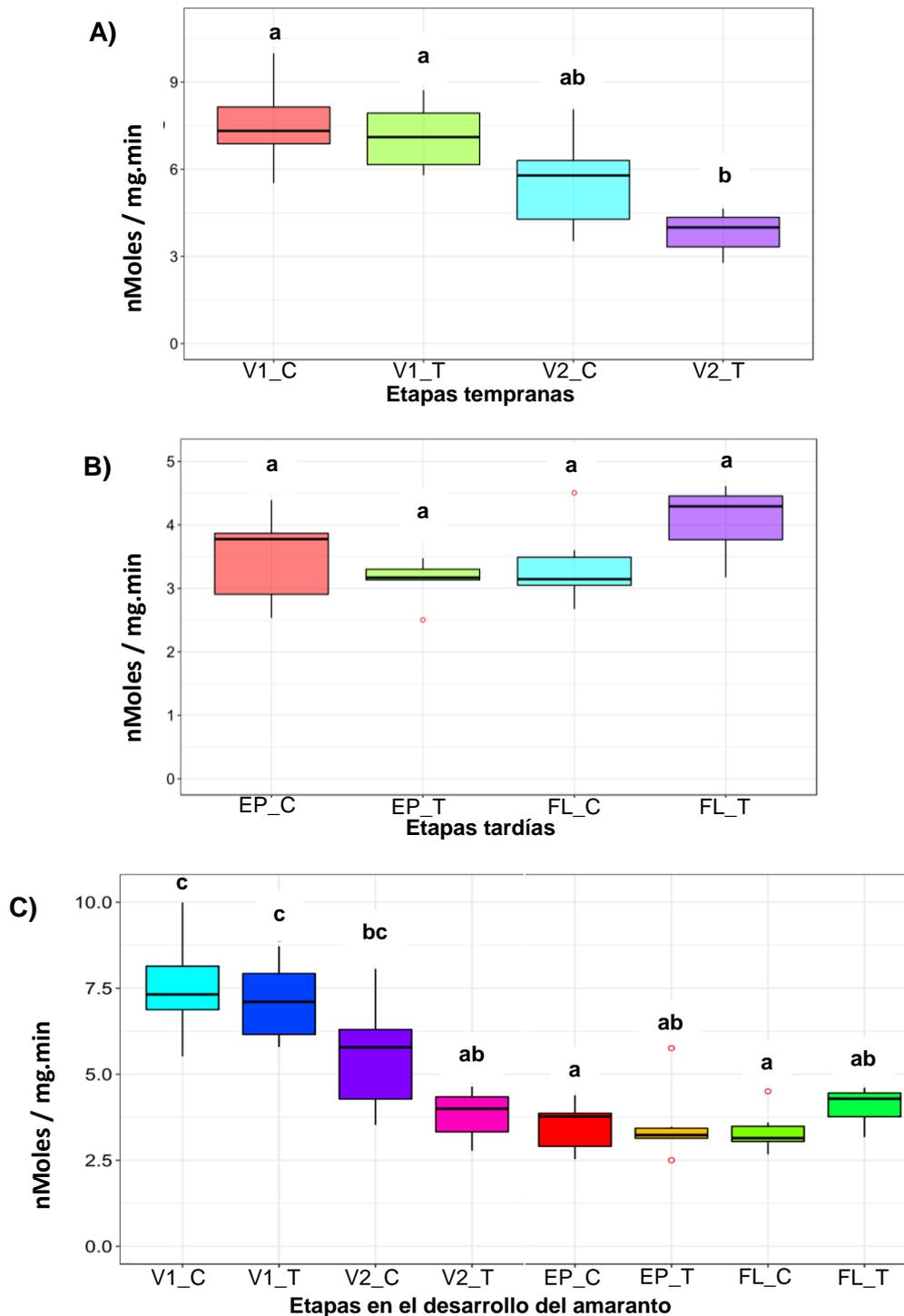


Figura 15. Niveles de actividad de la proteína cinasa SnRK1 en raíces de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación total.

Esta gráfica muestra los niveles de fosforilación del péptido sintético AMARAASAAALARRR, generados por la cinasa SnRK1. **A)** Niveles de actividad del complejo SnRK1 en etapas vegetativas tempranas, V1 y V2. **B)** Niveles de actividad del complejo SnRK1 en etapas reproductivas tardías, EP y FL. **C)** Comportamiento de la proteína SnRK1 a lo largo del desarrollo en raíces de amaranto en plantas de control (“C”) o sometidas a estrés por defoliación total (“T”). Las etapas de desarrollo son representadas por “Vegetativa 1” (V1), “Vegetativa 2” (V2), “Emergencia de panoja” (EP) y “Floración” (FL)”. Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey con un valor de $p \leq 0.05$. Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas en los niveles de actividad SnRK1 en raíces de plantas “T”

y "C" en cada una de las etapas de desarrollo del amaranto analizadas. Los círculos rojos representan datos fuera de rango.

7.11 La actividad de la cinasa SnRK1 disminuyó significativamente en panojas de plantas sometidas a estrés por defoliación en la etapa reproductiva EP

La actividad basal de SnRK1 detectada en panojas fue alta, en general, tanto en las etapas reproductivas EP y FL. Sin embargo, el estrés por defoliación total causó una reducción significativa en la actividad cinasa SnRK1 en panojas de plantas defoliadas analizadas en la etapa EP (Fig. 15).

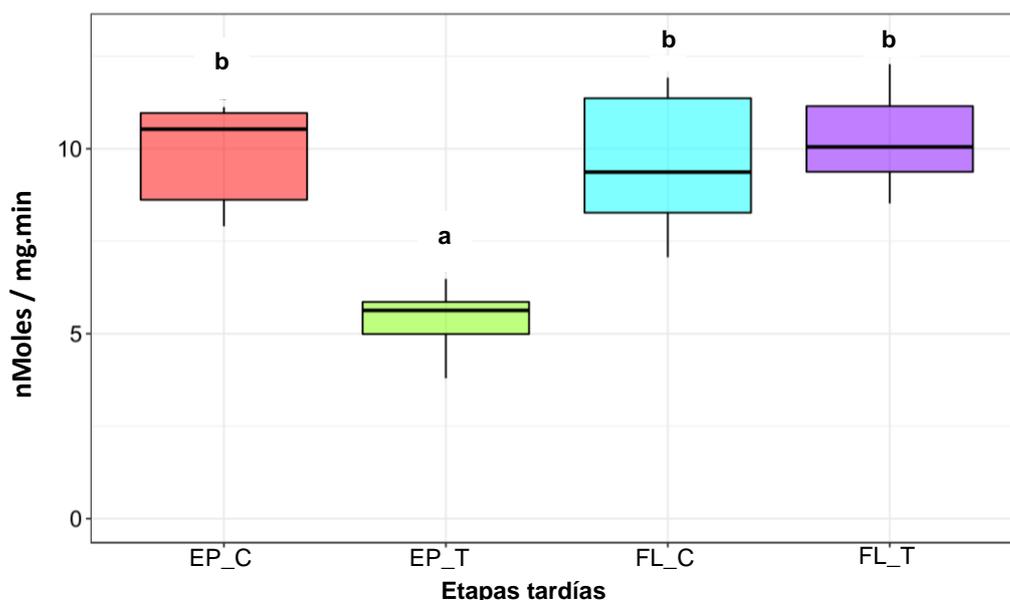


Figura 16. Niveles de actividad de la proteína cinasa SnRK1 en panojas de plantas de *A. cruentus* sometidas a defoliación total.

Esta gráfica muestra los niveles de fosforilación del péptido sintético AMARAASAAALARRR, generados por la cinasa SnRK1 en etapas reproductivas tardías, EP y FL. Las etapas de desarrollo son representadas por "Emergencia de panoja" (EP) y "Floración" (FL)". Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey con un valor de $p \leq 0.05$. Letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas en los niveles de actividad SnRK1 en panojas de plantas defoliadas ("T") y controles ("C") en cada una de las dos etapas reproductivas del amaranto analizadas.

8. DISCUSIÓN

8.1 Actividad del regulador maestro del metabolismo TOR

La apropiada señalización en respuesta a la recepción de estímulos definidos, seguida de una rápida respuesta, son factores críticos en la tolerancia o resistencia de las plantas ante ciertos tipos de estrés. Para ello, la planta debe regular sus procesos metabólicos con el único fin de mantener la homeostasis energética. Esto requiere de un coordinado y complejo reajuste de conversiones de nutrientes y energía, ya sea formando macromoléculas o degradándolas (Ben-Sahra y Manning, 2017). Estos cambios son dependientes de los recursos existentes, pues como cualquier proceso metabólico requieren de energía. En este contexto, las condiciones de estrés, como lo es una severa reducción de área foliar, alteran la tasa de asimilación y distribución normal de carbono, que invariablemente afectará la eficiencia de defensa (Schwachtje et al., 2006). Se ha reportado que la defoliación total causa cambios en la expresión de genes codificantes para enzimas sacarolíticas, así como su actividad (Massange-Sánchez, 2015; Cisneros-Hernández, 2016). Estas alteraciones en la expresión de los genes codificantes para invertasas y/o en su actividad, afecta directamente al complejo TOR, ya que estas enzimas regulan una gran cantidad de procesos, tal como como la expansión y desarrollo de tejidos a través de la tasa de consumo y el grado de demanda de éstos a órganos fuente (González et al., 2005). Además, están implicadas en el desarrollo meristemático, crecimiento por división celular y establecimiento de la floración (Yanagisawa et al., 2003). Además, las hexosas generadas por las invertasas a partir de la hidrólisis irreversible de la sacarosa proporcionan los llamados “azúcares de señalización” necesarios para la activación del complejo TOR (Baena-González et al., 2007a). De este modo, los niveles de la actividad o expresión de los diferentes tipos de invertasas pueden ser un reflejo del comportamiento del complejo TOR en condiciones de estrés.

En este trabajo, la defoliación se realizó en plantas de *A. cruentus* cuyas hojas sufrieron un 66% de pérdida de tejido foliar, la cual fue causada por daño mecánico en su superficie. Curiosamente, el pico de actividad de TOR se detectó en plantas control intactas, en etapa V1, correspondiente a la etapa más temprana de desarrollo analizada (Figura 8A). Este resultado fue en cierta medida el esperado, debido a que en las primeras 5 o 6 semanas después de la germinación, la planta está en desarrollo predominantemente heterotrófico, usando las reservas contenidas en la semilla,

sugiriendo que el complejo TOR está regulando este proceso. Sin embargo, la actividad se redujo significativamente en hojas de plantas V1 sometidas a defoliación, debido posiblemente a un cambio en las prioridades metabólicas de las plantas (Boege y Marquis, 2005). En la etapa V2 (Figura 8B) se encontró una disminución de la actividad del TOR, independientemente de la defoliación, lo que concuerda con la reducción de la actividad invertasa reportada en la misma etapa de desarrollo por Sánchez-Martínez (2015). Al contrario, la reducción de la actividad TOR cinasa no coincidió con el elevado nivel de expresión de isoformas de ciertas invertasas, previamente reportadas en hojas de plantas de amaranto defoliadas en V2 (Cisneros-Hernández, 2016). Esto podría deberse a que estos genes podrían estar implicados en otros procesos asociados con la respuesta a la defoliación en esta etapa. La actividad TOR cinasa permaneció constante, sin modificaciones relevantes, en hojas de plantas analizadas en la etapa EP, mientras que en la etapa FL se detectó un aumento significativo de esta actividad en hojas de plantas defoliadas. Este aumento podría estar de acuerdo con la ligera inducción de IPC detectada en hojas de plantas dañadas en FL, resultado que podría representar una posible inducción del uso de las reservas de carbono ubicadas en hoja, debido a las demandas energéticas que representa el proceso de floración. Este aumento de actividad TOR cinasa también coincidió con la inducción de los 3 genes que codifican para el complejo TOR, *TOR*, *RAPTOR* y *LST8* en hojas de plantas defoliadas en la etapa FL (Cisneros-Hernández, 2016).

Una observación importante es la baja actividad del complejo TOR comparada con su cinasa antagonista SnRK1 detectada tanto en plantas control como en plantas expuestas a defoliación total en todo el desarrollo y en todos los órganos. Sugiriendo que como TOR es un regulador del crecimiento y desarrollo por proliferación celular, lo cual es requerido en tejidos de constante crecimiento, como los meristemas apicales de tallo y raíz, promoviendo, además, el desarrollo de meristemas del tejido vascular y la formación de pelos radiculares (Xiong y Sheen, 2012). Es posible que los bajos niveles se hayan debido a una sobrerregulación por ABA, ya que se ha reportado que la defoliación o sombreado de la planta reduce la fotosíntesis, mientras que altera positivamente los niveles de ABA y el ácido aminociclopropano 1 carboxílico (o ACC), un precursor biosintético del etileno (Yuan, 1988). ABA, a su vez, se ha reportado como un regulador negativo, en condiciones de estrés, de fosfatasa tipo A de la familia PP2CA, las cuales, inhiben, a su vez, la actividad de SnRK2. Dicha inhibición es relevante pues cuando SnRK2 está activa, fosforila la subunidad RAPTOR del complejo TOR, disociando el complejo e inactivando al complejo TOR (Wang et al., 2018). Por lo tanto, es válido especular que una sobrerregulación por parte de ABA, podría estar

ocurriendo en hojas que perdieron una buena parte de su superficie foliar, ya que TOR mostró una menor actividad comparada con las plantas control, aunque en plantas control también se encontró que la actividad de TOR fue baja, esto podría deberse al tipo de tejido recolectado ya que eran células ya diferenciadas y no se colectaron los meristemas que es donde en teoría TOR estaría mayormente expresado. Otra función que se sabe que es regulada por TOR, es el establecimiento de la floración, lo cual sugeriría que su mayor actividad estaría ubicada en los botones florales o meristemas florales (Cisneros-Hernández, 2016). También se ha reportado que gran parte de la activación de TOR, proviene de la glucosa originaria de la fotosíntesis. Por ende, la reducción del área fotosintética de las hojas por defoliación, tendría como consecuencia una reducción considerable en la actividad de TOR (Xiong & Sheen, 2013). Además, otro punto que proporciona soporte a la baja actividad de TOR detectada en hoja, proviene de estudios en los cuales la expresión del gen *TOR* se detectó en todos los tejidos de *Arabidopsis*, mientras la proteína TOR fue principalmente encontrada en tejidos jóvenes en crecimiento, tales como pelos radiculares u hojas emergentes, sugiriendo una regulación postranscripcional de la expresión de TOR (Dobrenel et al., 2011). No obstante, la posibilidad de medir la actividad de TOR, aunque en niveles bajos, sugiere la presencia constitutiva de este regulador maestro del metabolismo, a pesar de que las hojas recolectadas sufrieron una considerable pérdida de su área superficial, lo que muy probablemente redujo drásticamente su tasa fotosintética. Además, se sabe que la sacarosa está presente constitutivamente, pero es necesario que su concentración exceda un cierto umbral para ejecutar su rol de señalización y por ende influir sobre la actividad de TOR (Pollock et al., 2003). En este contexto, otros reportes han establecido que la sacarosa actúa no sólo como precursor de bloques de construcción de estructuras celulares, sino también como regulador del crecimiento y desarrollo, al proporcionar las hexosas que serán las activadoras del complejo TOR. En este contexto, es sabido que la sacarosa es capaz de modular los reguladores centrales del metabolismo y desarrollo, principalmente a SnRK1, pero posiblemente también al complejo TOR (Deprost et al., 2007).

En tallos, se encontró un patrón interesante, ya que todas las plantas que sufrieron defoliación mostraron una inducción de la actividad de TOR, en todas las etapas de desarrollo (Figura 9C). Estos resultados concuerdan con un estudio paralelo en el cual se observó un aumento en los niveles de actividad y de acumulación de transcritos de la mayoría de invertasas en tallo en las cuatro etapas estudiadas, excepto V1 en la cual se encontró que una disminución de la actividad y transcritos codificantes de invertasas vacuolares (IV) (Cisneros-Hernández, 2016). Estos resultados podrían ser un reflejo del

alto grado de demanda de nutrientes y energía en una planta sometida a condiciones de estrés, como la defoliación, lo que implica una interacción muy activa entre órganos sumideros y órganos fuente (Shi et al., 2018). En este contexto, la planta, requiere de recursos y de la movilización de las reservas de carbono ubicadas en tallo y raíces, para mantener la homeostasis en otros órganos y asegurar la supervivencia, favoreciendo el proceso de floración, el cual es un proceso regulado por TOR, además de que la movilización de recursos y reservas, se realizan como compensación de la pérdida de tejido foliar; proceso que también viene siendo regulado por el complejo TOR. Sin embargo, en el estudio mencionado, exceptuando la etapa V2, no se observó la inducción de los 3 genes codificantes del complejo TOR, en tallos de plantas sometidas a estrés por defoliación (Cisneros-Hernández, 2016).

Interesantemente, en raíz, se encontró una inducción 3 veces mayor de la actividad de TOR en plantas defoliadas analizadas en la etapa V1 (Fig. 10C). En contraste, en las otras etapas no se observaron diferencias significativas en comparación al tratamiento control. Estos datos que no fueron congruentes con los niveles de expresión de invertasas, reportados por Cisneros-Hernández (2016), que son las enzimas encargadas de proporcionar hexosas reguladoras positivas de TOR. Este autor reportó, al contrario de lo descrito en este trabajo, una represión generalizada de la expresión de genes codificantes de invertasas en raíces de amaranto, independientemente del tratamiento y, en todas las etapas de desarrollo. Sin embargo, observó una inducción leve no en V1, sino en la etapa FL. Asimismo, Sánchez-Martínez (2015) observó un patrón de disminución leve en la actividad de las invertasas, el cual no fue congruente con la actividad de cTOR reportada en este trabajo. Esto podría sugerir, nuevamente, que TOR sólo es inducido en etapas muy tempranas de desarrollo, para luego mantener una actividad basal en el resto de la planta, independiente del tratamiento de estrés. Los contrastantes picos máximos de actividad alcanzados por el cTOR, en V1, y de invertasas, en FL, sugieren una compleja regulación, que requiere de más estudios para dar una hipótesis adecuada del fenómeno que realmente está ocurriendo, tomando en cuenta que, en raíces, estos dos tipos de proteínas están involucradas en una compleja red de regulación de crecimiento dependiente de la disponibilidad de recursos. Además, otros reportes han establecido que el complejo TOR, se comporta como un centro de control de redes de señalización en todos los eucariotes (Shi et al., 2018), pero esta regulación involucra no sólo al crecimiento, sino también al control de procesos anabólicos. Lo anterior permite sugerir que la actividad que se detectó en este trabajo podría haber sido influida por otro(s) factor(es) activados como consecuencia del estrés, capaces de afectar/ modular la actividad de TOR en diferentes niveles de desarrollo. Por

ejemplo, la inducción 3 veces mayor de la actividad de TOR en raíces de plantas defoliadas en V1, se podría explicar con base en estudios anteriores que establecieron que el desarrollo de pelos radiculares en etapas tempranas es inducido por condiciones de disponibilidad de glucosa (Xiong y Sheen, 2012). Estos mismos autores reportaron, además, que este desarrollo es coordinado por TOR y estimulado por auxinas y etileno en *Arabidopsis* y papa (Deng et al., 2017). Estos trabajos confirmaron estudios previos en *Arabidopsis*, donde se reportó la presencia de la proteína TOR en tejidos jóvenes, como pelos radiculares u hojas emergentes, localización que se sugirió era necesaria para promover el desarrollo y mantener la homeostasis en raíz (Dobrenel et al., 2011). Por ende, la información de los resultados de este trabajo, en conjunto con la amplia evidencia experimental de estudios anteriores, sugieren que TOR se indujo en raíces de plantas defoliadas en V1 gracias a que no se presentó una deficiencia de carbono debido a que la planta estaba atravesando por una etapa heterotrófica, donde los recursos y la energía estaban siendo proporcionados, todavía, por la semilla. Sin embargo, los niveles de expresión de los genes codificantes del cTOR reportados por Cisneros-Hernández (2016), no coinciden con lo anterior, ya que, contrario a los niveles de actividad, se encontró una leve inducción de los tres genes en condiciones de estrés, tanto en V2, EP y FL, mientras que en V1 se observó una represión de la expresión de estos genes.

Por último, en el análisis de la actividad de TOR, la panoja mostró un patrón de actividad similar al observado previamente en tallo, donde el tratamiento de defoliación total provocó una inducción de la actividad de TOR en EP y FL (Figura 11). Estos resultados fueron congruentes con los niveles de expresión de invertasas reportados por Cisneros-Hernández (2016), donde se encontró una inducción de la actividad de invertasas que coincidió, en algunos casos, con un aumento los niveles de expresión de sus respectivos genes. Esto podría haberse debido, una vez más, al grado de demanda adicional que exigían estos órganos al verse sometidos al estrés por defoliación e inclusive al normal desarrollo de la planta, ya que la panoja es el fin reproductivo del amaranto, el cual se sumó a la necesidad de la planta de asegurar el llenado de semillas y prolongar su supervivencia. De modo que una sobrerregulación de estas proteínas sugiere que permiten una respuesta más eficiente al estrés, al integrar los niveles de carbohidratos disponibles, con las señales activadas por las fitohormonas asociadas a situaciones de estrés y con energía requerida para asegurar un desarrollo apropiado de estructuras reproductivas. Sin embargo, todo indica que esta función no es regulada por el complejo TOR, sino por SnRK1, la cual se sabe que controla el llenado de semilla, al regular la síntesis de almidón (Tiessen et al., 2003). No obstante, se sugiere que TOR estaría

cumpliendo un papel de señalizador o activador de este proceso, pues reportes previos han demostrado que líneas transgénicas donde se inhibe la actividad de TOR muestran una reducción significativa en el tamaño de la semilla y el peso fresco de las plantas comparado con las plantas control (Ren et al., 2012). Asimismo, la presencia de actividad TOR en todas las etapas de desarrollo y todos los órganos analizados puede explicarse a partir de varios estudios derivados de mutantes de esta cinasa en plantas, los cuales indicaron que TOR se encuentra comúnmente en múltiples sitios subcelulares, secciones o subsecciones de órganos, donde regulan o son el centro de regulación de muchos procesos anabólicos o de crecimiento. La activación en ciertos órganos y etapas de desarrollo en respuesta a estrés por defoliación sugiere, además, que uno de los objetivos de TOR es detectar cualquier cambio de energía, desencadenando cambios metabólicos para evitar el agotamiento completo de la energía disponible. Lo anterior, con el fin de evitar daños o consecuencias que puedan derivarse del deterioro ocasionado por la autofagia (Smith y Stitt, 2007; Osuna et al., 2007). Un dato interesante se encontró al comparar estos niveles de actividad, con los niveles de expresión de los genes codificantes del complejo TOR en panoja reportados por Cisneros-Hernández (2016), donde se encontró que el gen codificante de la subunidad catalítica de TOR, se indujo en condiciones de estrés por defoliación, de acuerdo con los niveles de actividad en este órgano detectados en este trabajo.

8.2 Actividad del regulador maestro del metabolismo SnRK1

Las plantas como organismos autotróficos sintetizan azúcares en hojas maduras, para apoyar el almacenamiento o el crecimiento y desarrollo en tejidos sumideros (Castrillón-Arbeláez et al., 2012). Estos metabolitos son regulados por una gran cantidad de factores que coordinan el crecimiento celular. Además, han sido involucrados en respuestas de estrés, establecimiento de la floración, desarrollo, germinación y senescencia (Pollock et al., 2003). Este metabolismo de carbohidratos es regulado por dos proteínas cinasas que se han conservado a lo largo de la evolución, estableciéndose su interacción como el corazón de la percepción de recursos y energía. La primera, TOR, que como ya se mencionó, está encargada de promover el anabolismo, consumo de energía y desarrollo, en situaciones de disponibilidad de recursos. Y, por otra parte, la proteína cinasa antagonista, SnRK1, que regula toda una gama de respuestas activadas ante la carencia de carbohidratos. Para ello, desencadena una drástica reprogramación del metabolismo que se ve reflejada en la eficiente tolerancia de la

planta a las condiciones de estrés (Baena-González y Hanson, 2017). Estudios recientes han vinculado a SnRK1 con la movilización de carbohidratos en la planta, ya que reportan que SnRK1 estuvo involucrada en el control génico de SUSY en tubérculos de papa. Como se ha mencionado, SUSY es la encargada de transformar sacarosa y UDP a glucosa-UDP y fructosa, regulando su transcripción y afectando varios aspectos en el metabolismo de los carbohidratos. SUSY, a su vez, está estrechamente relacionada a la fuerza de demanda del sumidero. La interacción entre estas dos proteínas fue confirmada usando plantas sobreexpresantes de SnRK1 donde se observó la inducción de la actividad de SUSY (Wang et al., 2017). Otra función importante vinculada a SnRK1, es la regulación de AGPasa, la cual es reportada por ser la encargada de la síntesis de almidón en tubérculos de papa. El mecanismo de regulación se realiza por reacciones de óxido-reducción a nivel post-transcripcional (Tiessen et al., 2003). Además, se ha demostrado la regulación por fosforilación directa de SnRK1 a SPS, inactivando la conversión de UDP-glucosa y fructosa en sacarosa (Sugden et al., 1999). En este contexto, los resultados obtenidos en este trabajo, muestran una coincidencia entre la actividad de SnRK1 cinasa y la expresión de isoformas de genes codificantes de SUSY (Cisneros-Hernández, 2016) y la actividad de las mismas (Sánchez-Martínez en 2015) en plantas de amaranto de grano sometidas a estrés por defoliación.

En hojas, los resultados obtenidos en este trabajo no mostraron modificación de actividad de SnRK1 cinasa, ni diferencias significativas entre tratamientos. No obstante, se presentó un patrón interesante: la actividad de SnRK1, comenzó con un máximo en etapas tempranas y empezó a disminuir en el transcurso del desarrollo para llegar a la actividad mínima encontrada durante la floración (Figura 12C). Estos datos pueden estar correlacionados con un estudio de Williams et al. (2014), en el cual se estableció que la actividad de SnRK1 cinasa está inversamente correlacionada con la edad de las plantas y es más alta en hojas jóvenes. Asimismo, estudios de regulación en *A. thaliana*, establecieron que la poca acumulación de azúcares comparadas con las hojas más adultas sugiere un decaimiento en la actividad de SnRK1, el cual es requerido para el desarrollo vegetativo y la floración. También, se ha reportado que SnRK1 cinasa es requerida para el temprano establecimiento del cotiledón, el crecimiento y la arquitectura en plantas de chícharo, actuando en conjunto con la vía de regulación indirecta de citocininas, y contribuyendo a la regulación del transporte y distribución de auxinas. Además, se reportó que también está encargada del inicio de la maduración del embrión, regulado por vías de señalización dependientes de ABA (Radchuk et al., 2009). Esta disminución de la actividad de SnRK1 en el desarrollo de la planta es necesaria ya

que también se ha encontrado que SnRK1 regula el desarrollo post-embrionario a través de la regulación de biosíntesis y señalización hormonal cuando la planta está en etapa heterotrófica, pues SnRK1 coordina y ajusta las demandas fisiológicas y metabólicas con el crecimiento (Radchuk et al., 2009). Además, SnRK1 interactúa con FUS3 proteína que regula la transición de fases desde el desarrollo embrionario, vegetativo, reproductivo hasta el desarrollo de órganos laterales (Tsai y Gazzarrini, 2014). Otro factor importante es la acumulación de T6P, ya que puede inhibir la actividad de SnRK1, y cuya concentración va en aumento desde tejidos jóvenes y en crecimiento hasta tejidos adultos, actuando como un metabolito de señalización necesario para regular el crecimiento en respuesta a la disponibilidad de azúcar (Radchuk et al., 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que, en plantas de amaranto de grano, la actividad de SnRK1 cinasa no es alterada significativamente por el estrés causado por defoliación. Los resultados están de acuerdo con una premisa que establece que SnRK1 cinasa, considerada como un regulador maestro del metabolismo posee diferentes funciones en diferentes tejidos a lo largo del desarrollo y que cada respuesta de tolerancia o resistencia depende del órgano afectado (Wurzinger et al., 2018). Asimismo, la comparación con los resultados obtenidos por Cisneros-Hernández (2016), derivados del análisis de los niveles de expresión de los genes codificantes para el complejo SnRK1 y la proteína SnRK2 en plantas de amaranto defoliadas, no resultó, en general, muy congruente, ya que sólo se encontraron coincidencias entre la actividad de SnRK1 cinasa y la inducción de transcritos de SnRK1 y SnRK2 en respuesta a estrés por defoliación en hoja, en la etapa V2, mientras que todas las otras etapas se reportaron con una disminución de la expresión comparada con las hojas de plantas control, no defoliadas.

En tallos, la defoliación total, provocó una disminución significativa de la actividad de SnRK1 cinasa, sólo en la etapa V2 de vegetativa 2, permaneciendo constante en el resto de las etapas (Figura 13C), Estos resultados no concuerdan con los reportados para la actividad enzimática y expresión génica de SUSY por Sánchez-Martínez (2015) y Cisneros-Hernández (2016), respectivamente. Estos trabajos reportaron una reducción de la actividad de las invertasas en las etapas V1 y EP, que coincidió con la disminución, en las mismas etapas, de los niveles de expresión de isoformas de genes *SUSY*. Por el contrario, en la etapa V2, se detectó una inducción 1.5 veces más alta en la actividad tipo invertasa (Sánchez-Martínez, 2015), así como una inducción de 3 isoformas de IV (Cisneros-Hernández, 2016), de IPC y de IC. La activación de la transcripción/ actividad de estas invertasas muy probablemente proporcionó la glucosa necesaria para la inactivación de la SnRK1 cinasa, lo que podría explicar la disminución de su actividad

en la etapa V2 en plantas defoliadas. Otro dato interesante fue el pico de actividad SnRK1 alcanzado en esta etapa de desarrollo en plantas control. Se ha reportado que la subunidad (β) de SnRK1, i. e., GAL83, es la encargada de la localización de recursos en órganos menos susceptibles, para su posterior consumo y mantención de la homeostasis energética en condiciones de estrés. Esta función se demostró en plantas de tabaco sometidas a herbivoría por insectos masticadores, en las cuales se estableció que la tolerancia a este tipo de estrés biótico era dependiente de GAL83, ya que se encontró que esta subunidad participa en la regulación de la movilización y almacenamiento de recursos, en tallos y raíces, que al quedar fuera del alcance de los insectos agresores, posteriormente serán utilizados para apoyar la producción de semillas (Schwachtje et al., 2006). Es posible que un mecanismo de defensa similar sea activado por plantas de *A. cruentus* sometidas a estrés por defoliación. Inclusive, se ha propuesto que la tolerancia de esta planta a la pérdida de tejido foliar, radica en su capacidad de redistribuir reservas de almidón y sacarosa, localizadas predominantemente en raíz y tallo, así como la activación de meristemos secundarios que inicien el crecimiento después del daño (Vargas-Ortiz et al., 2015). En este contexto, la actividad de SnRK1 cinasa alcanzó su máximo nivel de actividad en la etapa V2, que coincide con la etapa en la cual la planta posee la capacidad de sintetizar los carbohidratos necesarios para el posterior almacenamiento en raíces y tallos. Por lo cual, cuando hay estrés por defoliación, la pérdida total de tejido foliar interrumpe el suministro de la sacarosa producto de la fotosíntesis desde hojas hacia tallos y raíces, provocando el consumo de las reservas de carbono en estos últimos, induciendo de esta manera la actividad de las invertasas para la movilización de recursos y de SnRK1 para regular la posterior respuesta al estrés. Este mecanismo proporciona la glucosa y fructosa necesarias para mantener la homeostasis energética o para iniciar la producción de semillas. Sin embargo, los niveles de actividad SnRK1 cinasa en tallo no coincidieron con los niveles de expresión de los genes codificantes para *SnRK1* y *SnRK2* (Cisneros-Hernández 2016) ya que sólo se detectó la inducción de estos genes en la etapa V2 y una represión en el resto de las etapas. Sin embargo, un dato interesante fue la inducción por defoliación del gen *SnRK2* en tallo, en todas las etapas de desarrollo analizadas, lo que sugiere que podría estar cumpliendo importantes funciones de regulación y respuesta a este tipo de estrés.

En raíces, el comportamiento de la actividad de SnRK1 cinasa fue variable, ya que no hubo ninguna diferencia significativa entre tratamientos, a excepción de la etapa V2, en la cual se observó una leve diferencia. Sin embargo, en la etapa V1 se detectó el máximo de actividad, el cual no fue modificado por efecto de la defoliación total. En forma similar,

no se observaron variaciones en los niveles de actividad SnRK1 cinasa en las muestras de raíz colectadas en las etapas EP y FL (Figura 14C). Estos resultados no fueron congruentes con la medición de los niveles de expresión génica de isoformas de SUSY reportados por Cisneros-Hernández (2016), que reportó represión en la expresión de estos genes en las etapas V1 y EP. Tampoco coincidieron con los niveles de la actividad SUSY reportados por Sánchez-Martínez (2015). Un dato interesante en los resultados de este trabajo fue la inducción de la actividad SnRK1 en raíces de plantas defoliadas en la etapa V2, similar a lo observado en tallo. Lo anterior refuerza el concepto de que estos órganos podrían actuar como sitios de reserva de nutrientes/ energía en amaranto, menos susceptibles a variaciones ocasionadas por diferentes tipos de estrés. Este mecanismo podría contribuir a incrementar la resistencia o tolerancia a la pérdida de tejido foliar, ya sea por ataque de herbívoros o por daño mecánico. Lo anterior sugiere que SnRK1, podría estar cumpliendo la misma función atribuida a tallos de plantas de tabaco silvestre, donde se encontró que GAL83, subunidad del complejo de la proteína SnRK1, contribuye a regular la localización de recursos en raíz y tallo, posiblemente para alejarlos de los depredadores. No obstante, hay que tener en cuenta que las condiciones de estrés pueden conducir a diferentes respuestas de la planta que podrían estar implicadas en otros tipos de estrés y en las que podría estar participando SnRK1, realizando varios cambios metabólicos. Por ejemplo, estudios previos han establecido, en *Arabidopsis*, que una moderada sequía y exposición al frío, induce la acumulación de un amplio rango de carbohidratos y otros metabolitos primarios, como hexosas, sacarosa, trealosa o manitol, aminoácidos, ácidos orgánicos y componentes ricos en celulosa. Esto pone en evidencia que la T6P también puede estar regulando a SnRK1 en condiciones donde se acumulen carbohidratos en ciertos órganos como respuesta a condiciones de estrés. Estos órganos son, en general, menos susceptibles al daño directo, como tallo y raíz (Figuroa et al., 2016). Y aun así SnRK1 estaría siendo inducido como regulador de la respuesta de la planta ante condiciones de deficiencia de energía, dejando claro que forma parte de una intrincada red de regulación en la que se encuentran integrados los reguladores maestros del metabolismo. Para la raíz, se reportó anteriormente que los genes codificantes para *SnRK1* se mantuvieron reprimidos en las primeras etapas de desarrollo, situación que cambió en las etapas reproductivas tardías (Cisneros-Hernández, 2016). Sin embargo, estos resultados no coincidieron con los niveles de actividad de SnRK1 cinasa medidos en raíz.

Por último, en las muestras de panoja, la actividad de cinasa de SnRK1, fue variable. En la etapa FL, la actividad de SnRK1 cinasa no se vio afectada por el tratamiento de defoliación total. Por el contrario, se observaron diferencias significativas en la etapa de

emergencia de panoja, con una disminución de la actividad en plantas defoliadas a casi la mitad de los niveles detectados en plantas control intactas (Figura 15). Este resultado tampoco fue congruente con los niveles de expresión para genes *SUSY* reportados por Cisneros-Hernández (2016) y los niveles de actividad de estas mismas enzimas, que permanecieron sin alteración en panojas de plantas defoliadas respecto a los controles (Sánchez-Martínez, 2015). La diferencia mostrada en la etapa EP podría ser atribuida a la regulación que SnRK1 establece sobre el llenado de semillas, ya que se ha demostrado que SnRK1 incrementa el flujo de sacarosa, a través de la vía de biosíntesis de almidón, sobre regulando sacarosas sintasas y AGPasa y reduciendo la activación de SPS por fosforilación directa, en condiciones normales (Halford y Hey, 2009; Tiessen et al., 2003). Sin embargo, la disminución de la actividad de SnRK1 en plantas tratadas, vista en EP, podría estar relacionada con la inducción de la actividad de IPC, que se indujo 1.4 veces más en panojas de plantas defoliadas (Sánchez-Martínez, 2015), lo cual fue reiterado por la acumulación de transcritos codificantes de IPC detectada en órganos similares (Cisneros-Hernández, 2016). Por ende, estos resultados apoyan estudios que reportan que la SnRK1 cinasa es, al parecer, indispensable en la movilización de almidón y dirige, además, la extensiva reprogramación transcripcional en respuesta a la escasez de carbono (Thelander et al., 2004), mediante la alteración de la actividad de enzimas claves involucradas en el metabolismo primario y por regulación de la expresión de genes a través del control de factores de transcripción (Mair et al., 2015). Entre éstos se puede mencionar al factor de transcripción bZIP1, el cual fue recientemente confirmado como un regulador maestro transcripcional, que permite la respuesta rápida a la señal emitida por el estatus de nutrientes en la planta, mediante el control principalmente de genes implicados en el metabolismo de aminoácidos y de fósforo (Para et al., 2014). Esta función fue confirmada por estudios realizados en plantas de *Arabidopsis* sobre expresantes y silenciadas en bZIP63, las cuales presentaron una gran diferencia en los perfiles de aminoácidos en relación con las plantas no transformadas, observándose una diferencia en la acumulación de aminoácidos que fue atribuida a una degradación de proteínas más eficiente, particularmente bajo condiciones de oscuridad y bajos niveles de carbono. Esto es interesante debido al hecho de que bZIP63 es uno de los principales blancos de SnRK1, lo que sugiere que este factor de transcripción podría ser un mediador directo de SnRK1 durante la reprogramación transcripcional (Para et al., 2014). En este contexto un resultado interesante fue la disminución de la actividad de SnRK1 en panojas de plantas defoliadas en la etapa EP, ya que este resultado fue congruente con los niveles de expresión de genes codificantes para *SnRK1*, medidos por Cisneros-Hernández (2016)

que reportó que el gen codificante para la subunidad catalítica de este complejo con actividad cinasa, también estuvo reprimido, tanto en EP como en FL.

Finalmente, un dato interesante derivado de este trabajo fue la alta tasa de actividad de SnRK1 encontrada en todos los tejidos y las etapas de desarrollo, tanto con plantas control como en plantas sometidas a estrés por defoliación total. Este dato apoya la premisa de que la SnRK1 cinasa está expresada constitutivamente, realizando diferentes funciones que serán o no alteradas en condiciones de estrés, dependiendo del órgano afectado, orquestando una red transcripcional para promover el catabolismo y suprimir el anabolismo y mantener la energía celular en estas condiciones. Diversos estudios han sido reportados en este contexto, estableciendo que SnRK1 está involucrado en la señalización por ABA dependiente del FUS3, la cual se encarga de regular la transición entre etapas de desarrollo y el llenado de los frutos con almidón (Lovas et al., 2003). Además, controla la expresión de genes de *APG/ATG*, implicados en el proceso de autofagia, los cuales son inducidos en condiciones de estrés (Baena-González et al., 2007b) y se encuentran, al parecer, presentes en todos los tejidos de la planta (Wurzinger et al., 2018). No obstante, SnRK1 no sólo es activada en condiciones de estrés, sino que reportes en plantas de *Arabidopsis* cultivadas en oscuridad establecieron que esta cinasa es regulada por T6P mediante un ciclo circadiano, donde en la oscuridad, la concentración de T6P en roseta baja, permitiendo que SnRK1 realice una serie de cambios metabólicos para la supervivencia en oscuridad (Figueroa et al., 2016).

De esta forma, los resultados aquí obtenidos aportan una idea del comportamiento de las proteínas cinasas cTOR y SnRK1 bajo condiciones de estrés por defoliación, mostrando que las dos, aunque de función contrastante, nunca se desactivan del todo. Lo anterior podría explicarse en el contexto de la supervivencia y los cambios metabólicos constantes que sufren las plantas, día a día, o en condiciones de estrés. De modo que en estas condiciones constantemente en fluctuación, las plantas requieren de la regulación tanto por TOR, que inhibe el proceso de autofagia como de SnRK1, necesaria para optimizar energía y relocalizar recursos, para mantener la homeostasis energética.

9. CONCLUSIONES

El tratamiento de defoliación total en plantas de *A. cruentus* provocó cambios en la actividad del cTOR y SnRK1, los cuales fueron dependientes de la etapa de desarrollo y el órgano analizado.

El complejo TOR, presentó actividad en todos los órganos y etapas de desarrollo. En contra de lo esperado su actividad se modificó, tanto positiva como negativamente, en respuesta al estrés por defoliación. Los cambios observados fueron dependientes de la etapa de desarrollo y el órgano analizado.

Lo anterior sugiere que, contrario a lo reportado, la actividad del complejo TOR puede activarse en respuesta a condiciones de escasez de carbono, mientras que la actividad de SnRK1 puede reprimirse.

El péptido sintetizado “*de novo*”, AFAGFTYVAPRRR, reportado por primera vez, es apropiado para la medición de la actividad cinasa de TOR *in vitro* usando ³²P. Este sustrato sintético tiene un sitio de fosforilación y de reconocimiento únicos que pueden ser usados para medir la actividad de TOR durante el desarrollo de plantas, y posiblemente de otros organismos desde levaduras hasta mamíferos.

10. PERSPECTIVAS

1. Exponer plantas a defoliación total y recolectar solo muestras de meristemas radiculares, apicales y secundarios, para medir más específicamente la actividad del complejo TOR.

Silenciar en plantas de amaranto, genes claves para la formación del complejo en las proteínas cinasas reguladores del crecimiento TOR y SnRK1 durante el desarrollo de la planta, para poder determinar su importancia en la regulación del desarrollo y de respuestas a estrés.

Medir la actividad del complejo TOR y las familias de SnRK cinasas en diferentes condiciones de estrés, para poder estudiar su contribución a regular los cambios metabólicos generados como respuestas a diferentes tipos de estrés.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal S, Grover A** (2006) Molecular Biology, Biotechnology and Genomics of Flooding-Associated Low O₂ Stress Response in Plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* **25**: 1–21
- Ahn CS, Han J-A, Lee H-S, Lee S, Pai H-S** (2011) The PP2A Regulatory Subunit Tap46, a Component of the TOR Signaling Pathway, Modulates Growth and Metabolism in Plants. *Plant Cell* **23**: 185–209
- Ananieva EA, Gillaspay GE, Ely A, Burnette RN, Erickson FL** (2008) Interaction of the WD40 Domain of a Myoinositol Polyphosphate 5-Phosphatase with SnRK1 Links Inositol, Sugar, and Stress Signaling. *Plant Physiol* **148**: 1868–1882
- Anderson GH, Veit B, Hanson MR** (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol* **3**: 1–11
- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P** (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* **14**: 2085–96
- Atkinson NJ, Urwin PE** (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot* **63**: 3523–3543
- Ávila-Castañeda A, Gutiérrez-Granados N, Ruiz-Gayosso A, Sosa-Peinado A, Martínez-Barajas E, Coello P** (2014) Structural and functional basis for starch binding in the SnRK1 subunits AKIN1² and AKIN1³. *Front Plant Sci* **5**: 1–8
- Avila-Sakar G, Stephenson AG** (2006) Effects of the Spatial Pattern of Leaf Damage on Growth and Reproduction: Whole Plants. *Int J Plant Sci* **167**: 1021–1028
- Baena-González E, Hanson J** (2017) Shaping plant development through the SnRK1–TOR metabolic regulators. *Curr Opin Plant Biol* **35**: 152–157
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J** (2007a) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938–942
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J** (2007b) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938–942
- Baena-González E, Sheen J** (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* **13**: 474–482

- Bailey-Serres J, Voeselek LACJ** (2008) Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 313–339
- Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, Awmack C, Bezemer TM, Brown VK, Butterfield J, Buse A, Coulson JC, Farrar J, et al** (2002) Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Glob Chang Biol* **8**: 1–16
- Barker JA, Slocombe S, Ball K, Grahamehardie D, Shewry P, Halford A** (1996) EvidenceThatBarley3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme AReductaseKinase1saMemberoftheSucrose Nonfermenting-1-RelatedProteinKinaseFamily'. *PlantPhysiol* **112**: 1141–1149
- Barbabás B, Jager K, Feher A** (2007) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ* **8**: 878-885
- Baroja-Fernández E, Muñoz FJ, Saikusa T, Rodríguez-López M, Akazawa T, Pozueta-Romero J** (2003) Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol* **44**: 500–509
- Barton KE, Koricheva J** (2010) The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. *Am Nat* **175**: 481–93
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K** (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**: 2–11
- Ben-Sahra I, Manning BD** (2017) ScienceDirect mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* **45**: 72–82
- Blasing OE, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible W-R, Stitt M** (2005) Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE* **17**: 3257–3281
- Boege K, Marquis RJ** (2005) Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends Ecol Evol* **20**: 441–8
- Borisjuk L, Walenta S, Weber H, Mueller-Klieser W, Wobus U** (1998) High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *Plant J* **15**: 583–591

- Borzak CL, Potts BM, Barry KM, Pinkard EA, O'Reilly-Wapstra JM** (2017) Genetic stability of physiological responses to defoliation in a eucalypt and altered chemical defence in regrowth foliage. *Tree Physiol* **37**: 220–235
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C** (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 41758–41766
- Bradford MM** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Braun DM, Wang L, Ruan YL** (2014) Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *J Exp Bot* **65**: 1713–1735
- Brenner D** (2000) Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. *Plant Breed Rev* **19**: 228–285
- Brodribb TJ, Feild TS, Jordan GJ** (2007) Leaf Maximum Photosynthetic Rate and Venation Are Linked by Hydraulics. *Plant Physiol* **144**: 1890–1898
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin J-F, Wu S-H, Swidzinski J, Ishizaki K, et al** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* **42**: 567–585
- Cai Y, Shao L, Li X, Liu G, Chen S** (2016) Gibberellin stimulates regrowth after defoliation of sheepgrass (*Leymus chinensis*) by regulating expression of fructan-related genes. *J Plant Res* **129**: 935–944
- Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang Y, Bartholomaeus L, Fernie AR, Willmitzer L, Giavalisco P** (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **73**: 897–909
- Camargo ID, Tapia-López R, Núñez-Farfán J** (2015) Ecotypic variation in growth responses to simulated herbivory: trade-off between maximum relative growth rate and tolerance to defoliation in an annual plant. *AoB Plants*. 7(1)
- Caselato-Sousa VM, Amaya-Farfán J** (2012) State of Knowledge on Amaranth Grain: A Comprehensive Review. *J Food Sci* **77**: 93–104

- Castrillón-Arbeláez PA, Martínez-Gallardo N, Arnaut HA, Tiessen A, Délano-Frier JP** (2012) Metabolic and enzymatic changes associated with carbon mobilization, utilization and replenishment triggered in grain amaranth (*Amaranthus cruentus*) in response to partial defoliation by mechanical injury or insect herbivory. *BMC Plant Biol.* doi: 10.1186/1471-2229-12-163
- Celenza JL, Carlson M** (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* (80-) **233**: 1175–1180
- Chen S, Cai Y, Zhang L, Yan X, Cheng L, Qi D, Zhou Q, Li X, Liu G** (2014) Transcriptome analysis reveals common and distinct mechanisms for sheepgrass (*Leymus chinensis*) responses to defoliation compared to mechanical wounding. *PLoS One* **9**(2)
- Cheng WH** (1996) The miniature1 seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell Online* **8**: 971–983
- Chinnusamy V, Zhu J-K** (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 133–139
- Cho Y-H, Hong J-W, Kim E-C, Yoo S-D** (2012) Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development. *Plant Physiol* **158**: 1955–1964
- Cisneros-Hernández I** (2016) “ Cambios en la expresión génica de reguladores maestros del metabolismo en respuesta a la defoliación severa en Amarantho de grano.
- Confraria A, Martinho C, Elias A, Rubio-Somoza I, Baena-González E** (2013) miRNAs mediate SnRK1-dependent energy signaling in Arabidopsis. *Front Plant* **4**
- Corbesier L, Lejeune P, Bernier G** (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: Comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* **206**: 131–137
- Crozet P, Margalha L, Butowt R, Fernandes N, Elias CA, Orosa B, Tomanov K, Teige M, Bachmair A, Sadanandom A, et al** (2016) Sumoylation represses SnRK1 signaling in Arabidopsis. *Plant J* **85**: 120–133
- Dalchau N, Baek SJ, Briggs HM, Robertson FC, Dodd AN, Gardner MJ, Stancombe MA, Haydon MJ, Stan G-B, Goncalves JM, et al** (2011) The circadian oscillator gene *GIGANTEA* mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana*

circadian clock to sucrose. Proc Natl Acad Sci **108**: 5104–5109

Dale S, Wilson WA, Edelman AM, Hardie DG (1995) Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. FEBS Lett **361**: 191–195

Debnam PM, Fernie AR, Leisse A, Golding A, Bowsher CG, Grimshaw C, Knight JS, Emes MJ (2004) Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. Plant J **38**: 49–59

Délano-frier JP, Avilés-arnaut H, Casarrubias-castillo K, Casique-arroyo G, Castrillón-arbeláez PA, Herrera-estrella L, Massange-sánchez J, Martínez-gallardo NA, Parra-cota FI, Vargas-ortiz E, et al (2011) Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) using 454 pyrosequencing: comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. BMC Genomics **12**: 363

Délano-Frier JP, Avilés-Arnaut H, Casarrubias-Castillo K, Casique-Arroyo G, Castrillón-Arbeláez PA, Herrera-Estrella L, Massange-Sánchez J, Martínez-Gallardo NA, Parra-Cota FI, Vargas-Ortiz E, et al (2011) Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) using 454 pyrosequencing: Comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. BMC Genomics **12**: 363

Délano-Frier JP, Martínez-Gallardo N, Martínez-de la Vega O, Salas-Araiza MD, Barbosa-Jaramillo ER, Torres A, Vargas P, Borodanenko A (2004) The effect of exogenous jasmonic acid on induced resistance and productivity in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is influenced by environmental conditions. J Chem Ecol **30**: 995–1027

Deng K, Dong P, Wang W, Feng L, Xiong F, Wang K, Zhang S, Feng S, Wang B, Zhang J, et al (2017) The TOR Pathway Is Involved in Adventitious Root Formation in Arabidopsis and Potato. Front Plant Sci **8**: 784

Deprost D, Truong HN, 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, Bedu M, Robaglia C, Meyer C** (2007a) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep* **8**: 864–870
- Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C** (2007b) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *Embo Rep* **8**: 864–870
- 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**: 261–285
- Dobrenel T, Marchive C, Azzopardi M, Clément G, Moreau M, Sormani R, Robaglia C, Meyer C** (2013) Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? *Front Plant Sci* **4**: 1–6
- Dobrenel T, Marchive C, Sormani R, Moreau M, Mozzo M, Montané M-H, Menand B, Robaglia C, Meyer C** (2011) Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. *Biochem Soc Trans* **39**: 477–481
- Edgar RC** (2004) Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792–1797
- Ehrlén J** (2002) Assessing the lifetime consequences of plant-animal interactions for the perennial herb *Lathyrus vernus* (Fabaceae). *Perspect Plant Ecol Evol Syst* **5**: 145–163
- Ende W Van den** (2013) Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Front Plant Sci* **4**: 247
- Van Den Ende W, Valluru R** (2009) Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: Scavenging and salvaging? *J Exp Bot* **60**: 9–18
- Farnsworth E** (2004) Hormones and shifting ecology throughout plant development. *Ecology* **85**: 5–15
- Farras R, Ferrando A, Jásik J, Kleinow T, Okrész L, Tiburcio A, Salchert K, del Pozo C, Schell J, Koncz C** (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J* **20**: 2742–2756
- Figuroa CM, Feil R, Ishihara H, Watanabe M, Kölling K, Krause U, Höhne M, Encke B, Plaxton WC, Zeeman SC, et al** (2016) Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. *Plant J* **85**: 410–423
- Foster JR** (2017) Xylem traits, leaf longevity and growth phenology predict growth and

mortality response to defoliation in northern temperate forests. *Tree Physiol* **37**: 1151–1165

Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, et al (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50**: 2123–2132

Ghillebert R, Swinnen E, Wen J, Vandesteene L, Ramon M, Norga K, Rolland F, Winderickx J (2011) The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: Structure, function and regulation. *FEBS J* **278**: 3978–3990

Gibson SI (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 93–102

Goel AK, Lundberg D, Torres MA, Matthews R, Akimoto-Tomiyama C, Farmer L, Dangl JL, Grant SR (2008) The *Pseudomonas syringae* Type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**: 361–370

González MC, Roitsch T, Cejudo FJ (2005) Circadian and developmental regulation of vacuolar invertase expression in petioles of sugar beet plants. *Planta* **222**: 386–395

Goodger JQD, Gleadow RM, Woodrow IE (2006) Growth cost and ontogenetic expression patterns of defence in cyanogenic *Eucalyptus* spp. *Trees* **20**: 757–765

Gruner DS, Smith JE, Seabloom EW, Sandin SA, Ngai JT, Hillebrand H, Harpole WS, Elser JJ, Cleland EE, Bracken MES, et al (2008) A cross-system synthesis of consumer and nutrient resource control on producer biomass. *Ecol Lett* **11**: 740–755

Grüning MM, Simon J, Rennenberg H, L-M-Arnold A (2017) Defoliating insect mass outbreak affects soil N fluxes and tree N nutrition in pcots Pine forests. *Front Plant Sci* **8**: 954

H. Winter, Huber SC (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *CRC Crit Rev Plant Sci* **19**: 31–67

Halford NG, Hey S, Jhurrea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang Y (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot* **54**: 467–75

- Halford NG, Hey SJ** (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J* **419**: 247–259
- HANLEY ME, FEGAN EL** (2007) Timing of cotyledon damage affects growth and flowering in mature plants. *Plant Cell Environ* **30**: 812–819
- Hanley ME, Fenner M, Whibley H, Darvill B** (2004) Early plant growth: identifying the end point of the seedling phase. *New Phytol* **163**: 61–66
- Hanna M, Janne K, Perttu V, Helena K** (2018) Gaps in the capacity of modern forage crops to adapt to the changing climate in northern Europe. *Mitig Adapt Strateg Glob Chang* **23**: 81–100
- Hanson J, Johannesson H, Engström P** (2001) Sugar-dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HDZhdip gene ATHB13. *Plant Mol Biol* **45**: 247–62
- Hao L** (2003) Geminivirus AL2 and L2 Proteins Interact with and Inactivate SNF1 Kinase. *Plant Cell Online* **15**: 1034–1048
- Hardie DG** (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 774–785
- Hatier J-HB, Faville MJ, Hickey MJ, Koolaard JP, Schmidt J, Carey B-L, Jones CS** (2014) Plant vigour at establishment and following defoliation are both associated with responses to drought in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J Exp Bot* **65**: 5823–34
- Haukioja E, Koricheva J** (2000) Tolerance to herbivory in woody vs. herbaceous plants. *Evol Ecol* **14**: 551
- Hedbacker K, Carlson M** (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* **13**: 2408–20
- Heitman J, Movva N, Hall M** (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* (80-) **253**: 905–909
- Herms DA, Mattson WJ** (1992) The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *Q Rev Biol* **67**: 283–335
- Hincha DK, Zuther E, Hellwege EM, Heyer AG** (2002) Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* **12**: 103–110

- Horacio P, Martinez-noel G, Tognetti JA, Pontis HG, Martínez-noël GMA** (2016) Sucrose signaling in plants : A world yet to be explored sucrose signaling in plants A world yet to be explored. doi: 10.4161/psb.23316
- Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, et al** (2015) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* **132**: 666–680
- Huerta-Ocampo JÁ, Paulina Barba De La Rosa A** (2011) Amaranth: A pseudo-cereal with nutraceutical properties. *Curr Nutr Food Sci* **7**: 1–9
- Hulsmans S, Rodriguez M, De Coninck B, Rolland F** (2016) The SnRK1 energy sensor in plant biotic interactions. *Trends Plant Sci* **21**: 648–661
- Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan K** (2005) Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Society* **69**: 79–100
- Jeong EY, Seo PJ, Woo JC, Park CM** (2015) AKIN10 delays flowering by inactivating IDD8 transcription factor through protein phosphorylation in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **15**: 1–13
- John F, Roffler S, Wicker T, Ringli C** (2011) Plant TOR signaling components. *Plant Signal Behav* **6**: 1700–1705
- Kapahi P, Chen D, Rogers AN, Katewa SD, Li PW, Thomas EL, Kockel L** (2011) With TOR less is more: a key role for the conserved nutrient sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab* **11**: 453–465
- Kessler A, Halitschke R, Baldwin IT** (2004) Silencing the Jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science (80-)* **305**: 665–668
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T** (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1–related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* **16**: 1163–1177
- Kojima H, Suzuki T, Kato T, Enomoto K, Sato S, Kato T, Tabata S, Sáez-Vasquez J, Echeverría M, Nakagawa T, et al** (2007) Sugar-inducible expression of the nucleolin-1 gene of Arabidopsis thaliana and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant J* **49**: 1053–1063
- Kunz J, Schneider U, Howald I, Schmidt A, Hall MN** (2000) HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast. *J Biol Chem* **275**: 37011–37020
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick J, Frommer W, Ward J** (1999)

The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing. *Plant Cell* **11**: 707–726

Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot* **65**: 799–807

Lázaro-Nogal A, Matesanz S, Godoy A, Pérez-Trautman F, Gianoli E, Valladares F (2015) Environmental heterogeneity leads to higher plasticity in dry-edge populations of a semi-arid Chilean shrub: insights into climate change responses. *J Ecol* **103**: 338–350

Leiber R-M, John F, Verhertbruggen Y, Diet A, Knox JP, Ringli C (2010) The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 1898–1908

Lemoine R, Camera S La, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain J-L, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, et al (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci* **4**: 1–21

Lilly Borzak C (2015) Intraspecific variation in defence and recovery of *Eucalyptus globulus* from mammalian herbivory.

Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3730–3738

Liu Y, Bassham DC (2010) TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. **87**: 14-21

Lovas Á, Bimbó A, Szabó L, Bánfalvi Z (2003) Antisense repression of *StubGAL83* affects root and tuber development in potato. *Plant J* **33**: 139–147

Luan S (2009) The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci* **14**: 37–42

Ma J, Hanssen M, Lundgren K, Hernandez L, Delatte T, Ehlert A, Liu CM, Schluepmann H, Droge-Laser W, Moritz T, et al (2011) The sucrose-regulated *Arabidopsis* transcription factor bZIP11 reprograms metabolism and regulates trehalose metabolism. *New Phytol* **191**: 733–745

Machado RAR, Zhou W, Ferrieri AP, Arce CCM, Baldwin IT, Xu S, Erb M (2017) Species-specific regulation of herbivory-induced defoliation tolerance is associated

with jasmonate inducibility. *Ecol Evol* **7**: 3703–3712

MACKINTOSH RW, DAVIES SP, CLARKE PR, WEEKES J, GILLESPIE JG, GIBB BJ, HARDIE DG (1992) Evidence for a protein kinase cascade in higher plants. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem* **209**: 923–931

Mair A, Pedrotti L, Wurzinger B, Anrather D, Simeunovic A, Weiste C, Valerio C, Dietrich K, Kirchler T, Nägele T, et al (2015) SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *Elife* **4**: 1–33

Man AL, Purcell PC, Hannappel U, Halford NG (1997) Potato SNF1-related protein kinase: molecular cloning, expression analysis and peptide kinase activity measurements. *Plant Mol Biol* **34**: 31–43

MANEL S, PONCET BN, LEGENDRE P, GUGERLI F, HOLDEREGGER R (2010) Common factors drive adaptive genetic variation at different spatial scales in *Arabis alpina*. *Mol Ecol* **19**: 3824–3835

Maschinski J, Whitham TG (1989) The Continuum of Plant Responses to Herbivory: The Influence of Plant Association, Nutrient Availability, and Timing. *Am Nat* **134**: 1–19

Massange-Sanchez JA, Palmeros-Suarez PA, Martinez-Gallardo NA, Castrillon-Arbelaez PA, Avilés-Arnaut H, Alatorre-Cobos F, Tiessen A, Délano-Frier JP (2015) The novel and taxonomically restricted Ah24 gene from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) has a dual role in development and defense. *Front Plant Sci* **6**: 602

Matsuki S, Sano Y, Koike T (2004) Chemical and physical defence in early and late leaves in three heterophyllous birch species native to northern Japan. *Ann Bot* **93**: 141–7

McKibbin RS, Muttucumaru N, Paul MJ, Powers SJ, Burrell MM, Coates S, Purcell PC, Tiessen A, Geigenberger P, Halford NG (2006) Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnol J* **4**: 409–418

McLaughlin JE, Boyer JS (2004) Glucose localization in maize ovaries when kernel number decreases at low water potential and sucrose is fed to the stems. *Ann Bot* **94**: 75–86

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* **99**: 6422–6427
- Mithöfer A, Boland W** (2008) Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiol* **146**: 825–31
- Mithöfer A, Wanner G, Boland W** (2005) Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiol* **137**: 1160–8
- Mittler R, Blumwald E** (2010a) Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 443–462
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-H, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J** (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* (80-) **300**: 332–336
- Moreau M, Azzopardi M, Clement G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette M-L, Taconnat L, Renou J-P, Robaglia C, et al** (2012) Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/G L, a partner of the target of rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell Online* **24**: 463–481
- Moreno DM, Núñez-Farfán J, Terrazas T, Lucero Del Mar Ruiz P, Trinidad-Santos A, Carlos Trejo L, Larque-Saavedra A** (1999) Plastic responses to clipping in two species of *Amaranthus* from the Sierra Norte de Puebla, Mexico. *Genet Resour Crop Evol* **46**: 225–234
- Munns R, Tester M** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651–681
- Muro J, Irigoyen I, Lamsfus C** (1998) Effect of defoliation on onion crop yield. *Sci Hortic (Amsterdam)* **77**: 1–10
- Nagata T, Hara H, Saitou K, Kobashi A, Kojima K, Yuasa T, Ueno O** (2012) Activation of ADP-Glucose Pyrophosphorylase gene Promoters by a WRKY transcription factor, AtWRKY20, in *Arabidopsis thaliana* L. and sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Plant Prod Sci* **15**: 10–18
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiol Plant* **126**: 62–71
- Narbona E, Dirzo R** (2010) Experimental defoliation affects male but not female

reproductive performance of the tropical monoecious plant *Croton suberosus* (Euphorbiaceae). *Ann Bot* **106**: 359–69

Nunes C, Primavesi LF, Patel MK, Martinez-Barajas E, Powers SJ, Sagar R, Fevereiro PS, Davis BG, Paul MJ (2013) Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol Biochem* **63**: 89–98

Núñez-Farfán J, Fornoni J, Valverde PL (2007) The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **38**: 541–566

Osuna D, Usadel B, Morcuende R, Gibon Y, Bläsing OE, Höhne M, Günter M, Kamlage B, Trethewey R, Scheible W-R, et al (2007) Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **49**: 463–491

Pandey SP, Srivastava S, Goel R, Lakhwani D, Singh P, Asif MH, Sane AP (2017) Simulated herbivory in chickpea causes rapid changes in defense pathways and hormonal transcription networks of JA/ethylene/GA/auxin within minutes of wounding. *Sci Rep* **7**: 44729

Para A, Li Y, Marshall-Colón A, Varala K, Francoeur NJ, Moran TM, Edwards MB, Hackley C, Bargmann BOR, Birnbaum KD, et al (2014) Hit-and-run transcriptional control by bZIP1 mediates rapid nutrient signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 10371–6

Park YJ, Nishikawa T (2012) Characterization and expression analysis of the starch synthase gene family in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). *Genes Genet Syst* **87**: 281–289

Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* **421**: 37–42

Pastore C, Zenoni S, Fasoli M, Pezzotti M, Torielli GB, Filippetti I (2013) Selective defoliation affects plant growth, fruit transcriptional ripening program and flavonoid metabolism in grapevine. *BMC Plant Biol* **13**: 30–37

Pestaña M, Santolamazza-Carbone S (2011) Defoliation negatively affects plant growth and the ectomycorrhizal community of *Pinus pinaster* in Spain. *Oecologia* **165**: 723–733

Pien S, Wyrzykowska J, Fleming AJ (2001) Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the

apical meristem. *Plant J* **25**: 663–74

Pierre M, Traverso JA, Boisson B, Domenichini S, Bouchez D, Giglione C, Meinell T (2007) N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **19**: 2804–2821

Pinkard Ea, Eyles A, O'Grady Ap (2011) Are gas exchange responses to resource limitation and defoliation linked to source:sink relationships? *Plant Cell Environ* **34**: 1652–1665

Polge C, Jossier M, Crozet P, Gissot L, Thomas M (2008) Subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function together with expression and function specificities; physical interaction with nitrate reductase specifically occurs via AKIN 1-subunit. *PLANT Physiol* **148**: 1570–1582

Polge C, Thomas M (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci* **12**: 20–28

Pollock C, Farrar J, Tomos D, Gallagher J, Lu C, Koroleva O (2003) Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. *J Exp Bot* **54**: 489–494

Pollock CJ, Cairns AJ (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bioi* **42**: 77–1

Prasad PV V., Pisipati SR, Momčilović I, Ristic Z (2011) Independent and combined effects of high temperature and drought stress during grain filling on plant yield and chloroplast EF-Tu expression in spring Wheat. *J Agron Crop Sci* **197**: 430–441

Price J, Laxmi A, St Martin SK, Jang J-C (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2128–2150

Purcell PC, Smith AM, Halford NG (1998) Antisense expression of a sucrose non fermenting 1 related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J* **14**: 195–202

Quentin AG, O'Grady AP, Beadle CL, Mohammed C, Pinkard EA (2012) Interactive effects of water supply and defoliation on photosynthesis, plant water status and growth of *Eucalyptus globulus* Labill. *Tree Physiol* **32**: 958–967

Quentin AG, Pinkard EA, Beadle CL, Wardlaw TJ, O 'grady AP, Paterson S,

- Mohammed CL** (2010) Do artificial and natural defoliation have similar effects on physiology of *Eucalyptus globulus* Labill. seedlings? *Ann For Sci.* **45**: 14-25
- Radchuk R** (2005) Repressing the expression of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol* **140**: 263–278
- Radchuk R, Emery RJN, Weier D, Vigeolas H, Geigenberger P, Lunn JE, Feil R, Weschke W, Weber H** (2009) Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *Plant J* **61**: 324–338
- Rangel E, Sánchez M, López E, La D, Olán O, Valencia R, Trejo M, Espinoza C, Casillas H, 2010 JM** (2010) Conservación y uso de los recursos genéticos de Amarantho en México.
- Ren M, Qiu S, Venglat P, Xiang D, Feng L, Selvaraj G, Datla R** (2011) Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **155**: 1367–1382
- Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S, et al** (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4850–4874
- Rennie EA, Turgeon R** (2009) A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 14162–14167
- Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B** (2015) TOR signalling in plants. *Biochem J* **470**: 1–14
- Robaglia C, Thomas M, Meyer C** (2012) Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 301–307
- Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, Margalha L, Confraria A, Martinho C, Elias A, Rabissi A, Lumbreras V, Gonzalez-Guzman M, et al** (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-Related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 3871–3884
- Roitto M, Rautio P, Markkola A, Julkunen-tiitto R, Varama M, Saravesi K, Tuomi J** (2008) Induced accumulation of phenolics and sawfly performance in Scots pine in response to previous defoliation. *Tree Physiol* **29**: 207–216
- Roldán M, Gómez-Mena C, Ruiz-García L, Salinas J, Martínez-Zapater JM** (1999)

Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *Plant J* **20**: 581–590

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 675–709

Ruan Y-L, Patrick JW, Bouzayen M, Osorio S, Fernie AR (2012) Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends Plant Sci* **17**: 656–665

Ruan Y, Llewellyn DJ, Furbank RT (2003) Suppression of sucrose synthase gene expression represses Cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell* **15**: 952–964

Sage RF, Zhu X-G (2011) Exploiting the engine of C4 photosynthesis. *J Exp Bot* **62**: 2989–3000

Sánchez-Hernández C, Martínez-Gallardo N, Guerrero-Rangel A, Valdés-Rodríguez S, Délano-Frier J (2004) Trypsin and α -amylase inhibitors are differentially induced in leaves of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) in response to biotic and abiotic stress. *Physiol Plant* **122**: 254–264

Sánchez-Martínez (2015) Metabolismo de azúcares en plantas defoliadas de *Amaranthus cruentus* durante el desarrollo. Universidad Politécnica del Valle de Toluca

Sanson G (2006) The biomechanics of browsing and grazing. *Am J Bot* **93**: 1531–1545

Saravesi K, Markkola A, Rautio P, Roitto M, Tuomi J (2008) Defoliation causes parallel temporal responses in a host tree and its fungal symbionts. *Oecologia* **156**: 117–123

Schädler M, Alpei J, Scheu S, Brandl R, Auge H (2004) Resource dynamics in an early-successional plant community are influenced by insect exclusion. *Soil Biol Biochem* **36**: 1817–1826

Schmelz EA, Alborn HT, Tumlinson JH (2001) The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin- and jasmonic acid-induced sesquiterpene volatile release in *Zea mays*. *Planta* **214**: 171–9

Schmelzle T, Beck T, Martin DE, Hall MN (2004) Activation of the RAS / cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* **24**: 338–351

Schwachtje J, Minchin PEH, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon

to roots. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 12935–12940

Shen W, Reyes MI, Hanley-Bowdoin L (2009) Arabidopsis Protein Kinases GRIK1 and GRIK2 Specifically Activate SnRK1 by Phosphorylating Its Activation Loop. *Plant Physiol* **150**: 996–1005

Shi L, Wu Y, Sheen J (2018) TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development* **145**: 35-39

Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 274–279

Smirnova A V., Matveyeva NP, Polesskaya OG, Yermakov IP (2009) Generation of reactive oxygen species during pollen grain germination. *Russ J Dev Biol* **40**: 345–353

Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell Environ* **30**: 1126–1149

Snider JL, Oosterhuis DM, Loka DA, Kawakami EM (2011) High temperature limits in vivo pollen tube growth rates by altering diurnal carbohydrate balance in field-grown *Gossypium hirsutum* pistils. *J Plant Physiol* **168**: 1168–1175

Sormani R, Lei Y, Menand B, Ennar N, Lecampion C, Meyer C, Robaglia C (2007) *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol* **7**: 1–8

Soulard A, Cohen A, Hall MN (2009) TOR signaling in invertebrates. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 825–836

Spiteller D, Pohnert G, Boland W (2001) Absolute configuration of volicitin, an elicitor of plant volatile biosynthesis from lepidopteran larvae. *Tetrahedron Lett* **42**: 1483–1485

Stan R, McLaughlin MM, Cafferkey R, Johnson RK, Rosenberg M, Livi GP (1994) Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *J Biol Chem* **269**: 32027–32030

Sturm A, Tang GQ (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* **4**: 401–407

Sugden C, Crawford RM, Halford NG, Hardie DG (1999a) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J* **19**: 433–439

- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG** (1999b) Two SNF1-Related Protein Kinases from Spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol* **120**: 257–274
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R** (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* **203**: 32–43
- Technikova-Dobrova Z, Sardanelli a. M, Papa S** (1991) Spectrophotometric determination of functional characteristics of protein kinases with coupled enzymatic assay. *FEBS Lett* **292**: 69–72
- Thelander M, Olsson T, Ronne H** (2004) Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO J* **23**: 1900–1910
- Tiessen A, Hendriks J, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farre E, Geigenberger P** (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post- translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* **14**: 2191–2213
- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P** (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J* **35**: 490–500
- Tiffin P** (2000) Mechanisms of tolerance to herbivore damage: what do we know? *Evol Ecol* **14**: 523–536
- Tognetti JA, Pontis HG, Martínez-Noël GMA** (2013) Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signal Behav* **8**:(15)
- TomáĚ F, NÄngele T, Adamo M, Garg A, Marco-Illorca C, Nukarinen E, Pedrotti L, Peviani A, Simeunovic A, Tatkiewicz A, et al** (2014) The low energy signaling network. *Front Plant Sci* **5**: 1–12
- Toroser D, Plaut Z, Huber SC** (2000) Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol* **123**: 403–412
- Tsai AY-L, Gazzarrini S** (2014) Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Front Plant Sci* **5**: 1–11
- Turgeon R, Medville R** (1998) The absence of phloem loading in willow leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12055–60

- Valdés-Rodríguez SE, Segura-Nieto M, Chagolla-Lopez A, Verver y Vargas-Cortina A, Martínez-Gallardo N, Blanco-Labra A** (1993) Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiol* **103**: 1407–1412
- Vandesteene L, López-Galvis L, Vanneste K, Feil R, Maere S, Lammens W, Rolland F, Lunn JE, Avonce N, Beeckman T, et al** (2012) Expansive evolution of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol* **160**: 884–96
- Vargas-Ortiz E** (2009) Estudio de la redistribución de carbohidratos y nitrógeno como posible mecanismo de tolerancia a la pérdida de tejido foliar por herbivoría y/o daño mecánico en amaranto. 93
- Vargas-Ortiz E, Espitia-Rangel E, Tiessen A, Délano-Frier JP** (2013) Grain Amaranths are defoliation tolerant crop species capable of utilizing stem and root carbohydrate reserves to sustain vegetative and reproductive growth after leaf loss. *PLoS One* **8**: 1–13
- Vargas-Ortiz E, Garrido E, Délano-Frier JP, Tiessen A** (2015) The tolerance of grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) to defoliation during vegetative growth is compromised during flowering. *Plant Physiol Biochem* **91**: 36–40
- Venskutonis PR, Kraujalis P** (2013) Nutritional components of Amaranth seeds and vegetables: A review on composition, properties, and uses. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **12**: 381–412
- Vereyken IJ, van Kuik JA, Evers TH, Rijken PJ, de Kruijff B** (2003) Structural requirements of the fructan-lipid interaction. *Biophys J* **84**: 3147–54
- Vile D, Pervent M, Bellauau M, Vasseur F, Bresson J, Muller B, Granier C, Simonneau T** (2012) Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects? *Plant Cell Environ* **35**: 702–718
- Wang F, Ye Y, Chen X, Wang J, Chen Z, Zhou Q** (2017) A sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 1 gene from potato, StSnRK1, regulates carbohydrate metabolism in transgenic tobacco. *Physiol Mol Biol Plants* **23**: 933–943
- Wang P, Zhao Y, Li Z, Hsu C-C, Liu X, Fu L, Hou Y-J, Du Y, Xie S, Zhang C, et al** (2018) Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Mol Cell* **69**: 100–112
- Wang W, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme

- temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1–14
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U** (1996) Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant J* **10**: 823–834
- Weiner J** (2004) Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* **6**: 207–215
- Welham T, Pike J, Horst I, Flietakis E, Katinakis P, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Perry J, Parniske M, et al** (2009) A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. *J Exp Bot* **60**: 3353–3365
- Weltzin JF, Archer SR, Heitschmidt RK** (1998) Defoliation and woody plant (shape *Prosopis glandulosa*) seedling regeneration: potential vs realized herbivory tolerance. *Plant Ecol* **138**: 127–135
- Westgate ME** (1994) Water status and development of the Maize endosperm and embryo during drought. *Crop Sci* **34**: 76
- Wiley E, Huepenbecker S, Casper BB, Helliker BR** (2013) The effects of defoliation on carbon allocation: can carbon limitation reduce growth in favour of storage? *Tree Physiol* **33**: 1216–1228
- Williams SP, Rangarajan P, Donahue JL, Hess JE, Gillaspay GE** (2014) Regulation of Sucrose non-Fermenting Related Kinase 1 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **5**: 1–13
- Wurzinger B, Nukarinen E, Nägele T, Weckwerth W, Teige M** (2018) The SnRK1 kinase as central mediator of energy signaling between different organelles. *Plant Physiol* **176**: 1085–1094
- Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J** (2013) Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* **496**: 181–186
- Xiong Y, Sheen J** (2014) The role of Target of Rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol* **164**: 499–512
- Xiong Y, Sheen J** (2013) Glucose-TOR signaling in the transcriptional control of cell cycle. *Cell Cycle* **12**: 1989–1990
- Xiong Y, Sheen J** (2012) Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J Biol Chem* **287**: 2836–2842

- 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
- Yanagisawa S, Yoo S-D, Sheen J** (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* **425**: 521–525
- Yuan R** (1988) Litchi Fruit Abscission : its patterns, effect of shading and relation to endogenous abscisic acid 1. **36**: 281–292
- Zenoni S, Dal Santo S, Tornielli GB, D’Inca E, Filippetti I, Pastore C, Allegro G, Silvestroni O, Lanari V, Pisciotto A, et al** (2017) Transcriptional responses to pre-flowering leaf defoliation in grapevine Berry from different growing sites, years, and genotypes. *Front Plant Sci* **8**: 630
- Zhang D-Y, Jiang X-H** (2002) Size-dependent resource allocation and sex allocation in herbaceous perennial plants. *J Evol Biol* **15**: 74–83
- Zhang Y, Persson S, Giavalisco P** (2013) Differential regulation of carbon partitioning by the central growth regulator Target of Rapamycin (TOR). *Mol Plant* **6**: 1731–1733
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Powers SJ, Schluempmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ** (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by Trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol* **149**: 1860–1871
- Zhang Y, Shewry PR, Jones H, Barcelo P, Lazzeri PA, Halford NG** (2001) Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J* **28**: 431–441
- Zhang Z, Zhu JY, Roh J, Marchive C, Kim SK, Meyer C, Sun Y, Wang W, Wang ZY** (2016) TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in Arabidopsis. *Curr Biol* **26**: 1854–1860
- Zhou L, Jang J -c., Jones TL, Sheen J** (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 10294–10299
- Zhu T, Wang X, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S** (2000) Large-scale profiling of the Arabidopsis transcriptome. *Plant Physiol* **124**: 1472–1476

